

Gabriela Hanske

**Zur Bedeutung der kontraktilen Dysfunktion und
der Auswirkung von Calcium-regulierenden Proteinen
auf L-Typ-Calciumkanäle im Herz-Kreislauf-System**

2003

Pharmazeutische Chemie

**Zur Bedeutung der kontraktilen Dysfunktion und
der Auswirkung von Calcium-regulierenden Proteinen
auf L-Typ-Calciumkanäle im Herz-Kreislauf-System**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Gabriela Hanske
aus Opava

2003

Dekan:

Prof. Dr. J. Leker

Erster Gutachter:

Prof. Dr. K. Müller

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. W. Schmitz

Tage der mündlichen Prüfungen:

01.03, 02.03 und 04.03

Tag der Promotion:

04.03.2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Münster in der Zeit von Juni 2000 bis August 2003 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. W. Schmitz, Herrn Prof. Dr. J. Neumann und Herrn Prof. Dr. K. Müller angefertigt.

Ich danke

Herrn Prof. Dr. W. Schmitz und Herrn Prof. Dr. J. Neumann sowie Herrn Dr. U. Kirchhefer für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Vergabe der interessanten Aufgabenstellung, für die motivierenden Ratschläge und Anregungen zur Durchführung der Experimente sowie die intensive, freundliche Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. K. Müller für die naturwissenschaftliche Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit,

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster für das Graduiertenstipendium, dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung für die finanzielle Förderung, meiner kooperierenden Mitdotorandin Frau Isabel Justus für ihre Durchführung der Kardiomyozyten-Isolation und ihre freundschaftliche Hilfe,

Frau Dr. Uta Madeja für ihre Unterstützung bei der Einarbeitung in die Versuchsmethodik und ihre stets hilfreichen Ratschläge,

Herrn Dietrich Hübner für sein Engagement und seinen Ideenreichtum bei Neuinstallationen und anfallenden Reparaturarbeiten am Patch-Clamp-Arbeitsplatz,

besonders Frau Dr. Stephanie Grote für ihre freundschaftliche und wertvolle Anregungen und Gespräche sowie fortwährende Hilfs- und Diskussionsbereitschaft,

allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts für die stetige Hilfsbereitschaft sowie das angenehme und kollegiale Arbeitsklima,

ganz persönlicher Dank meinem Mann, meinen Eltern und meiner Schwester für ihre große Geduld und Unterstützung, die somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

I. EINLEITUNG	1
1. Kardiale Ischämie und Stunning	1
2. Die elektromechanische Kopplung in der Herzmuskelzelle	3
3. Calciumkanäle	4
4. Ca ²⁺ -Adenosintriphosphatase des sarkoplasmatischen Retikulums	6
5. Junctin	6
6. Reversible Phosphorylierung und Kontraktionskraft des Herzens	7
7. Serin-/Threonin-Proteinphosphatasen und ihre Inhibitoren	9
8. Pathophysiologische Bedeutung von Proteinphosphatasen	10
9. Patch-Clamp-Technik	11
II. FRAGESTELLUNG	12
III. MATERIAL UND METHODEN	13
A. STUNNING-UNTERSUCHUNGEN AM HUND	13
1. Instrumentierung des Hundes	13
1.1. Modell des chronisch-instrumentierten Hundes	13
1.2. Operative Instrumentierung	13
1.3. Behandlung der Tiere nach der Instrumentierung	14
2. Druck-, Wanddicke-Meßmethoden	15
3. Messung der regionalen myokardialen Perfusion	16
4. Entnahme der myokardialen Gewebeproben	17
5. Bestimmung von Phospholamban	17
5.1. Herstellung des Proteinextraktes	17
5.2. Gel-Elektrophorese	17
5.3. Western-Blot-Verfahren	18
5.4. Immunologischer Nachweis von Phospholamban	18
6. Proteinphosphatasen	19
6.1. Präparation des Myokardgewebes	19
6.2. Herstellung [³² P]-markierter Phosphorylase a	19
6.3. Bestimmung der Proteinphosphatase-Aktivität im Homogenat	20
6.4. Präparation der Membranvesikel	20
6.5. Bestimmung der Proteinphosphatase-Aktivität in Membranvesikeln	21
7. cAMP-abhängige Proteinkinase	21
7.1. Präparation des Myokardgewebes	21
7.2. Messung der Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase	21

B. MESSUNGEN DER L-TYP-CALCIUMKANALSTRÖME	22
1. Transgene Mäuse	22
1.1. Verwendete Konstrukte	23
1.2. Nachweis der Transgene durch PCR	25
1.2.1. Isolation von genomischer DNA	25
1.2.2. Durchführung der PCR	25
2. Isolation der Maus-Kardiomyozyten	26
3. Messen mittels der Patch-Clamp-Technik	26
3.1. Ganzzellkonfiguration	27
3.2. Meßbedingungen	29
3.3. Inaktivierungszeitkonstanten	32
3.4. Leitfähigkeit	34
4. Statistische Auswertung der Meßergebnisse	34
IV. ERGEBNISSE	35
A. STUNNING-UNTERSUCHUNGEN AM HUND	35
1. Instrumentierung und Probengewinnung	35
2. Phosphorylierung von Phospholamban	37
3. Proteinphosphatasen	37
3.1. Bestimmung der Proteinphosphatase-Aktivität im Homogenat	37
3.2. Bestimmung der Proteinphosphatase-Aktivität in Membranvesikeln	39
3.3. Bestimmung der Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase	41
B. MESSUNGEN DER L-TYP-CALCIUMKANALSTRÖME	42
1. Validierung des Patch-Clamp-Systems	42
2. Untersuchungen an Junctin-überexprimierenden Mäusen	44
2.1. Körpergewicht, Herzgewicht, relatives Herzgewicht und Zellkapazität	44
2.2. Einfluß von EGTA als Ca ²⁺ -Chelator	44
2.2.1. Strom-Spannungs-Beziehung	44
2.2.2. Inaktivierung	48
2.2.3. Leitfähigkeit	48
2.3. Einfluß von Barium-Ionen als Ladungsträger	53
2.3.1. Strom-Spannungs-Beziehung	54
2.3.2. Inaktivierung	54
2.4. Einfluß von BAPTA als Ca ²⁺ -Chelator	57
2.4.1. Strom-Spannungs-Beziehung	57
2.4.2. Inaktivierung	57

3. Untersuchungen an Mäusen, die eine SERCA 2a-Doppelmutante überexprimieren	61
3.1. Körpergewicht, Herzgewicht, relatives Herzgewicht und Zellkapazität	61
3.2. Einfluß von EGTA als Ca ²⁺ -Chelator	61
3.2.1. Strom-Spannungs-Beziehung	61
3.2.2. Inaktivierung	65
3.2.3. Leitfähigkeit	65
4. Untersuchungen an Mäusen, die eine trunkierte Form des Inhibitors 2 der Proteinphosphatase 1 überexprimieren	70
4.1. Körpergewicht, Herzgewicht, relatives Herzgewicht und Zellkapazität	70
4.2. Einfluß von BAPTA als Ca ²⁺ -Chelator	70
4.2.1. Strom-Spannungs-Beziehung	70
4.2.2. Inaktivierung	71
4.3. Einfluß von Calyculin A als Proteinphosphatase-Inhibitor	76
4.3.1. Strom-Spannungs-Beziehung	76
4.3.2. Inaktivierung	76
5. Untersuchungen an Mäusen, welche eine katalytische Untereinheit α der Proteinphosphatase 2A überexprimieren	80
5.1. Körpergewicht, Herzgewicht, relatives Herzgewicht und Zellkapazität	80
5.2. Einfluß von EGTA als Ca ²⁺ -Chelator	80
5.2.1. Strom-Spannungs-Beziehung	80
5.2.2. Inaktivierung	81
5.2.3. Leitfähigkeit	81
V. DISKUSSION	89
1. Stunning	89
2. Überexpression von Junctin	92
3. Überexpression einer Doppelmutante der SERCA 2a	97
4. Überexpression des Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1	100
5. Überexpression einer katalytischen Untereinheit α der Proteinphosphatase 2A	103
VI. ZUSAMMENFASSUNG	107
VII. ANHANG	109
1. Arbeitsmaterialien	109
2. Geräte und Bezugsquelle	113
3. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	114
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	120

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylzyklase
α -MHC	α -Isoform der schweren Kette des Myosins
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAPTA	1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
bp	Basenpaare
BSA	Albumin des Rinderserum
C	Cytosin
Ca^{2+} /CaMKII	Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpm	counts per minute (= Zählrate pro Minute)
CSQ	Calsequestrin
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
DL-DTT	DL-Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
F	Farad, Einheit für die elektrische Kapazität
G	Guanin
G_{rel}	relative Leitfähigkeit
G_s	stimulierendes G-Protein
G_i	inhibitorisches G-Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
$\times g$	-fache Erdbeschleunigung ($1 \times g = 9.80665 \text{ m/s}^2$)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
I	Stromstärke
^{125}I	Radionuklid des Jod (Zerfallsart: γ -Strahlung)
I_{Ca}	L-Typ-Calciumkanalstrom
Iso	Isoprenalin
IU	internationale Einheiten

kb	Kilo-Base
kDa	Kilo-Dalton
MBq	Megabecquerel; (10^9 Bq = 27.03 mCi)
MKS	multiple Klonierungsstelle
MLC	myosin light chain (leichte Kette des Myosins)
mRNA	messenger Boten-Ribonukleinsäure
Ω	Ohm, Einheit für den elektrischen Widerstand
pA	Picoampere (10^{-12})
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pF	Picofarad (10^{-12})
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PLB	Phospholamban
PP	Proteinphosphatase
R	elektrischer Widerstand
RNA	Ribonukleinsäure
RyR	Ryanodin-Rezeptor oder Calciumfreisetzungskanal
S	Siemens, Einheit für den elektrischen Leitwert
SERCA 2a	Ca ²⁺ -Adenosintriphosphatase 2a des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SV 40	Simian Virus 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tnl	inhibitorische Untereinheit des Troponins
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
τ	Inaktivierungszeitkonstante
τ_1	schnelle Inaktivierungszeitkonstante
τ_2	langsame Inaktivierungszeitkonstante
U	Spannung
z. A.	zur Analyse

I. EINLEITUNG

1. Kardiale Ischämie und Stunning

Ischämie ist eine verminderte Durchblutung eines Organs oder Organteils infolge einer herabgesetzten Blutzufuhr und kann eine Hypoxie und bei längerem Bestehen eine Nekrose zu Folge haben. Myokardischämie ist die häufigste Ursache der Herzinsuffizienz. Nach dem Gefäßverschluß, der sogenannten Okklusion, kommt es zu einer Ischämie im Versorgungsgebiet des Herzen. Die ersten irreparablen Nekrosen treten in Hunde-Modellen z.B. nach ca. 40 Minuten auf, wobei zunächst nur die subendokardialen Schichten betroffen sind. Bei Wiedereinsetzen der Perfusion zu diesem Zeitpunkt würde nur ein geringer Zellschaden auftreten und das Ischämieareal wäre nur vorübergehend kontraktionsgestört. Man spricht von einem „myocardial stunning“ (Heyndrickx et al. 1975; s. Abb. 1.1.). Stunning stellt die reversible, während der Herzinfarkt die irreversible Form der Ischämie dar. Es wurde nachgewiesen, daß eine rasche Reperfusion der während des Infarkts ischämisch gewordenen Myokardareale die spätere Entwicklung einer Herzinsuffizienz verhindern kann (Pfeffer und Braunwald 1990).

Stunning ist definiert als eine eingeschränkte, aber nach längerer Zeit voll reversible myokardiale Kraftentwicklung, keine Nekrose und eine normale oder nur gering eingeschränkte myokardiale Durchblutung (Bolli 1992, Braunwald and Kloner 1982). Stunning kann bei vielen klinischen Situationen auftreten, z.B. bei instabiler Angina pectoris, Koronarspasmus, nach erfolgreicher Thrombolyse, einem akuten Myokardinfarkt, koronararterieller Bypass-Operation, perkutaner transluminaler Koronarangioplastie oder nach Herztransplantationen (Atar 1997). Stunning beeinträchtigt die Arbeitsfunktion des Herzventrikels, obwohl die Koronardurchblutung wieder hergestellt ist. Dies kann zu einer Ursache von Komplikationen wie Myokardinsuffizienz oder Arrhythmien, die mit hoher Morbidität und Mortalität verbunden sind, führen.

Da die pathophysiologischen Mechanismen von Stunning bislang nur unzureichend verstanden sind (Bolli et al. 1992, Erdmann und Kirsch 1993, Heusch 1998), etablierten mehrere Arbeitsgruppen tierexperimentelle Modelle am Schwein (Brand et al. 1992, Sato et al. 1997) sowie am wachen Hund (Li et al. 1993, Rolf et al. 1997, Triana et al. 1991), um die Mechanismen der Kontraktionsstörung des Myokards bei Stunning zu untersuchen.

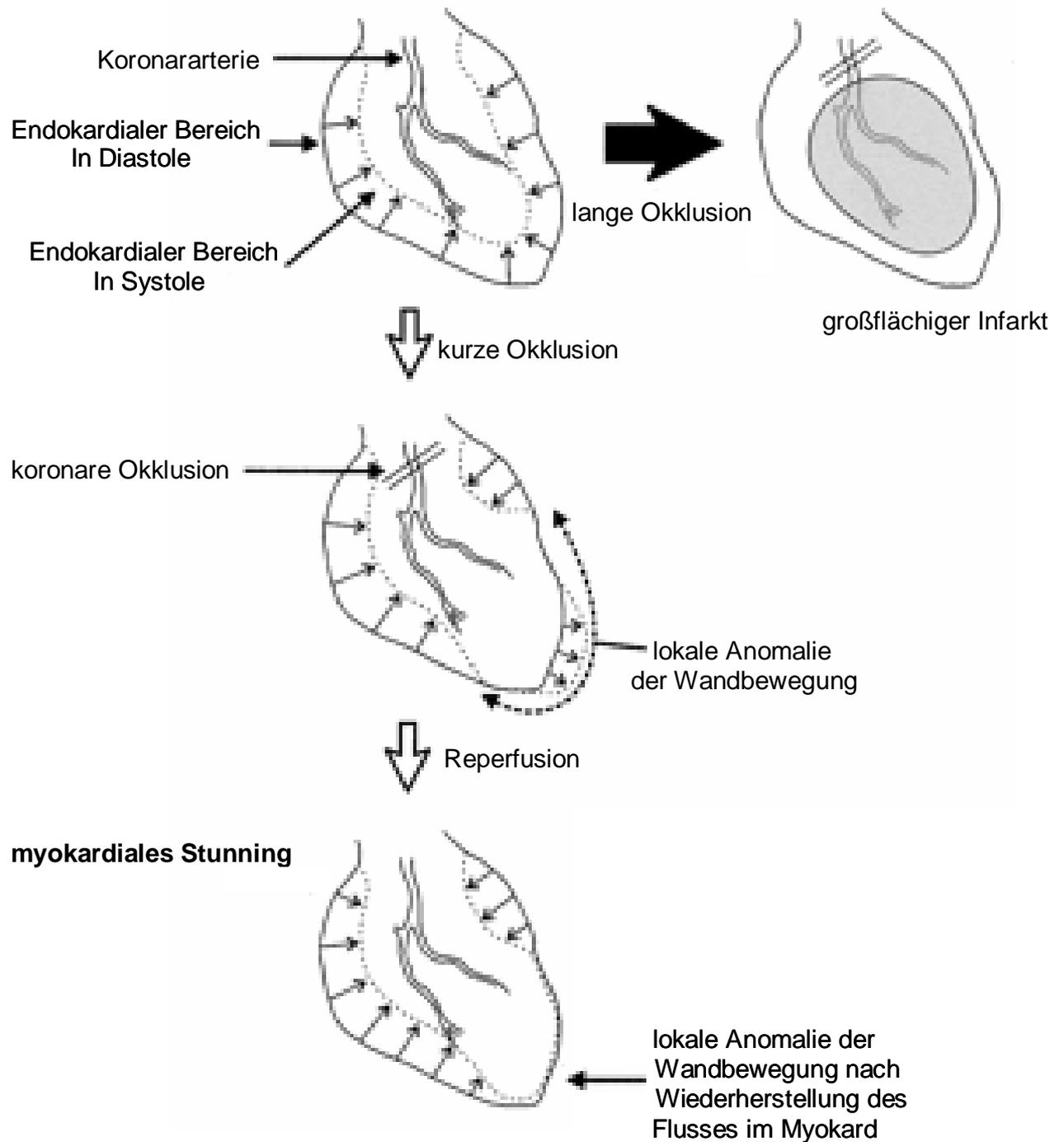


Abb. 1.1.: Schema der Entstehung von Stunning im Herz

Dargestellt ist die Entstehung von Stunning und die Folge der Okklusion im Herz. Eine kurze Okklusion der Koronararterien führt zu verminderter Durchblutung des Herzens und zu lokaler kontraktile Dysfunktion. Nach erfolgreicher Reperfusion kommt es zu Stunning. Die kurzzeitige Ischämie führt nicht wie eine lange Okklusion zu einem großflächigen Infarkt (Kloner und Jennings 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein etabliertes, validiertes Modell des chronisch instrumentierten Hundes für myokardiales Stunning verwendet (Rolf et al. 1997). Der Vergleich zwischen betäubten Hunden mit offenem Thorax und wachen chronisch instrumentierten Hunden hat deutliche Unterschiede aufgewiesen (Triana et al. 1991). Das Modell des chronisch instrumentierten Hundes ermöglicht, daß verschiedene Faktoren, die das Antwortverhalten auf Ischämie und Reperfusion verändern können, vermieden werden. Zu den Faktoren gehören z.B. Anästhesie, Hypothermie, künstliche Perfusion, chirurgisches Trauma. Daher entspricht dieses Modell eher der physiologischen Situation am Menschen.

Mechanismen, welche die Kraftregulation der Herzmuskelzellen verändern können, werden ebenso in transgenen Tiermodellen untersucht. Darauf bezieht sich der zweite Teil dieser Arbeit. Es wurde der Einfluß der Überexpression von kardialen Proteinen auf den L-Typ-Calciumkanalstrom mit Hilfe des Patch-Clamp Meßsystems untersucht. Dazu wurden verschiedene Mausmodelle verwendet. Diese Mausmodelle überexprimierten einzelne kardiale Proteine (sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase 2a, Junctin, Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1 und Proteinphosphatase 2A; s. Abb. 1.3.). Die Untersuchungen sollten eine Aussage über das Zusammenspiel der kardialen Proteine mit der Ca^{2+} -Homöostase ermöglichen. Alle Proteine werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

2. Die elektromechanische Kopplung in der Herzmuskelzelle

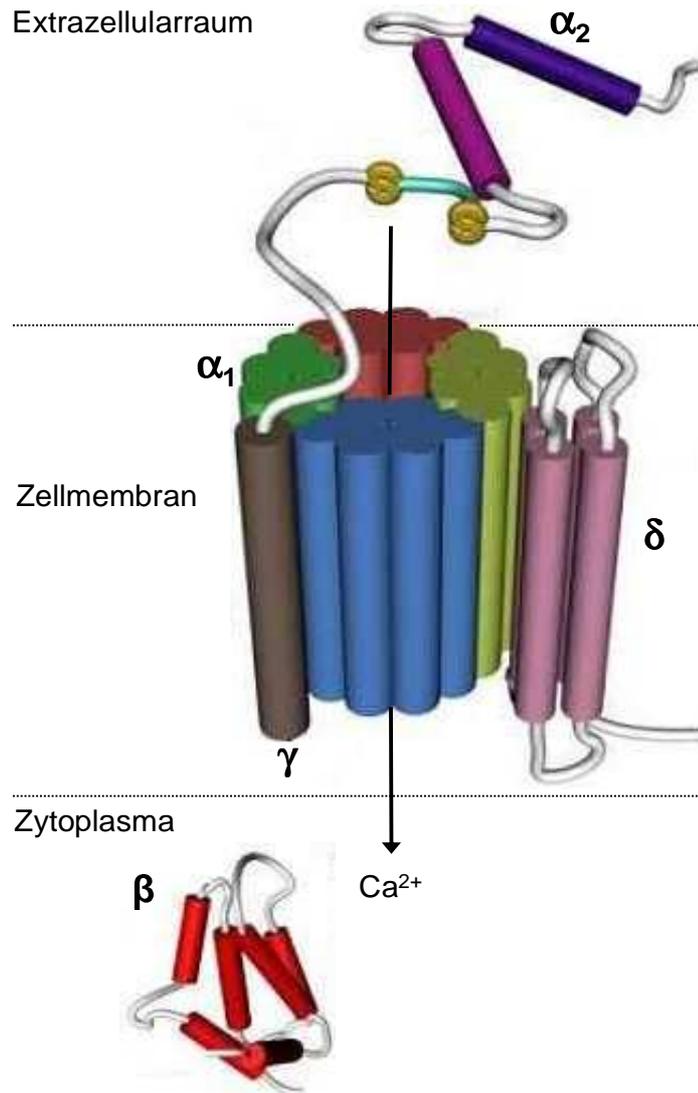
Bei der Membrandepolarisation der Herzmuskelzelle während eines Aktionspotentials kommt es über die spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanäle im Sarkolemma zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytoplasma und nachfolgend zur Freisetzung von im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) gespeicherten Ca^{2+} -Ionen (sogenannte Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung; Bers 2002, Fabiato und Fabiato 1975, Sham et al. 1995). Die freigesetzten Ca^{2+} -Ionen binden an Troponin C der Aktinfilamente, wodurch es letztlich zu einer Verschiebung der Aktin-Myosin-Filamente der Zelle kommt. Die freigesetzten Ca^{2+} -Ionen werden anschließend durch die Ca^{2+} -ATPase 2a des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA 2a) in das SR zurücktransportiert (Simmermann und Jones 1998). Dies führt zur Relaxation der Zelle.

3. Calciumkanäle

Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen über die spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanäle spielt eine sehr wichtige Rolle für die calciumabhängige Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und für die elektromechanische Kopplung (Bassani et al. 1995, Sham et al. 1995; s. Abb. 1.2.).

Bei Calciumkanälen handelt es sich um transmembranäre Proteine, die als Poren den passiven Transport von Ionen über die Zellmembran ermöglichen (Hofmann et al. 1999). Im Bereich des Ruhemembranpotentials der Zelle liegen die Calciumkanäle in geschlossenem Zustand vor. Während des Aktionspotentials werden sie durch die Depolarisation der Zellmembran in den geöffneten Zustand versetzt und gestatten so den Ionendurchtritt. Calciumkanäle lassen sich aufgrund ihrer Aktivierungsschwelle, der unterschiedlichen Inaktivierungskinetik, ihrer Leitfähigkeit sowie ihrer Sensitivität anorganischen und organischen Ca^{2+} -Kanalblockern gegenüber in verschiedene Typen einteilen (Bers und Perez-Reyes 1999). So unterscheidet man in der Herzmuskelzelle hauptsächlich die Calciumkanäle vom L-Typ und vom T-Typ (Nilius et al. 1985, Mitra und Morad 1986, Vassort und Alvarez 1994). Während der T-Typ-Calciumkanal bei negativen Membranpotentialen aktiviert und schnell inaktiviert wird, benötigt der L-Typ-Calciumkanal eine stärkere Depolarisation zur Aktivierung und zeigt eine langsamere Inaktivierung. In adulten ventrikulären Kardiomyozyten stellt der L-Typ-Calciumkanal die Hauptkomponente dar und ist maßgeblich für den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle verantwortlich.

Der kardiale L-Typ-Calciumkanal ist ein multimerer Proteinkomplex, bestehend aus fünf Untereinheiten (Glossmann und Striessnig 1990, Hosey et al. 1996). Die α_1 -Untereinheit ist die zentrale funktionelle Komponente des Komplexes und bildet die Ca^{2+} -leitende Pore (s. Abb.1.2.). Auf der α_1 -Untereinheit befinden sich die Bindungsstellen für Ca^{2+} -Kanalantagonisten. Des Weiteren ist auf der α_1 -Untereinheit der Calciumsensor, der Spannungssensor, der Selektivitätsfilter und die Phosphorylierungsstellen lokalisiert (Hosey et al. 1996, Mitterdorfer et al. 1998). Die übrigen Untereinheiten besitzen regulatorische Funktion, wobei die auf der extrazellulären Oberfläche der Membran befindliche α_2 -Untereinheit über Disulfidbrücken mit der transmembranären δ -Untereinheit verbunden ist. Die β -Untereinheit ist intrazellulär lokalisiert (Perez-Reyes und Schneider 1995, Singer et al. 1991).



Domänen verantwortlich für:

- α_1 :** - spannungsabhängige Aktivierung
 - spannungsabhängige Inaktivierung
 - Interaktion mit β -Untereinheit
 - Ionenselektivität
 - Bindung von Dihydropyridinen
 - Bindung von Phenylalkylaminen
 - calciumabhängige Inaktivierung
 - putative proteolytische Spaltung
 - Öffnung des Kanals

- β :** - Inaktivierung des Kanals
 - Interaktion mit α_1 -Untereinheit

- δ :** - Interaktion mit α_1 -Untereinheit

- α_2 :** - Modulation des Kanals

Abb. 1.2.: Schematische Darstellung des kardialen L-Typ-Calciumkanals

Dargestellt ist der schematische Aufbau des kardialen spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanals, der aus folgenden Untereinheiten besteht: die transmembranäre α_1 -Untereinheit, die intrazellulär lokalisierte β -Untereinheit, die extrazellulär lokalisierte α_2 - sowie die transmembranäre δ -Untereinheit, welche über Disulfidbrücken (S-S) miteinander verbunden sind (Hosey et al. 1996, Smith 2003).

4. Ca^{2+} -Adenosintri-phosphatase des sarkoplasmatischen Retikulums

SERCA 2a spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von Kontraktion und Relaxation des Myokards (MacLennan 1970; s. Abb. 1.3.). Während der Diastole transportiert die ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpe in Abhängigkeit des Phosphorylierungszustandes von Phospholamban Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytoplasma in das SR (Bassani et al. 1994, He et al. 1997).

Die molekulare Klonierung hat eine ganze Familie von SERCA-Pumpen identifiziert, die von drei unterschiedlichen Genen kodiert werden (SERCA 1, SERCA 2 und SERCA 3; Brandl et al. 1986, MacLennan et al. 1985). Das SERCA 2-Gen kodiert für zwei Isoformen: Serca 2a, die Hauptisoform des Herzens und SERCA 2b, die ubiquitär vorhanden ist (Lytton et al. 1989, Zarain-Herzberg et al. 1990). SERCA 2a zeigt eine niedrigere Affinität für Ca^{2+} und eine höhere Ca^{2+} -Transportrate als SERCA 2b.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Patch-Clamp-Technik die Kardiomyozyten einer Doppelmutante von SERCA 2a untersucht. Bei dieser Doppelmutante sind die Aminosäuren Isoleucin 235 und Threonin 446 durch Phenylalanin bzw. Isoleucin ersetzt worden (SERCA 2a-I235F/T446I). Die beiden Mutationen befinden sich in bisher wenig untersuchten Bereichen von SERCA 2a. Es wäre vorstellbar, daß die Doppelmutation Auswirkungen auf die Interaktion mit Phospholamban oder mit Ca^{2+} -Ionen besitzt.

5. Junctin

Junctin (JUN) ist ein wichtiges transmembranäres Protein des kardialen junktionalen SR (Jones et al. 1995; s. Abb. 1.3.). Zusammen mit dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal (Synonym Ryanodin-Rezeptor, RyR), Calsequestrin (CSQ) und Triadin 1 (TRD) bildet es einen quartären Proteinkomplex innerhalb des junktionalen SR (Jones et al. 1995, Zhang et al. 1997). Der Proteinkomplex ist Teil einer Struktur, in der sich SR und Sarkolemma besonders nahe kommen (Protasi 2002).

JUN ist strukturell stark mit TRD verwandt. Es besitzt wie TRD eine kurze zytoplasmatische Domäne, eine lange luminale Region und eine transmembranäre Domäne (Jones et al. 1995). Die transmembranären Proteine TRD (Kobayashi und Jones 1999) und JUN verankern CSQ an den RyR (Zhang et al. 1997).

6. Reversible Phosphorylierung und Kontraktionskraft des Herzens

Eine wichtige Rolle für die Anpassung der Herzarbeit an körperliche Belastung spielen Phosphorylierungen verschiedener kardialer Proteine des Herzens. Dabei ist der Phosphorylierungszustand eines Proteins das Resultat aus der Aktivität phosphorylierender Proteinkinasen (PK) und dephosphorylierender Proteinphosphatasen (PP). Katecholamine besetzen β -Adrenorezeptoren des Myokards und bedingen über stimulatorische GTP-bindende Proteine eine Erhöhung der Adenylylzyklase-Aktivität. Es wird vermehrt zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat (cAMP) aus Adenosin-5'-triphosphat (ATP) gebildet. Dieses aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA). Durch die Aktivierung der PKA kommt es unter anderem zur Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) auf der Aminosäure Serin 16. Weiterhin kommt es durch die Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II zur Phosphorylierung von PLB auf der Aminosäure Threonin 17 (Hartzell 1988, Simmerman und Jones 1998, Wegener et al. 1989). PLB ist ein regulatorisches Protein der SERCA 2a, welches als Membranprotein Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytoplasma in das SR transportiert (Wegener et al. 1989, Lindemann et al. 1983). In nicht-phosphoryliertem Zustand hemmt PLB die SERCA 2a. Durch die Phosphorylierung von PLB wird die Affinität von SERCA für freies Ca^{2+} erhöht. Als Folge kann SERCA mehr Ca^{2+} in das SR transportieren (Jones 1985, Lindemann et al. 1983, Tada und Katz 1982). Das aufgenommene Ca^{2+} wird an das Ca^{2+} -speichernde Protein CSQ gebunden (MacLennan und Wong 1971, Mitchell et al. 1988). Bei der nächsten Kontraktion kann somit mehr Ca^{2+} aus dem SR durch den quartären Proteinkomplex freigesetzt werden, welches zu einer erhöhten Kontraktionskraft führt (positiv inotroper Effekt). Durch die schnellere Aufnahme des Ca^{2+} in das SR verkürzt sich darüber hinaus auch die Relaxationszeit (positiv lusitroper Effekt; z.B. Luo et al. 1994).

Neben PLB werden spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle nach β -adrenerger Stimulation durch die PKA vermehrt phosphoryliert (s. Abb. 1.1.). Die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle steigt an und es kann mehr Ca^{2+} in die Zelle einströmen (Charnet et al. 1995, Gao et al. 1997, Rapundalo 1998). Dies führt ebenfalls zu einer Steigerung der Kontraktionskraft. Außerdem phosphoryliert die PKA den Troponin-Inhibitor (TnI), welcher mit Ca^{2+} -bindendem Troponin (TnC) den Troponin-Komplex innerhalb der Myofilamente bildet. Der phosphorylierte TnI inhibiert das TnC. Dadurch wird die Affinität von TnC für Ca^{2+} verringert (Solaro et al. 1981).

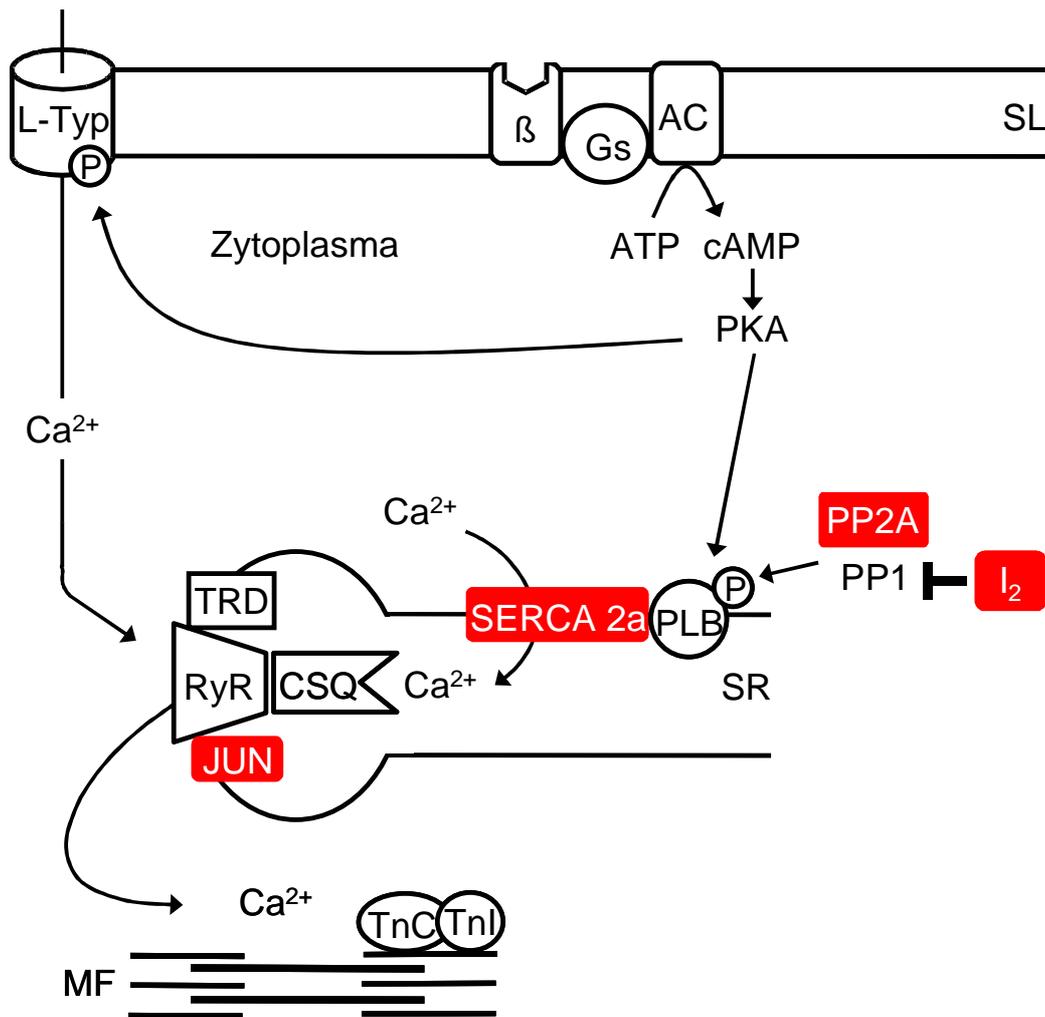


Abb. 1.3.: Schema der Ca^{2+} -Homöostase in der Herzmuskelzelle

Nach der Membrandepolarisation der Herzmuskelzelle kommt es zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch die spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanäle des Sarkolemmas (SL) und zur Ca^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Die Stimulation von β -Adrenorezeptoren (β) führt unter Vermittlung von stimulierenden G-Proteinen (Gs) zu einer erhöhten Aktivität der Adenylylzyklase (AC), wodurch aus ATP vermehrt cAMP gebildet wird. Die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) nimmt zu. Diese phosphoryliert unter anderem Phospholamban (PLB) und die L-Typ-Calciumkanäle, was zu einer Steigerung der Kontraktionskraft führt. PLB verliert durch die Phosphorylierung seinen hemmenden Einfluß auf die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase 2a (SERCA 2a). Die Affinität von SERCA 2a wird zu Ca^{2+} -Ionen erhöht und Ca^{2+} wird vermehrt in das SR transportiert. Im SR werden die Ca^{2+} -Ionen überwiegend an Calsequestrin (CSQ) gebunden. Während jeder Kontraktion wird Ca^{2+} aus dem SR über den Ryanodin-Rezeptor (RyR), der zusammen mit CSQ, Triadin 1 (TRD) und Junctin (JUN) einen quartären Komplex bildet, freigesetzt. Das freigesetzte Ca^{2+} bindet an regulatorische Proteine innerhalb der Myofilamente (MF) wie z.B. den Troponin-Komplex, zu dem das Ca^{2+} -bindende Troponin (TnC) sowie der Troponin-Inhibitor (TnI) gehören. Die Phosphorylierung nach β -adrenerger Stimulation wird durch Proteinphosphatasen (PP) vom Typ 1 und 2A rückgängig gemacht. Die PP werden durch die PP-Inhibitoren (z.B. I_2) gehemmt. (Die rot markierten Proteine wurden für diese Arbeit in Mausmodellen überexprimiert.)

7. Serin-/Threonin-Proteinphosphatasen und ihre Inhibitoren

Phosphorylierung und Dephosphorylierung sind wichtige Mechanismen zur Regulation der Zellfunktion. PP1 und PP2A bilden etwa 90% der im Herzen vorhandenen Phosphataseaktivität (MacDougall et al. 1991, Lüss et al. 2000a). Weitere PPs, die in den letzten Jahren beschrieben wurden, wie Typ 3, 4, 5 und 6 (Cohen 1997, Walter und Mumby 1993, Wera und Hemmings 1995), wurden bisher nicht im Herzen nachgewiesen bzw. haben nur eine minimale kardiale Aktivität. Sie werden deshalb hier nicht weiter betrachtet.

Im Myokard werden kardiale Proteine, wie z. B. PLB und Tnl, durch die PP vom Typ 1 und 2A dephosphoryliert und in ihrer Aktivität beeinflusst (MacDougall et al. 1991, Neumann et al. 1999, Shenolikar und Nairn 1991, Zimmermann et al. 1994). PLB wird vorwiegend von Typ1-PPs (MacDougall et al. 1991), Tnl von Typ 2A-PPs dephosphoryliert (Mumby et al. 1987).

Die katalytische Untereinheit der PP1 wird von den Genen PP1 α , PP1 β und PP1 γ kodiert (Mumby und Walter 1993). Es sind bisher mehr als 40 regulatorische und „targeting/anchoring-Untereinheiten“ sowie mehr als 10 modulatorische Proteine der katalytischen Untereinheit der PP1 bekannt (Cohen 2002). Die katalytische Untereinheit der PP1 wird durch zwei spezifische endogene Inhibitoren I₁^{PP1} und I₂^{PP1} reguliert (Cohen 1989, Connor et al. 2000, Tao et al. 1978). I₁^{PP1} ist nur nach einer Phosphorylierung durch die PKA inhibitorisch wirksam. Die β -adrenerge Stimulation geht daher mit einer erhöhten hemmenden Wirkung von I₁^{PP1} einher (Gupta et al. 1996, 2002, Neumann et al. 1991). Somit steigert die β -adrenerge Stimulation nicht nur direkt die Phosphorylierung regulatorischer Proteine, sondern bewirkt gleichzeitig die Hemmung der Dephosphorylierung durch Inhibition der PP-Aktivität. Der I₂^{PP1} ist konstitutiv aktiv (Übersicht bei Herzig und Neumann 2000).

Typ 2-PPs lassen sich einteilen in Typ 2A, 2B und 2C nach Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen differenzieren (Ingebritsen et al. 1983). Typ 2B-PPs benötigen als Aktivator Ca²⁺/Calmodulin, Typ 2C dagegen Mg²⁺-Ionen (Shenolikar und Nairn 1991).

Das Holoenzym der PP2A besteht aus einer strukturellen Untereinheit (A), an die eine katalytische Untereinheit (C) sowie eine regulatorische Untereinheit (B) binden können. Die katalytische Untereinheit existiert in zwei Genen (PP2A α und PP2A β ; Green et al. 1987). Durch Interaktion mit den Untereinheiten A und B werden die

subzelluläre Lokalisation, die Substratspezifität und die Aktivität der katalytischen Untereinheit reguliert (McCright et al. 1996, Tehrani et al. 1996). Beschrieben wurden auch zwei endogene Inhibitoren der PP2A, I_1^{PP2A} und I_2^{PP2A} . Diese binden direkt an die katalytische Untereinheit und hemmen alle Holoenzym-Formen der PP2A (Li et al. 1995, 1996).

Eine funktionelle Möglichkeit, zwischen PPs zu unterscheiden, ergibt sich aus der unterschiedlichen Sensitivität auf Okadasäure (Sheppeck et al. 1997). PP2A wird durch Okadasäure bereits in nanomolaren Konzentrationen und PP1 erst im mikromolaren Bereich gehemmt. Typ 2B- und Typ 2C-PPs werden durch Okadasäure nicht gehemmt (Cohen 1989).

Mit den PP-Hemmstoffen Cantharidin und Calyculin A lassen sich Typ 1- und Typ 2A-PPs etwa gleichermaßen hemmen, während Typ 2B und 2C weitgehend ungehemmt bleiben (Ishihara et al. 1989, Neumann et al. 1995a/b).

Durch PP-Hemmstoffe kommt es funktionell zu einer Zunahme der Kontraktionskraft (Kodama et al. 1986, Linck et al. 1996) und zu einer Verkürzung der Relaxationszeit (Neumann et al. 1995). Der Anstieg der Kontraktionskraft ist von einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration begleitet (Lee et al. 1991).

8. Pathophysiologische Bedeutung von Proteinphosphatasen

Es gibt einige Hinweise auf eine pathophysiologische Bedeutung von PPs am Herzen, z.B. bei Stunning, Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz. Eine erhöhte Phosphatase-Aktivität wurde nach chronischer koronarer Ischämie, chronischer β -adrenerger Stimulation oder nach Herzinfarkt in Ratten-Modellen (Bokník et al. 2000, Stein et al. 1996) und beim Menschen (Neumann et al. 1997) beobachtet. Ein weiterer Hinweis für eine Beteiligung von PPs an pathophysiologischen Veränderungen an Herzen ist die Tatsache, daß die Überexpression von PP1 oder PP2B zur kardialen Hypertrophie führt (Molkentin et al. 1998, Neumann et al. 1998).

PP-Inhibitoren wie Fostriecin oder Okadasäure konnten in Modellen des Stunnings am isolierten Kaninchenherzen (Armstrong et al. 1998) oder bei offenen Schweineherzen (Barancik et al. 1997) die Zeitdauer und das Ausmaß des Stunnings reduzieren. Unklar ist bisher, ob die Aktivität und/oder die Expression von PPs und deren endogener Inhibitoren beim Stunning verändert sind. Weiterhin hemmten PP-Inhibitoren wie Okadasäure und Cantharidin in einem Einzelzellmodell von Stunning

den deletären Ca^{2+} -Anstieg, der die Zellen vermutlich reversibel über eine Ca^{2+} -Überflutung schädigte. So schützten die PP-Hemmstoffe vor hypoxischen Zellschäden (Armstrong et al. 1997, 1998, Ladilov et al. 1997). Darüber hinaus konnte in zwei Tiermodellen die Myokardinfarktgröße durch PP-Hemmstoffe reduziert werden (Barancik et al. 1997, Weinbrenner et al. 1998). Dabei bleibt ungeklärt, inwieweit eine erhöhte PP-Aktivität in die Pathogenese der Herzinsuffizienz involviert ist (Neumann et al. 1997).

9. Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik (Hamill et al. 1981, Hille 1992, Neher und Sakmann 1992 a/b) ist eine elektrophysiologische Meßmethode, die bedeutende Erkenntnisse über die Funktion und die Eigenschaften von Ionenkanälen in Zellmembranen ermöglicht. Das Meßprinzip der Patch-Clamp-Technik ist eine Voltage-Clamp-Technik mit sehr hoher Auflösung. Ein sehr kleiner Abschnitt der Zellmembran, ein Patch, wird elektrisch von seiner Umgebung mit einer Mikropipette (Patchpipette) isoliert. Dies wird durch den Aufbau eines sehr hohen Abdichtwiderstandes, eines sogenannten Gigaohm-Seals, an der Patchpipette erreicht. Die Membran ist dann sehr fest mit der Glaswand der Pipette verbunden. Dadurch werden verschiedene Manipulationen mit einem Membranpatch möglich, ohne daß die Verbindung zwischen der Membran und Pipette verloren geht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der L-Typ- Ca^{2+} -Kanalstrom der Maus-Kardiomyozyten unter der Ganzzellkonfiguration gemessen. Diese ermöglicht es den Strom, der durch die gesamte Membranfläche der Zelle fließt, zu messen. Um Änderungen des Membranpotentials der untersuchten Zelle zu verhindern, wird ein Kompensationsstrom erzeugt, der genauso groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt, der diesem aber entgegengerichtet ist (ein negativer Rückkopplungsmechanismus). Dieser sehr kleine Kompensationsstrom wird in Voltage-Clamp- und in Patch-Clamp-Experimenten gemessen. Er läßt unmittelbar Schlüsse auf die Leitfähigkeit der Membran zu, die unter anderem von den Ionenkanälen bestimmt wird.

II. FRAGESTELLUNG

Bei verschiedenen pathophysiologischen Erkrankungen kommt es zu einer Veränderung der Kontraktilität und der Ca^{2+} -Homöostase. Im Rahmen dieser Arbeit soll einerseits die im Modell für myokardiales Stunning entstehende reversible kontraktile Dysfunktion und andererseits der Einfluß der Überexpression von Ca^{2+} -regulierenden Proteinen in transgenen Mausmodellen auf die L-Typ-Calciumkanalströme untersucht werden.

Bei Stunning soll geklärt werden, welche Auswirkungen die Ischämie auf die Aktivität der Proteinphosphatasen 1 und 2A sowie der cAMP-abhängigen Proteinkinase hat. Zusätzlich soll der Phosphorylierungszustand von Phospholamban bestimmt werden. Die Untersuchungen sollen an ventrikulärem Gewebe des Hundes aus einem ischämischen und einem nicht-ischämischen Kontrollareal durchgeführt werden.

Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch die L-Typ-Calciumkanäle ist von entscheidender Bedeutung für die Calcium-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und somit für die gesamte elektromechanische Kopplung des Herzmuskels. Ein zweites Ziel der vorliegenden Arbeit soll es daher sein, mittels der Patch-Clamp-Technik Veränderungen der L-Typ-Calciumkanalströme von transgenen Maus-Kardiomyozyten zu messen. Die transgenen Mäuse überexprimieren herzspezifisch die Proteine Junctin, eine Doppelmutante der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase 2a, den Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1 sowie die Proteinphosphatase 2A.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zu neuen Erkenntnissen über den Zusammenhang der L-Typ-Calciumkanalströme mit der Ca^{2+} -Homöostase der Herzmuskelzelle beitragen. Die Ergebnisse sollen zeigen, ob die durch die Überexpression veränderte Ca^{2+} -Homöostase zur Auswirkung auf die L-Typ-Calciumkanalströme führt, beziehungsweise ob veränderte L-Typ-Calciumkanalströme rückwirkend auf die Ca^{2+} -Homöostase wirken.

In letzter Zeit wurde als wichtiger Modulator von kardiovaskulären Erkrankungen der Einfluß des Geschlechts näher untersucht. Diesen Hinweisen auf geschlechtsspezifische Unterschiede soll in dieser Arbeit zusätzlich auf die Stromdichte, Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanals nachgegangen werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

A. STUNNING-UNTERSUCHUNGEN AM HUND

1. Instrumentierung des Hundes

1.1. Modell des chronisch-instrumentierten Hundes

Das hier verwendete Modell des chronisch-instrumentierten Hundes ist ein etabliertes Modell für myokardiales Stunning (Lüss et al. 2000b, Meissner et al. 2000, Rolf et al. 1997). Die Experimente wurden an einem wachen, von der operativen Instrumentierung erholten Tier durchgeführt. Für diese Experimente wurden sowohl männliche als auch weibliche Hunde (Foxhounds) im Alter von 11 bis 13 Monaten verwendet.

Die im folgenden dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikum Münster durchgeführt und vom zuständigen Regierungspräsidium Münster genehmigt (Aktenzeichen G 25/98).

1.2. Operative Instrumentierung

Nach einer Nüchternzeit von mindestens 12 Stunden erfolgte unmittelbar vor der Narkoseeinleitung eine Prämedikation mit 5 mg/kg Ketamin intramuskulär. Unter der Wirkung des Ketamins wurde eine periphere venöse Verweilkanüle angelegt, über die eine intravenöse Narkoseeinleitung mit 3 mg/kg Propofol und 0.2 mg Fentanyl zur Analgesierung erfolgte. Nach endotrachealer Intubation wurde die Narkose durch Halothan in einem Lachgas/Sauerstoffgemisch mit einer O₂-Konzentration von 40 % aufrechterhalten. Nach lokaler Entfernung der Haare und Hautdesinfektion erfolgte unter aseptischen Bedingungen eine linksseitige Thorakotomie im 5. Interkostalraum.

Nach Darstellung des linken Vorhofes und der extraperikardial gelegenen Aorta descendens wurde zur Messung des intraaortalen Blutdruckes und zur Entnahme arterieller Blutproben ein flüssigkeitsgefüllter Katheter implantiert. Hierzu wurde das linke Herzohr bzw. die Aorta descendens tangential ausgeklemmt und der Tygon®-Katheter nach Anlage einer Tabaksbeutelnaht und Inzision eingebracht. Anschließend wurde der Ramus interventricularis (LAD) der linken Koronararterie proximal des Abgangs des ersten Diagonalastes über eine Strecke von ca. 2 cm

stumpf aus dem perivaskulären Fettgewebe freipräpariert. Hier erfolgte die Anlage einer 20 MHz- gepulsten Dopplerflußsonde und eines pneumatischen Gefäßokkluders um die LAD (s. Abb. 3.1.). Der Ramus circumflexus (RCX) der linken Koronararterie wurde in entsprechender Weise ebenfalls freipräpariert und mit einer Dopplerflußsonde instrumentiert. Auf das Epikard des Versorgungsgebietes der LAD und des RCX wurde jeweils ein 10 MHz-Dopplerkristall zur Messung der fraktionellen myokardialen Wanddicke genäht (s. Abb. 3.1.). Ein Katheter mit einem an der Spitze versehenen miniaturisierten Druckaufnehmer wurde über die Ventrikelspitze in den linken Ventrikel eingebracht und fixiert. Dieser erlaubte die Messung des linksventrikulären Druckes und der Druckanstiegsgeschwindigkeit, d.h. der ersten Ableitung nach der Zeit ($\pm LVdP/dt$).

Zur Drainage des Operationsgebietes erfolgte die Einlage einer Redon-Drainage in die linke Thoraxhöhle. Die Katheterverlängerungen und Meßkabel wurden subkutan zwischen die Schulterblätter getunnelt und fixiert. Der Thorax wurde schichtweise verschlossen und die Narkose ausgeleitet. Nach Rückkehr der Spontanatmung und Schutzreflexen wurde der Endotrachealtubus entfernt. Zur postoperativen Schmerzbehandlung erfolgten intramuskuläre Injektionen von 15 mg Piritramid. Bei Vorliegen stabiler Vitalfunktionen wurde das Tier in einen speziellen Käfig gebracht. Hier hatte der Hund freien Zugang zu Wasser und Futter. Am Tag der Operation und den vier folgenden Tagen erhielt er zur antibiotischen Abdeckung 2 g täglich p.o. Cefamandol.

1.3. Behandlung der Tiere nach der Instrumentierung

Alle Hunde wurden am 1. postoperativen Tag im Abstand von 2-3 Stunden überwacht. Um die Hunde an die experimentellen Bedingungen zu gewöhnen, wurden sie über einen Zeitraum von mindestens einer Woche täglich für zwei Stunden in den Käfig gebracht und an das Meßsystem angeschlossen. Nach Ablauf der acht Tage zur Erholung von der Operation wurden bei den Tieren weitere Versuche durchgeführt, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt waren:

1. Es lagen ein normaler arterieller Blutdruck und eine normale Herzfrequenz (60 bis 100 Schläge pro Minute) vor.
2. Es bestand kein Anhalt für einen lokalen oder systemischen Infekt.
3. Es lag eine normale arterielle Blutgasanalyse unter Ruhedingungen vor.

4. Die Tiere verhielten sich bei Anschluß der Meßkatheter und Meßsonden an das Monitorsystem ruhig und streßfrei.

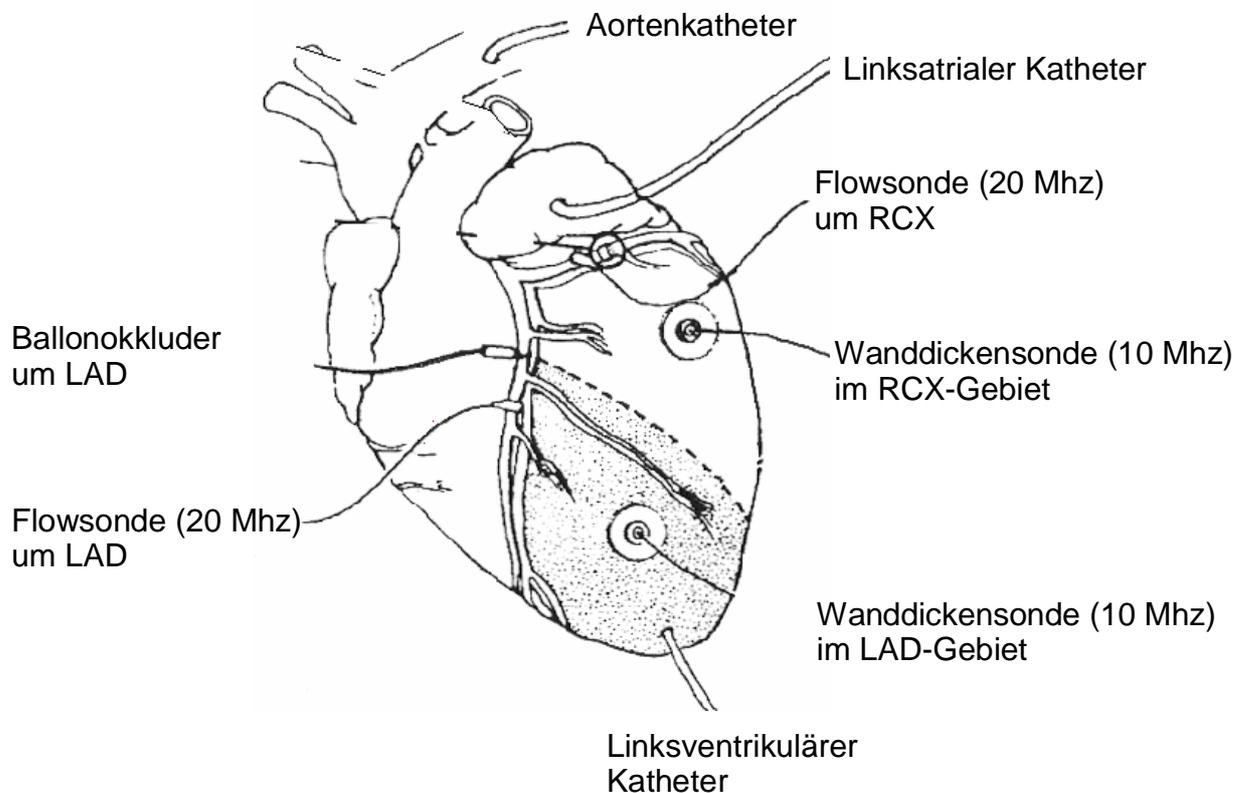


Abb. 3.1.: Schematische Darstellung der kardialen Instrumentierung am Herzen nach Implantation von Kathetern und Meßsonden

Dargestellt ist die kardiale Instrumentierung am Herzen nach Implantation von Kathetern und Meßsonden. Die grau unterlegte Fläche bezeichnet den Myokardbezirk, der durch Inflation des Ballonokkluders reversibel ischämisch wird. LAD: Ramus interventrikularis anterior, RCX: Ramus circumflexus der linken Koronararterie.

2. Druck-, Wanddicke-Meßmethoden

Der aortale und der linksatriale Druck wurden über flüssigkeitsgefüllte Tygon®-Katheter gemessen. Die Kalibrierung der Katheter erfolgte vor jedem Versuch mit einem geeichten Quecksilber-Manometer.

Zur kontinuierlichen Druckbestimmung im linken Ventrikel wurde ein implantierbares Mikromanometer verwendet. Vor jedem Experiment erfolgte eine Kalibrierung gegen den aortalen und den linksatrialen Blutdruck. Die linksventrikuläre Druckanstiegs-

geschwindigkeit ($\pm LVdP/dt$) wurde durch Differenzierung des linksventrikulären Drucksignals (LVP-Signal) nach der Zeit ermittelt.

Zur Messung der koronaren Blutflußgeschwindigkeit wurden mit 20 MHz gepulste Dopplerkristalle benutzt. Diese Technik stellt eine indirekte Blutflußbestimmungsmethode dar. Der tatsächliche Blutfluß läßt sich aus der gemessenen Frequenzablenkung bei bekanntem Durchmesser der Flußsonde mit Hilfe von Standardformeln errechnen. Es besteht eine direkte Relation zwischen der Doppler-ermittelten Frequenzablenkung und dem Blutfluß (Hartley et al. 1977). Zur Messung der Änderung der linksventrikulären Wanddicke wurde in den durchgeführten Versuchen eine wenig traumatisierende Einkristallmethode mit gepulstem Doppler eingesetzt (Hartley et al. 1983, Zhu et al. 1986). Der Methode liegt das Prinzip des Pulsechos und des gepulsten Ultraschalls zugrunde.

3. Messung der regionalen myokardialen Perfusion

Zur Messung der regionalen myokardialen Perfusion wurde die Technik der Mikrosphäreninjektion eingesetzt (Domenech et al. 1969). Hierzu werden gefärbte Polystyrenpartikel von 15 μm Durchmesser verwendet. Mikrosphären werden über den linken Vorhof in den arteriellen Schenkel des großen Kreislaufs injiziert und verteilen sich wie Erythrozyten in die Organe. Da sie eine Größe von 15 μm haben und nicht verformbar sind, werden die applizierten Mikrosphären bei der ersten Kreislaufpassage im Kapillarnetz festgehalten. Die Menge der Mikrosphären in einem bestimmten Gewebebezirk ist direkt proportional zur jeweiligen Gewebepfusion. Zeitgleich mit der Injektion erfolgte die Abnahme einer Referenzblutprobe aus dem aortalen Katheter mit einer Flußrate von 10 ml/min. Durch eine Ex-vivo-Zählung der Menge an Mikrosphären in den verschiedenen Organen und in der Referenz konnte der Blutfluß im Organ bestimmt werden. Es wurden vier verschieden gefärbte Mikrosphären verwendet, so daß die Organperfusion in jedem Tier unter vier verschiedenen experimentellen Bedingungen untersucht wurde. Die Mikrosphären dienten zur exakten Bestimmung der regionalen und transmuralen Myokardperfusion. Diese Technik erlaubte jedoch nur eine Bestimmung zu einer limitierten Anzahl von Zeitpunkten.

4. Entnahme der myokardialen Gewebeproben

Die LAD wurde am wachen Hund für 10 min komplett okkludiert. Daraufhin wurde die Perfusion bis zur 50 %-igen Erholung der regionalen kontraktile Funktion wieder ermöglicht. Zur Kontrolle der erfolgreichen Okklusion und Rekanalisierung wurde der Blutfluß distal der Okklusionsstelle mit der Dopplersonde überprüft. Zum Abschluß der Untersuchungen wurde dem narkotisierten Tier das Herz aus dem Situs entfernt, in Kochsalzlösung (4°C) gewaschen und die Koronararterien mit Kochsalzlösung durchspült. Die LAD wurde identifiziert, die Mikrometerkristalle wurden lokalisiert und ihre korrekte Lage überprüft. Transmurale Biopsien wurden in unmittelbarer Nähe der Mikrometerkristalle entnommen und zwar im ischämischen (LAD) und im Kontrollareal (RCX). Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5. Bestimmung von Phospholamban

5.1. Herstellung des Proteinextraktes

Die bei -80°C eingefrorenen Ventrikelproben wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit dem Mörser pulverisiert. 10 mg vom Pulverisat wurden in 300 µl einer 10 mM NaHCO₃-Lösung und 20 %igen SDS-Lösung (im Verhältnis 3:1) aufgenommen und unter Eiskühlung 30 s mit dem Polytron PT 3000 auf höchster Schaltstufe homogenisiert. Dieses Gemisch wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in der Tischzentrifuge für 20 min bei 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand, hier Homogenat genannt, wurde abgenommen und der Proteingehalt wurde nach Lowry (1951) bestimmt.

5.2. Gel-Elektrophorese

Das nach 3.5.1. erhaltene Homogenat wurde mit SDS und NaHCO₃-Lösung auf eine SDS-Konzentration von 5 % und einen Proteingehalt von 1 µg/µl angeglichen. Die Elektrophorese wurde in einem Polyacrylamidgel in Gegenwart von SDS nach Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurden jeweils 50 µg des Homogenates pro Gelspur und ein Molmassenstandard auf jedem Gel aufgetragen. Dieser bestand aus Phosphorylase b (94 kDa), Albumin des Rinderserums (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Karboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20.1 kDa) und α-Laktalbumin

(14.4 kDa). Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Elektrophoresekammer initial 30 min lang bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel und dann bei 60 mA pro Gel durchgeführt. Die Temperatur wurde durch ein Kühlbad bei 4°C gehalten. Die Elektrophorese wurde beendet, als die Farbfront das Trenngel zu verlassen begann.

5.3. Western-Blot-Verfahren

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden in einer Transfereinheit (Hoefer) im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer wurde stromkonstant mit 1.5 A für 3 h bei 4°C in in 50 mM Transferpuffer durchgeführt und durch eine Färbung der Membranen mit Ponceau-Rot-Lösung kontrolliert.

5.4. Immunologischer Nachweis von Phospholamban

Für die immunologische Bestimmung von Phospholamban (PLB) wurde die mit der Molmasse von PLB korrespondierende Region (5 – 30 kDa) auf der Nitrozellulose abgetrennt und in horizontale Streifen geschnitten. Vor Inkubation mit Antikörpern wurde die Ponceau-Rot-Färbung auf der Nitrozellulose durch Waschen mit A. bidest. entfernt. Danach wurden die Streifen für 30 min mit einem Puffer B (in mM: 154 NaCl, 13 Tris-HCl, 2 % BSA, pH 7.4) inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die Nitrozellulosestreifen mit dem polyklonalen Anti-PLB-Antikörper, der im Puffer B 1000-fach verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Streifen mit den Puffern A und C (A, C, C, A, je 5 min) gewaschen. Die radioaktive Detektion von PLB wurde mit 1:1000 in Puffer C verdünntem [¹²⁵I]-anti-Maus-IgG durchgeführt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper wurden die nicht an Antikörper gebundene Radioaktivität mit den Puffern A und C (A, C, C, A, je 5 min) entfernt. Der Puffer A enthält in mM: 154 NaCl, 13 Tris-HCl, pH 7.4, und Puffer C beinhaltet zusätzlich 0.1 % Tween 20. Die luftgetrockneten Membranen wurden in PhosphorImager™-Kassetten exponiert. Die Auswertung erfolgte durch dreidimensionale Densitometrie mit der ImageQuant®-Software. Das unspezifische Hintergrundsignal wurde von jedem Signal subtrahiert.

6. Proteinphosphatasen

6.1. Präparation des Myokardgewebes

Die Herstellung des Homogenats für die Messung der Proteinphosphatase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Ahmad et al. (1989).

Die bei -80°C eingefrorenen Gewebeproben wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit dem Mörser pulverisiert. Die gesamte weitere Präparation erfolgte auf Eis. Von dem Pulver wurden 600 mg in 5 ml Medium 1 (in mM: 4.0 EDTA, 15 β -Mercaptoethanol, A. bidest., pH 7.4) aufgenommen und darin mit dem Polytron PT 3000 dreimal je 30 s auf höchster Schaltstufe homogenisiert. Das Homogenat wurde in der Kühlzentrifuge für 20 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, hier Homogenat genannt, wurde bei -80°C eingefroren. Die Messung des Proteingehaltes erfolgte nach Bradford (1976) mit Rinderalbumin als Standard.

6.2. Herstellung [³²P] markierter Phosphorylase a

Zur Herstellung des Substrats zur Messung der Aktivität der Proteinphosphatasen wurde aus Kaninchenskelettmuskulatur gewonnene Phosphorylase b mittels Phosphorylase-Kinase unter Verwendung von γ -[³²P]-ATP phosphoryliert und so in [³²P]-markierte Phosphorylase a überführt (Ahmad et al. 1989).

Hierzu wurden 4 ml einer Inkubationslösung (in mM: 62.5 Tris-HCl, 20 MgCl₂, 1.0 ATP, 1.0 CaCl₂, 2.25 % β -Mercaptoethanol, 0.25 g/l BSA, 5 g/l Phosphorylase b, 16.67 IU/ml Phosphorylase-Kinase, 20 MBq/ml γ -[³²P]-ATP, A. bidest., pH 7.4.) für 3 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden zur Präzipitation der Proteine 6 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung hinzugefügt und das Gemisch für 30 min im Eisbad gekühlt. Dieser Ansatz wurde mit der Kühlzentrifuge für 20 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 4 ml eines Dialysepuffers (in mM: 10 Tris-HCl, 10 EDTA, A. bidest., pH 7.4) resuspendiert, in einen Dialyseschlauch eingebracht und 12 h gegen 4 l des Dialysepuffers bei Raumtemperatur dialysiert. Danach wurde der Puffer erneuert und die Dialyse über weitere 12 Stunden fortgesetzt. Das Dialysat wurde bei 4°C gelagert und als Phosphorylase a-Lösung zur Messung der Proteinphosphataseaktivität verwendet. Der Proteingehalt dieser Lösung wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

6.3. Bestimmung der Proteinphosphatase-Aktivität im Homogenat

Die Bestimmung der Proteinphosphataseaktivität wurde nach Neumann et al. (1991) durchgeführt. Als Substrat wurde [³²P]-markierte Phosphorylase a eingesetzt und die Freisetzung von markiertem Orthophosphat als Maß der Phosphataseaktivität ermittelt.

Zur Messung der Phosphorylase-Phosphataseaktivität wurden 30 µl des Myokardhomogenates (Gewinnung siehe 3.6.1.) mit 20 µl der Phosphorylase a enthaltenden Lösung im Eisbad versetzt und anschließend für 10 min bei 30°C inkubiert. Damit wurde die Dephosphorylierungsreaktion gestartet. Die Inkubationslösung (50 µl) enthielt hierbei 2.0 mM Tris-HCl, 5.0 mM Koffein, 1.0 mM EDTA, 0.12 % β-Mercaptoethanol, 0.4 % DMSO, 5 µM [³²P]-Phosphorylase a, 2 µg Probehomogenat, pH 7.4. Dann wurde die Reaktion auf Eis durch Zugabe von 50 %iger Trichloressigsäure (20 µl) gestoppt, zusätzlich wurde BSA (20 g/l) in 0.1 % Natriumazid (30 µl) hinzugefügt. Nach zehn Minuten im Eisbad wurden die präzipitierten Proteine durch fünfminütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge sedimentiert. 70 µl des Überstandes wurden im β-Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

6.4. Präparation der SR-Membranvesikel

Die Präparation der SR-Membranvesikel erfolgte nach Rapundalo et al. (1989). Dafür wurden 400 mg des bei -80°C eingefrorenen Ventrikelgewebes in 2 ml eines Puffers A (in mM: 4.0 EDTA, 15 β-Mercaptoethanol; 50 NaF, pH 7.4) aufgenommen. Die gesamte weitere Präparation wurde bei 4°C vollzogen. Mit dem Polytron PT 3000 wurde das Gewebe für dreimal 30 s homogenisiert. Im Anschluß daran wurde das Homogenat für 20 min in der Kühlzentrifuge bei 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann für 30 min bei 45000 x g zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand enthält die zytosolischen Bestandteile. Das dabei entstandene Sediment wurde in 2 ml des Puffers A, der zusätzlich mit 0.6 M KCl auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt war, resuspendiert. Die Suspension wurde erneut für 30 min bei 45000 x g zentrifugiert. Das gewonnene Sediment wurde in 100 µl Puffer B (in mM: 50 Tris-HCl, 0.1 EDTA, 15 β-Mercaptoethanol, pH 7.4) resuspendiert und bei -80°C gelagert. Diese Suspension enthält die Membranvesikel-Fraktion. Der Proteingehalt wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

6.5. Bestimmung der Proteinphosphatase-Aktivität in SR-Membranvesikeln

Die inhibitorische Potenz von Okadasäure (OA) für die katalytischen Untereinheiten der Proteinphosphatasen (PP) 1 und 2A ist unterschiedlich stark ausgeprägt (Neumann et al. 1999). Typ 2A-PP wird durch OA bereits in nanomolaren Konzentrationen gehemmt, Typ 1-PP erst im mikromolaren Bereich. Diese Tatsache wurde ausgenutzt, um die gemessene PP-Aktivität in Typ 1- und Typ 2A zu differenzieren. Hierzu wurden mit 10 µl SR-Membranvesikel-Fraktion (Gewinnung s.6.4.) der gleichen Probe zwei Messungen nach der in 6.3. beschriebenen Methode durchgeführt. Eine wurde in An- und eine in Abwesenheit von 10 nM OA ausgeführt. Der Meßwert ohne OA repräsentiert die Summe aus Typ 1- und Typ 2A-PP-Aktivität, der Meßwert in Anwesenheit von OA die Typ 1-Aktivität.

7. cAMP-abhängige Proteinkinase

7.1. Präparation des Myokardgewebes

Die Herstellung des Homogenats für die Messung der Enzymaktivität erfolgte nach der Methode von Bartel et al. (1985).

Die bei -80°C eingefrorenen Gewebeproben wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit dem Mörser pulverisiert. Die gesamte weitere Präparation erfolgte auf Eis. Von dem Pulver wurden 300 mg in 4 ml Puffer (in mM: Kaliumphosphat 10, EDTA 10.0, β-Mercaptoethanol 2, 3-Isobutyl-1-methylxanthin 0.5, A. bidest., pH 7.4) aufgenommen und darin mit dem Polytron PT 3000 für dreimal 30 s auf höchster Schaltstufe homogenisiert. Das so entstandene Homogenat wurde in der Kühlzentrifuge für 20 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, hier Homogenat genannt, wurde bei -80°C eingefroren. Die Messung des Proteingehaltes des Homogenates erfolgte nach Bradford (1976) mit Rinderalbumin als Standard.

7.2. Messung der Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase

Die Messung der Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) erfolgte in Anlehnung an Bartel et al. (1985). Als Substrat für die PKA wurde Kemptid (Prashad 1985) benutzt, ein synthetisches Oligopeptid, das die Konsensussequenz des Enzyms enthält.

10 µl des Myokardhomogenates (Gewinnung s. 3.7.1.) wurden zusammen mit 30 µl eines Substrat-Mixes, 10 µl eines ATP-Mixes und 10 µl einer cAMP-Lösung nach Mischen und Anzentrifugieren für 30 min bei 30°C auf dem Heizblock inkubiert. Das Inkubationsgemisch (60 µl) enthielt (in mM) 20.0 Kaliumphosphat, 6.0 Magnesiumacetat, 0.5 ATP, 83.33 µM Kemptid, 20 kBq γ -[³²P]-ATP, A. bidest. in An- bzw. Abwesenheit von 2 µM cAMP. Anschließend wurde die Reaktion im Eisbad mit 50 µl 0.2 M EDTA gestoppt und die Stoppreaktion auf dem Rüttler gemischt. Nach 15 min im Eisbad wurden 20 µl des Gemisches auf ein 2.5 cm x 2.5 cm großes Stück Zellulosephosphatpapier aufgebracht, welches nach dem Trocknen für jeweils viermal fünf Minuten mit 75 mM Phosphorsäure gewaschen wurde. Nach dem erneuten Trocknen wurde die im Papier enthaltene Radioaktivität im β -Flüssigkeitszintillationszähler bestimmt. Der [³²P]-Einbau in Kemptid galt als die PKA-Aktivität.

Von allen Meßwerten wurde die unspezifische Aktivität (blank) abgezogen, die analog zum oben beschriebenen Vorgehen in Anwesenheit von cAMP 2 µM ermittelt wurde, indem das Homogenat vor der Inkubation für 10 min auf 95°C erhitzt wurde. Die im Reaktionsansatz insgesamt vorhandene Radioaktivität (total counts) entspricht der eingebrachten Gesamtmenge ATP. Sie wurde gemessen, indem ein Stück des Zellulosephosphatpapiers ohne Waschen der Messung zugeführt wurde. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung.

B. MESSUNGEN DER L-TYP-CALCIUMKANALSTRÖME

1. Transgene Mäuse

Anhand verschiedener transgenen Modelle wurde der Einfluß der Überexpression von verschiedenen Proteinen des SR auf die L-Typ-Calciumkanalströme untersucht. Die transgenen Mäuse überexprimierten herzspezifisch die Proteine Junctin (JUN), eine Doppelmutante I235F/T446I der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase 2a (SERCA 2a), den Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1 (I₂) oder die katalytische Untereinheit α der Proteinphosphatase 2A (PP2A).

Die transgenen Tiere für JUN, SERCA 2a-Doppelmutante wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. L. R. Jones von der Indiana University School of Medicine in Indianapolis, USA, erzeugt und gezüchtet. Die transgene I₂- und die PP2A-Maus wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums

Münster durch Dr. U. Kirchhefer und Dr. U. Gergs erzeugt. Die Tiere wurden bei handelsüblichem Standard-Laborfutter und Leitungswasser ad libitum gehalten.

1.1. Verwendete Konstrukte

Die Expression des jeweiligen Transgens in den Mausherzen wurde durch den Promotor der α -Isoform der schweren Kette des Myosins kontrolliert (Gulick et al. 1991, Subramaniam et al. 1991). Zusätzlich fügte man in das Konstrukt ein Fragment aus dem SV 40-Genom ein, welches ein Intron und das Signal für die Polyadenylierung der mRNA enthält (Brinster et al. 1988). Das gesamte Konstrukt wurde nach Einklonierung der cDNA des Fragments mit der Restriktionsendonuklease *NruI* aus dem Vektor ausgeschnitten und in Pronuklei der Mausoozyten injiziert (Gordon 1989).

Die Klonierung der cDNA für JUN erfolgte aus einem Hunde-Herz cDNA (Jones et al. 1995). Die JUN-cDNA wurde nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *NotI/KpnI* in die multiple Klonierungsstelle eines Klonierungsvektors zwischen α -MHC Promotor und SV 40-Poly A Sequenz inseriert (Zhang et al. 2001).

Ebenso erfolgte nach *NotI*-Restriktionsendonukleaseverdau die Einklonierung der cDNA für eine Doppelmutante der SERCA 2a (Mutationen an I235F und T446I).

Zur Gewinnung der cDNA des Inhibitors 2 der Phosphatase 1 (I_2) wurde Gesamt-RNA aus dem linken Ventrikel des menschlichen Herzens (Chomczynski und Sacchi 1987) gewonnen und eine reverse Transkription durchgeführt. Aus der so gewonnenen cDNA wurde mittels PCR die kodierende Sequenz des I_2 amplifiziert und nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *NotI/KpnI* in die multiple Klonierungsstelle des Expressionsvektors einkloniert.

Die Klonierung der cDNA für die katalytische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A erfolgte aus einer Maus-Herz cDNA-Genbank. Die cDNA wurde nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *NotI/SaI* in die multiple Klonierungsstelle eines Klonierungsvektors zwischen α -MHC Promotor und SV 40 Poly A Sequenz einkloniert (Gergs et al. 2003).

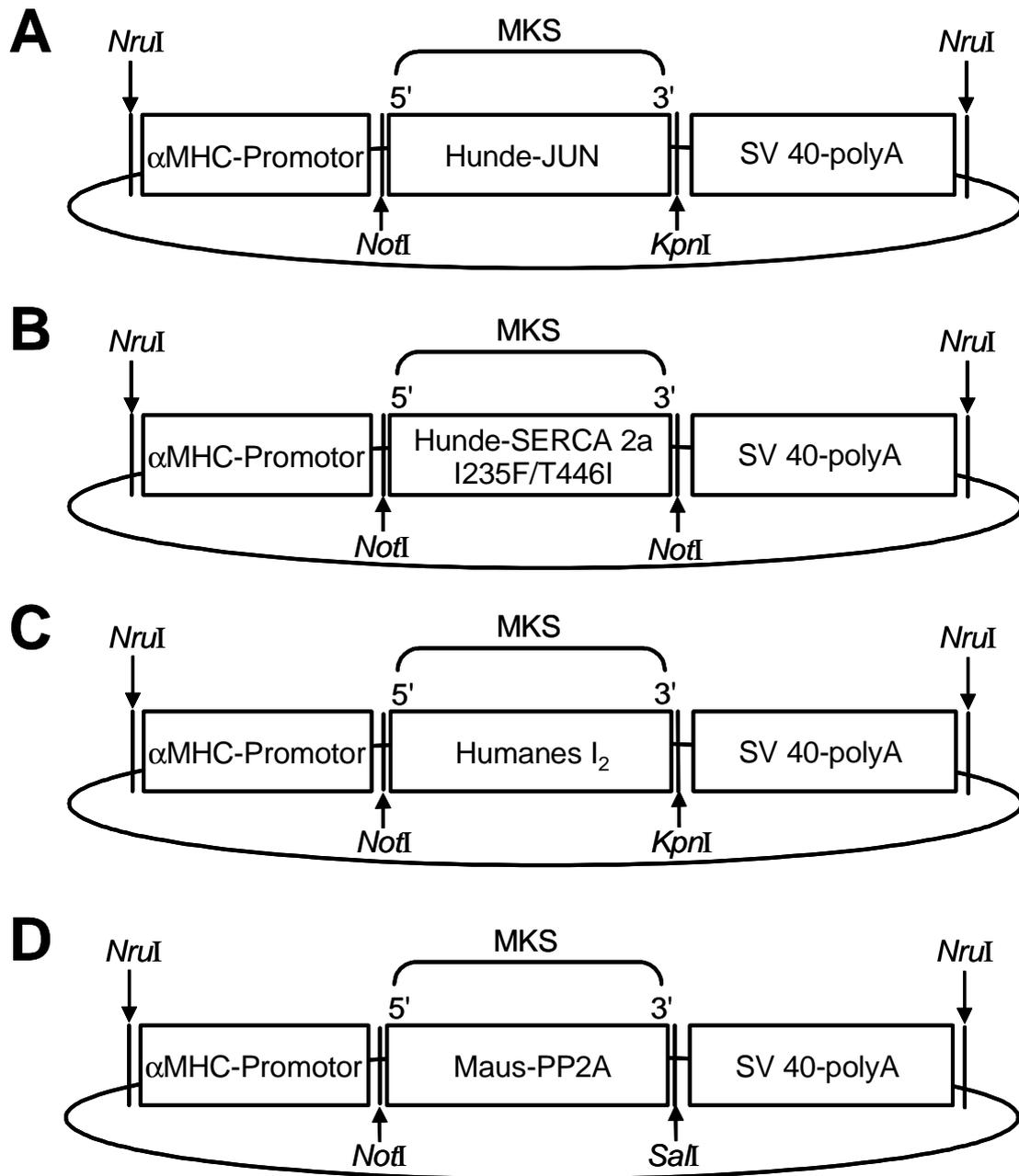


Abb. 3.2.: Schematische Darstellung der DNA-Konstrukte (A: JUN, B: SERCA 2a-Doppelmutante, C: I₂ und D: PP2A)

Die Transkription wurde durch den Promotor der α -Isoform der schweren Kette des Myosins (α -MHC-Promotor) kontrolliert. Dem Promotor folgen im Bereich der multiplen Klonierungsstelle (MKS) die cDNA der Transgene, und nach einigen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen folgt ein Fragment aus dem SV 40-Genom. Die Integration der Transgene konnten in PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern (5' α MHC, und 3': JUN, SERCA 2a, I₂, PP2A) nachgewiesen werden.

1.2. Nachweis der Transgene durch PCR

1.2.1. Isolation von genomischer DNA

Zum Nachweis des Transgens (JUN, SERCA-Doppelmutante, I₂ und PP2A) in den Mäusen wurde aus Schwanzbiopsien DNA isoliert. Schwanzbiopsien der Mäuse wurden 8-10 Stunden in jeweils 700 µl Proteinase-K-Lösung (s. Anhang) bei 55°C im Thermomixer inkubiert. Die DNA wurde durch ein Phenol-Chloroform-Gemisch extrahiert und mit Natriumacetat und 100 %igem Ethanol gefällt (Sambrook et al. 1989). Anschließend wurde die DNA mit 70 %igem Ethanol gereinigt. Nach der Sedimentation durch Zentrifugation (14000 × g, 10 Minuten) wurde die DNA in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (s. Anhang) gelöst. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm (Sambrook et al. 1989).

1.2.2. Durchführung der PCR

In jede Amplifikationsreaktion wurden 100 ng genomische DNA, jeweils 22.5 pmol der beiden für das jeweilige Transgen entsprechenden unten angegebenen Primer und 1.5 Enzymeinheiten *Taq*-DNA-Polymerase in 50 µl Amplifikationspuffer (s. Anhang) eingesetzt. Die spezifischen Primer zum Nachweis der Transgene hatten folgende Nukleotidsequenz:

JUN	5'-CTCTGACAGAGAAGCAGGCACTTTACATGG-3' 5'-CAAGATCAAACCAGACGACAGC-3'
SERCA-Doppelmutante	5'-GACAGAGAAGCAGGCACTTTACATGGAGTC-3' 5'-CTCAGGCCGTGGGCTCGTGC-3'
I₂	5'-GACAGAGAAGCAGGCACTTTACATGGAGTC-3' 5'-ACTACAGGCATCTTCATCATCCCC-3'
PP2A	5'-ACCCTTACCCACATAGACC-3' 5'-CTTAAACACTCGTCGTAGAACC-3'

Jeder Reaktionsansatz durchlief 35 Zyklen in einem Thermocycler: Denaturierung (1 min bei 94°C), Annealing (JUN: 1 min bei 62°C, S ERCA: 1 min bei 60°C, I₂: 1 min bei 53°C und PP2A: 1 min bei 60°C) und Elongation (2 min bei 72°C). Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch in einem 1.5 %igen Agarosegel mit 1 × TBE (s. Anhang) getrennt und mit einem 100 bp Standard verglichen.

2. Isolation der Maus-Kardiomyozyten

Alle notwendigen behördlichen Genehmigungen zur Durchführung der Organentnahmen (Genehmigungsnummer A 31/97) mit anschließenden Organentnahmen nach Injektion von Heparin (Genehmigungsnummer G 45/96) lagen vor. 16 bis 20 Wochen alten, 25-30 g schweren Mäusen wurde 50 IU/g Heparin (Liquemin[®] 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) intraperitoneal verabreicht (Wolska und Solaro 1996). Nach 30 Minuten wurden die Tiere durch das Einatmen von Kohlendioxid bis zum Atemstillstand getötet. Das Herz wurde rasch per Thoraktomie entnommen und durch eine an der Aorta befestigte Kanüle für fünf Minuten mit Ca²⁺-freier Tyrode (s. Anhang) bei 37°C perfundiert. Anschließend wurden der Tyrode zum enzymatischen Verdau 0.2 mg/ml Kollagenase zugefügt. Das Herz wurde mit Kollagenase-Lösung für 4 min in einem Organbad rezirkulierend perfundiert. Nach jeweils einer Minute wurde die CaCl₂-Konzentration im Organbad um 20 µM bis zu einer Endkonzentration von 60 µM erhöht. Nach Beendigung des Verdau wurde das Herz nicht-zirkulierend für weitere 10 min mit Kollagenase-freier Tyrode gespült. Der Ventrikel wurde in „Kraftbrühe“-Lösung (s.Anhang) zerkleinert, der Ansatz mittels Hochsaugen in einer Pipette zerkleinert und durch ein Nylonnetz gefiltert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in Kraftbrühe inkubiert (Isenberg und Klöckner 1982) und bis zu sechs Stunden nach der Isolation für die Messungen verwendet. Für die Messungen wurden nur Zellen verwendet, die länglich geformt waren und eine für Kardiomyozyten charakteristische Querstreifung aufwiesen (s. Abb. 3.3.).

3. Messen mittels der Patch-Clamp-Technik

Das Verfahren basiert auf dem Prinzip der „Spannungsklemme“, durch das Änderungen des Membranpotentials der untersuchten Zelle verhindert werden (Hamill et al. 1981, Hille 1992, Neher und Sakmann 1992 a/b). Dazu wird ein

Kompensationsstrom erzeugt, der gleich groß ist wie der Strom, der über die Membran fließt, diesem aber entgegengerichtet ist (s. Abb. 3.4.). Dies erfolgt durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem das Membranpotential gemessen und mit dem vorgegebenen gewünschten Wert, der Sollspannung, verglichen wird. Mittels eines Verstärkers, der einen Strom-Spannungs-Wandler darstellt, ist diese Rückkopplung herstellbar. Wie in der Abb. 3.4. zu sehen ist, entspricht die Sollspannung der Kommandospannung. Jeder Unterschied zwischen der Kommandospannung und der tatsächlich gemessenen Membranspannung aktiviert einen Regler, der einen entgegengesetzten Strom in die Zelle injiziert. Dieser Kompensationsstrom wird in den Patch-Clamp-Experimenten gemessen. Er läßt unmittelbaren Schluß auf die Leitfähigkeit der Membran zu, die unter anderem von der Aktivität der Ionenkanäle bestimmt wird. Vereinfachend angenommen verhält sich die Membran wie ein Ohmscher Widerstand. Es gilt das Ohmsche Gesetz: $U = R \times I$. Die Leitfähigkeit wird in Siemens angegeben und ist der Kehrwert des Ohmschen Widerstandes ($R = 1/S$). Die Leitfähigkeit der Membran steigt in Abhängigkeit von der Öffnung der Ionenkanäle.

3.1. Ganzzellkonfiguration

Die isolierten Maus-Kardiomyozyten (s. Abb. 3.3.) wurden in die Versuchskammer (s. Abb. 3.4.) auf dem Arbeitstisch eines inversen Mikroskops eingebracht. Nach einer Sedimentationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen in die Versuchskammer für 10 min mit extrazellulärer Lösung (s. Anhang) perfundiert, bevor mit den elektrophysiologischen Untersuchungen begonnen wurde. Zur Blockade der Kaliumströme enthielt die extrazelluläre Lösung 130 mM Tetraethylammoniumchlorid und 4 mM 4-Aminopyridin. Während der Untersuchungen floß die Flüssigkeit der extrazellulären Lösung aus einem Reservoir durch die Versuchskammer mit einer kontinuierlichen Geschwindigkeit von 2 ml/min. Die sich bildende überschüssige Flüssigkeit in der Kammer wurde mittels einer Pumpe abgesaugt.

Für die Patch-Clamp-Messungen wurde ein L/M PC Patch-Clamp-Verstärker verwendet. Die Ionenströme wurden mit einem computergesteuerten Aufnahmesystem mit spezifischer Software erfaßt. Die Pipetten aus Sodaklarglaskapillaren wurden in zwei Ziehschritten mit einem vertikalen Pipettenziehgerät hergestellt. Im Anschluß daran erfolgte das Polieren der Pipettenspitze mittels einer "Schmiede". Dabei wurde ein Glühfilament für wenige

Sekunden nahe an die Pipettenspitze geführt, wodurch die Ränder der Pipettenspitze rundgeschmolzen wurden. Die zur Messung verwendeten Pipetten hatten einen Schaft-Außendurchmesser von 1.5 mm und einen Innendurchmesser von 1.2 mm. Der Spitzendurchmesser der ausgezogenen Pipetten betrug $\approx 1 \mu\text{m}$. Mit intrazellulärer Lösung (s. Anhang) gefüllt, betrug der elektrische Widerstand der Pipetten zwischen 1.5 und 2.5 M Ω . Als Pipetten- und Referenzelektroden dienten Ag/AgCl-Elektrodenröhre.

Für die Messungen des Membranpotentials (V_m) wurde das Patch-Clamp-Verfahren in der Ganzzellkonfiguration, engl. „whole-cell configuration“, angewendet (Horn und Marty 1988). Unter leichtem Überdruck wurde die Pipette mit Hilfe eines Mikromanipulators auf die Zelle aufgesetzt. Durch anschließendes Anlegen eines leichten Unterdrucks mittels einer am Ende der Pipette angeschlossenen Spritze wurde eine Verbindung zwischen Zellmembran und Pipette aufgebaut. Der dabei entstandene elektrische Widerstand lag im Bereich mehrerer G Ω und wird als "Gigaseal" bezeichnet (Hamill et al. 1981). Die Pipette wurde auf ein negatives Haltepotential eingestellt, das dem Bereich des zu erwartenden Ruhemembranpotentials (-80 mV) entsprach. Durch vorsichtiges Erhöhen des Unterdrucks in der Pipette wurde die Membran im Bereich der Pipettenöffnung durchbrochen. Dadurch erhielt man eine Ganzzellkonfiguration, bei der ein offener Zugang zum Zytoplasma besteht. Nach kurzer Zeit tauschte sich das Zytoplasma mit der Pipettenlösung aus. Bei der Ganzzellkonfiguration mißt man den Strom, der durch die gesamte Membranfläche der Zelle fließt und nicht nur den Strom unter der Pipettenmündung.



Abb. 3.3.: Foto einer Herzmuskelzelle

Das Foto zeigt bei 400facher Mikroskopvergrößerung eine isolierte Kardiomyozyte einer Wildtyp-Maus mit der für Kardiomyozyten charakteristischen Querstreifung (s. Pfeil).

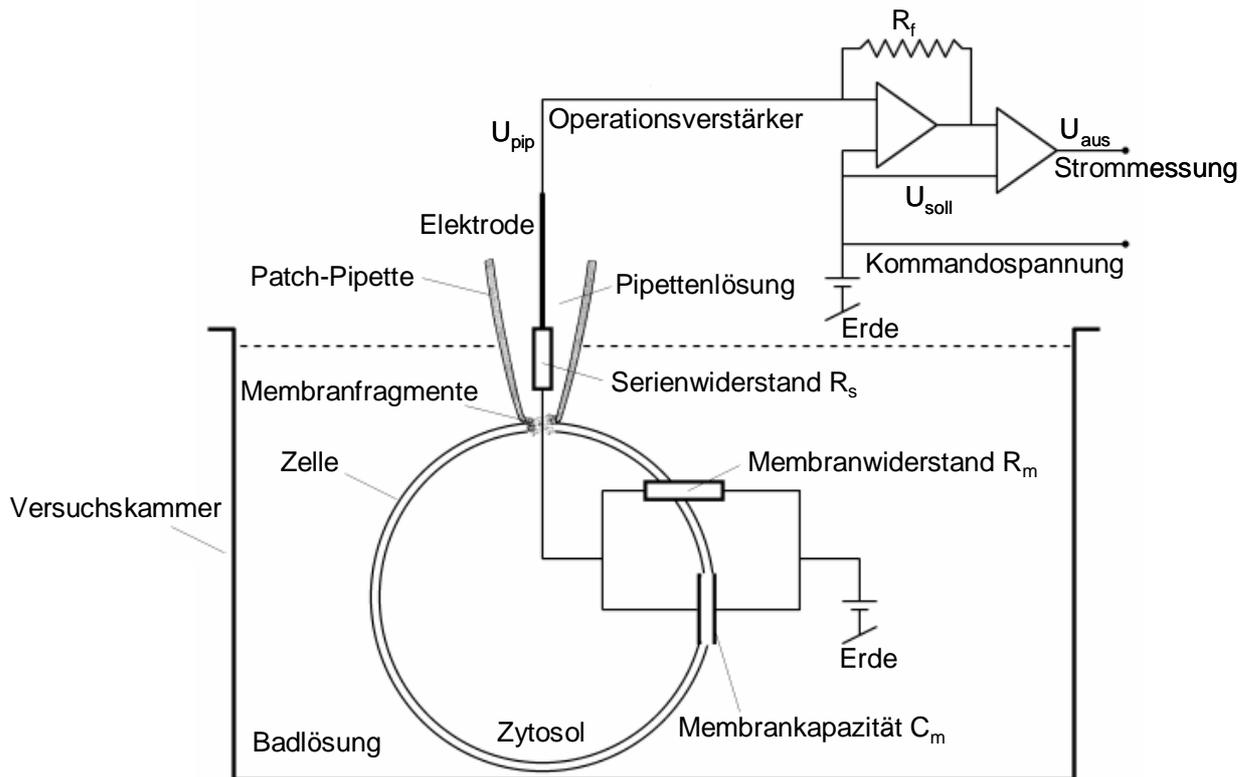


Abb. 3.4.: Schaltbild des elektrischen Meßkreises

Die Abbildung stellt das Schaltbild des Meßkreises für Patch-Clamp-Experimente dar. Die beiden Operationsverstärker bilden durch ihre Verschaltung mit dem Rückkopplungswiderstand (R_f) den Regler und Vorverstärker. An den Eingängen des Operationsverstärkers liegen die Spannung der Pipette (U_{pip}) und eine vorzugebende Sollspannung (U_{soll}) an. Kommt es zur Abweichung zwischen U_{pip} und U_{soll} , so fließt ein Strom durch R_f und durch die Elektrode, bis es zum Ausgleich zwischen U_{pip} und U_{soll} kommt. Die Ausgangsspannung (U_{aus}) ist proportional zum Kompensationsstrom, der gemessen wird.

3.2. Meßbedingungen

Die Messung der Ionenkanalströme wurde bei konstant gehaltenem Membranpotential durchgeführt, um eine wechselseitige Beeinflussung von Membranpotential und Strömen über die Zellmembran zu verhindern. Ausgehend von einem negativen Haltepotential von -40 mV (Hadley and Lederer 1991) erfolgten alle zehn Sekunden die Spannungssprünge für eine Dauer von 200 ms auf $+10$ mV. Der dabei auftretende Strom wurde registriert (s. Abb. 3.6.). Im Aktivitätsbereich der spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanäle entspricht dieser Strom (I_{Ca}) dem transmembranären Ionenstrom durch die L-Typ-Calciumkanäle der Herzmuskelzelle.

Die Amplitude von I_{Ca} ergab sich als die Differenz zwischen dem durch die Depolarisation ausgelösten Spitzeneinwärtsstrom und dem Stromwert am Ende des Testpulses. Anschließend wurde die Stromdichte aus dem Quotienten von Stromamplitude (pA) und Zellkapazität (pF) berechnet, um zellkapazitätsbedingte Unterschiede in der Stromamplitude auszugleichen. Die Zellkapazität wurde von der Iso 2-Software ermittelt und angegeben.

Zum Erstellen einer Strom-Spannungs-Beziehung wurde das Verhalten des I_{Ca} bei wechselnden Spannungen untersucht. Es erfolgten stufenweise in 10 mV-Schritten die Spannungssprünge von -40 mV auf Potentiale zwischen -30 mV und +60 mV (s. Abb. 3.5.). Die daraus resultierende Stromdichte wurde stets von Zellen der transgenen Mäuse im Vergleich zu Zellen der Wildtyp-(WT)-Mäuse ermittelt.

Bei Versuchen von Bestimmung der Einflüsse verschiedener Substanzen wie Nickel ($NiCl_2 \times 6 H_2O$), Cadmium ($CdCl_2$), Isoprenalin, Calyculin A auf den I_{Ca} erfolgte zunächst eine zehnmündige Messung unter basalen Bedingungen mit 1 mM EGTA als Ca^{2+} -Chelator und danach die Ermittlung der Strom-Spannungs-Beziehung (s. Abb. 3.6.). Im Anschluß daran wurde die von oben genannte Substanz der extrazellulären Lösung für 10 min appliziert und der Strom weiter registriert. Anschließend wurde die Strom-Spannungs-Beziehung, wie bereits beschrieben, erstellt (s. Abb. 3.6.).

Bei den Versuchen mit Ba^{2+} -Ionen ($BaCl_2 \times 2 H_2O$) als Ladungsträger (Ferreira et al. 1997, Tsien et al. 1987) wurde das sonst verwendete Ca^{2+} der extrazellulären Lösung (s. Anhang) durch äquimolare Mengen Ba^{2+} ersetzt. Ba^{2+} zeichnet sich im Vergleich zu Ca^{2+} durch eine Linksverschiebung zu kleineren Spannungswerten der Strom-Spannungs-Kennlinie aus und es kommt zu einer Zunahme der Stromamplitude (McDonald et al. 1986).

Bei weiteren Versuchen enthielt die intrazelluläre Lösung (s. Anhang) anstelle des sonst verwendeten EGTA 10 mM BAPTA als Ca^{2+} -Chelator. BAPTA besitzt im Vergleich zu EGTA eine deutlich höhere Affinität zu Ca^{2+} -Ionen (Smith et al. 1984, Stern 1992), wodurch die Ca^{2+} -Ionen, die durch den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal einströmen, schneller und wirksamer komplexiert werden.

Einwärtsströme wie der L-Typ-Calciumkanalstrom (I_{Ca}) werden mit negativem Vorzeichen dargestellt.

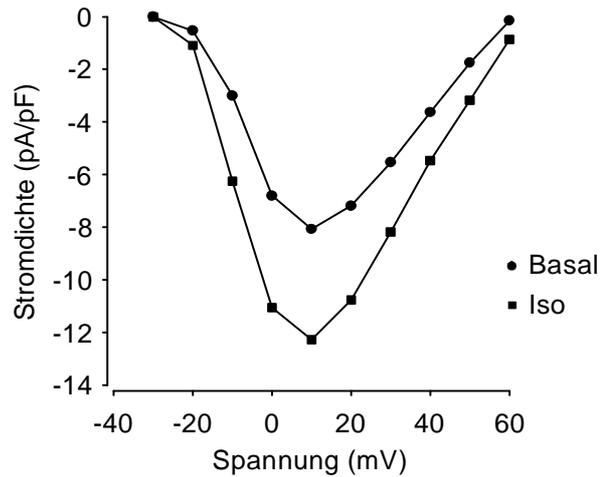


Abb. 3.5.: Originalregistrierung der Strom-Spannungs-Beziehung

Dargestellt ist die Originalregistrierung der Strom-Spannungs-Beziehung des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) einer Herzmuskelzelle von WT-Mäusen unter basalen Bedingungen (Basal) sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin (Iso). Bei der Strom-Spannungs-Beziehung erfolgten die Spannungssprünge von -40 mV stufenweise in 10 mV-Schritten auf Potentiale zwischen -30 mV und +60 mV (Experimentnummer: 020617 id.4/2002).

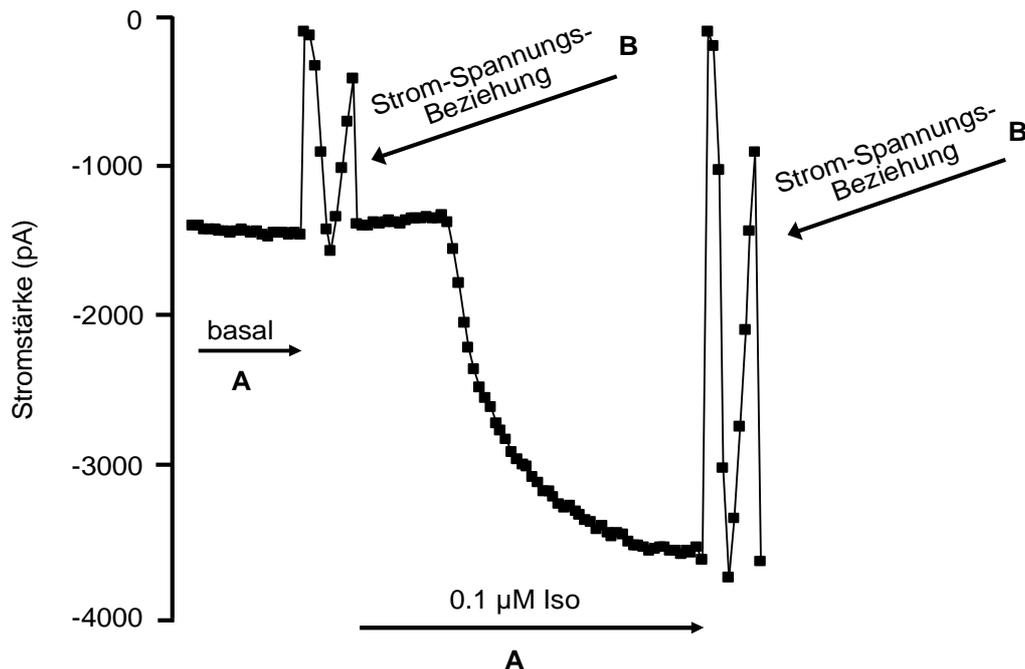


Abb. 3.6.: Zeitverlauf einer Messung des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca})

Die Abbildung stellt den Zeitverlauf des I_{Ca} einer WT-Zelle unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin (Iso) dar. Unter beiden Bedingungen erfolgten ausgehend von einem negativen Haltepotential von -40 mV alle 10 s Spannungssprünge einer Dauer von 200 ms auf +10mV (A). Der Versuch unter basalen Bedingungen beziehungsweise nach β -adrenerger Stimulation wurde mit der Registrierung einer Strom-Spannungs-Beziehung beendet (B). Die resultierenden Spannungssprünge der Strom-Spannungs-Beziehung finden sich in der Abbildung als Peak (Experimentnummer 030707 id.5/2003).

3.3. Inaktivierungszeitkonstanten

Zur Charakterisierung der Inaktivierung des I_{Ca} wurden die Inaktivierungszeitkonstanten τ , τ_1 und τ_2 ermittelt (s. Abb. 3.7.).

Zur Ermittlung der Inaktivierungszeitkonstanten wurden mittels der Iso 2-Software Kurvenapproximationen durchgeführt, wobei zur Approximation der Stromkurve entweder eine Exponentialfunktion oder die Summe zweier Exponentialfunktionen herangezogen wurde. Folgende Exponentialfunktionen wurden verwendet:

$$I = A_1 \times \exp(-t/\tau) + B$$

oder

$$I = A_1 \times \exp(-t/\tau_1) + A_2 \times \exp(-t/\tau_2) + B,$$

wobei I die Stromamplitude in pA, t die Zeit in ms, τ , τ_1 und τ_2 die Zeitkonstanten des Abfalls der Inaktivierung des L-Typ-Calciumkanalstromes in ms, A_1 und A_2 die Amplituden der inaktivierenden Stromkomponente zum Zeitpunkt $t = 0$ in pA und B eine Konstante darstellen.

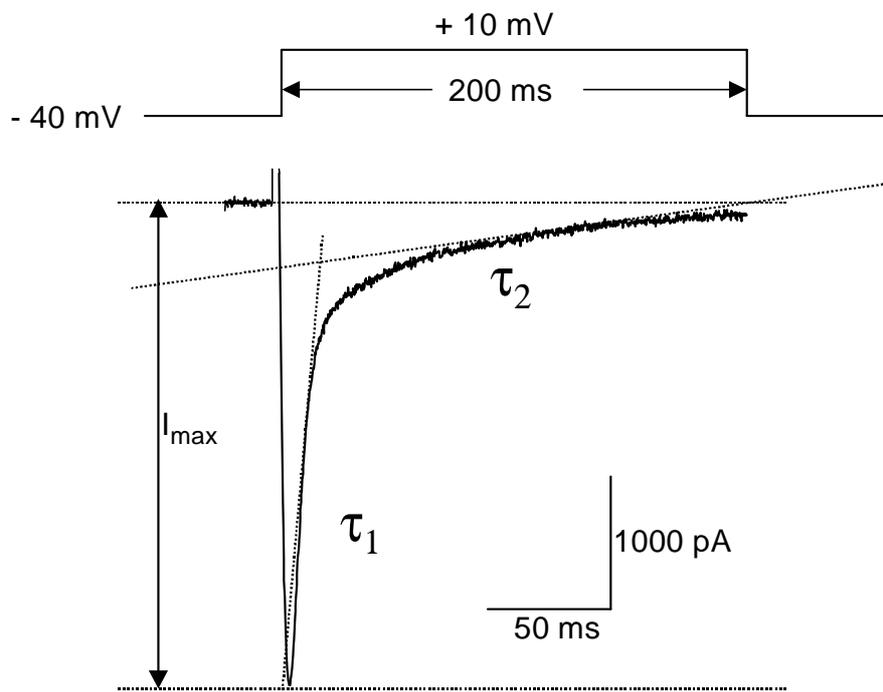


Abb. 3.7.: Inaktivierung des I_{Ca} in der Ganzzellkonfiguration

Dargestellt ist der Anfang der Stromregistrierung bei einem rechteckförmigen Spannungspuls. Beim Sprung vom Haltepotential von -40 mV auf +10 mV für 200 ms entsteht der zunächst fast senkrecht ansteigende kapazitive Ladestrom I_{max} , der dann biexponentiell abfällt und sich mit zweier, τ_1 und τ_2 , Inaktivierungszeitkonstanten beschreiben lässt.

Unter basalen Bedingungen lag der maximale Spitzenstrom der Strom-Spannungs-Beziehung in meisten Fällen bei +10 mV. Daher wurden die Inaktivierungszeitkonstanten bei diesem Potential ermittelt.

Die Inaktivierung des I_{Ca} unter Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator lässt sich mit zweier Inaktivierungszeitkonstanten, τ_1 und τ_2 , beschreiben (Ludwig et al. 1998). Die Konstanten τ_1 und τ_2 stellen die schnelle bzw. langsame Inaktivierungszeitkonstanten (s. Abb. 3.7. und 3.8.) dar.

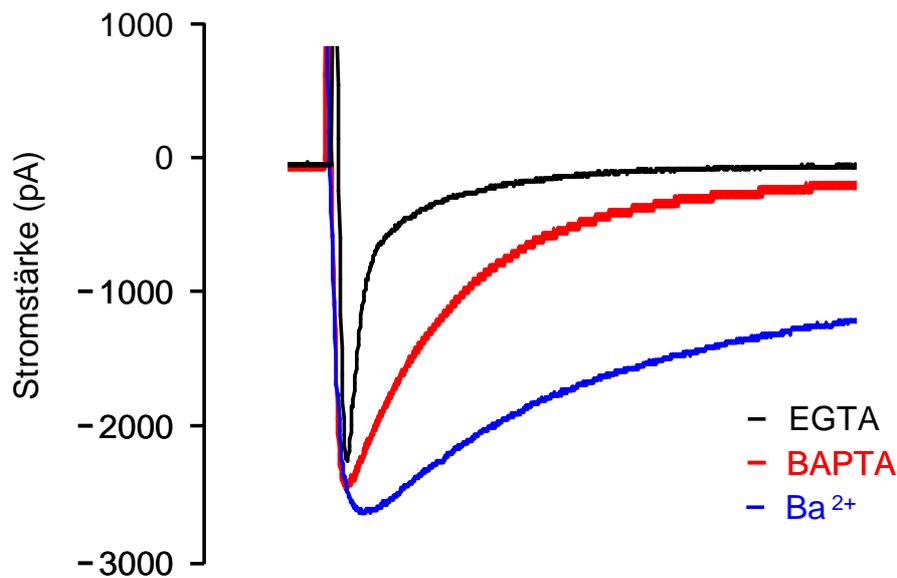


Abb. 3.8.: Originalregistrierungen des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) unter drei verschiedenen Bedingungen

Dargestellt sind die Originalregistrierungen des I_{Ca} von Maus-Kardiomyozyten unter Verwendung sowohl der Ca^{2+} -Chelator EGTA und BAPTA, als auch unter Verwendung von Ba^{2+} -Ionen. Die Ca^{2+} -Chelatoren wurden der intrazellulären und die Ba^{2+} -Ionen der extrazellulären Lösung zugesetzt. Ausgehend von einem Haltepotential von -40mV erfolgte alle 10 s ein Spannungspuls von 200 ms auf +10 mV. Der entsprechende Einwärtsstrom wurde aufgezeichnet. Auffällig sind die verlängerten Inaktivierungszeiten unter Verwendung von BAPTA als Ca^{2+} -Chelator und von Ba^{2+} in der extrazellulären Lösung (Experimentnummers: EGTA-020617 id.4/2002, BAPTA-020905 id.4/2002, Ba^{2+} -021202 id.2/2002).

Die Inaktivierungskurve des Stromes unter Verwendung von Barium als Ladungsträger verläuft flacher und lässt sich mit nur einer Zeitkonstanten τ beschreiben (Masaki et al. 1997, Lee et al. 1985; s. Abb. 3.8.). Gleichzeitig wird die Calcium-abhängige Komponente der Inaktivierung ausgeschaltet (Ferreira et al. 1997, Lee et al. 1985).

Unter Verwendung von BAPTA als stärkerem Ca^{2+} -Chelator als EGTA (Smith et al. 1984, Stern 1992) werden die Ca^{2+} -Ionen, die durch den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal einströmen, komplexiert. Dies ermöglicht auf indirekte Art und Weise Rückschlüsse auf die Beeinflussung des SR auf den L-Typ-Calciumkanal zu ziehen. Die Inaktivierungskurve des I_{Ca} unter Verwendung von BAPTA wurde mit einer Inaktivierungszeitkonstante τ ermittelt (s. Abb. 3.8.).

3.4. Leitfähigkeit

Für jedes Potential der Strom-Spannungs-Beziehung wurden aus den Stromdichten (Stromamplitude/Zellkapazität) der I_{Ca} die entsprechenden Leitfähigkeitswerte berechnet (Reuter und Scholz 1977). Dazu wurde die Stromdichte durch die Differenz zwischen Umkehr- und Kommandospannung dividiert, wobei die Umkehrspannung dem Potential entspricht, bei dem die Stromamplitude gleich Null ist. Die erhaltenen Leitfähigkeitswerte bei jedem Potential wurden bis zum maximalen Leitfähigkeitswert über ein Computerprogramm mit Boltzmann-Funktionen angepaßt. Es entstanden Werte über die maximale Leitfähigkeit (G_{max}), das Potential der halbmaximalen Leitfähigkeit ($V_{1/2}$) als charakteristische Größe, bei der genau die Hälfte der Kanäle aktiviert werden und die Maßzahl für die Steigung der Leitfähigkeits-Spannungs-Kurve (b), welche die Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Spannung beschreibt.

Bei der Boltzmann-Funktion handelt es sich um folgende Gleichung:

$$G = G_{\text{max}} [1 + \exp ((V_{1/2} - V) / b)],$$

wobei G die Leitfähigkeit des I_{Ca} und V das Potential ist. Für die Berechnung der relativen Leitfähigkeit wurden die Leitfähigkeitswerte bei jedem Potential auf den maximalen Leitfähigkeitswert der jeweiligen Kurve normiert.

4. Statistische Auswertung der Meßergebnisse

Aus den Versuchsergebnissen wurde das arithmetische Mittel und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet. Mit „n“ wurde die Anzahl der Einzelversuche bezeichnet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mittels t-Test nach Student beurteilt. P -Werte kleiner oder gleich 0.05 wurden als signifikant bewertet. Alle weiteren Angaben zu Zellen beziehen sich auf Maus-Kardiomyozyten.

IV. ERGEBNISSE

A. STUNNING-UNTERSUCHUNGEN AM HUND

1. Instrumentierung und Probengewinnung

Biochemische Untersuchungen wurden an einem etablierten, validierten Stunning-Modell am wachen instrumentierten Hund durchgeführt (Lüss et al. 2000b, Meissner et al. 2000, Rolf et al. 1997).

In der Stunning-Gruppe (insgesamt 10 Tiere) wurde das Areal des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (LAD-Areal) an instrumentierten, wachen Hunden für 10 min verschlossen, sogenannte okkludiert und anschließend bis zur 50 %-igen Erholung der kontraktiven Funktion reperfundiert.

Eine 10-minütige Okklusion des LAD-Areals führte zu einer Abnahme des mittleren Aortendruckes auf 95 % des prä-ischämischen Ausgangswertes. Ebenso sanken die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ($LVdP/dt_{max}$) und die linksventrikuläre Druckabnahmegeschwindigkeit ($LVdP/dt_{min}$) auf 78 % bzw. 66 % der Ausgangswerte. Unmittelbar nach der Reperfusion kehrten der linksventrikuläre Druck, der mittlere Aortendruck sowie die regionale Myokardperfusion auf präischämische Ausgangswerte zurück (s. Tab. 4.1.).

Wie der Tabelle 4.2. zu entnehmen ist, führte die 10-minütige Okklusion zu einer starken Abnahme der myokardialen Wanddickenfraktion um 70 %. Die anschließende Reperfusion verbesserte sich die kontraktile Funktion und die 50 %-Erholung wurde nach 29 ± 5 min ($n = 10$) erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Biopsien aus dem ischämischen LAD-Areal und aus dem Areal des Ramus circumflexus der linken Koronararterie (RCX-Areal; Kontrollareal) entnommen. Die Wanddickenfraktion des RCX-Kontrollareals war während der gesetzten Ischämie unverändert geblieben. Es war daraus resultierend möglich, die biochemischen Veränderungen zwischen ischämischen LAD- und nicht-ischämischen RCX-Areal zu untersuchen.

	KONTROLLE	ISCHÄMIE	EXPLANTATIONS- ZEITPUNKT
Mittlerer Aortendruck (mmHg)	103 ± 3	98 ± 5 ★	101 ± 4
LV dP/dt_{max} (mmHg/s)	3561 ± 285	2784 ± 301 ★	3352 ± 241
LV dP/dt_{min} (mmHg/s)	2702 ± 231	1786 ± 266 ★	2643 ± 196

★ p<0.05 vs. Kontrolle

Tab. 4.1.: Hämodynamische Parameter im ischämischen Areal des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (LAD)

In der Tabelle sind der mittlere Aortendruck, die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (LVdP/dt_{max}) und die linksventrikuläre Druckabnahmegewindigkeit (LVdP/dt_{min}) im LAD-Areal aufgeführt. Die Meßwerte wurden vor der Okklusion (Kontrolle), nach 10 minütiger Ischämie und vor der Explantation bestimmt (n=10).

	ISCHÄMIE	REPERFUSION			
	10 min	10 min	20 min	30 min	40 min
WTF (%)	-30.1	16.9	29.6	31.3	42.0
SEM	6.03	8.86	7.31	7.80	9.00
n	10	10	8	3	2

Tab. 4.2.: Wanddickenfraktion (WTF) im ischämischen Areal des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (LAD)

Dargestellt ist die WTF im ischämischen LAD-Areal nach 10-minütiger Okklusion mit anschließender Reperfusion. Die Wanddickenfraktion wurde mittels eines Dopplerkristalls im LAD-Areal und im Areal des Ramus circumflexus der linken Koronararterie (RCX) kontinuierlich gemessen. Die Daten sind als Prozent der Wanddickenfraktion im RCX-Areal ausgedrückt.

2. Phosphorylierung von Phospholamban

Der Phosphorylierungszustand von Phospholamban (PLB) wurde aus ventrikulären Herzgewebe des ischämischen LAD- und nicht-ischämischen RCX-Areals durch Western Blotting mit anschließender immunologischer Quantifizierung gemessen. Die phosphorylierungsspezifischen Antikörper waren gegen das PLB-Peptid (Aminosäuren 9-19), das an Serin-16 (PLB-PS-16) bzw. Threonin-17 (PLB-PT-17) phosphoryliert wurde, gerichtet (Drago und Colyer, 1994, Boknik et al. 1999).

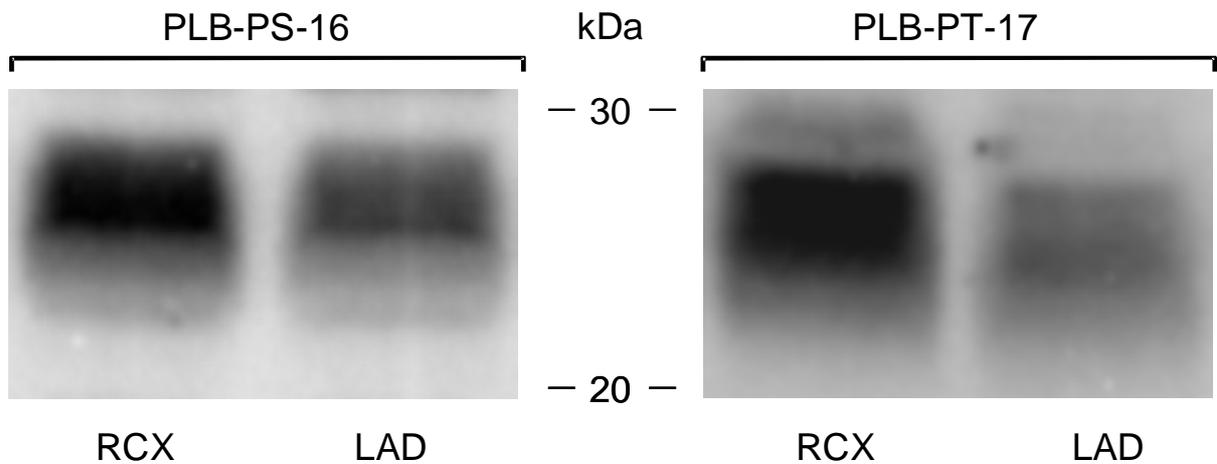
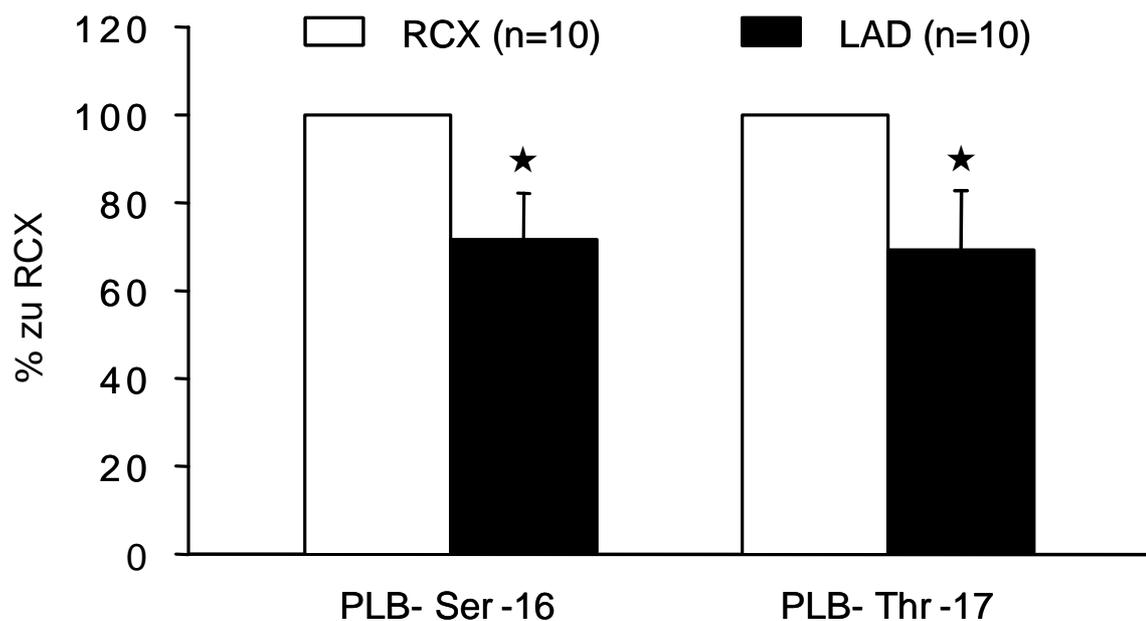
Nach Auswertung des Autoradiogramms war die PLB-Phosphorylierung sowohl an Serin-16 als auch an Threonin-17 im ischämischen LAD-Areal um 20 % für PLB-PS-16 bzw. um 19 % für PLB-PT-17 im Vergleich zum RCX-Kontrollareal vermindert (s. Abb. 4.1.). Dabei korrelierte die PLB-Phosphorylierung an Serin-16 bzw. Threonin-17 mit der Zeit zur 50 %-igen Erholung der Wanddickenfraktion im ischämischen Areal (s. Abb. 4.2.).

3. Proteinphosphatasen

3.1. Bestimmung der Proteinphosphatase-Aktivität im Homogenat

Die Bestimmung der Proteinphosphatase (PP)-Aktivität wurde nach Neumann et al. (1991) durchgeführt. Die Untersuchungen wurden in ventrikulären Homogenaten von Gewebeproben aus dem ischämischen LAD- und nicht-ischämischen RCX-Areal mit [³²P]-markierter Phosphorylase a als Substrat und in Abwesenheit von Kalzium- und Magnesium-Ionen vorgenommen.

Da die PP vom Typ 2B und 2C in Abwesenheit von zweiwertigen Ionen nicht aktiv sind, kann unter diesen Bedingungen die ermittelte gesamt-PP-Aktivität der PP1 und PP2A zugeordnet werden (Herzig und Neumann 2000, Shenolikar und Nairn 1991). Zwischen dem LAD- und RCX-Areal war die gesamt-PP-Aktivität in den Homogenaten unverändert (s. Abb. 4.3.).

A**B**

★ p < 0.05 vs. RCX

Abb. 4.1.: Phospholamban-Phosphorylierung an Serin-16 (PLB-PS-16) und an Threonin-17 (PLB-PT-17) im ischämischen (LAD) und Kontrollareal (RCX)

Abbildung A stellt das Autoradiogramm von PLB-PS-16 und PLB-PT-17 im LAD- und RCX-Areal dar. Zwischen den Originalabbildungen sind die Positionen der Molekulargewichtsstandards in Kilodalton markiert. Die Quantifizierung der Phospholamban-Phosphorylierung im LAD- und RCX-Areal ist als Säulendiagramm in Abbildung B dargestellt. Die Phospholamban-Phosphorylierung im LAD-Areal ist als Prozent des entsprechenden Wertes im RCX-Areal angegeben.

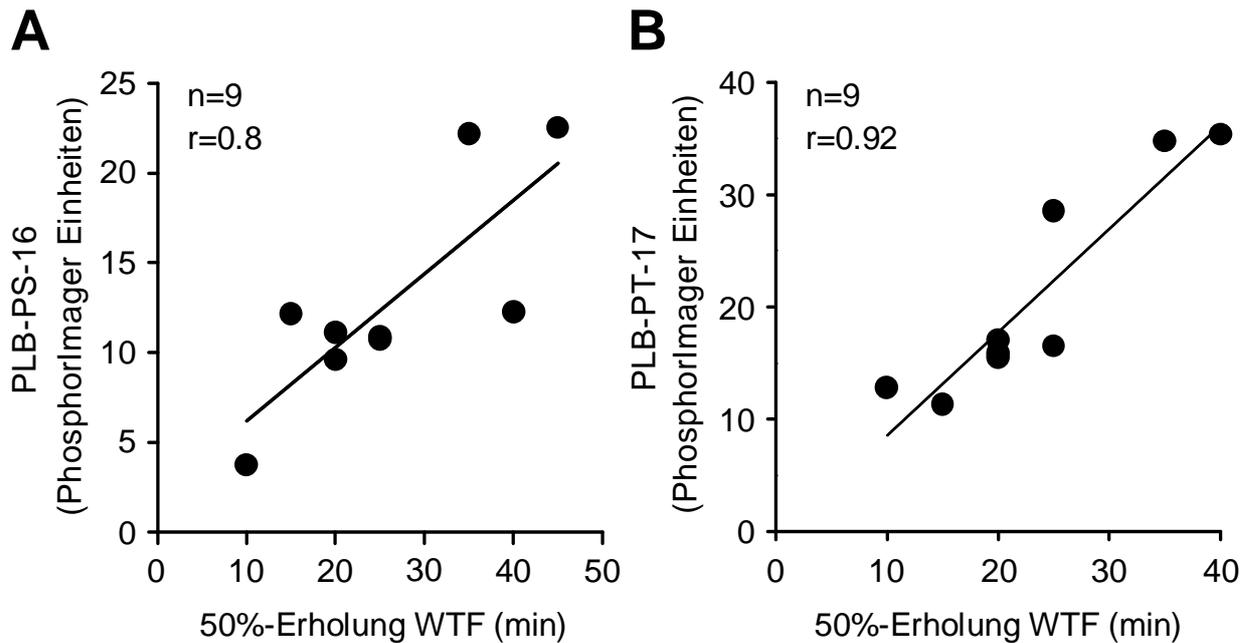


Abb. 4.2.: Korrelation zwischen der Zeit bis zur 50 %-Erholung der Wanddickenfraktion (WTF) und Phospholamban-Phosphorylierung an Serin-16 und Threonin-17

Dargestellt ist die Korrelation zwischen der Zeit bis zur 50 %-Erholung der WTF und Phospholamban-Phosphorylierung an Serin-16 (PLB-PS-16, **A**) bzw. Threonin-17 (PLB-PT-17 **B**) im ischämischen LAD-Areal. Es ist jeweils der lineare Korrelationskoeffizient (r) und die Anzahl der LAD-Proben angegeben.

3.2. Bestimmung der Proteinphosphatase-Aktivität in SR-Membranvesikeln

Die PP-Aktivität wurde auch in SR-Membranvesikeln aus Gewebe des ischämischen LAD- und nicht-ischämischen RCX-Areals untersucht. Die PP-Aktivität wurde in An- und Abwesenheit von 1 nM Okadasäure gemessen. Diese Konzentration hemmt spezifisch nur die PP-Aktivität vom Typ 2A (Neumann et al. 1999). Diese Tatsache wurde ausgenutzt, um die gemessene PP-Aktivität in Typ 1- und Typ 2A-Aktivität differenzieren zu können. Die PP2A-Aktivität wurde als Differenz zwischen der gesamt-PP-Aktivität und der PP1-Aktivität ermittelt. Die Messungen zeigten keine Hinweise auf eine Veränderung des Verhältnisses zwischen der PP1- und PP2A-Aktivität im LAD-Areal im Vergleich zum RCX-Areal (s. Abb. 4.4.).

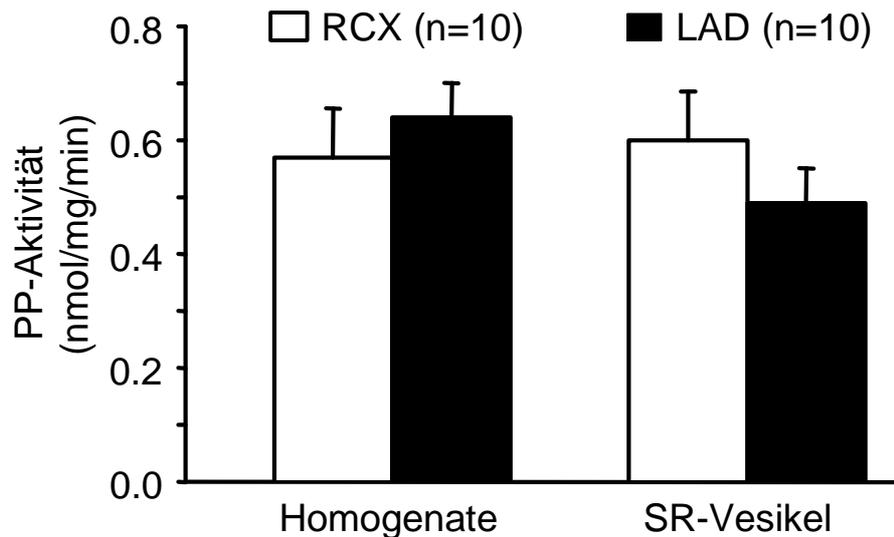


Abb. 4.3.: Proteinphosphatase (PP)-Aktivität in Homogenaten und SR-Membranvesikeln aus dem ischämischen (LAD) und Kontrollareal (RCX)

Dargestellt ist die gesamt-PP-Aktivität in Homogenaten und SR-Membranvesikeln (SR-Vesikel) aus dem LAD- und RCX-Areal. Die Messungen wurden mit [³²P]-markierter Phosphorylase a als Substrat durchgeführt. Die PP-Aktivität ist in nmol/mg/min angegeben.

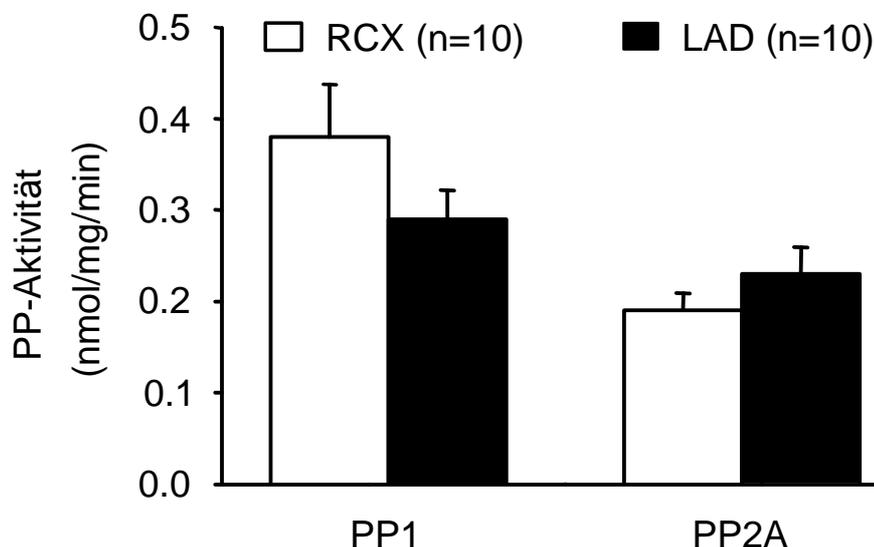


Abb. 4.4.: Proteinphosphatase (PP)-Aktivität vom Typ 1 und 2A in SR-Membranvesikeln aus dem ischämischen (LAD) und Kontrollareal (RCX)

Dargestellt ist die Proteinphosphatase (PP)-Aktivität vom Typ 1 und vom Typ 2A in SR-Membranvesikeln aus dem LAD- und RCX-Areal. Die PP1-Aktivität entspricht der PP-Aktivität in Anwesenheit von 1 nM Okadasäure. PP2A-Aktivität wurde als Differenz zwischen der gesamt-PP-Aktivität und PP1-Aktivität ermittelt. Die Messungen wurden mit [³²P]-markierter Phosphorylase a als Substrat durchgeführt. Die PP-Aktivität ist in nmol/mg/min angegeben.

3.3. Bestimmung der Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase

Die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) wurde nach Bartel et al. (1985) gemessen. Als Substrat für die PKA wurde das synthetische Oligopeptid Kemptid (Prashad 1985) benutzt. Die PKA-Aktivität wurde in ventrikulären Homogenaten aus Gewebeproben des ischämischen LAD- und nicht-ischämischen RCX-Areals gemessen. Die basale PKA-Aktivität sowie die stimulierte PKA-Aktivität in Anwesenheit von 2 μ M cAMP wurden bestimmt. 2 μ M cAMP führte zur maximalen Stimulation der PKA-Aktivität. Die Aktivität der PKA in Ab- und Anwesenheit von 2 μ M cAMP und deren Verhältnis waren zwischen ischämischen LAD-Areal und nicht-ischämischen RCX-Areal unverändert (s. Abb. 4.5.).

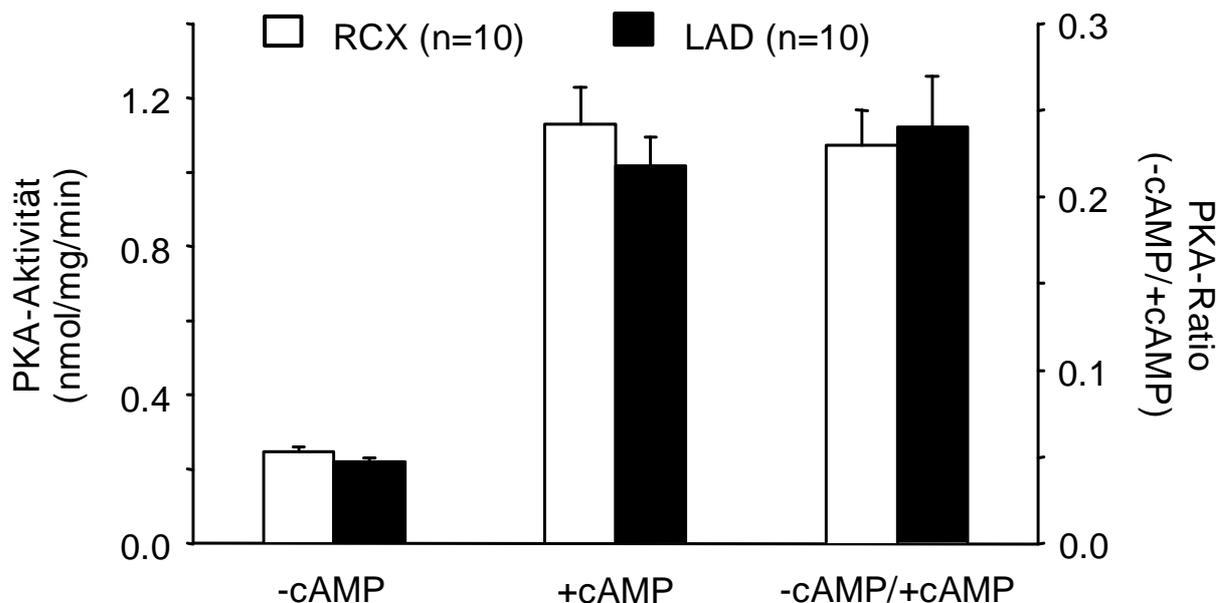


Abb. 4.5.: Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) im ischämischen (LAD) und Kontrollareal (RCX)

Dargestellt ist die Aktivität der PKA in Ab- (-cAMP) und Anwesenheit von 2 μ M cAMP (+cAMP) und deren Verhältnis (-cAMP/+cAMP) im LAD- und RCX-Areal. Die Messungen wurden mit Kemptid als Substrat durchgeführt. Die Enzymaktivität in nmol/mg/min bezeichnet die umgesetzte Substratmenge (angegeben in nmol), bezogen auf ein Milligramm Protein im Homogenat und eine Minute Reaktionsdauer.

B. MESSUNGEN DER L-TYP-CALCIUMKANALSTRÖME

1. Validierung des Patch-Clamp-Systems

Zunächst wurden die Wirkungen von Nickelchlorid (Josephson et al. 1984, Mitra und Morad 1986) und Cadmiumchlorid (Cohen und Lederer 1988, Josephson et al. 1984) auf den Strom des L-Typ-Calciumkanals (I_{Ca}) an Herzmuskelzellen von Wildtyp-(WT)-Mäusen getestet, um das Meßsystem wie auch die Zellvitalität zu überprüfen. Der I_{Ca} ließ sich durch Zugabe von Cd^{2+} - oder Ni^{2+} -Ionen blockieren (s. Abb. 4.6.). Die Blockade des L-Typ-Calciumkanals durch Cd^{2+} - und Ni^{2+} -Ionen kommt vermutlich durch die Interaktion der Ionen mit Bindungsstellen im Inneren der Kanalpore zustande, wodurch der Ionendurchtritt von Ca^{2+} verhindert wird (Josephson et al. 1984, Lansman et al. 1986). Infolge dessen ist der Kanal für den Durchtritt von Ca^{2+} -Ionen unzugänglich.

Nach getrennter Applikation der beiden Substanzen kam es zu einer charakteristischen, vollständigen Blockade des I_{Ca} , wobei die Effekte reversibel waren. Nach Auswaschen der Substanzen erreichten die Stromamplituden wieder ihre Ausgangswerte. Des weiteren sollte ausgeschlossen werden, daß neben dem L-Typ-Calciumkanalstrom auch der T-Typ-Calciumkanalstrom gemessen wird. Nach Anlegen eines Haltepotentials von -100 mV und depolarisierenden Spannungssprüngen auf -30 mV war die Registrierung eines Ca^{2+} -Einwärtsstromes vom T-Typ nicht möglich (Experiment nicht gezeigt).

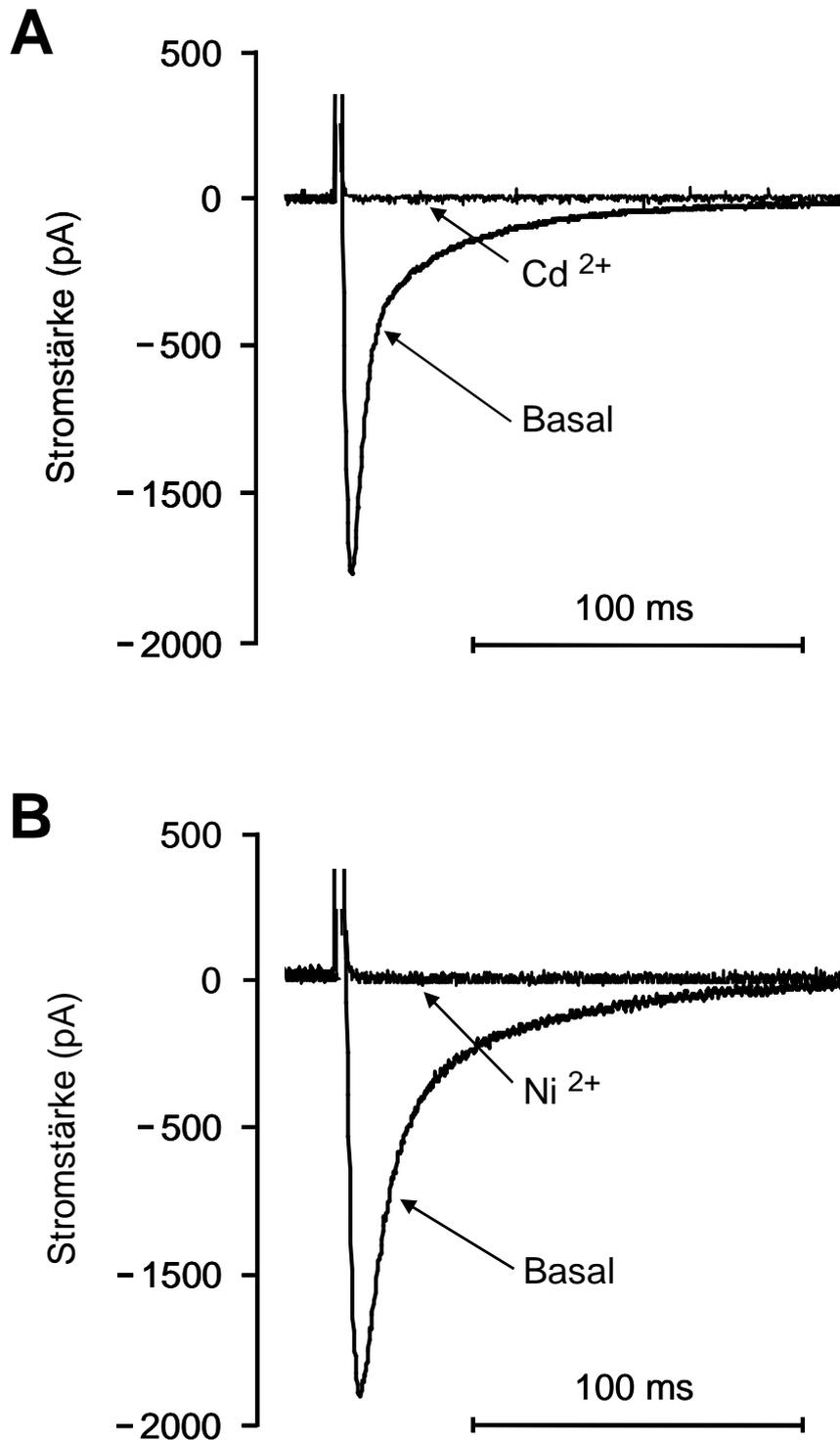


Abb. 4.6.: Blockade des L-Typ-Calciumkanals

Dargestellt sind die Effekte von 10 mM Cd²⁺ (A) und 5 mM Ni²⁺ (B) auf den L-Typ-Ca²⁺-Kanal einer WT-Zelle. Ausgehend von einem Haltepotential von -40mV erfolgte alle 10 s ein Spannungspuls von 200 ms auf +10 mV. Der entsprechende Einwärtsstrom wurde aufgezeichnet. Sowohl Cd²⁺ als auch Ni²⁺ blockieren den L-Typ-Ca²⁺-Kanal vollständig und führen somit zur Aufhebung des Stromes. Die Effekte sind reversibel. Nach Auswaschen von Cd²⁺ und Ni²⁺ erreichten die Stromamplituden basale Werte (x-Achse = Stromstärke in pA, y-Achse = Zeit in ms).

2. Untersuchungen an Junctin-überexprimierenden Mäusen

2.1. Körpergewicht, Herzgewicht, relatives Herzgewicht und Zellkapazität

Die transgenen, Junctin-überexprimierenden Mäuse (JUN) unterschieden sich äußerlich nicht von den WT-Mäusen. Sie waren gleich groß und schwer und zeigten weder Verhaltensauffälligkeiten noch eine erhöhte Mortalitätsrate. Die Herzen der JUN-Mäuse hatten eine Hypertrophie mit einer Gewichtszunahme von 14 % gegenüber den WT-Mäusen. Entsprechend war auch das relative Herzgewicht (Herzgewicht/Körpergewicht) bei den JUN-Mäusen um 14 % gegenüber den WT-Mäusen erhöht. Dies galt sowohl für weibliche wie auch für männliche Mäuse (s. Tab.7.1.). Außerdem war die Zellkapazität als Maß für die Zellgröße in der Gruppe der JUN-Zellen im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe um 18 % vergrößert. (s.Tab. 7.1.). Die vergrößerte Zellkapazität wurde sowohl bei Zellen der weiblichen als auch der männlichen Mäuse festgestellt (s. Tab. 7.1.)

2.2. Einfluß von EGTA als Ca^{2+} -Chelator

2.2.1. Strom-Spannungs-Beziehung

Für die Erstellung der Strom-Spannungs-Beziehungen (IV-Kurve) erfolgten die depolarisierenden Spannungssprünge stufenweise in 10 mV-Schritten auf Potentiale zwischen -30 mV und +60 mV. Die Stromdichte als Quotient aus maximaler Stromamplitude und Zellkapazität wurde bei den entsprechenden Testpotentialen bestimmt. Die Messung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanalstromes (I_{Ca}) erfolgte unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μM Isoprenalin (s. Abb. 4.7.).

Die ermittelten Stromdichten waren weder unter basalen Bedingungen noch nach Isoprenalin-Zugabe zwischen JUN- und WT-Zellen verändert (s. Abb. 4.8.). Der maximale Spitzenstrom der IV-Kurve lag unter basalen Bedingungen für JUN- und WT-Zellen bei +10 mV. Bei diesem Potential war die prozentuale Stromzunahme nach Zugabe von Isoprenalin zwischen JUN- und WT-Zellen gleich (s. Abb. 4.9.). Es konnten auch keine Unterschiede zwischen Zellen der weiblichen und männlichen Mäuse unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation gemessen werden.

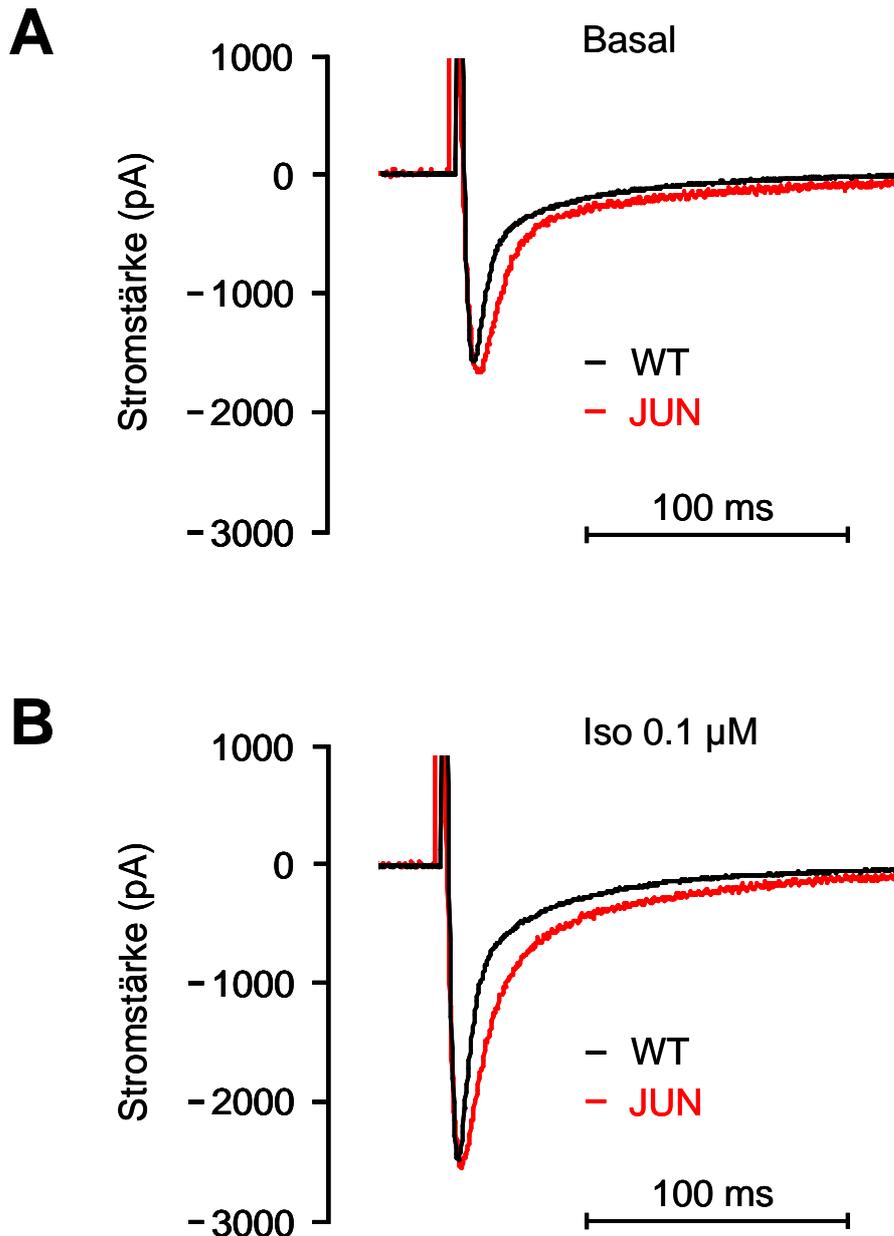


Abb. 4.7.: Originalregistrierung des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) unter Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator sowohl für basale Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen des I_{Ca} für Wildtyp-(WT)- und Junctin-überexprimierende Zellen (JUN) unter Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator sowohl für basale Bedingungen (A) als auch nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (B; Iso). Die Zellkapazitäten dieser Zellen waren vergleichbar. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erfolgte alle 10 s ein Spannungspuls von 200 ms auf +10 mV. Auffällig ist die verlängerte Inaktivierungszeit des I_{Ca} bei den Junctin-überexprimierenden Zellen sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation (Experimentnummern: WT-020617 id.6/2002, JUN-020129 id.1/2002; x-Achse = Stromstärke in pA, y-Achse = Zeit in ms).

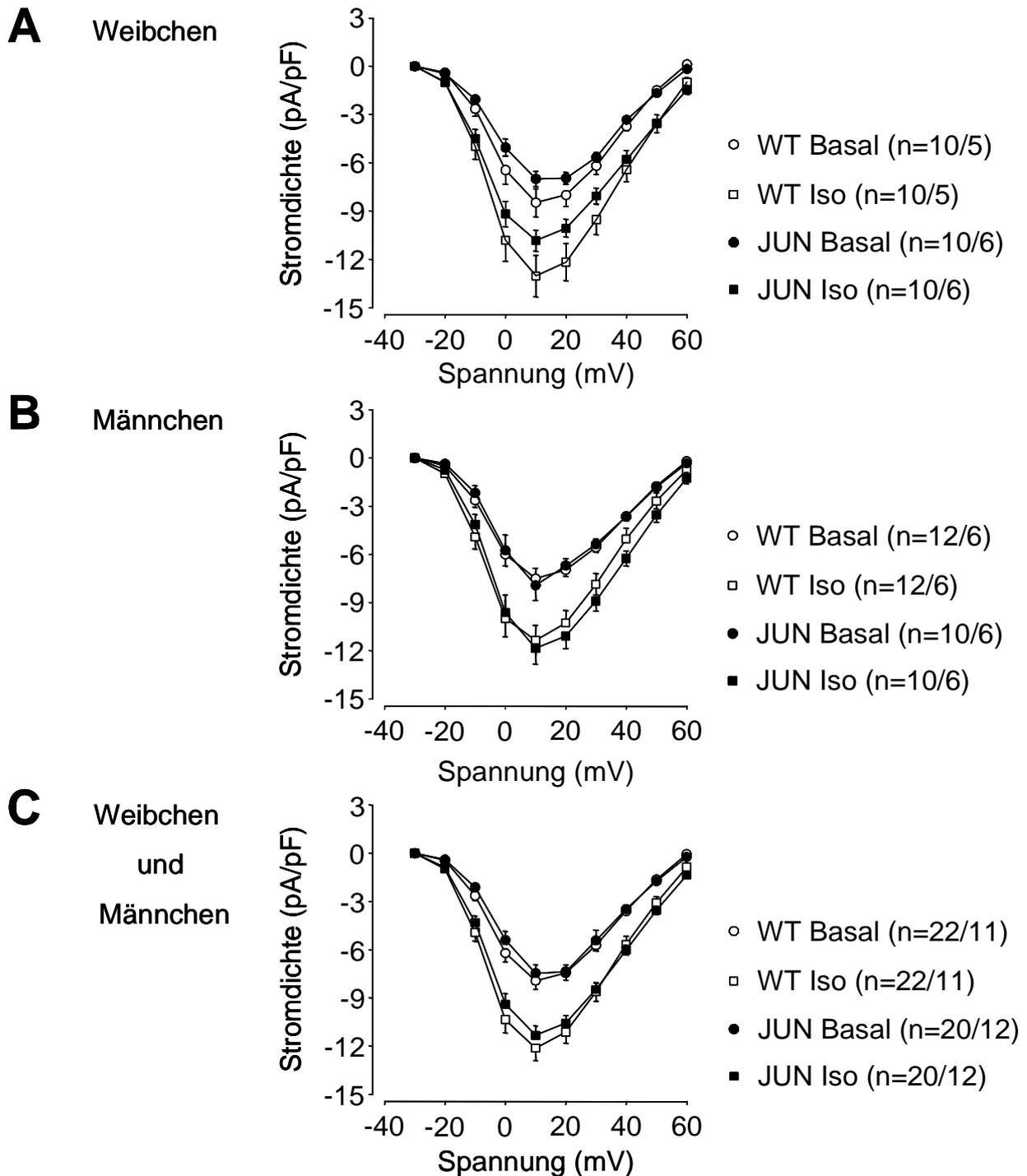


Abb. 4.8.: Strom-Spannungs-Beziehung (IV-Kurve) unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Die Abbildung stellt die IV-Kurve für Wildtyp-(WT)- und Junctin-überexprimierende Zellen (JUN) sowohl unter basalen Bedingungen (Kreise) als auch nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (Quadrate; Iso) dar. Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefaßt (C) dargestellt. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erfolgten alle 10 s Spannungspulse von 200 ms auf Testpotentiale zwischen -30 mV und +60 mV. Die Meßwerte der JUN- und WT-Zellen nach Iso-Zugabe waren von -20 mV bis +60 mV bei Weibchen, Männchen sowie für beide zusammen signifikant verändert im Vergleich zu basalen Werten (nicht dargestellt). n gibt die Anzahl untersuchter Zellen je Tierzahl an.

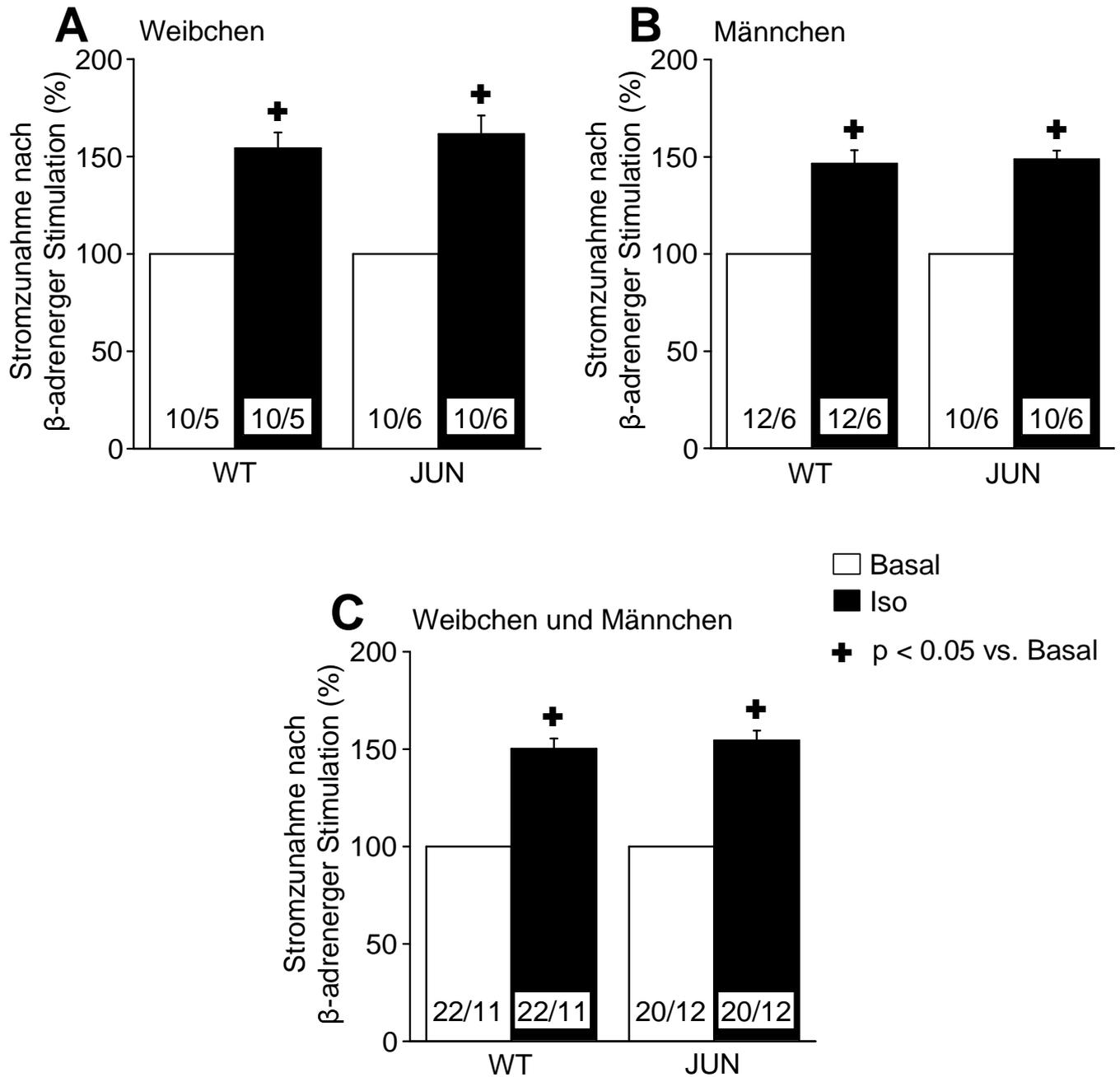


Abb. 4.9.: Prozentuale Stromzunahme durch den L-Typ-Calciumkanal (I_{Ca}) bei maximalem Spitzenstrom (bei +10 mV) nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Die Säulendiagramme stellen prozentual die Stromdichte des I_{Ca} bei +10 mV bezogen auf die basalen Bedingungen (weiße Säule) nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (schwarze Säule; Iso) von Wildtyp-(WT)- und Junctin-überexprimierenden (JUN) Zellen dar. Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefasst (C) dargestellt. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

2.2.2. Inaktivierung

Zur Beschreibung der Kinetik des inaktivierenden Anteils des I_{Ca} bei +10 mV unter Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator (s. Abb. 4.7.) wurden zur Kurvenanpassung zwei Exponentialfunktionen herangezogen.

Die daraus berechneten schnellen (τ_1) und langsamen (τ_2) Inaktivierungszeitkonstanten waren sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation bei JUN-Zellen vergrößert im Vergleich zu WT-Zellen (s. Abb. 4.10.). Bei der geschlechtsspezifischen Aufteilung waren unter basalen Bedingungen sowie nach Zugabe von Isoprenalin beide Inaktivierungszeitenkonstanten τ_1 und τ_2 zwischen JUN- und WT-Zellen der weiblichen Mäuse erhöht (s. Abb. 4.11.). Bei JUN-Zellen der männlichen Mäuse wurden nur die Inaktivierungszeiten der τ_2 unter basalen Bedingungen sowie nach Zugabe von Isoprenalin verzögert (s. Abb. 4.12.). Zusammengefaßt befinden sich die Ergebnisse in Tab. 7.1.

2.2.3. Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeits-Spannungs-Kurven wurden aus den jeweiligen Leitfähigkeitswerten zum gegebenen Testpotential unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin ermittelt. Die Anpassung der Kurven erfolgte über eine Boltzmann-Funktion.

Die maximale Leitfähigkeit sowie die Steigung der Kurve waren unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation bei JUN- und WT-Zellen nicht voneinander verschieden. Das Potential der halbmaximalen Leitfähigkeit war nach β -adrenerger Stimulation gleich, wies jedoch unter basalen Bedingungen bei JUN-Mäusen einen höheren Wert gegenüber WT-Zellen auf (s. Tab. 4.3.). Es lag kein Unterschied zwischen Zellen der weiblichen und männlichen Mäuse vor.

Weibchen und Männchen

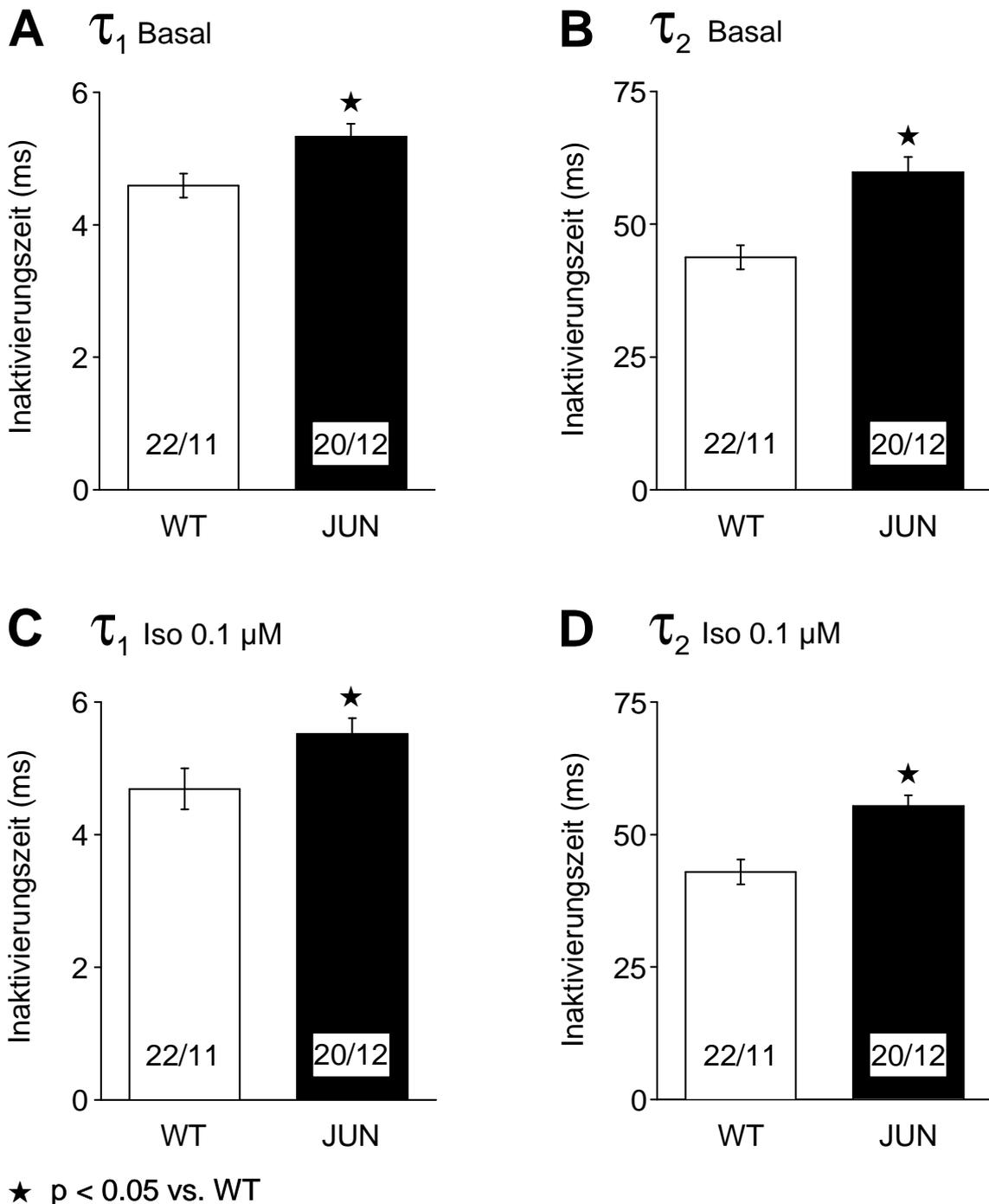


Abb. 4.10.: Schnelle (τ_1) und langsame (τ_2) Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Die Säulendiagramme stellen die Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 des I_{Ca} bei +10 mV unter basalen Bedingungen (A und B) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (C und D; Iso) für Wildtyp-(WT)- und Junctin-überexprimierenden Zellen (JUN) der weiblichen und männlichen Mäuse dar. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

Weibchen

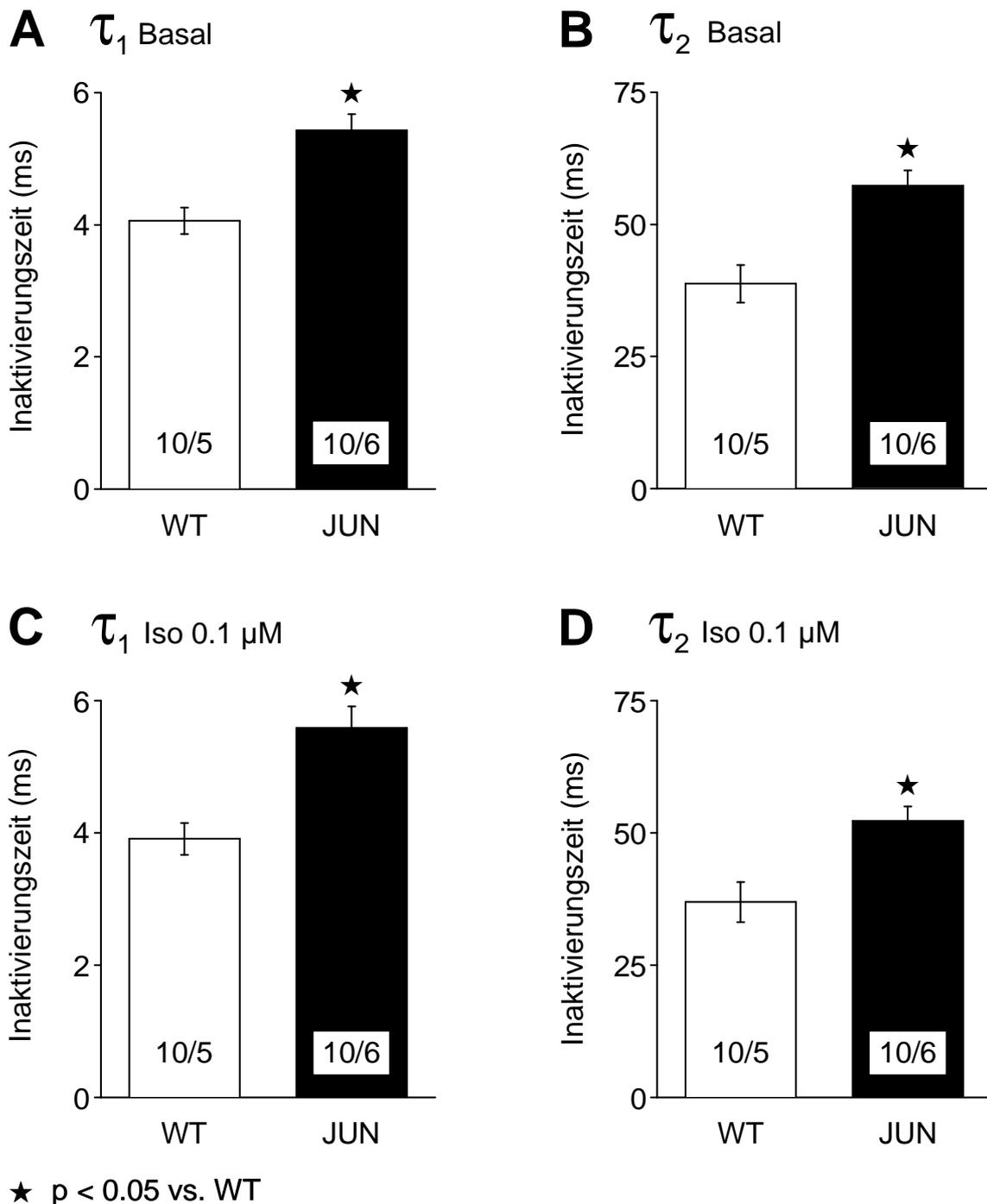


Abb. 4.11.: Schnelle (τ_1) und langsame (τ_2) Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin (Iso)

Die Säulendiagramme stellen die Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 des I_{Ca} bei +10 mV unter basalen Bedingungen (A und B) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (C und D; Iso) nur für Wildtyp-(WT)- und Junctin-überexprimierende Zellen (JUN) der weiblichen Mäuse dar. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

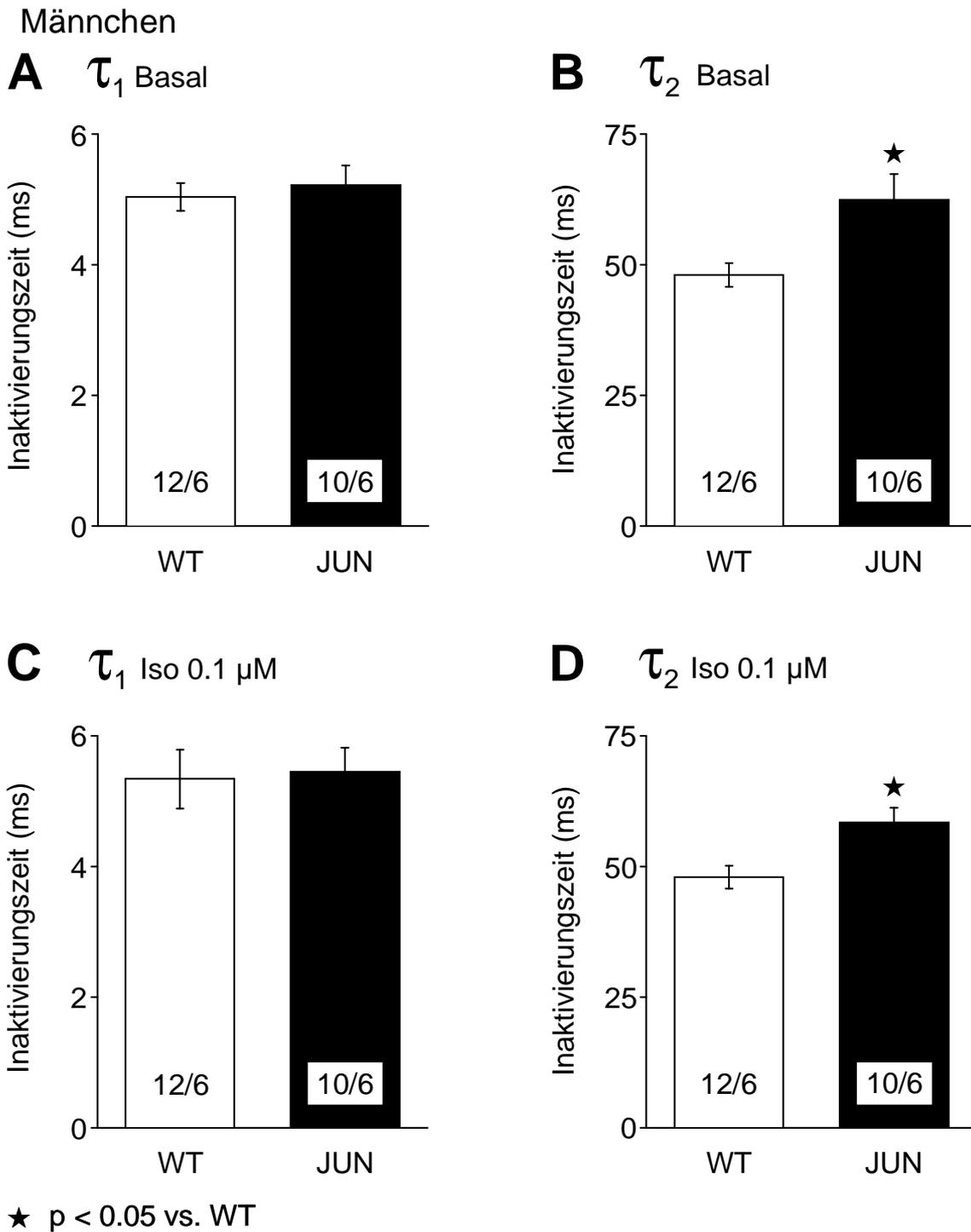


Abb. 4.12.: Schnelle (τ_1) und langsame (τ_2) Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Die Säulendiagramme stellen die Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 des I_{Ca} bei +10 mV unter basalen Bedingungen (A und B) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μM Isoprenalin (C und D; Iso) nur für Wildtyp-(WT)- und Junctin-überexprimierende Zellen (JUN) der männlichen Mäuse dar. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

Tab. 4.3.: Auswertung der Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung

Dargestellt sind die Ergebnisse der Interpolation an die Boltzmann-Funktion. Angegeben sind die maximale Leitfähigkeit in Bezug auf die Zellkapazität (G_{\max}), das Potential der halbmaximalen Leitfähigkeit ($V_{1/2}$) und der Steigungswert der Kurve jeweils für die Registrierungen unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (Iso) für Wildtyp-(WT)- und Junctin-überexprimierende (JUN) Zellen. n gibt die Anzahl untersuchter Zellen je Tierzahl an.

Weibchen und Männchen:

	WT _{Basal} (n = 22/11)	JUN _{Basal} (n = 20/12)	WT _{Iso} (n = 22/11)	JUN _{Iso} (n = 20/12)
G_{\max} (S/F)	131 \pm 7.3	128 \pm 7.0	167 \pm 9.8 ⁺	155 \pm 7.1 ⁺
$V_{1/2}$ (mV)	-3.4 \pm 0.7	-0.2 \pm 0.7 [★]	-5.0 \pm 0.7 ⁺	-4.2 \pm 0.6 ⁺
Steigungswert (mV)	6.0 \pm 0.2	6.3 \pm 0.2	5.6 \pm 0.2 ⁺	5.9 \pm 0.2 ⁺

Weibchen:

	WT _{Basal} (n = 10/5)	JUN _{Basal} (n = 10/6)	WT _{Iso} (n = 10/5)	JUN _{Iso} (n = 10/6)
G_{\max} (S/F)	139 \pm 12	122 \pm 6.3	178 \pm 16 ⁺	147.2 \pm 8.1 ⁺
$V_{1/2}$ (mV)	-3.7 \pm 1.2	-0.3 \pm 0.9 [★]	-4.2 \pm 0.9	-4.9 \pm 0.8 ⁺
Steigungswert (mV)	6.0 \pm 0.2	6.5 \pm 0.2	5.8 \pm 0.2	5.9 \pm 0.2 ⁺

Männchen:

	WT _{Basal} (n = 12/6)	JUN _{Basal} (n = 10/6)	WT _{Iso} (n = 12/6)	JUN _{Iso} (n = 10/6)
G_{\max} (S/F)	125 \pm 8.6	135 \pm 13	156 \pm 11 ⁺	163 \pm 12 ⁺
$V_{1/2}$ (mV)	-3.1 \pm 0.8	-0.1 \pm 1.0 [★]	-5.7 \pm 1.0 ⁺	-3.5 \pm 0.9 ⁺
Steigungswert (mV)	6.1 \pm 0.3	5.9 \pm 0.2	5.4 \pm 0.2 ⁺	5.8 \pm 0.2 ⁺

★ p<0.05 vs. WT; ⁺ p<0.05 vs. Basal

2.3. Einfluß von Barium-Ionen als Ladungsträger

Zwecks näherer Untersuchung der vergrößerten Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und zur Ausschaltung der calciumabhängigen Inaktivierung des L-Typ-Calciumkanals wurden Versuche mit Ba^{2+} anstelle des sonst verwendeten Ca^{2+} als Ladungsträger durchgeführt, wobei in der extrazellulären Lösung Ca^{2+} in äquimolarer Menge durch Ba^{2+} (2 mM) ersetzt wurde (s. Abb. 4.13.).

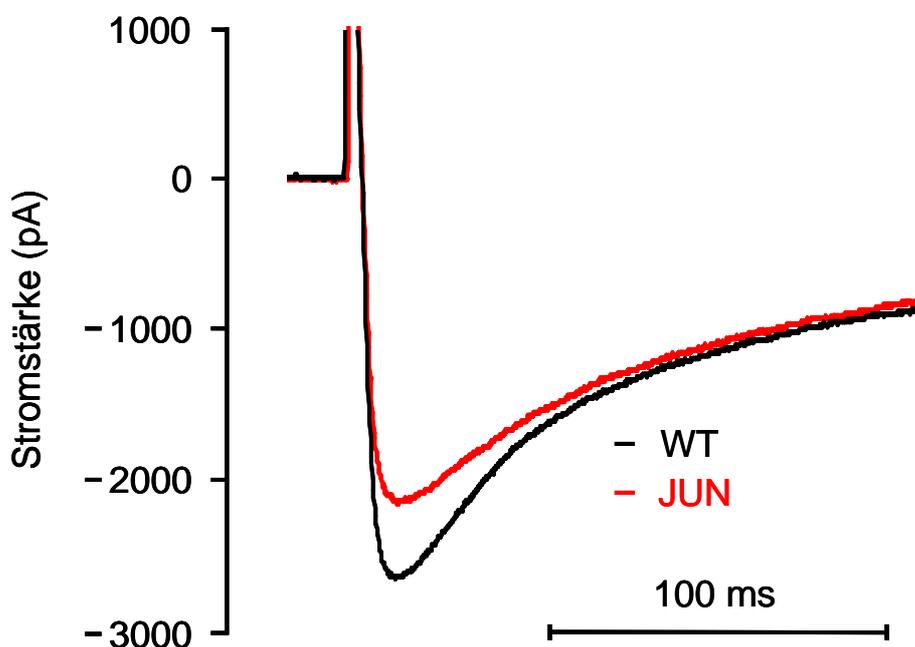


Abb. 4.13.: Originalregistrierung des Bariumstromes (I_{Ba}) durch den L-Typ-Calciumkanal unter Verwendung von Ba^{2+} als Ladungsträger

Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen des I_{Ba} durch den L-Typ-Calciumkanal für Wildtyp-(WT)- und Junctin-(JUN)-überexprimierende Zellen unter Verwendung von Barium-Ionen als Ladungsträger. Die Zellkapazitäten dieser Zellen waren vergleichbar. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erfolgte alle 10 s ein Spannungspuls von 200 ms auf +10 mV. Auffällig ist die verlängerte Inaktivierungszeit des I_{Ba} und geringere Stromamplitude bei Junctin-überexprimierenden Zellen (Experimentnummern: WT-021202 id.2/2002, JUN-021128 id.2/2002; x-Achse = Stromstärke in pA, y-Achse = Zeit in ms).

2.3.1. Strom-Spannungs-Beziehung

Die Erstellung der IV-Kurve erfolgte ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV nach Zugabe depolarisierender Testpulse auf -30 mV bis +60 mV. Die Stromdichte als Quotient aus maximaler Stromamplitude und Zellkapazität wurde bei entsprechenden Testpotentialen zwischen -30 mV und +60 mV bestimmt.

Die ermittelten Stromdichten waren unter Verwendung von Ba^{2+} -Ionen als Ladungsträger bei Testpulsen +10 mV und +30 mV für JUN-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen verringert (s. Abb. 4.14.). Nach geschlechtsspezifischer Differenzierung zeigten nur JUN-Zellen der männlichen Mäuse die erniedrigte Stromdichte, wobei JUN-Zellen der weiblichen Mäuse keinen Unterschied zu WT-Zellen aufwiesen (s. Abb. 4.14.).

2.3.2. Inaktivierung

Die Inaktivierungszeit des Bariumstromes (I_{Ba}) lässt sich mathematisch im Gegensatz zum Calciumkanalstrom (I_{Ca}) mit nur einer Exponentialfunktion beschreiben. Dabei war die Inaktivierungszeitkonstante Tau (τ) bei +10 mV für JUN-Zellen verlängert im Vergleich zu WT-Mäusen (s. Abb. 4.16.). Dies galt sowohl für Zellen der männlichen als auch der weiblichen Mäuse (s. Abb. 4.16.). Zusammengefasst befinden sich die Ergebnisse in Tab. 7.1.

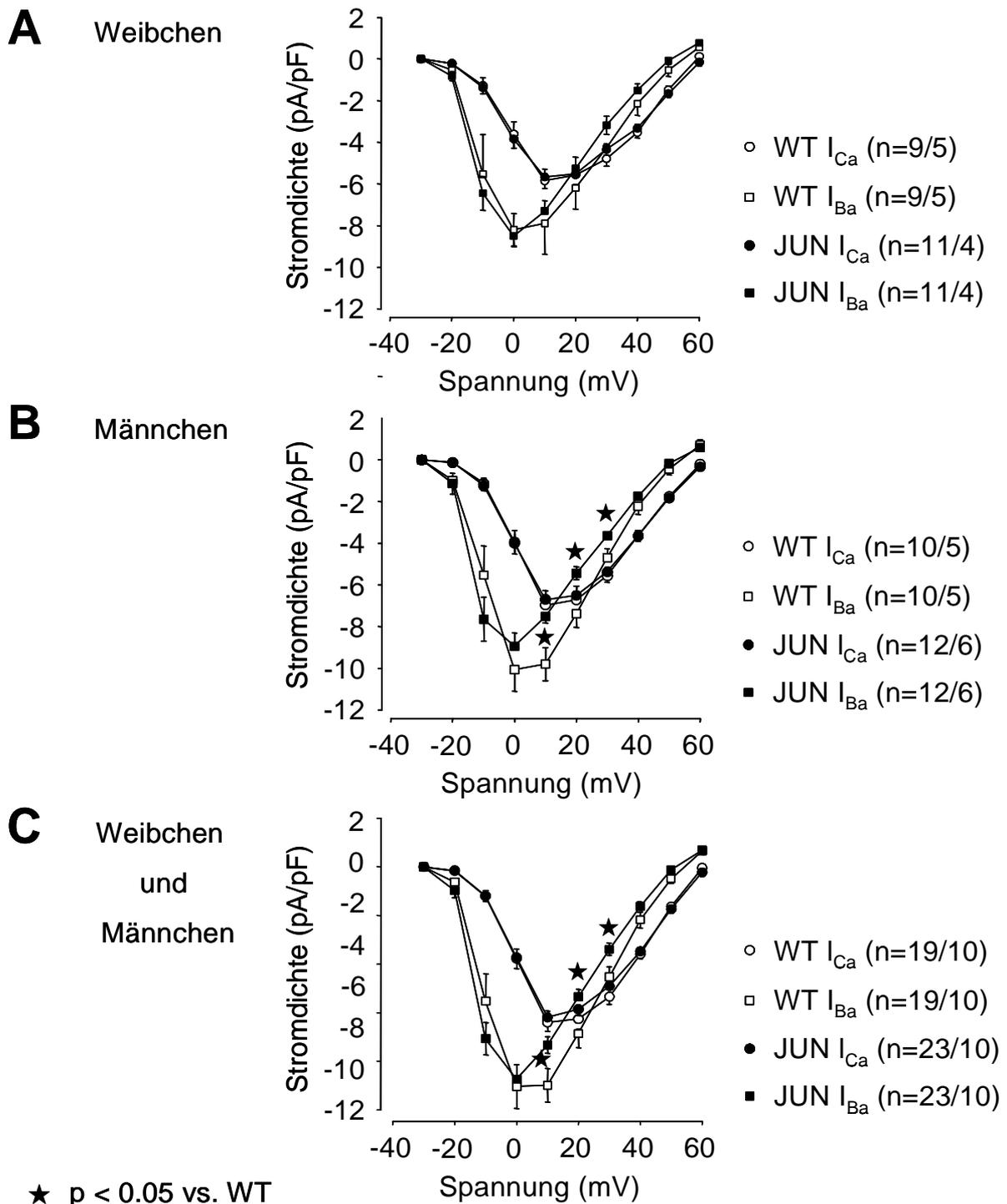
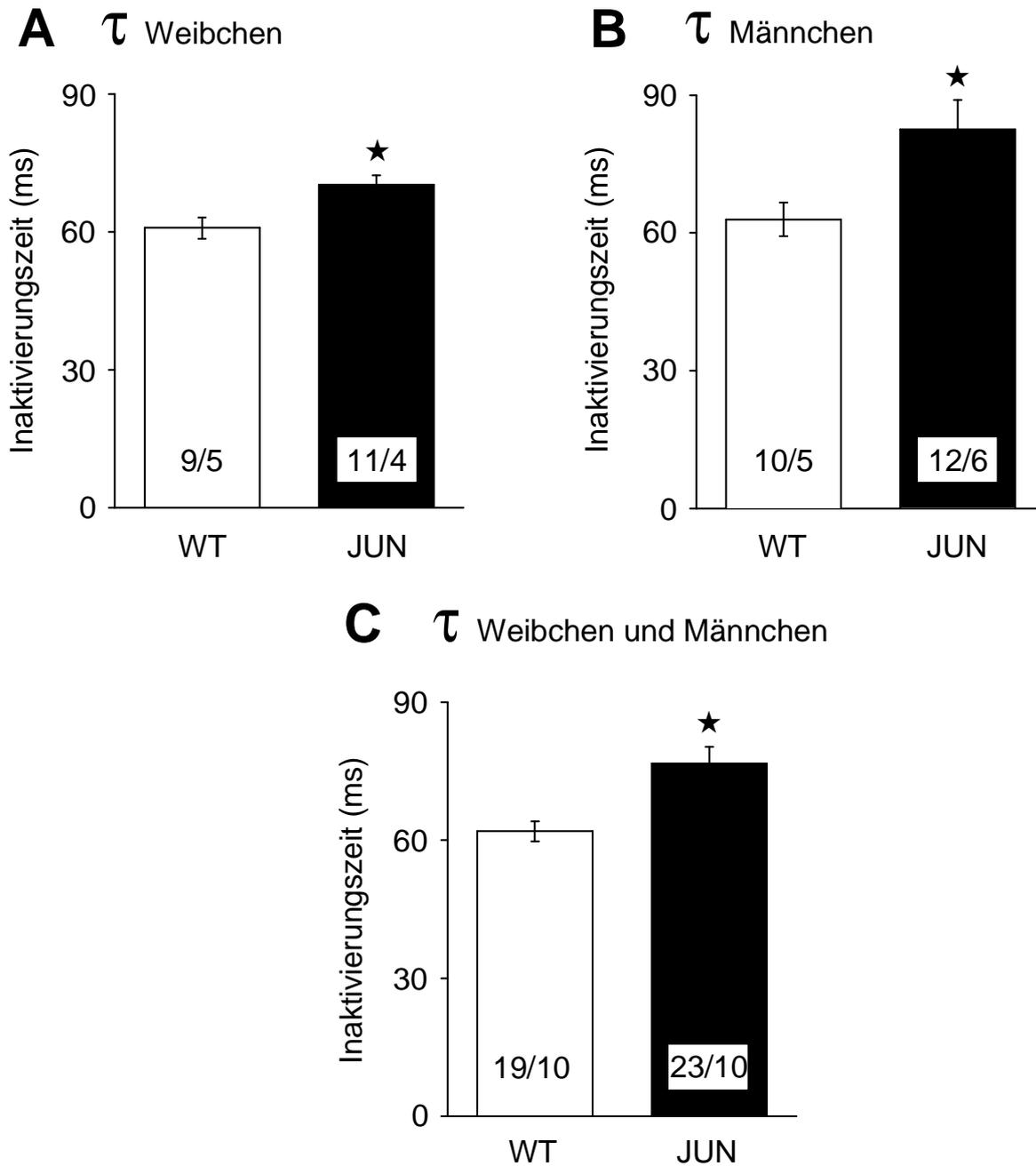


Abb. 4.14.: Vergleich der Strom-Spannungs-Beziehungen (IV-Kurven) mit Ca^{2+} bzw. Ba^{2+} als Ladungsträger

Dargestellt ist die IV-Kurve für Wildtyp-(WT)- und Junctin-überexprimierende Zellen (JUN). Einerseits wurde der Ca^{2+} -Strom (I_{Ca} ; Kreise) sowie andererseits der Ba^{2+} -Strom (I_{Ba} ; Quadrate) durch den L-Typ-Calciumkanal gemessen. Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefasst (C) dargestellt. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erfolgten alle 10 s Spannungspulse von 200 ms auf Testpotentiale zwischen -30 mV und +60 mV. Der entsprechende Strom wurde registriert; n gibt vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.



★ $p < 0.05$ vs. WT

Abb. 4.16.: Inaktivierungszeitkonstante τ des Bariumstromes (I_{Ba}) durch den L-Typ-Calciumkanal bei +10 mV

Die Säulendiagramme stellen die Inaktivierungszeitkonstante τ des I_{Ba} durch den L-Typ-Calciumkanal für Wildtyp-(WT)- und Junctin-überexprimierende Zellen (JUN) dar. Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefaßt (C) dargestellt. Die Inaktivierung des I_{Ba} läßt sich mit nur einer Inaktivierungszeitkonstante beschreiben. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

2.4. Einfluß von BAPTA als Ca^{2+} -Chelator

Unter Verwendung von BAPTA als stärkerem Ca^{2+} -Chelator als EGTA (Smith et al. 1984, Stern 1992) werden die Ca^{2+} -Ionen, die durch den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal einströmen, schneller und wirksamer komplexiert.

2.4.1. Strom-Spannungs-Beziehung

Die Messung des I_{Ca} erfolgte unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μM Isoprenalin (s. Abb. 4.17.). Unter basalen Bedingungen war die ermittelte Stromdichte der JUN-Zellen bei den Spannungssprüngen zwischen 0 mV und +30 mV im Vergleich zu WT-Zellen vergrößert. Bei der geschlechtspezifischen Analyse zeigte sich die vergrößerte Stromdichte nur bei JUN-Zellen der weiblichen Mäuse zwischen -20 mV bis +50 mV. Bei JUN-Zellen der männlichen Mäuse kam es zu keinen derartigen Veränderungen (s. Abb. 4.18.). Auch nach Isoprenalin-Gabe war die Stromdichte der JUN-Zellen mit Spannungssprüngen zwischen -10 mV und +20 mV im Vergleich zu WT-Zellen erhöht. Wiederum wiesen JUN-Zellen der weiblichen Mäuse eine erhöhte Stromdichte bei den Spannungssprüngen zwischen -20 mV und +40 mV gegenüber den WT-Zellen der weiblichen Mäuse auf. Bei JUN-Zellen der männlichen Mäuse dagegen war die Stromdichte bei -20 mV gegenüber den WT-Zellen der männlichen Mäuse vermindert (s. Abb. 4.18.).

Der maximale Spitzenstrom der IV-Kurve war unter basalen Bedingungen zwischen JUN- und WT-Zellen, bzw. zwischen Zellen der weiblichen und männlichen Mäuse, unterschiedlich. Überwiegend lag er bei +10 mV.

2.4.2. Inaktivierung

Zur Beschreibung der Kinetik des inaktivierenden Anteils des I_{Ca} bei +10 mV unter Verwendung von BAPTA als Ca^{2+} -Chelator wurde zur Kurvenanpassung eine Exponentialfunktion herangezogen. Dabei war die Inaktivierungszeitkonstante Tau (τ) unter basalen Bedingungen und nach Zugabe von Isoprenalin zwischen JUN- und WT-Zellen gleich. Nach der geschlechtsspezifischen Differenzierung war nur bei JUN-Zellen der männlichen Mäuse die Inaktivierungszeitkonstante τ nach β -adrenerger Stimulation schneller als bei WT-Zellen der männlichen Mäuse (s. Abb. 4.19.) Zusammengefaßt befinden sich die Ergebnisse in Tab. 7.1.

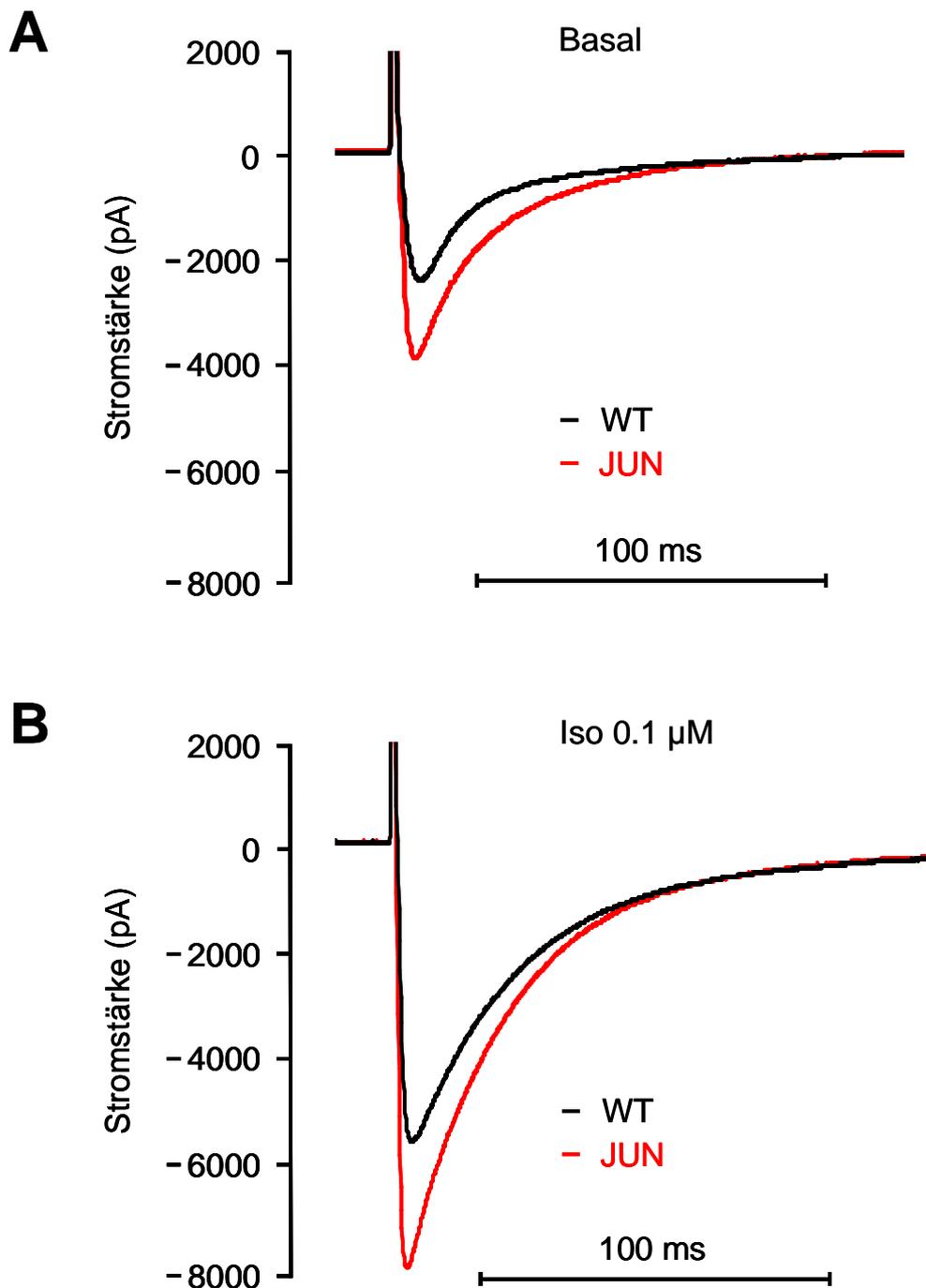


Abb. 4.17.: Originalregistrierung des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) unter Verwendung von BAPTA als Ca^{2+} -Chelator sowohl für basale Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen des I_{Ca} für Wildtyp-(WT)- und Junctin-überexprimierende Zellen (JUN) unter Verwendung von BAPTA als Ca^{2+} -Chelator sowohl für basale Bedingungen (A) als auch nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (B; Iso). Die Zellkapazitäten der Zellen waren vergleichbar. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erfolgte alle 10 s ein Spannungspuls von 200 ms auf +10 mV. Auffällig sind die größeren Stromamplituden unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation bei Junctin-überexprimierenden Zellen (Experimentnummern: WT-020905 id.4/2002, JUN-020828 id.2/2002; x-Achse = Stromstärke in pA, y-Achse = Zeit in ms).

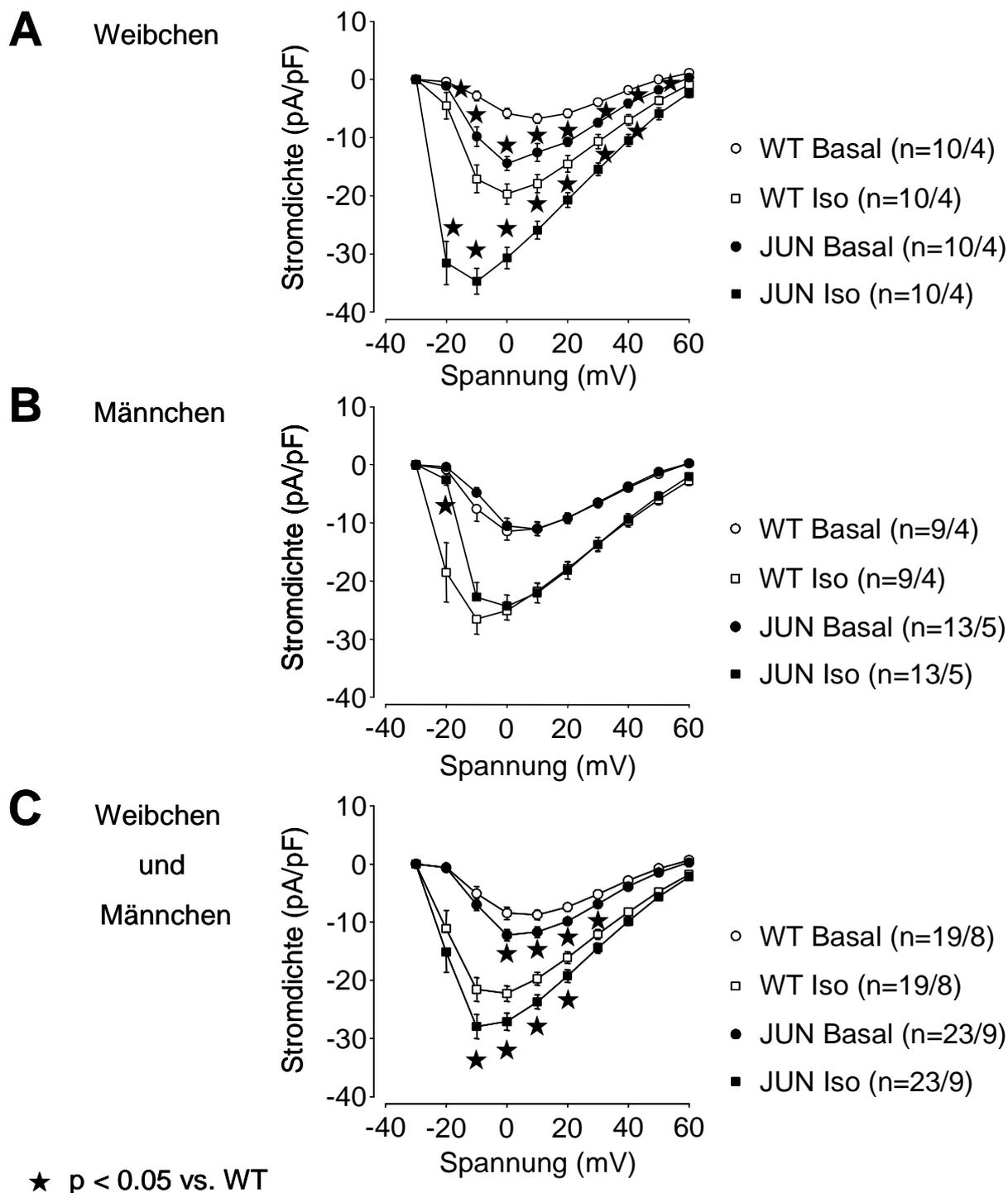


Abb. 4.18.: Strom-Spannungs-Beziehung (IV-Kurve) sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Dargestellt ist die IV-Kurve für Wildtyp-(WT)- und Junctin-überexprimierende Zellen (JUN) unter basalen Bedingungen (Kreise) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (Quadrate; Iso). Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefaßt (C) dargestellt. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erfolgten alle 10 s Spannungspulse von 200 ms auf Testpotentiale zwischen -30 mV und +60 mV. Die Meßwerte der JUN- und WT-Zellen nach Isoprenalin-Zugabe waren von -20 mV bis +60 mV bei Weibchen, Männchen sowie für beide zusammen signifikant verändert im Vergleich zu basalen Werten (nicht dargestellt). n gibt die Anzahl untersuchter Zellen je Tierzahl an.

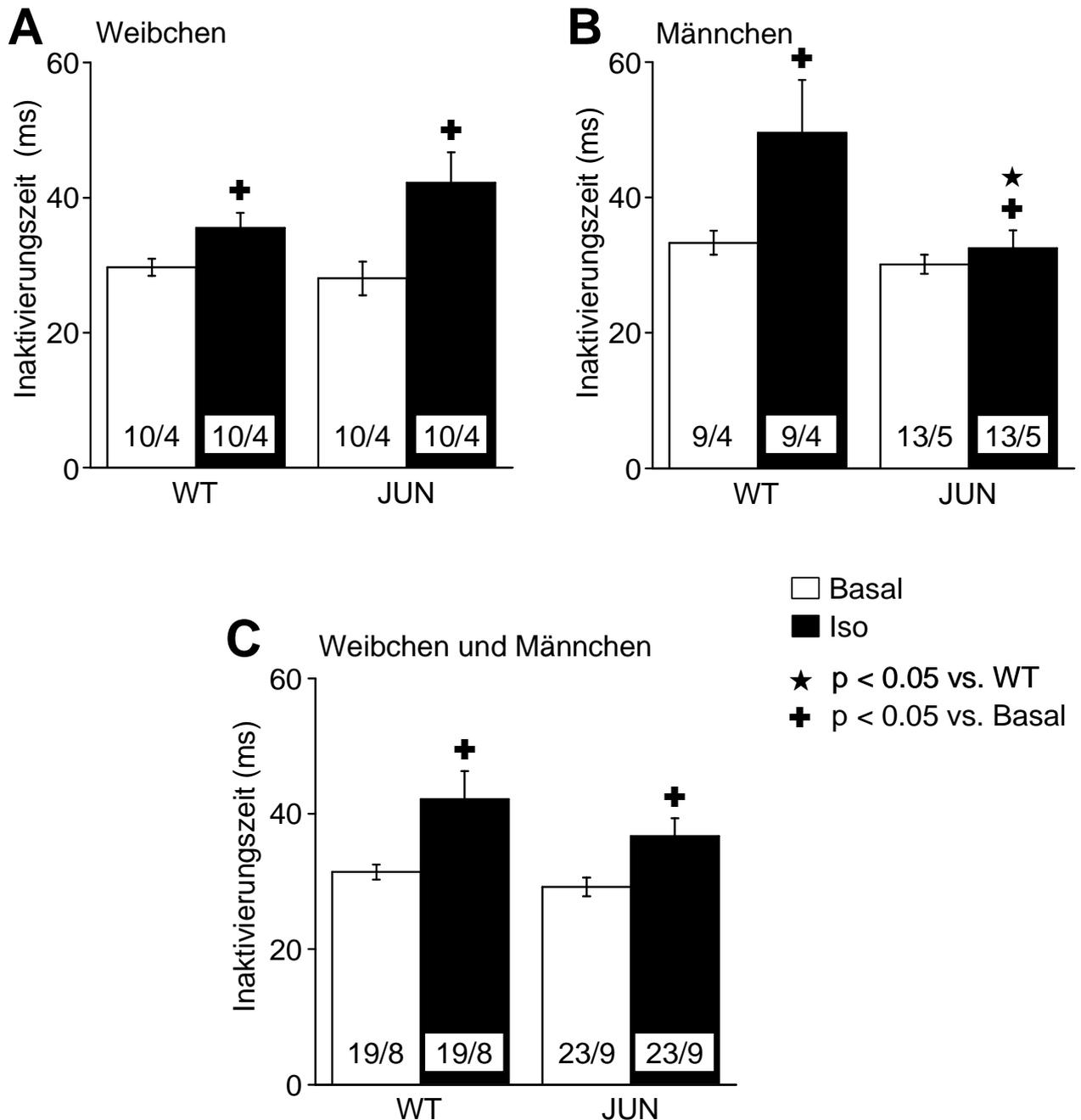


Abb. 4.19.: Inaktivierungszeitkonstante (τ) des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Dargestellt ist die Inaktivierungszeitkonstante τ des I_{Ca} von Wildtyp-(WT)- und Junctin-überexprimierenden (JUN) Zellen unter basalen Bedingungen (weiße Säule) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (schwarze Säule; Iso). Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefaßt (C) dargestellt. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

3. Untersuchungen an Mäusen, die eine Doppelmutante der SR-Ca²⁺-ATPase 2a im Herzen überexprimieren

3.1. Körpergewicht, Herzgewicht, relatives Herzgewicht und Zellkapazität

Transgene Mäuse, die eine Doppelmutante (I235F und T446I) der SR-Ca²⁺-ATPase 2a herzspezifisch überexprimierten (SERCA 2a), waren äußerlich nicht von WT-Mäusen unterscheidbar. Die Mäuse zeigten weder Verhaltensauffälligkeiten noch eine erhöhte Mortalitätsrate. Körpergewicht, Herzgewicht und das daraus resultierende relative Herzgewicht (Herzgewicht/Körpergewicht) waren bei SERCA 2a- im Vergleich zu WT-Mäusen unverändert (s. Tab. 7.2.). Bei weiblichen und männlichen Mäusen wurde kein Unterschied bezüglich des relativen Herzgewichts gemessen. Außerdem war die Zellkapazität als Maß für die Zellgröße bei SERCA 2a- und WT-Zellen gleich. Dies galt sowohl für Zellen der männlichen wie auch der weiblichen Mäuse (s. Tab. 7.2.).

3.2. Einfluß von EGTA als Ca²⁺-Chelator

3.2.1. Strom-Spannungs-Beziehung

Die Erstellung der IV-Kurve erfolgte ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV nach Zugabe depolarisierender Testpulse auf -30 mV bis +60 mV. Die Stromdichte als Quotient aus maximaler Stromamplitude und Zellkapazität wurde bei entsprechenden Testpotentialen zwischen -30 mV und +60 mV bestimmt. Die Messung des I_{Ca} erfolgte unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (s. Abb. 4.20.).

Die Stromdichte war unter basalen Bedingungen und nach Isoprenalin-Zugabe im Bereich der Testpotentiale zwischen -20 mV und +40 mV bei SERCA 2a-Zellen gegenüber WT-Zellen verringert. Nach der geschlechtsspezifischen Aufteilung war die geringere Stromdichte sowohl bei SERCA 2a-Zellen der weiblichen als auch der männlichen Mäuse im Vergleich zu WT-Zellen festgestellt (s. Abb. 4.21.).

Der maximale Spitzenstrom der IV-Kurve lag unter basalen Bedingungen für SERCA 2a- und WT-Mäusen bei +10 mV. Bei diesem Potential war die prozentuale Stromzunahme nach Zugabe von Isoprenalin zwischen SERCA 2a- und WT-Zellen gleich (s. Abb. 4.22.). Dies galt gleich für Zellen der weiblichen und männlichen Mäuse (s. Abb. 4.22.).

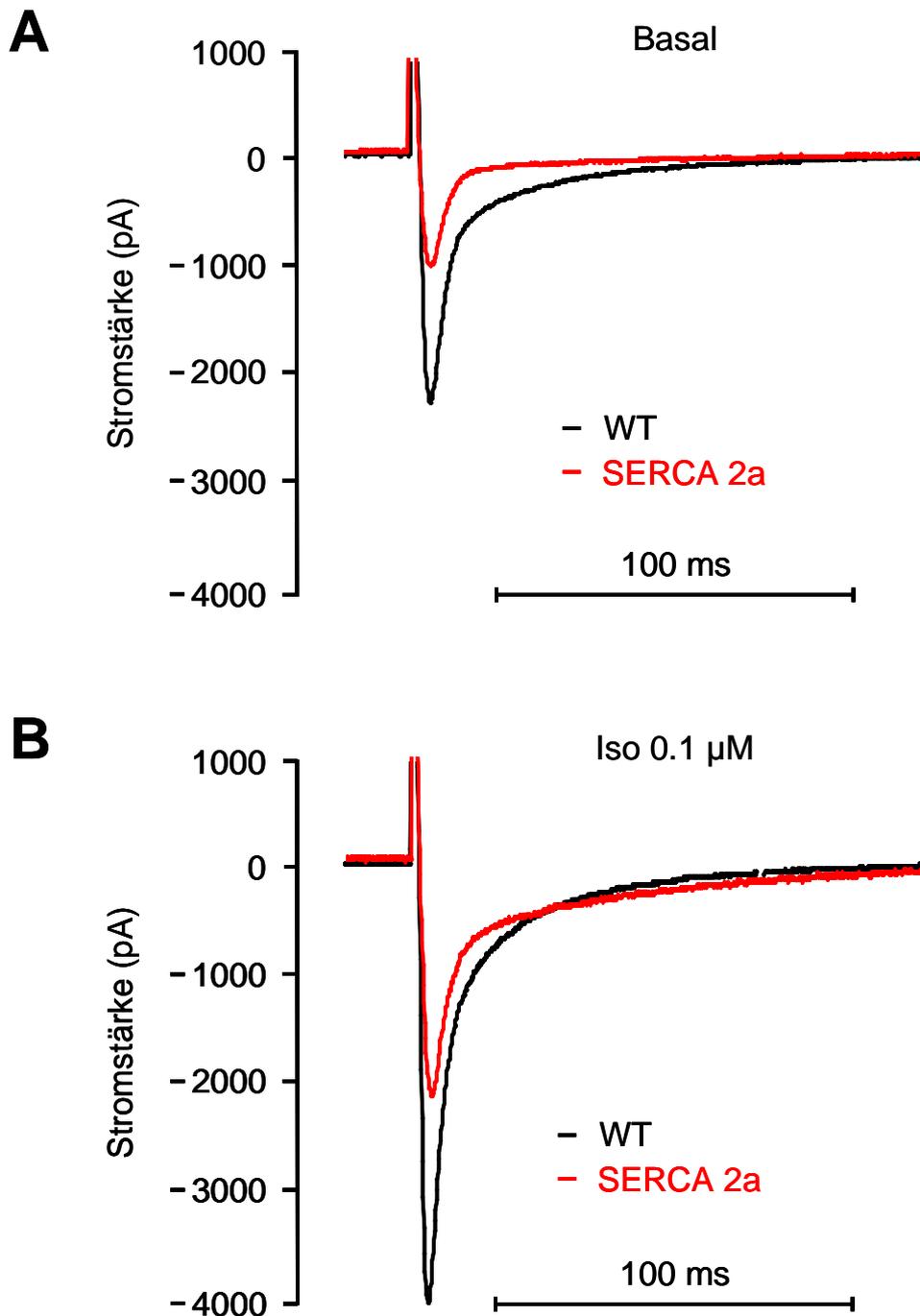


Abb. 4.20.: Originalregistrierung des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) unter Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator sowohl für basale Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen des I_{Ca} für Wildtyp-(WT)- und SERCA2a-überexprimierte Zellen unter Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator für basale Bedingungen (A) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (B; Iso). Die Zellkapazitäten dieser Zellen waren vergleichbar. Auffällig sind die geringeren Stromamplituden bei den SERCA 2a-Zellen unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation (Experimentnummern: WT-020604 id.5/2002, SERCA-030123 id.5/2003; x-Achse = Stromstärke in pA, y-Achse = Zeit in ms).

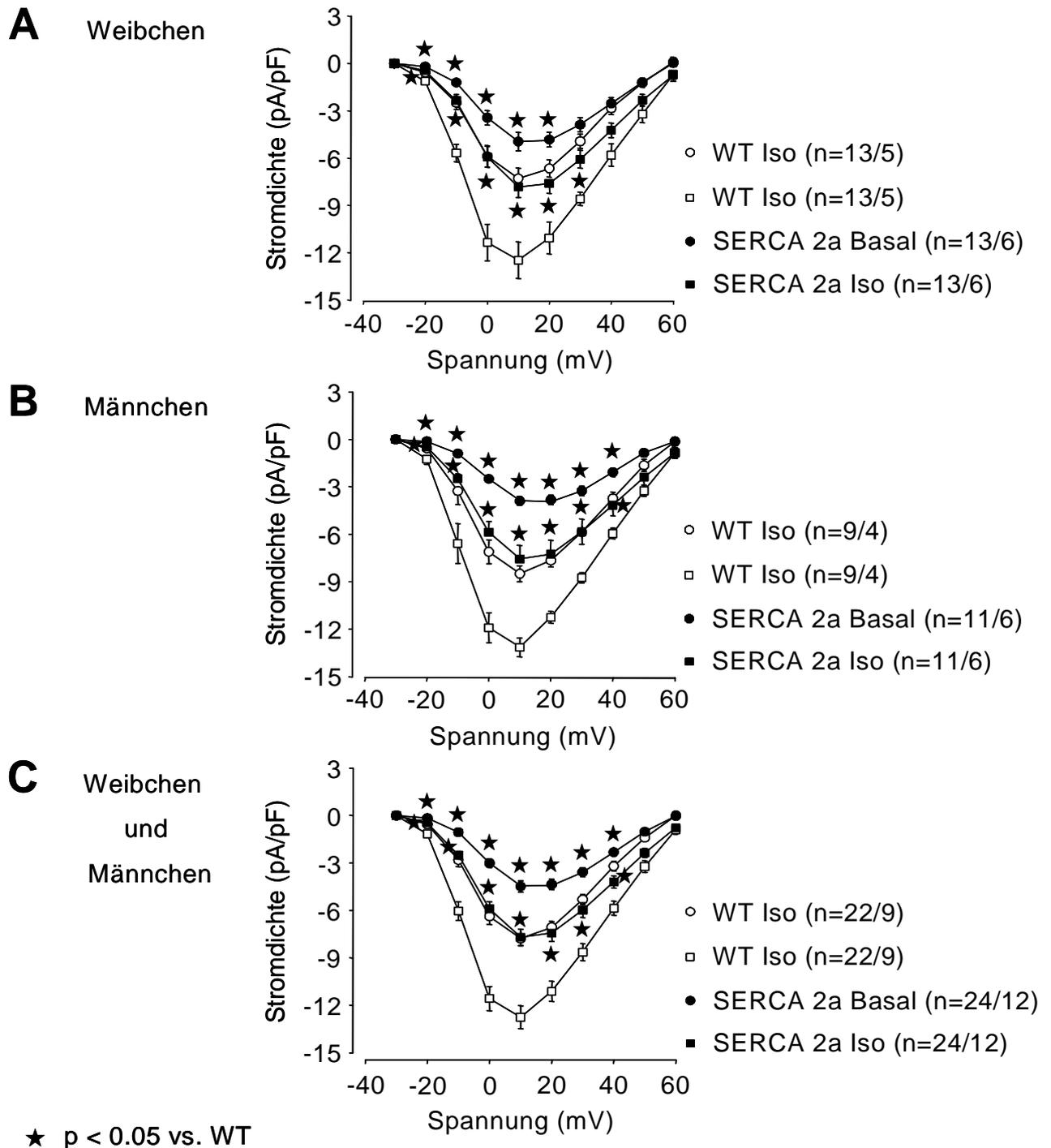


Abb. 4.21.: Strom-Spannungs-Beziehung (IV-Kurve) sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Dargestellt ist die IV-Kurve für Wildtyp-(WT)- und SERCA 2a-überexprimierende Zellen sowohl unter basalen Bedingungen (Kreise) als auch nach β -adrenerger Stimulation mit $0.1 \mu\text{M}$ Isoprenalin (Quadrate; Iso). Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefaßt (C) dargestellt. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erfolgten alle 10 s Spannungspulse von 200 ms auf Testpotentiale zwischen -30 mV und $+60 \text{ mV}$. Die Meßwerte der SERCA 2a- und WT-Zellen nach Isoprenalin-Zugabe waren von -20 mV bis $+60 \text{ mV}$ bei Weibchen, Männchen sowie für beide zusammen signifikant verändert im Vergleich zu basalen Werten (nicht dargestellt). n gibt die Anzahl untersuchter Zellen je Tierzahl an.

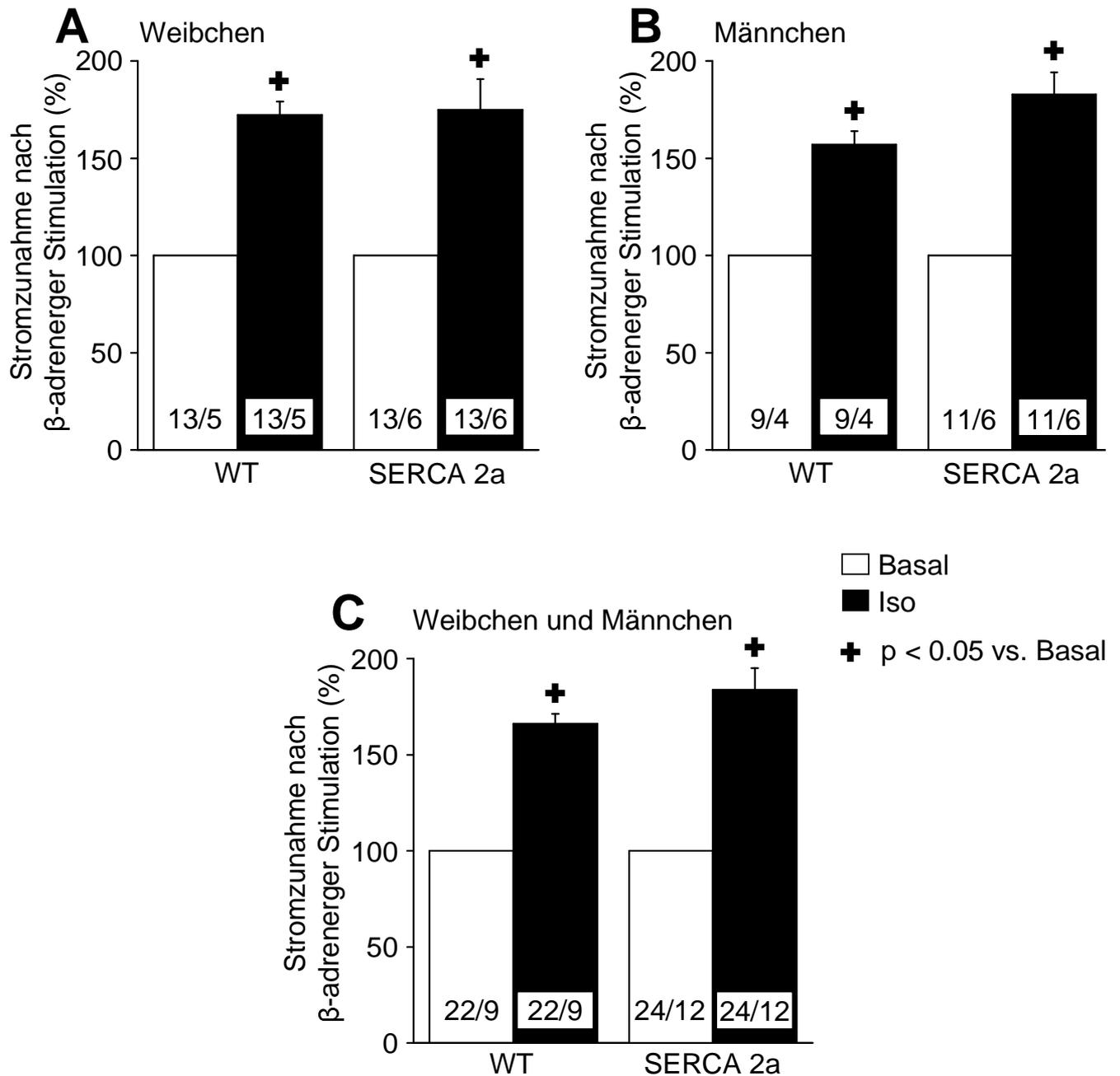


Abb. 4.22.: Prozentuale Stromzunahme durch den L-Typ-Calciumkanals (I_{Ca}) bei maximalem Spitzenstrom (bei +10 mV) nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Die Säulendiagramme stellen prozentual die Stromdichte des I_{Ca} bei +10 mV bezogen auf die basalen Bedingungen (weiße Säule) nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (schwarze Säule; Iso) dar. Untersucht wurden Wildtyp-(WT)- und SERCA 2a-überexprimierende Zellen. Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefasst (C) dargestellt. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

3.2.2. Inaktivierung

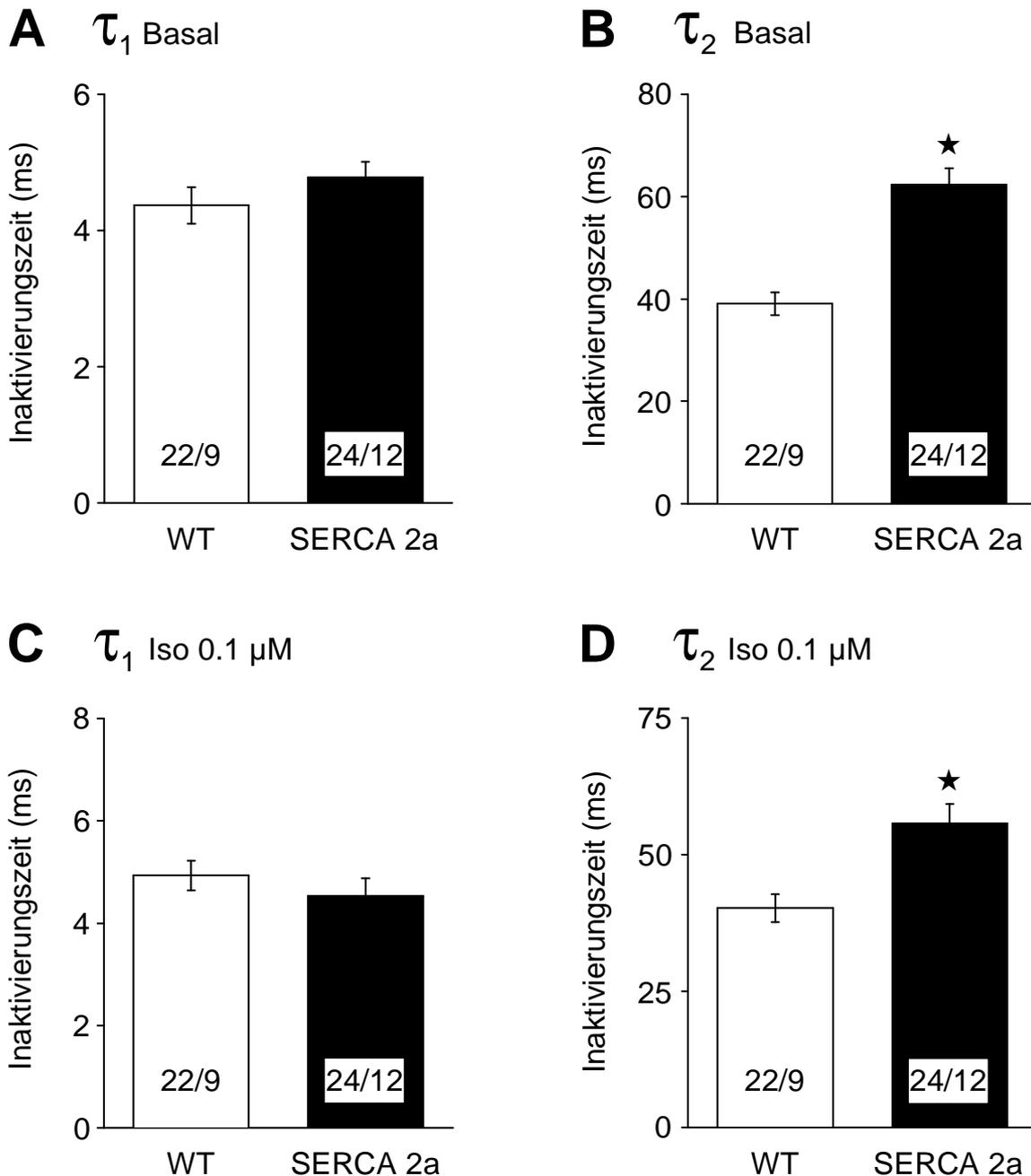
Der inaktivierende Anteil des I_{Ca} wurde bei +10 mV unter Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator mit Hilfe zweier Exponentialfunktionen bestimmt. Von den Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 war nur die Inaktivierungszeit der langsamen τ_2 bei SERCA 2a-Zellen gegenüber WT-Zellen sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Zugabe von Isoprenalin verzögert (s. Abb. 4.23.). Dies galt auch für Zellen der weiblichen und männlichen Mäuse (s. Abb. 4.24., 4.25.). Eine Zusammenfassung findet man in der Tab. 7.2.

3.2.3. Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeits-Spannungs-Kurven wurden aus den jeweiligen Leitfähigkeitswerten zum gegebenen Testpotential unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin ermittelt. Die Anpassung der Kurven erfolgte über eine Boltzmann-Funktion.

Die maximale Leitfähigkeit war sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation bei SERCA 2a-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen verringert. Die Maßzahl für die Steigung der Kurve hingegen war nur nach Zugabe von Isoprenalin in SERCA 2a-Zellen signifikant erhöht. SERCA 2a-Zellen erreichten unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation ein höheres Potential der halbmaximalen Leitfähigkeit als WT-Zellen (s. Tab. 4.4.). Dies galt auch für Zellen der weiblichen und männlichen Mäuse (s. Tab. 4.4.).

Weibchen und Männchen



★ $p < 0.05$ vs. WT

Abb. 4.23.: Schnelle (τ_1) und langsame (τ_2) Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Dargestellt sind die Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 des I_{Ca} bei +10 mV unter basalen Bedingungen (A und B) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (C und D; Iso) für Wildtyp-(WT)- und SERCA 2a-überexprimierende Zellen der weiblichen und männlichen Mäuse. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

Weibchen

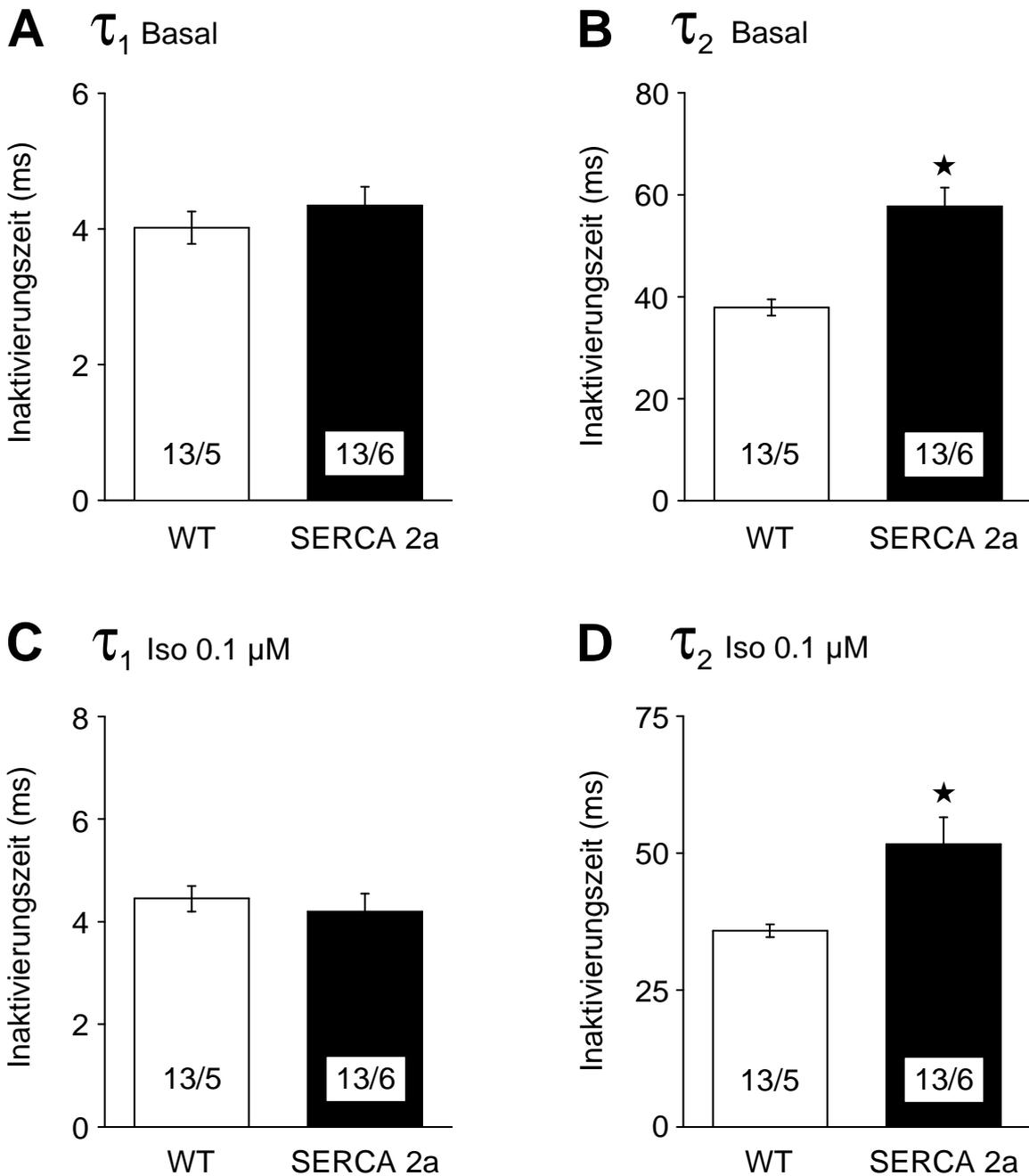
★ $p < 0.05$ vs. WT

Abb. 4.24.: Schnelle (τ_1) und langsame (τ_2) Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Die Säulendiagramme stellen die Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 des I_{Ca} bei +10 mV unter basalen Bedingungen (A und B) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (C und D; Iso) für Wildtyp-(WT)- und SERCA 2a-überexprimierende Zellen der weiblichen Mäuse dar. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

Männchen

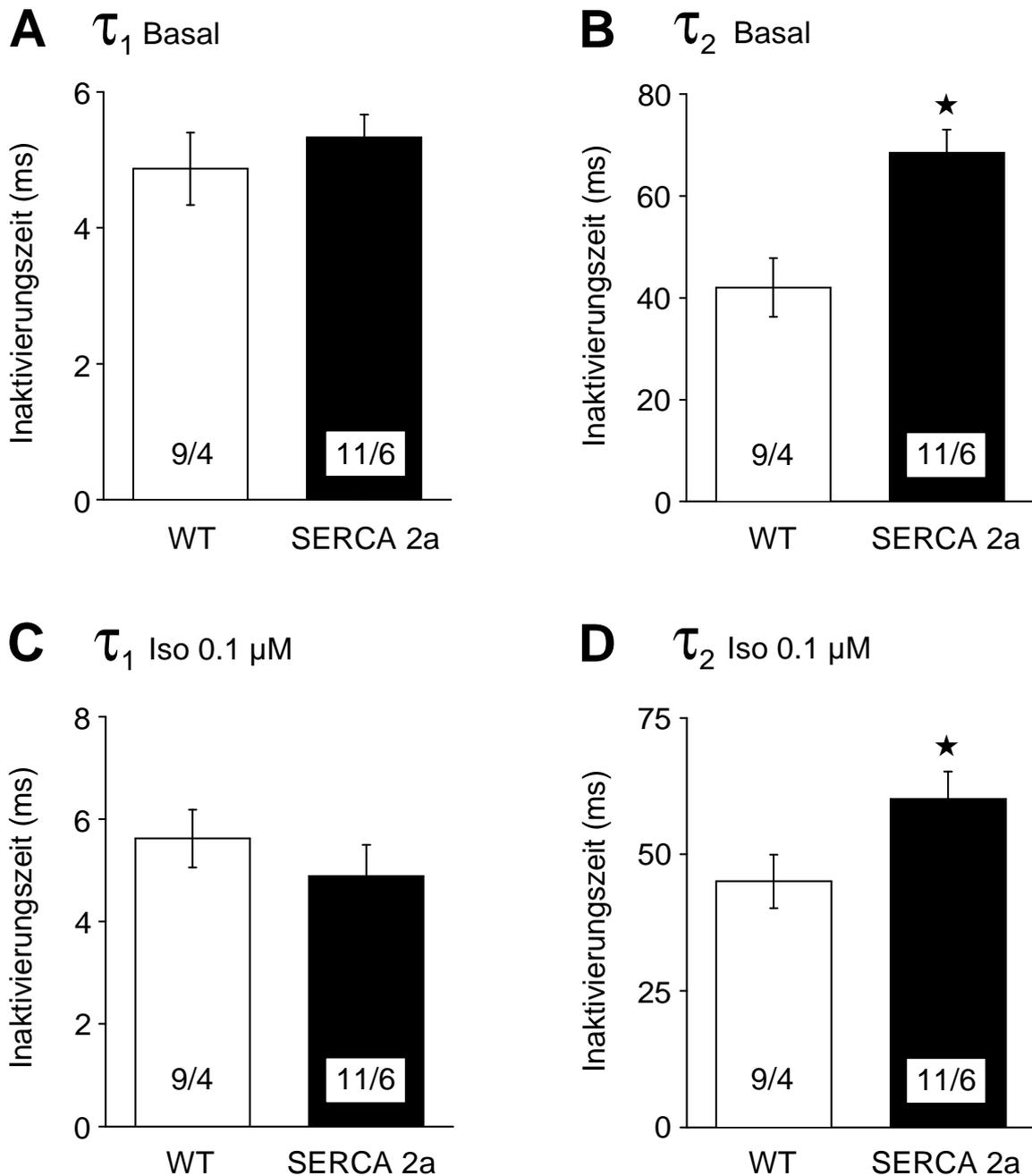
★ $p < 0.05$ vs. WT

Abb. 4.25.: Schnelle (τ_1) und langsame (τ_2) Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Dargestellt sind die Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 des I_{Ca} bei +10 mV unter basalen Bedingungen (A und B) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (C und D; Iso) für Wildtyp-(WT)- und SERCA 2a-überexprimierende Zellen der männlichen Zellen. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

Tab. 4.4.: Auswertung der Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung

Dargestellt sind die Ergebnisse der Interpolation an die Boltzmann-Funktion. Angegeben sind die maximale Leitfähigkeit in Bezug auf die Zellkapazität (G_{\max}), das Potential der halbmaximalen Leitfähigkeit ($V_{1/2}$) und der Steigungswert der Kurve jeweils für die Registrierungen unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μM Isoprenalin (Iso) für Wildtyp-(WT)- und SERCA 2a-überexprimierende Zellen. n gibt die Anzahl untersuchter Zellen je Tierzahl an.

Weibchen und Männchen:

	WT _{Basal} (n = 18/8)	SERCA 2a _{Basal} (n = 23/11)	WT _{Iso} (n = 18/8)	SERCA 2a _{Iso} (n = 23/11)
G_{\max} (S/F)	122 ± 7.5	74 ± 5.7 [★]	164 ± 11 [‡]	105 ± 7.0 ^{★ ‡}
$V_{1/2}$ (mV)	-2.7 ± 0.7	0.4 ± 0.6 [★]	-6.2 ± 0.6 [‡]	6.0 ± 0.9 ^{★ ‡}
Steigungswert (mV)	5.7 ± 0.2	6.1 ± 0.2	5.2 ± 0.2 [‡]	6.0 ± 0.2 [★]

Weibchen:

	WT _{Basal} (n = 13/5)	SERCA 2a _{Basal} (n = 12/5)	WT _{Iso} (n = 13/5)	SERCA 2a _{Iso} (n = 12/5)
G_{\max} (S/F)	115 ± 10	80 ± 9.6 [★]	160 ± 16 [‡]	102 ± 6.7 ^{★ ‡}
$V_{1/2}$ (mV)	-2.7 ± 0.6	0.2 ± 0.9 [★]	-6.8 ± 0.5 [‡]	5.1 ± 1.6 ^{★ ‡}
Steigungswert (mV)	5.8 ± 0.3	6.0 ± 0.3	5.3 ± 0.2 [‡]	6.0 ± 0.3 [★]

Männchen:

	WT _{Basal} (n = 5/3)	SERCA 2a _{Basal} (n = 11/6)	WT _{Iso} (n = 5/3)	SERCA 2a _{Iso} (n = 11/6)
G_{\max} (S/F)	129 ± 11	67 ± 5.2 [★]	157 ± 4.9 [‡]	108 ± 13 ^{★ ‡}
$V_{1/2}$ (mV)	-3.5 ± 0.7	0.6 ± 0.7 [★]	-4.8 ± 1.7	7.0 ± 0.8 ^{★ ‡}
Steigungswert (mV)	5.3 ± 0.3	6.2 ± 0.3	4.8 ± 0.2 [‡]	6.0 ± 0.3 [★]

★ p<0.05 vs. WT; ‡ p<0.05 vs. Basal

4. Untersuchungen an Mäusen, die den humanen Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1 im Herzen überexprimieren

4.1. Körpergewicht, Herzgewicht, relatives Herzgewicht und Zellkapazität

Transgene Mäuse, die den humanen Inhibitor 2 (I_2) der Proteinphosphatase 1 herzspezifisch überexprimierten, waren äußerlich nicht von den WT-Mäusen unterscheidbar. Die Mäuse waren gleich groß und schwer und zeigten weder Verhaltensauffälligkeiten noch eine erhöhte Mortalitätsrate. Das Körpergewicht und auch das Herzgewicht der Mäuse wurden durch die Überexpression nicht beeinflusst (s. Tab. 7.3.). Somit war auch das daraus resultierende relative Herzgewicht (Herzgewicht/Körpergewicht) der I_2 -Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen unverändert. Zwischen weiblichen und männlichen Mäusen wurde kein Unterschied bezüglich des relativen Herzgewichts gemessen. Die Zellkapazität als Maß für die Zellgröße war bei I_2 - und WT-Zellen gleich. Dies galt auch für Zellen der weiblichen und männlichen Mäuse (s. Tab. 7.3.).

4.2. Einfluß von BAPTA als Ca^{2+} -Chelator

4.2.1. Strom-Spannungs-Beziehung

Für die Erstellung der IV-Kurve erfolgten die depolarisierenden Spannungssprünge stufenweise in 10 mV-Schritten auf Potentiale zwischen -30 mV und +60 mV. Die Stromdichte als Quotient aus maximaler Stromamplitude und Zellkapazität wurde bei entsprechenden Testpotentialen bestimmt. Die Messung des I_{Ca} erfolgte vergleichend unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (s. Abb. 4.26.).

Es konnten unter basalen Bedingungen keine Unterschiede hinsichtlich der Stromdichte zwischen I_2 - und WT-Zellen ermittelt werden. Allerdings war die Stromdichte der I_2 -Zellen nach Zugabe von Isoprenalin bei den Spannungssprüngen zwischen 0 mV und +40 mV geringer als bei WT-Zellen (s. Abb. 4.27.). Die geschlechtsspezifische Differenzierung zeigte, daß für die geringere Stromdichte nur I_2 -Zellen der männlichen Mäuse verantwortlich sind. Bei I_2 - und WT-Zellen der weiblichen Mäuse lag kein Unterschied vor (s. Abb. 4.27.).

Der maximale Spitzenstrom der IV-Kurve lag unter basalen Bedingungen für I_2 - und WT-Zellen bei +10 mV. Bei diesem Potential war die prozentuale Stromzunahme

nach Zugabe von Isoprenalin für I_2 -Zellen geringer als für WT-Zellen. Dafür sind ebenso nur I_2 -Zellen der männlichen Mäuse verantwortlich (s. Abb. 4.28.). Die prozentuale Stromzunahme zwischen I_2 - und WT-Zellen der weiblichen Mäuse war gleich (s. Abb. 4.28.)

4.2.2. Inaktivierung

Zur Beschreibung der Kinetik des inaktivierenden Anteils des I_{Ca} bei +10 mV unter Verwendung von BAPTA als Ca^{2+} -Chelator wurde zur Kurvenanpassung einer Exponentialfunktion herangezogen.

Dabei war die Inaktivierungszeitkonstante τ unter basalen Bedingungen und nach Zugabe von Isoprenalin zwischen I_2 - und WT-Zellen gleich (s. Abb. 4.29.). Bei I_2 - und WT-Zellen der männlichen Mäuse verzögerte sich die Inaktivierungszeit nach Zugabe von Isoprenalin. Im Gegensatz dazu blieb die Inaktivierungszeit nach Zugabe von Isoprenalin bei I_2 - und WT-Zellen der weiblichen Mäuse unverändert (s. Abb. 4.29.). Zusammengefaßt befinden sich die Ergebnisse in Tab. Tab. 7.3.

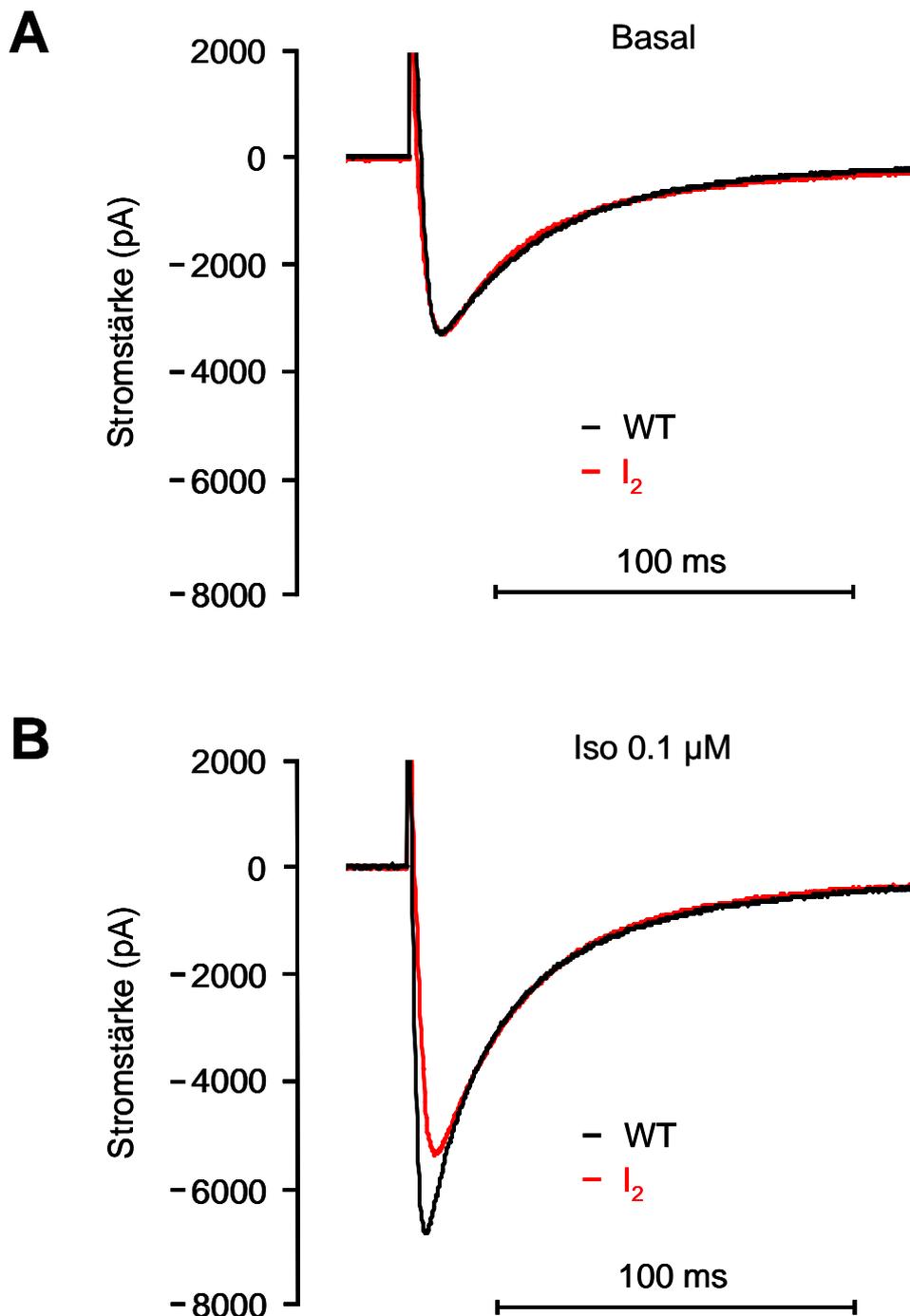


Abb. 4.26.: Originalregistrierung des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) unter Verwendung von BAPTA als Ca^{2+} -Chelator sowohl für basale Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen des I_{Ca} für Wildtyp-(WT)- und Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1-überexprimierende Zellen (I_2) unter Verwendung von BAPTA als Ca^{2+} -Chelator für basale Bedingungen (A) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (B; Iso). Die Zellkapazitäten dieser Zellen waren vergleichbar. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erfolgte alle 10 s ein Spannungspuls von 200 ms auf +10 mV. Auffällig ist der geringer ausgeprägte Isoprenalin-Effekt bei den I_2 Mäusen (Experimentnummern: WT-011001 id.2/2001, I_2 -010910 id.8/2001; x-Achse = Stromstärke in pA, y-Achse = Zeit in ms).

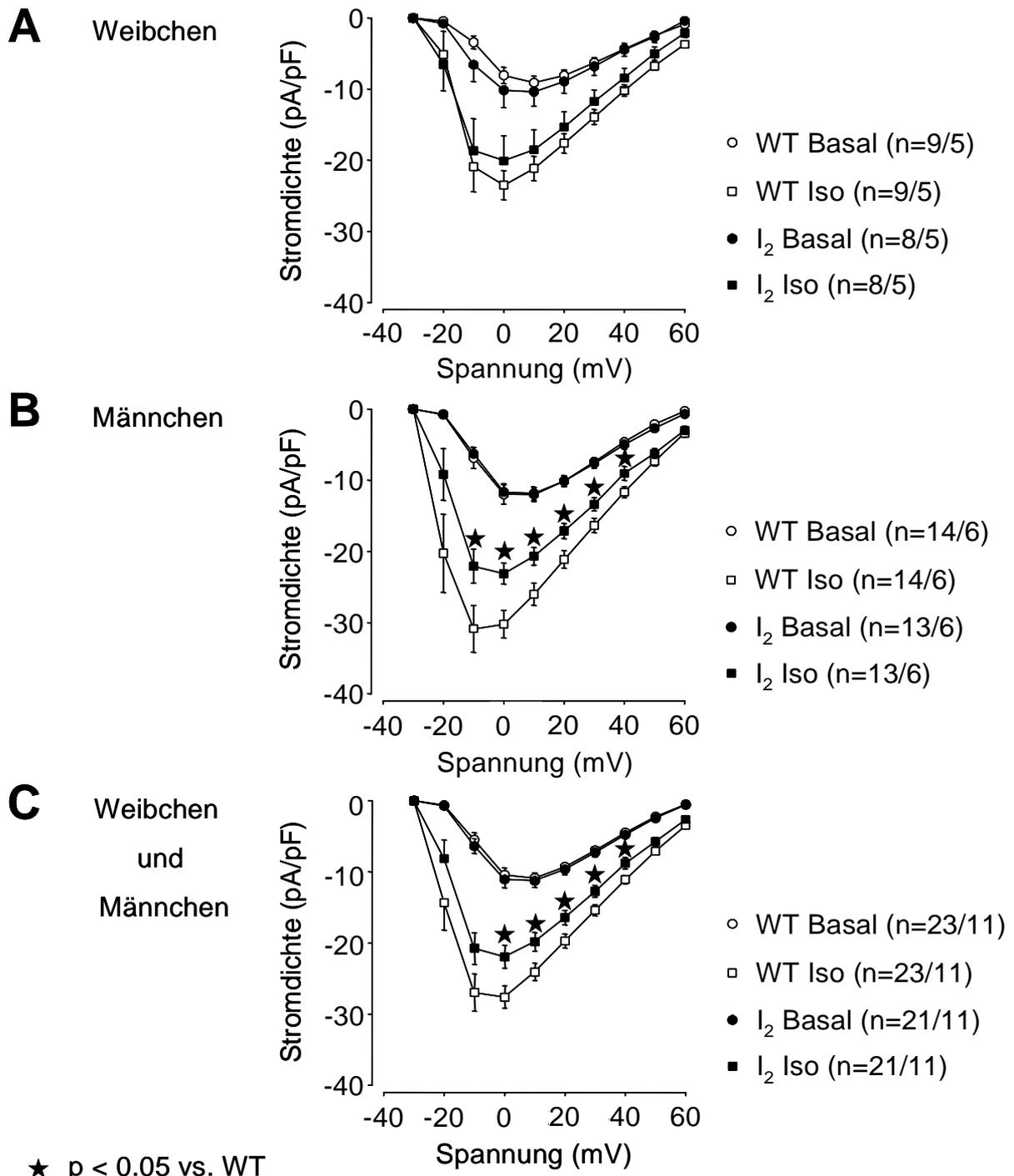


Abb. 4.27.: Strom-Spannungs-Beziehung (IV-Kurve) unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Dargestellt ist die IV-Kurve für Wildtyp-(WT)- und Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1-überexprimierenden Zellen (I₂) unter basalen Bedingungen (Kreise) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (Quadrate; Iso). Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefaßt (C) dargestellt. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erfolgten alle 10 s Spannungspulse von 200 ms auf Testpotentiale zwischen -30 mV und +60 mV. Die Meßwerte der I₂- und WT-Zellen nach Iso-Zugabe waren von -20 mV bis +60 mV bei Weibchen, Männchen sowie für beide zusammen signifikant verändert im Vergleich zu basalen Werten (nicht dargestellt). n gibt die Anzahl untersuchter Zellen je Tierzahl an.

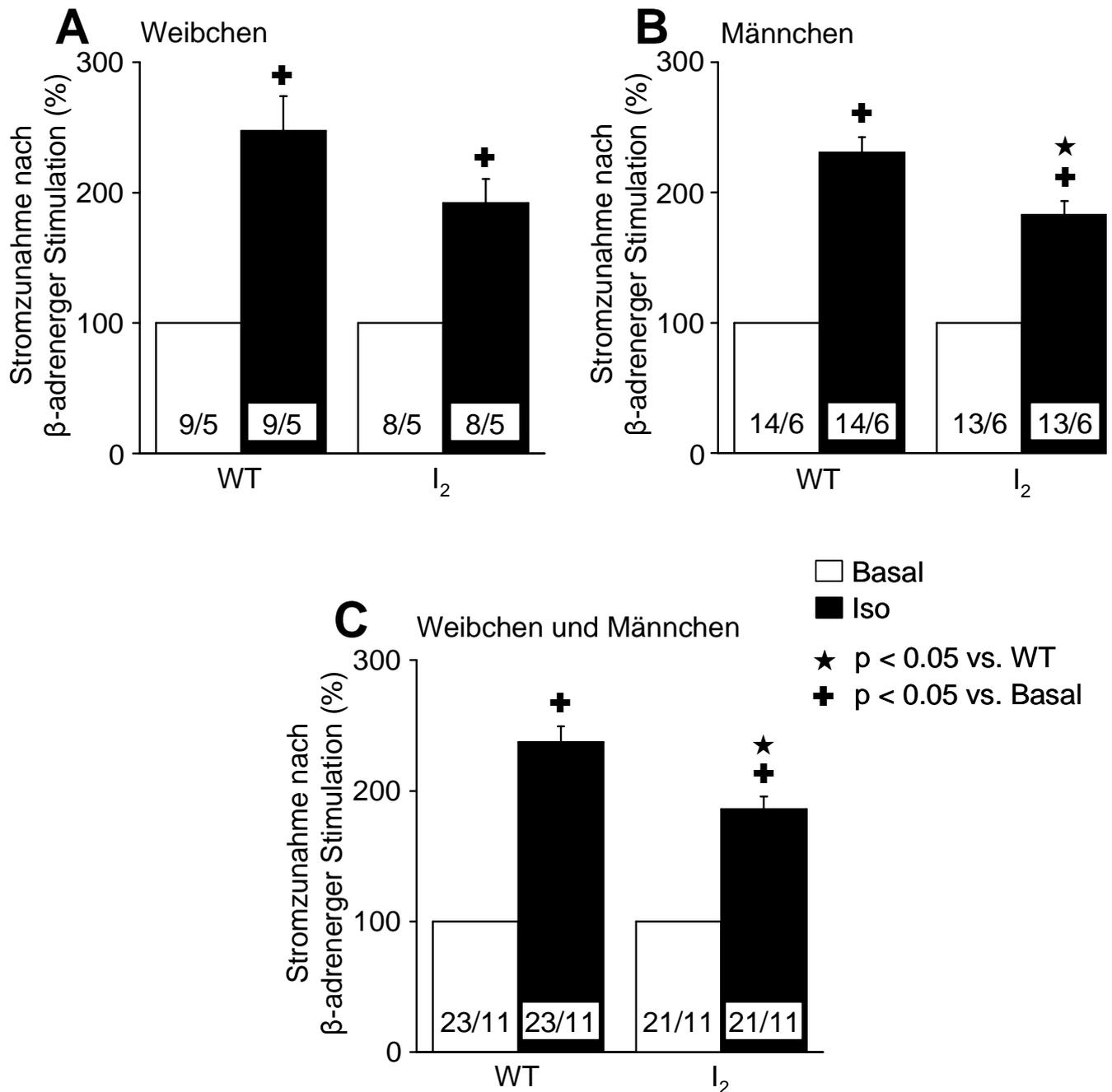
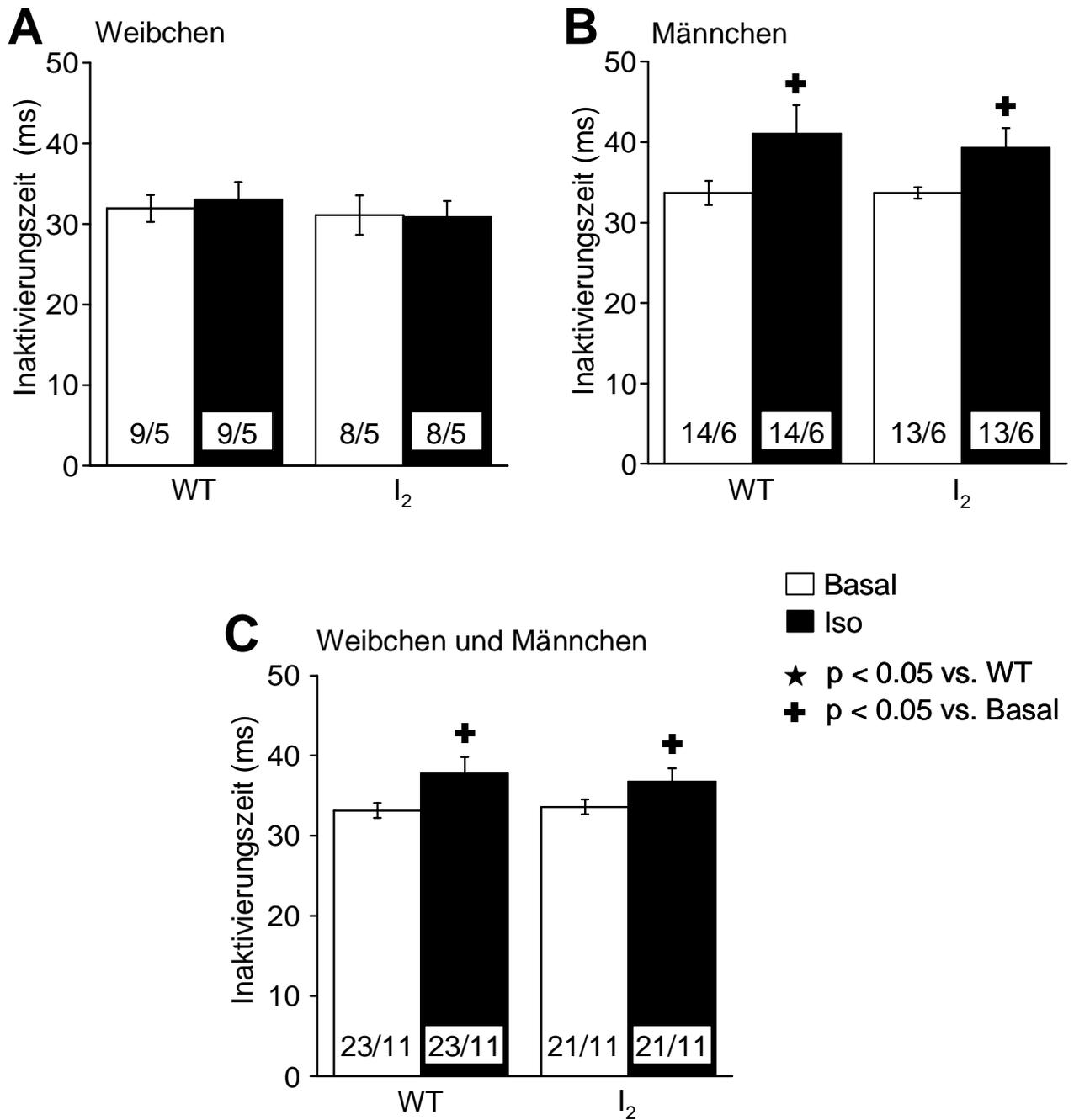


Abb. 4.28.: Prozentuale Stromzunahme durch den L-Typ-Calciumkanal (I_{Ca}) bei maximalem Spitzenstrom (bei +10 mV) nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Die Säulendiagramme stellen prozentual die Stromdichte des I_{Ca} bei +10 mV bezogen auf die basalen Bedingungen (weiße Säule) nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (schwarze Säule; Iso) von Wildtyp-(WT)- und Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1-überexprimierenden (I_2) Zellen dar. Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefasst (C) dargestellt. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.



2Abb. 4.29.: Inaktivierungszeitkonstante (τ) des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Dargestellt ist die Inaktivierungszeitkonstante τ des I_{Ca} bei +10 mV für Wildtyp-(WT)- und Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1-überexprimierende (I_2) Zellen sowohl unter basalen Bedingungen (weiße Säule) als auch nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (schwarze Säule; Iso). Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefaßt (C) dargestellt. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

4.3. Einfluß von Calyculin A als Proteinphosphatase-Inhibitor

Nach Trennung der Daten wurde ein geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt. Die reduzierte Stromdichte des L-Typ-Calciumkanals und die prozentuale Stromzunahme nach β -adrenerger Stimulation wurde nur bei männlichen I_2 -Zellen beobachtet. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede wurden auch bei Untersuchungen der Hämodynamik und der Ca^{2+} -Transienten beobachtet (s. Doktorarbeit Herr Mařuš). Aus diesem Grund wurden für die Versuche mit Calyculin A nur Zellen der männlichen I_2 - und WT-Herzen gewählt, um mögliche Veränderungen deutlich zu sehen.

4.3.1. Strom-Spannungs-Beziehung

Die Erstellung der IV-Kurve erfolgte ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV nach Zugabe depolarisierender Testpulse auf -30 mV bis +60 mV. Die Stromdichte als Quotient aus maximaler Stromamplitude und Zellkapazität wurde jeweils unter basalen Bedingungen sowie nach Zugabe von 0.1 μ M des Proteinphosphatase-Inhibitors Calyculin A bei entsprechenden Testpotentialen zwischen -30 mV und +60 mV bestimmt (s. Abb. 4.30.). Als Ca^{2+} -Chelator wurde 1 mM EGTA verwendet.

Es wurden unter basalen Bedingungen und nach Zugabe von Isoprenalin keine Unterschiede zwischen männlichen I_2 - und WT-Zellen gemessen (s. Abb. 4.31.). Der maximale Spitzenstrom der IV-Kurve lag unter basalen Bedingungen für männliche I_2 - und WT-Zellen bei +10 mV. Bei diesem Potential war die prozentuale Stromzunahme nach Zugabe von Calyculin A zwischen I_2 - und WT-Zellen der männlichen Mäuse gleich (s. Abb. 4.32.).

4.3.2. Inaktivierung

Der inaktivierende Anteil des I_{Ca} bei +10 mV mit Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator wurde unter basalen Bedingungen sowie nach Zugabe von 0.1 μ M des Proteinphosphatase-Inhibitors Calyculin A mit Hilfe zweier Exponentialfunktionen bestimmt. Die schnelle (τ_1) und die langsame (τ_2) Inaktivierungszeitkonstante waren unter basalen Bedingungen sowie nach Zugabe von Calyculin A bei I_2 -Zellen der männlichen Mäuse gegenüber WT-Zellen unverändert (s. Abb. 4.33.). Zusammenfassung findet man in der Tab. 7.3.

Männchen

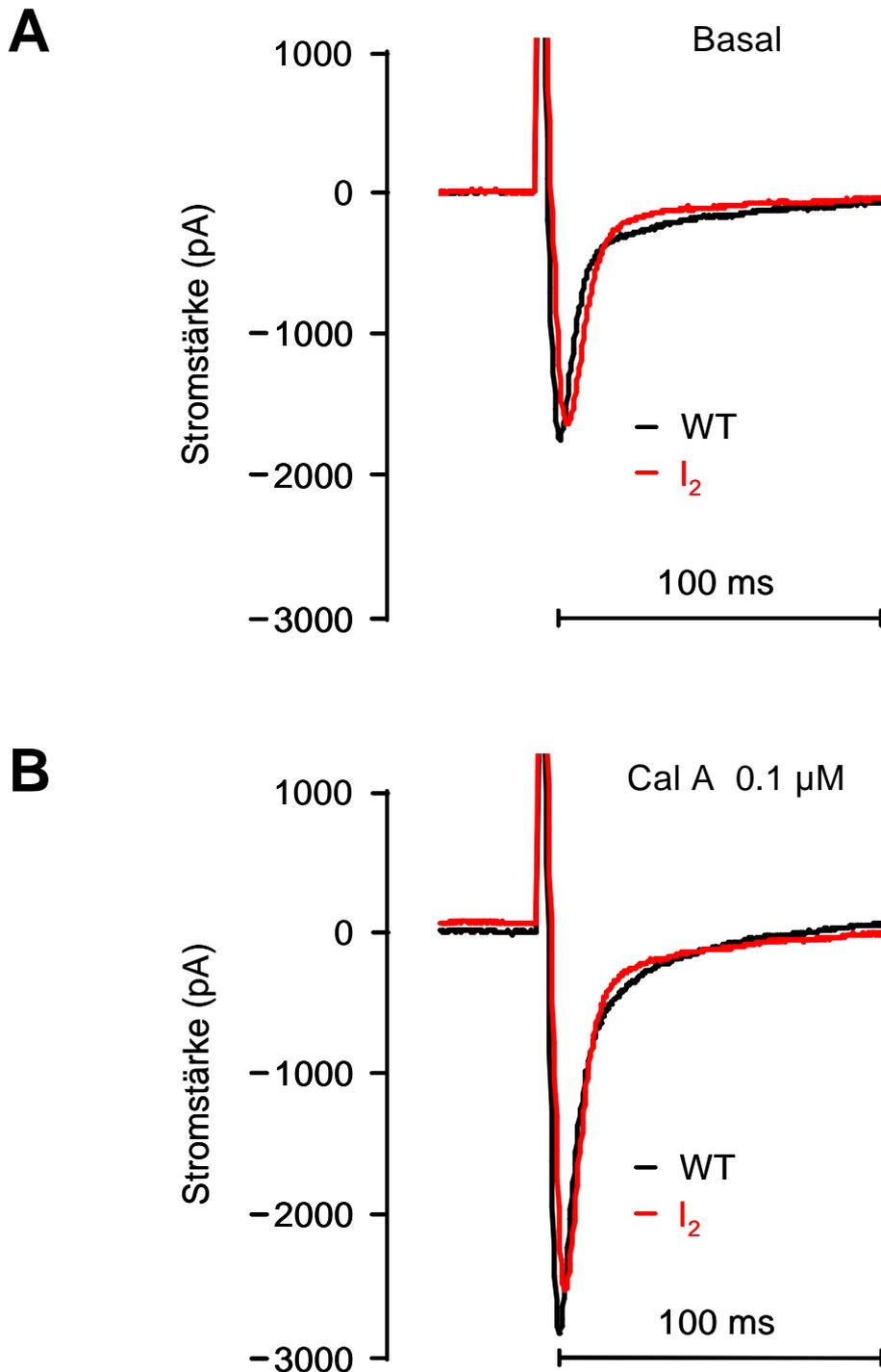


Abb. 4.30.: Originalregistrierung des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) basalen Bedingungen sowie nach Zugabe von Calyculin A

Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen des I_{Ca} für männliche Wildtyp-(WT)- und Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1 überexprimierende Zellen (I_2) unter basalen Bedingungen (A) sowie nach Zugabe von 0.1 μ M Calyculin A (B; Cal A). Die Zellkapazität dieser Zellen war vergleichbar. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erfolgte alle 10 s ein Spannungspuls von 200 ms auf +10 mV (Experimentnummern: WT-030724 id.1/2003, I_2 -030415 id.3/2003; x-Achse = Stromstärke in pA, y-Achse = Zeit in ms).

Männchen

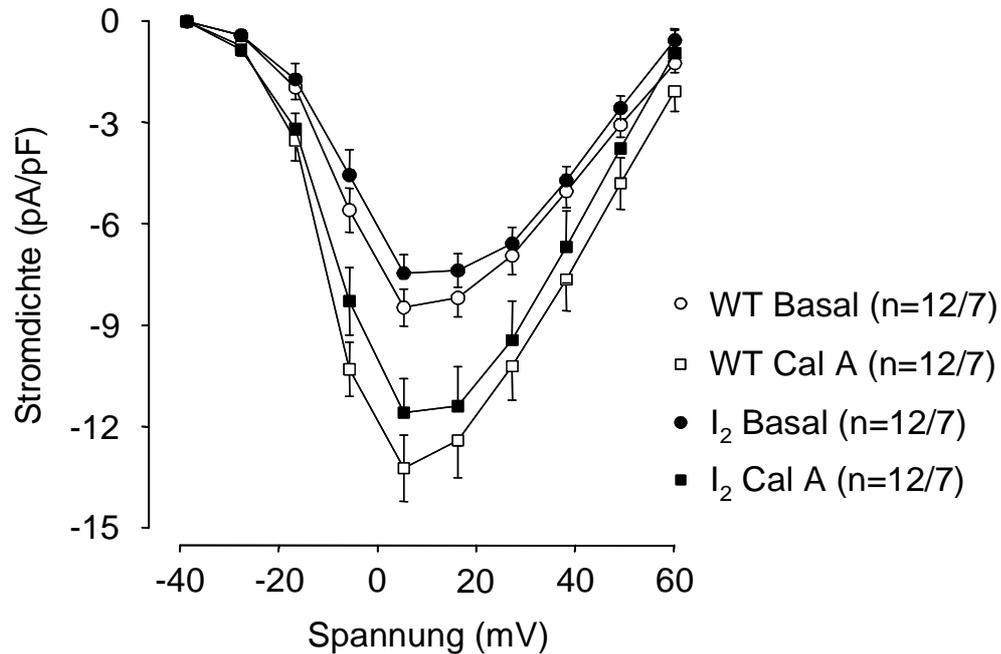
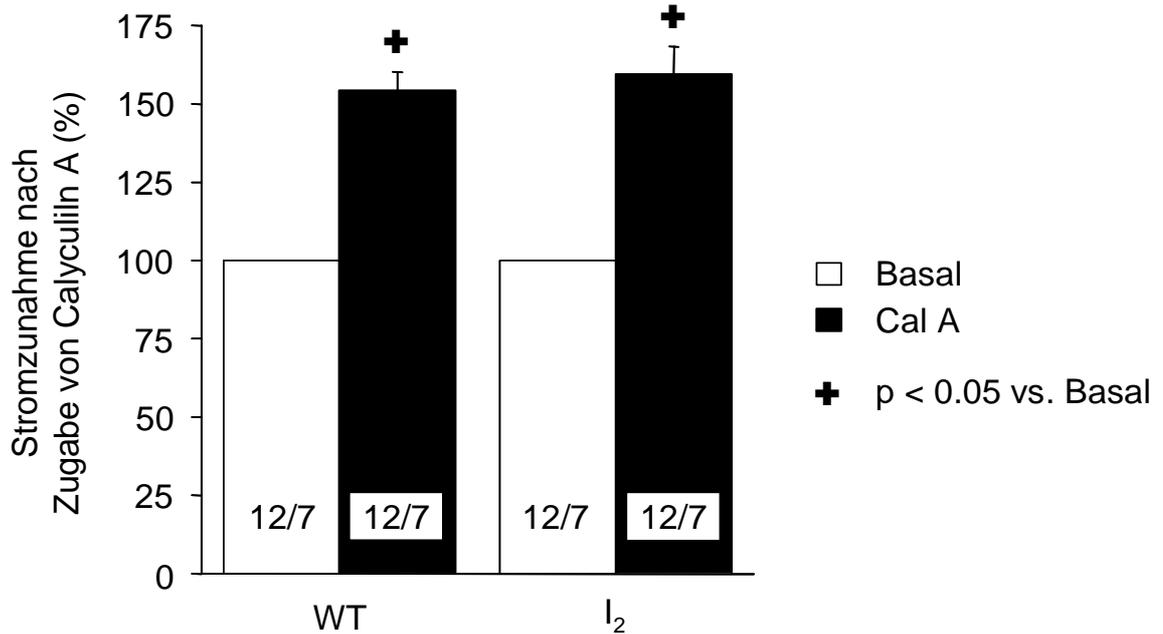
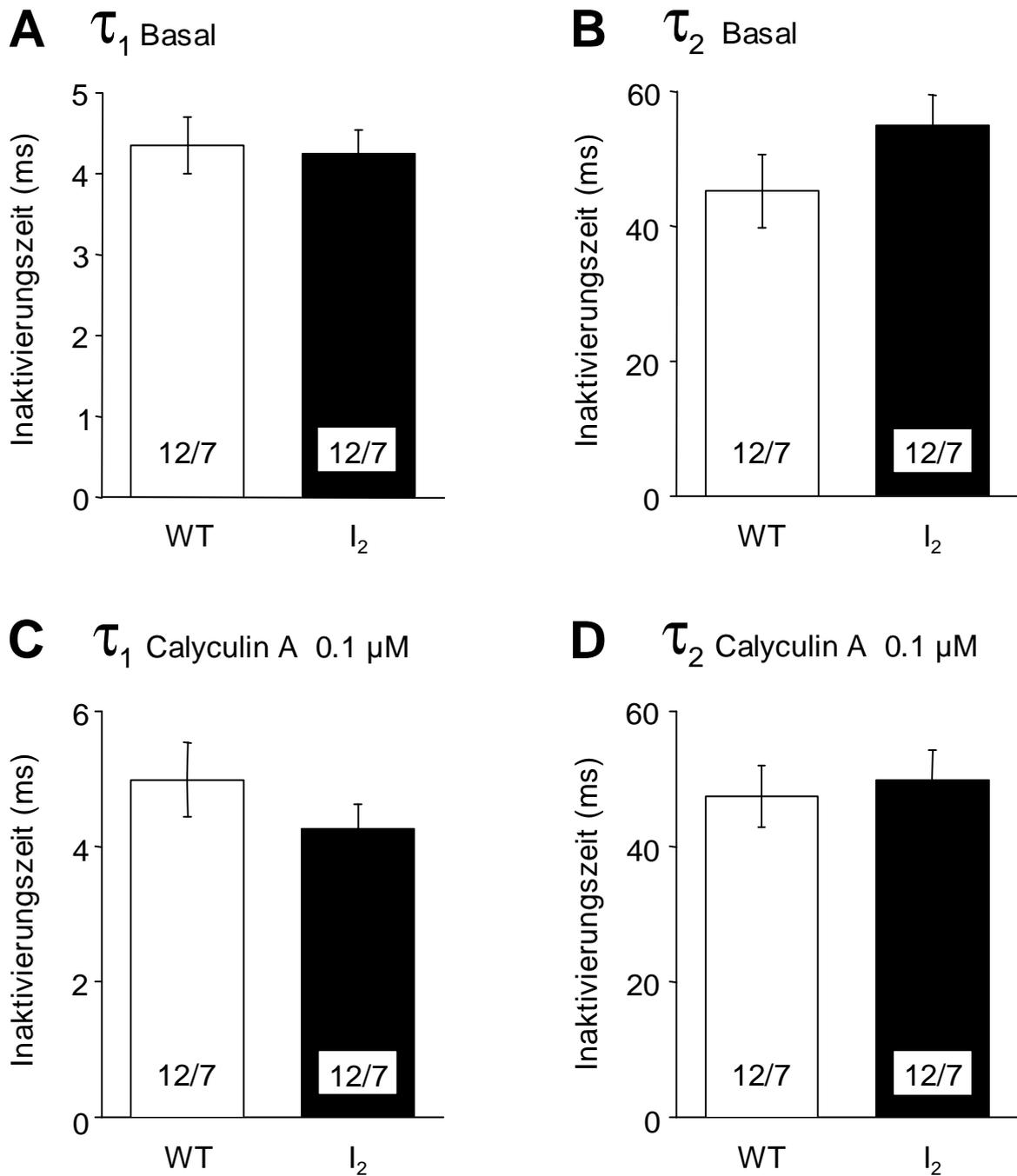
A**B**

Abb. 4.31.: Strom-Spannungs-Beziehung (IV-Kurve) und die prozentuale Stromzunahme nach Zugabe von Calyculin A

Dargestellt ist die IV-Kurve (A) für Wildtyp-(WT)- und Protein-phosphatase 1-Inhibitor 2-überexprimierende Zellen (I₂) der männlichen Mäuse unter basalen Bedingungen (Kreise) und nach Zugabe von 0.1 μ M Cal A (Quadrate). Die Meßwerte der I₂- und WT-Zellen der männlichen Mäuse waren nach Cal A-Zugabe von -20 mV bis +40 mV, bzw. bis +60 mV signifikant verändert im Vergleich zu basalen Werten (nicht dargestellt). Weiterhin stellt die Abbildung die prozentuale Stromzunahme (B) bezogen auf die basalen Bedingungen nach Zugabe von Calyculin A (B) dar. n gibt die Anzahl untersuchter Zellen je Tierzahl an.

Männchen



Tab. 4.33.: Schnelle (τ_1) und langsame (τ_2) Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach Zugabe von Calyculin A

Die Säulendiagramme stellen die Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 des I_{Ca} unter basalen Bedingungen (A und B) und nach Zugabe von 0.1 μ M Calyculin A (C und D) für Wildtyp-(WT) und Inhibitor 2-überexprimierende Zellen (I_2) der männlichen Mäuse dar. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

5. Untersuchungen an Mäusen, welche die katalytische Untereinheit α der Proteinphosphatase 2A im Herzen überexprimieren

5.1. Körpergewicht, Herzgewicht, relatives Herzgewicht und Zellkapazität

Die Mäuse, welche die katalytische Untereinheit α der Proteinphosphatase 2A überexprimierten (PP2A), waren äußerlich nicht von den WT-Mäusen unterscheidbar. Die Mäuse waren gleich groß und schwer und zeigten weder Verhaltensauffälligkeiten noch eine erhöhte Mortalitätsrate. Die Herzen der PP2A-Mäuse hatten eine ausgeprägte Hypertrophie mit einer Gewichtszunahme von 62 % gegenüber den WT-Mäusen. Somit war auch das daraus resultierende relative Herzgewicht (Herzgewicht/Körpergewicht) bei den PP2A-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen um 56 % erhöht. Dies galt sowohl für weibliche als auch für männliche Mäuse (s. Tab.7.4.). Außerdem war die Zellkapazität als Maß für die Zellgröße bei PP2A-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen um 25 % vergrößert. (s. Tab. 7.4.). Die vergrößerte Zellkapazität wurde sowohl bei Zellen der weiblichen als auch der männlichen Mäuse festgestellt (s. Tab. 7.4.).

5.2. Einfluß von EGTA als Ca^{2+} -Chelator

5.2.1. Strom-Spannungs-Beziehung

Die Erstellung der IV-Kurve erfolgte ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV nach Zugabe depolarisierender Testpulse auf -30 mV bis +60 mV. Die Stromdichte als Quotient aus maximaler Stromamplitude und Zellkapazität wurde bei entsprechenden Testpotentialen zwischen -30 mV und +60 mV bestimmt. Die Messung des I_{Ca} erfolgte unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μM Isoprenalin (s. Abb. 4.34.).

Unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin war die ermittelte Stromdichte der PP2A-Zellen bei den Spannungssprüngen zwischen +10 mV und +50 mV geringer als bei WT-Zellen (s. Abb. 4.35.). Nach geschlechtsspezifischer Aufteilung wurde bei PP2A-Zellen der weiblichen Mäuse geringere Stromdichte sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin gemessen. Bei PP2A-Zellen der männlichen Mäuse wurde sie nur unter basalen Bedingungen festgestellt (s. Abb. 4.35.). Der maximale Spitzenstrom der IV-Kurve lag unter basalen Bedingungen für PP2A- und WT-Zellen

bei +10 mV. Bei diesem Potential war die prozentuale Stromzunahme nach Zugabe von Isoprenalin zwischen PP2A- und WT-Zellen gleich (s. Abb. 4.36.).

5.2.2. Inaktivierung

Zur Beschreibung der Kinetik des inaktivierenden Anteils des I_{Ca} bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin wurde zur Kurvenanpassung zweier Exponentialfunktionen herangezogen.

Dabei waren die schnellen (τ_1) und die langsamen (τ_2) Inaktivierungszeitkonstanten unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation bei PP2A-Zellen vergrößert im Vergleich zu WT-Zellen (s. Abb. 4.37.). Bei der geschlechtsspezifischen Differenzierung waren bei PP2A-Zellen der weiblichen und männlichen Mäuse die schnellen Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation erhöht gegenüber WT-Zellen der weiblichen und männlichen Mäuse. Die langsamen Inaktivierungszeitkonstanten τ_2 waren nur nach β -adrenerger Stimulation vergrößert im Vergleich zu WT-Mäuse (s. Abb. 4.38., 4.39.). Zusammengefaßt wurden die Ergebnisse in Tab. 7.4.

5.2.3. Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeits-Spannungs-Kurven wurden aus den jeweiligen Leitfähigkeitswerten zum gegebenen Testpotential unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin ermittelt. Die Anpassung der Kurven erfolgte über eine Boltzmann-Funktion.

Die maximale Leitfähigkeit, das Potential der halbmaximalen Leitfähigkeit sowie der Steigungswert waren unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation bei PP2A-Zellen geringer als bei WT-Zellen (s. Tab. 4.5.). Dies zeigte auch die geschlechtsspezifische Unterscheidung mit einer Ausnahme. Der Steigungswert war bei PP2A-Zellen der weiblichen und männlichen Mäuse im Vergleich zu WT-Zellen unverändert (s. Tab. 4.5.).

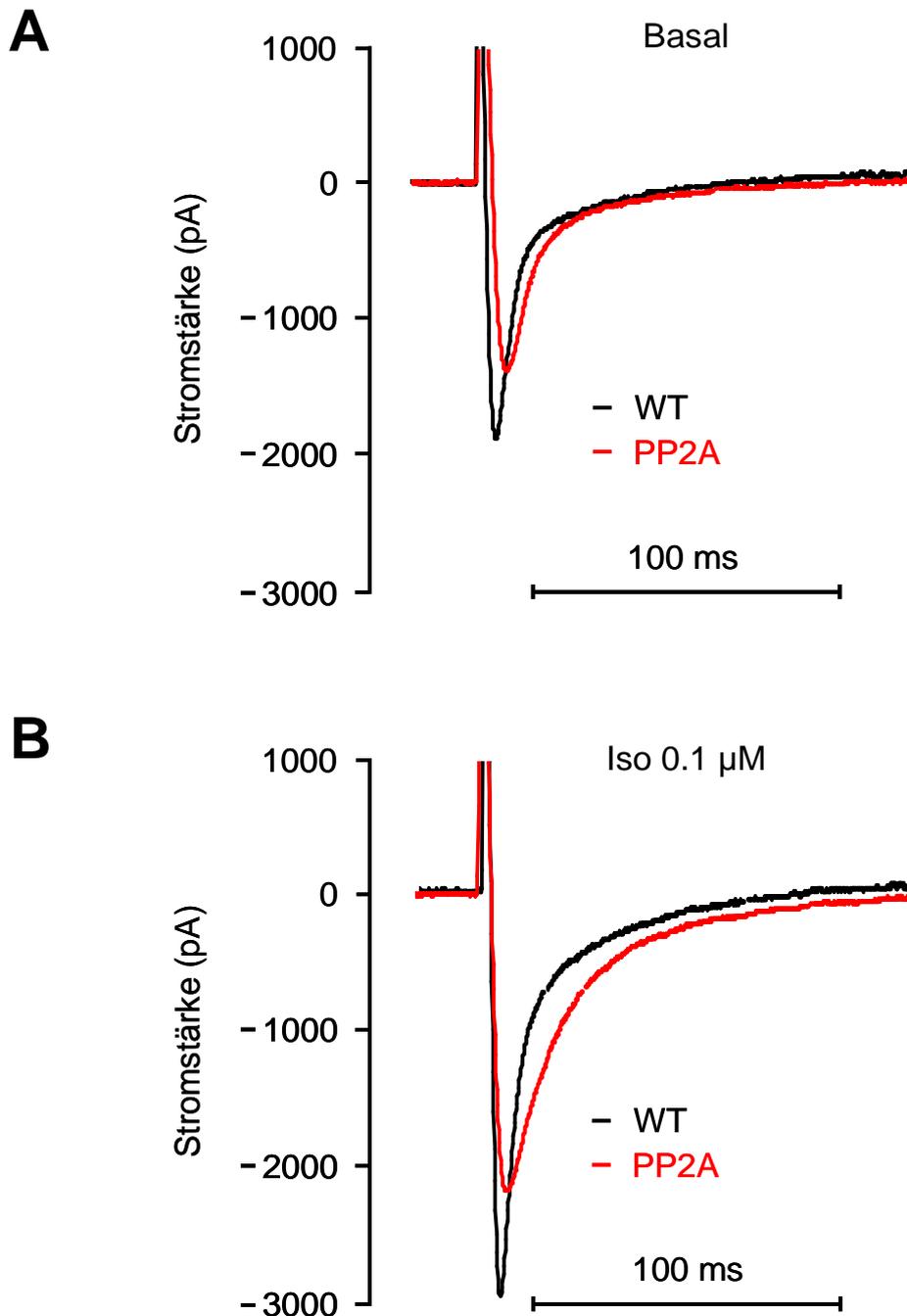


Abb. 4.34.: Originalregistrierung des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) unter Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator für basale Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin (Iso)

Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen des I_{Ca} für Wildtyp-(WT)- und Proteinphosphatase 2A-überexprimierende Zellen (PP2A) unter Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator für basale Bedingungen (A) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μM Isoprenalin (B; Iso). Die Zellkapazitäten dieser Zellen waren vergleichbar. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erfolgte alle 10 s ein Spannungspuls von 200 ms auf +10 mV. Auffällig sind die verlängerte Inaktivierungszeiten des I_{Ca} und geringere Stromamplituden bei den PP2A-überexprimierenden Mäusen sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation (Experimentnummern: WT-021114 id.2/2002, PP2A-021015 id.1/2002; x-Achse = Stromstärke in pA, y-Achse = Zeit in ms).

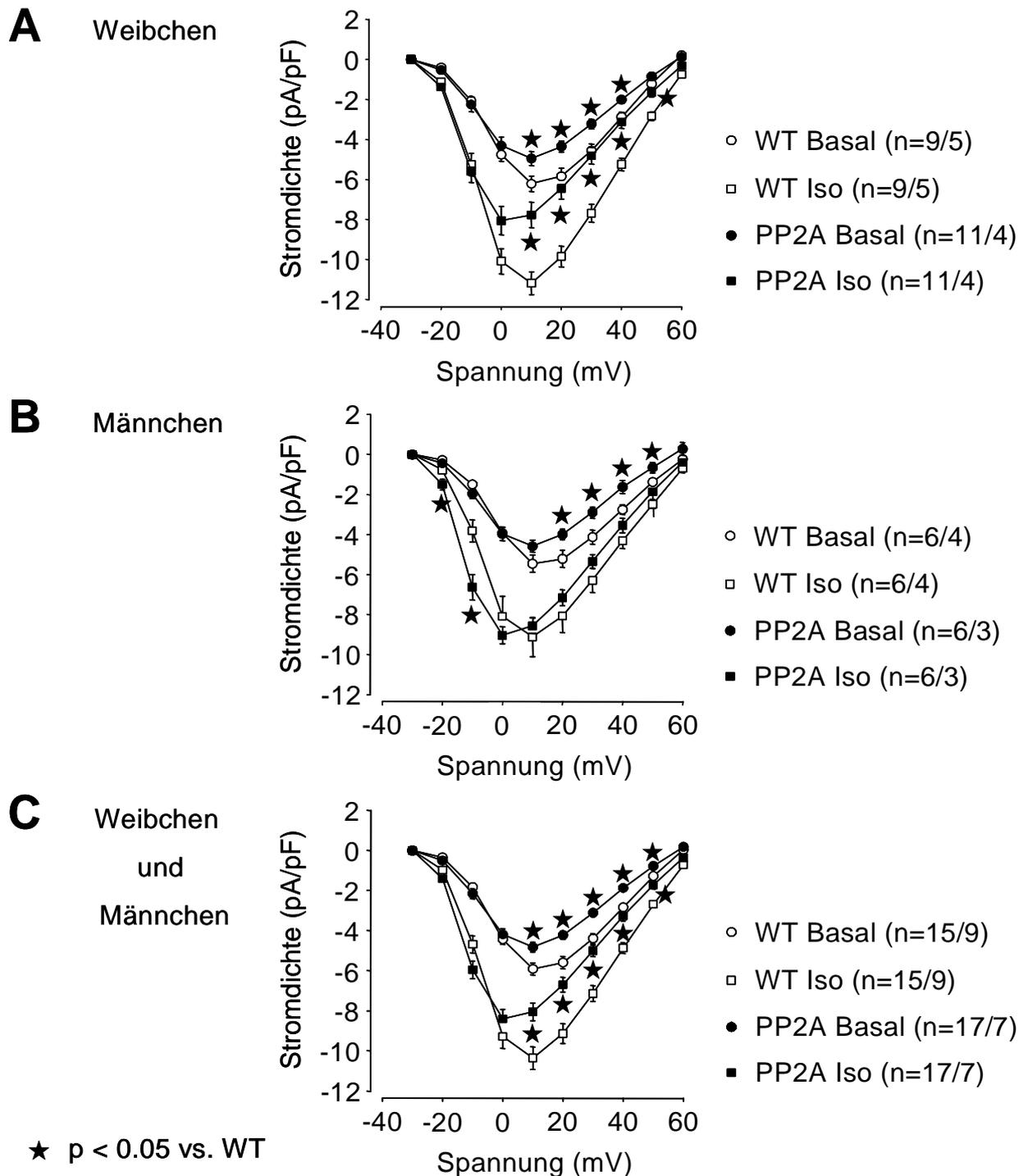


Abb 4.35.: Strom-Spannungs-Beziehung (IV-Kurve) unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Dargestellt ist die IV-Kurve für Wildtyp-(WT)- und Proteinphosphatase 2A-überexprimierende Zellen (PP2A) unter basalen Bedingungen (Kreise) und nach β -adrenerger Stimulation mit $0.1 \mu\text{M}$ Isoprenalin (Quadrate; Iso). Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefaßt (C) dargestellt. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erfolgten alle 10 s Spannungspulse von 200 ms auf Testpotentiale zwischen -30 mV und $+60 \text{ mV}$. Die Meßwerte der PP2A- und WT-Zellen nach Iso-Zugabe waren von -20 mV bis $+60 \text{ mV}$ bei Weibchen, Männchen sowie für beide zusammen signifikant verändert im Vergleich zu basalen Werten (nicht dargestellt). n gibt die Anzahl untersuchter Zellen je Tierzahl an.

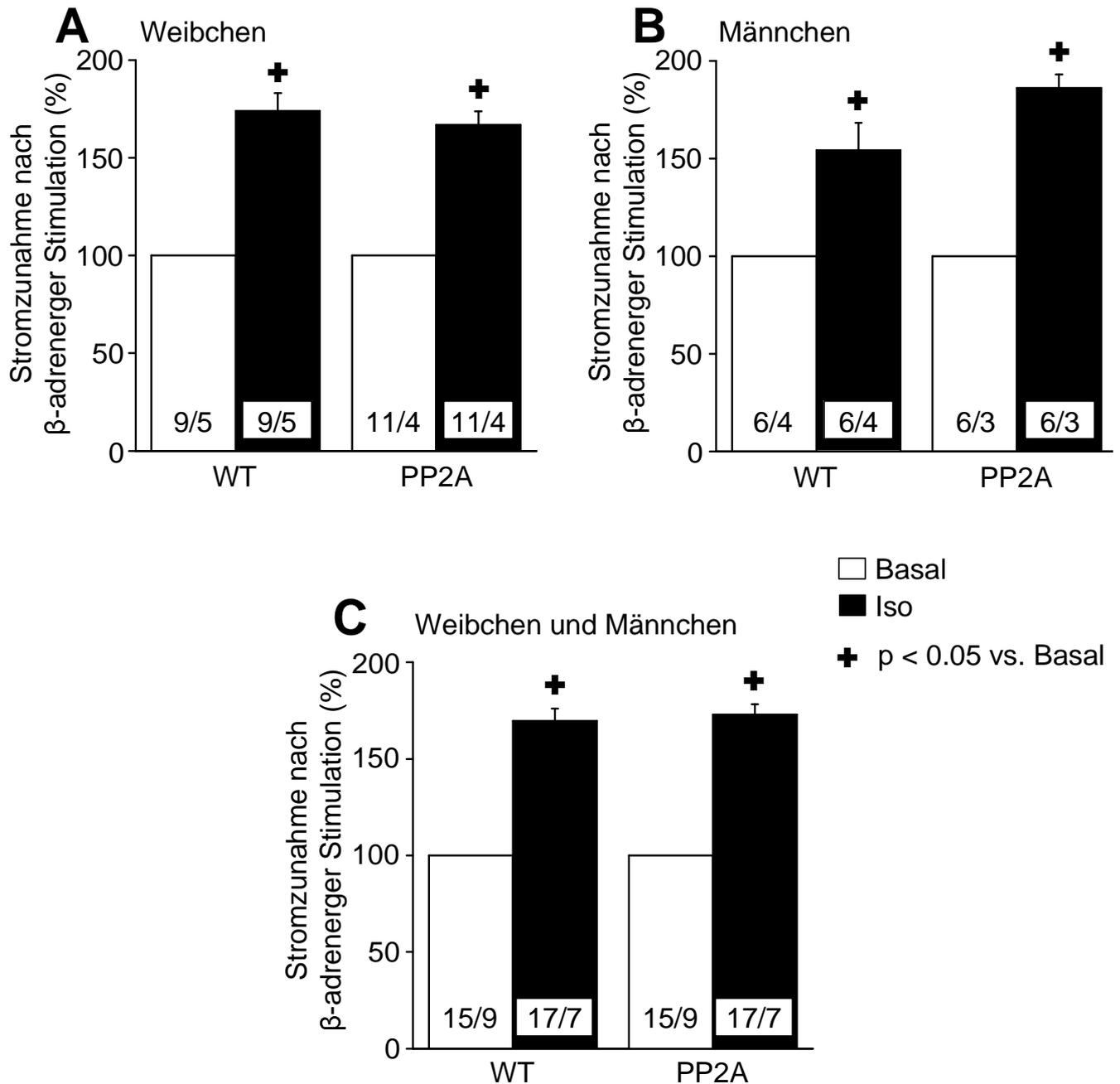


Abb. 4.36.: Prozentuale Stromzunahme durch den L-Typ-Calciumkanals (I_{Ca}) bei maximalem Spitzenstrom (bei +10 mV) nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Die Säulendiagramme stellen prozentual die Stromdichte des I_{Ca} bei +10 mV bezogen auf die basalen Bedingungen (weiße Säule) nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (schwarze Säule; Iso) von Wildtyp-(WT)- und Proteinphosphatase 2A-überexprimierenden Zellen (PP2A) dar. Die Ergebnisse sind nach Weibchen (A) und Männchen (B) getrennt sowie zusammengefaßt (C) dargestellt. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

Weibchen und Männchen

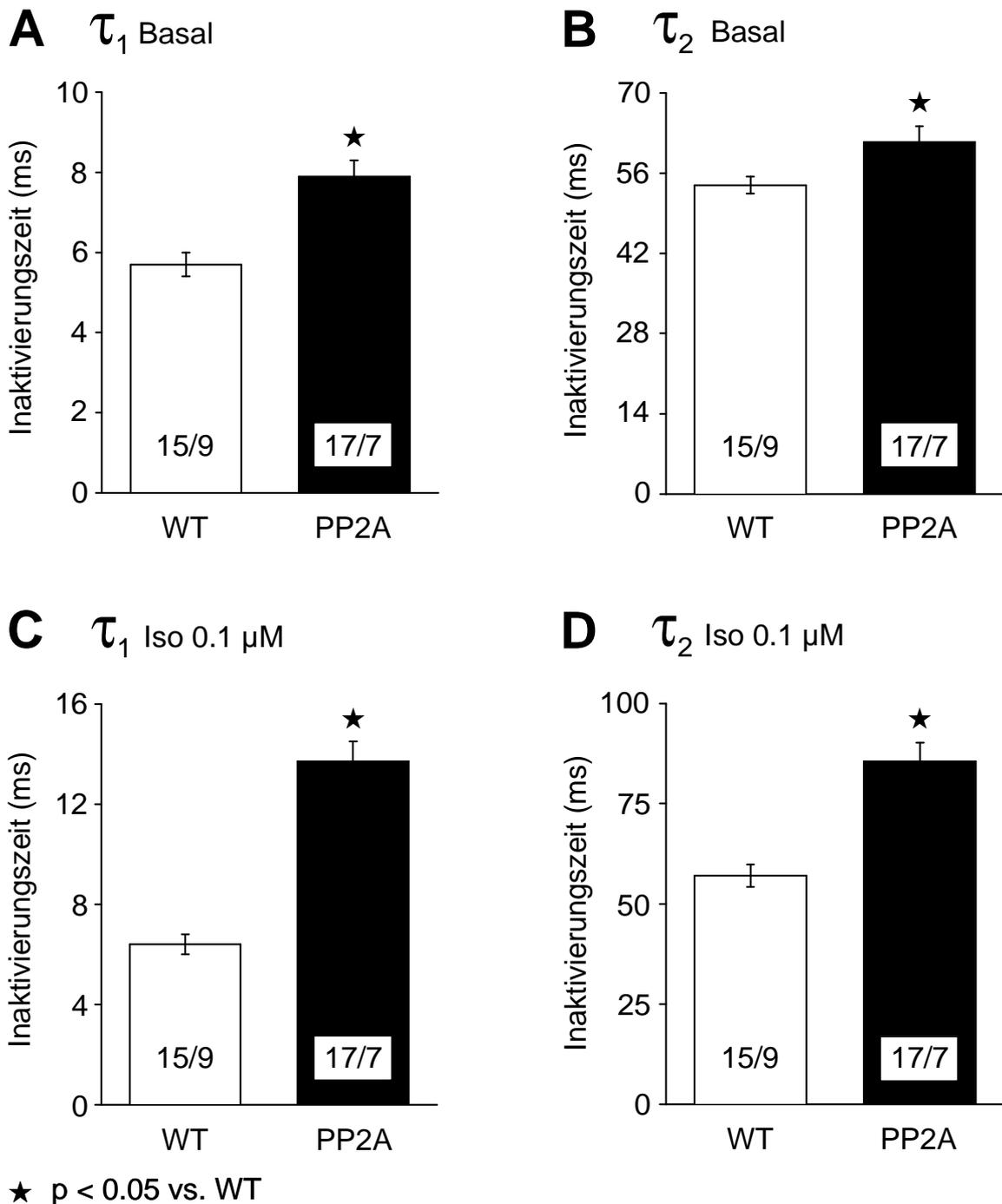


Abb. 4.37.: Schnelle (τ_1) und langsame (τ_2) Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanalstromes (I_{Ca}) bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Die Säulendiagramme stellen die Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 des I_{Ca} bei +10 mV unter basalen Bedingungen (A und B) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (C und D; Iso) für Wildtyp-(WT)- und Proteinphosphatase 2A-überexprimierende Zellen (PP2A) der weiblichen und männlichen Mäuse dar. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

Weibchen

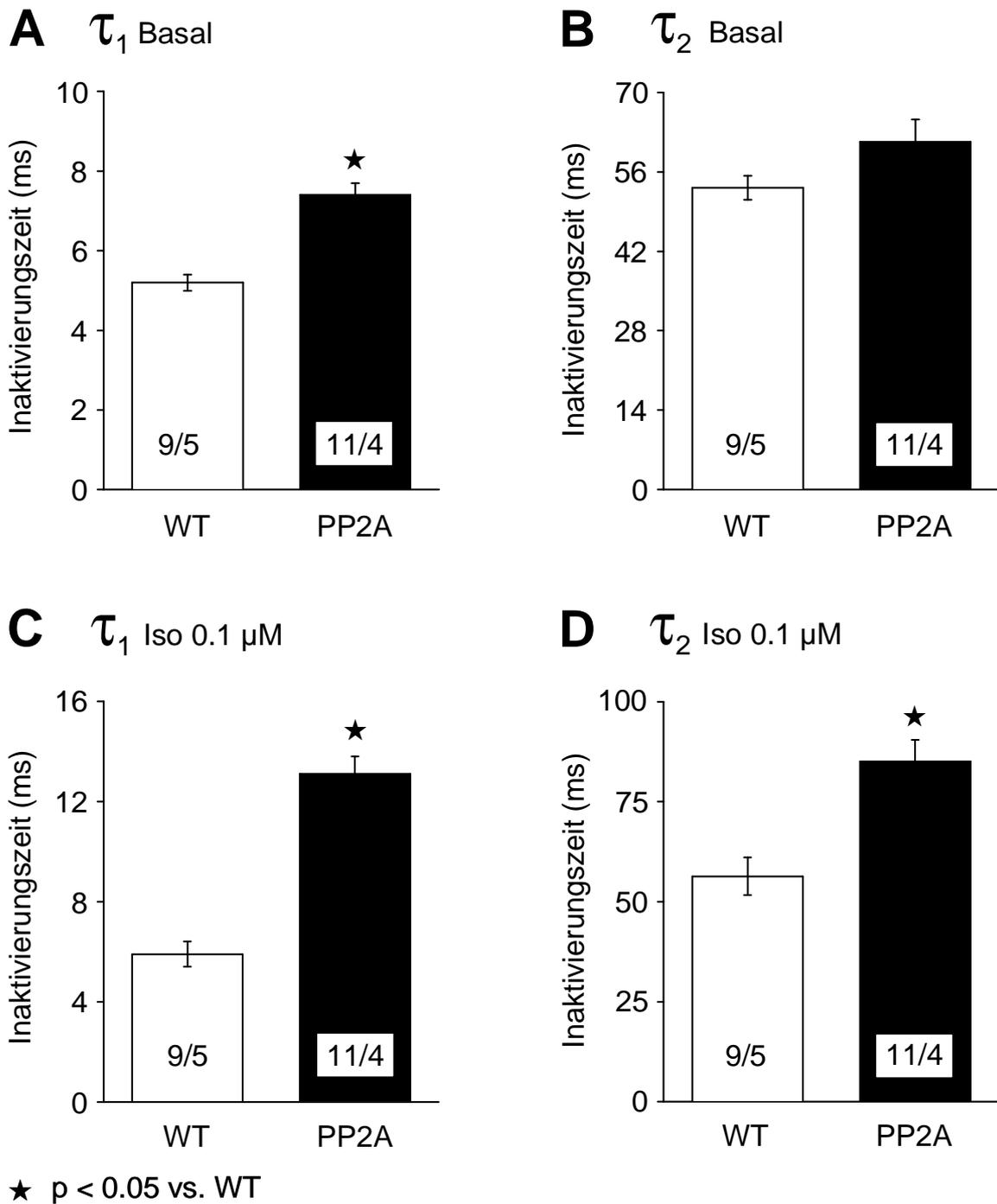


Abb. 4.38.: Schnelle (τ_1) und langsame (τ_2) Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanal-Stromes (I_{Ca}) bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Die Säulendiagramme stellen die Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 des I_{Ca} bei +10 mV unter basalen Bedingungen (A und B) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (C und D; Iso) für Wildtyp-(WT)- und Proteinphosphatase 2A-überexprimierende Zellen (PP2A) der weiblichen Mäuse dar. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

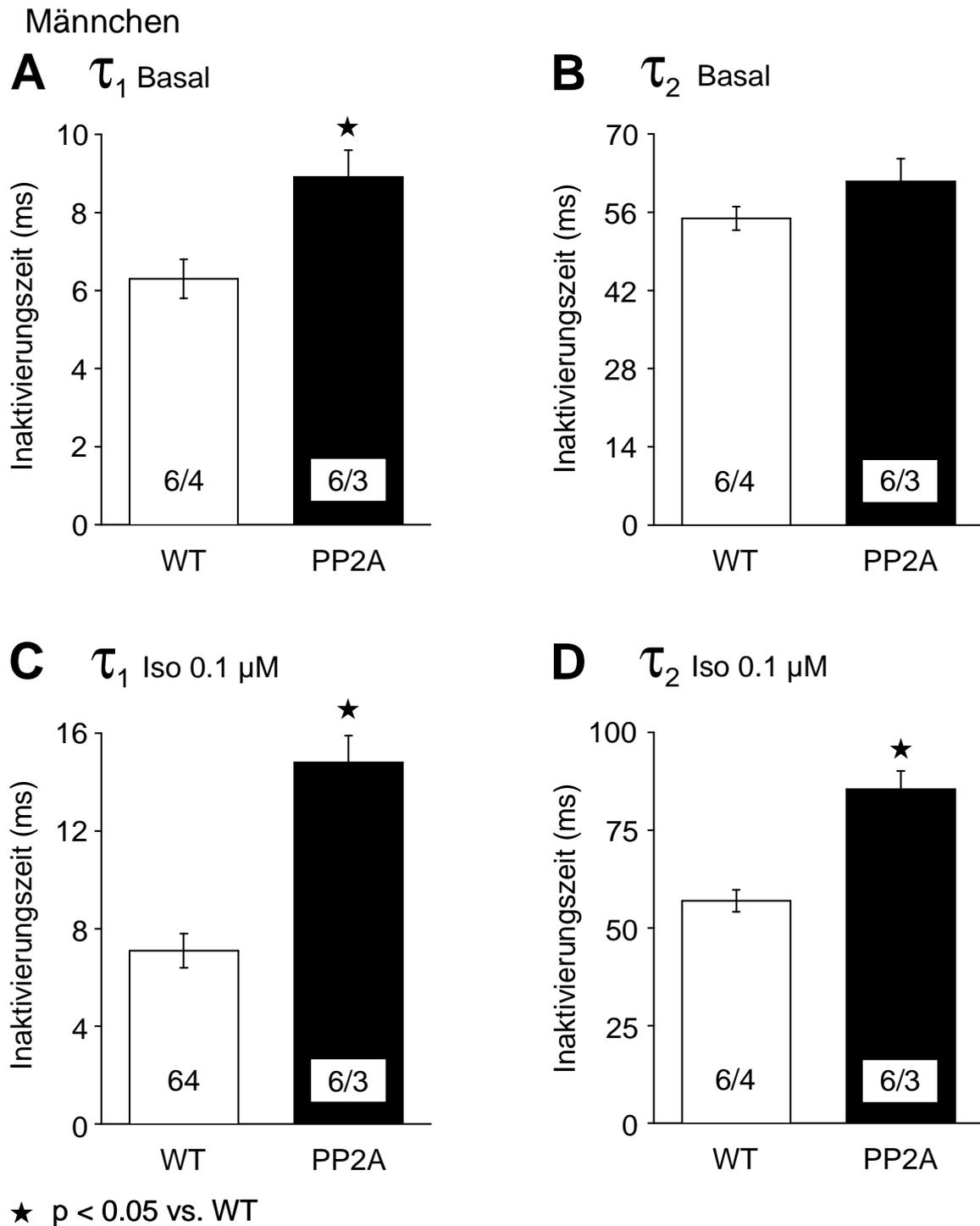


Abb. 3.39.: Schnelle (τ_1) und langsame (τ_2) Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanal-Stromes (I_{Ca}) bei +10 mV unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Die Säulendiagramme stellen die Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 des I_{Ca} bei +10 mV unter basalen Bedingungen (A und B) und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin (C und D; Iso) für Wildtyp-(WT)- und Proteinphosphatase 2A-überexprimierende Zellen (PP2A) der männlichen Mäuse dar. Die Zahlen in den Säulen geben vor dem Schrägstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Schrägstrich die Anzahl der untersuchten Mäuse an.

Tab. 4.5.: Auswertung der Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung

Dargestellt sind die Ergebnisse der Interpolation an die Boltzmann-Funktion. Angegeben sind die maximale Leitfähigkeit in Bezug auf die Zellkapazität (G_{\max}), das Potential der halbmaximalen Leitfähigkeit ($V_{1/2}$) und der Steigungswert der Kurve jeweils für die Registrierungen unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation mit 0.1 μ M Isoprenalin für Wildtyp-(WT)- und Protein-Phosphatase 2A überexprimierende Zellen (PP2A). n gibt die Anzahl untersuchter Zellen je Tierzahl an.

Weibchen und Männchen:

	WT _{Basal} (n = 15/9)	PP2A _{Basal} (n = 15/9)	WT _{Iso} (n = 17/7)	PP2A _{Iso} (n = 17/7)
G_{\max} (S/F)	97 ± 5.3	74 ± 3.6 [★]	138 ± 7.4 [‡]	102 ± 5.5 ^{★ ‡}
$V_{1/2}$ (mV)	-2.1 ± 0.6	-5.5 ± 0.7 [★]	-6.5 ± 0.7 [‡]	-11.4 ± 0.6 ^{★ ‡}
Steigungswert (mV)	6.1 ± 0.1	5.7 ± 0.1 [★]	5.3 ± 0.1 [‡]	4.6 ± 0.2 ^{★ ‡}

Weibchen:

	WT _{Basal} (n = 9/5)	PP2A _{Basal} (n = 9/5)	WT _{Iso} (n = 11/4)	PP2A _{Iso} (n = 11/4)
G_{\max} (S/F)	101 ± 7.1	76 ± 5.1 [★]	147 ± 7.6 [‡]	99 ± 8.0 ^{★ ‡}
$V_{1/2}$ (mV)	-2.6 ± 0.8	-5.5 ± 0.9 [★]	-6.8 ± 1.0 [‡]	-11.1 ± 0.8 ^{★ ‡}
Steigungswert (mV)	6.2 ± 0.1	5.7 ± 0.2	5.4 ± 0.2 [‡]	4.8 ± 0.2 ^{★ ‡}

Männchen:

	WT _{Basal} (n = 6/4)	PP2A _{Basal} (n = 6/3)	WT _{Iso} (n = 6/4)	PP2A _{Iso} (n = 6/3)
G_{\max} (S/F)	90 ± 7.7	70 ± 3.9 [★]	120 ± 12.5 [‡]	109 ± 5.0 [‡]
$V_{1/2}$ (mV)	-1.4 ± 0.6	-5.4 ± 1.1 [★]	-6.0 ± 0.9 [‡]	-11.9 ± 1.1 ^{★ ‡}
Steigungswert (mV)	6.0 ± 0.2	5.8 ± 0.2	5.3 ± 0.2 [‡]	4.2 ± 0.4 ^{★ ‡}

★ p<0.05 vs. WT; ‡ p<0.05 vs. Basal

V. DISKUSSION

1. Stunning

Die pathophysiologischen Mechanismen von Stunning sind bisher nur unzureichend verstanden. Zur Zeit werden vor allem zwei Theorien diskutiert, einerseits die Bildung von freien Radikalen wie Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$), und Hydroxylradikalen (OH^{\bullet}) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Li et al. 1993, Sekili et al. 1993, Wang und Zweier 1996), andererseits die veränderte Ca^{2+} -Homöostase (Bolli 1990, Kim et al. 2001, Kloner et al. 1998). Für die veränderte Ca^{2+} -Homöostase sprechen die reduzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen-Konzentration (Ca^{2+} -Transienten), eine erniedrigte Stromdichte des L-Typ-Calciumkanals sowie Relaxations- und Kontraktionsstörungen der Stunning-Kardiomyozyten (Kim et al. 2001, Kloner et al. 2001). Beide Theorien schließen einander nicht aus. Freie Radikale können regulatorische Proteine (z.B. SERCA 2a, NCX) beeinflussen, den Ca^{2+} -Transport in die Zelle verändern und als Folge zu intrazellulärer Ca^{2+} -Überladung der Zelle führen (Krause et al. 1989, Corretti et al. 1991).

Weitere Zusammenhänge zwischen der veränderten Ca^{2+} -Homöostase und regulatorischen Proteinen, wie z.B. dem Phospholamban (PLB) bei Stunning aufzuklären, war ein Ziel dieser Arbeit. So wurden molekulare Mechanismen von Stunning an einem etablierten, validierten Stunning-Modell, dem wachen instrumentierten Hund untersucht (Lüss et al. 2000b, Meissner et al. 2000, Rolf et al. 1997). Die Hunde-Biopsien wurden aus dem ischämischen (LAD-Areal) und nicht-ischämischen (RCX-Areal) Kontrollareal desselben Herzens gewonnen. Dies ermöglichte eine vergleichende Untersuchung.

PLB ist ein regulatorisches Protein der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase 2a (SERCA 2a) und reguliert die Ca^{2+} -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR; Brittsan und Kranias 2000, Simmermann und Jones 1998). SERCA 2a wird durch unphosphoryliertes PLB gehemmt, während die β -adrenerge Stimulation unter Vermittlung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) zur PLB-Phosphorylierung und damit zur keine Inhibition der SERCA 2a führt. Die Expression von SERCA 2a und PLB ist bei gestunnten Herzen unverändert. Dies zeigten die Untersuchungen an gestunnten Hunde- (Lüss et al. 2000b) und Schweine-Herzen (Lüss et al. 1998, Kim

et al. 2001) sowie an menschlichen Herzen nach koronararterieller Bypass-Operation (Lüss et al. 2002).

Die reversible Proteinphosphorylierung ist ein essentieller regulatorischer Mechanismus für die Regulation der Herzkontraktion. Dabei wird die Phosphorylierung über Proteinkinasen, die Dephosphorylierung über Proteinphosphatasen (PP) katalysiert. PLB besitzt zwei Phosphorylierungsstellen, eine an der Aminosäure Serin-16 (Ser¹⁶), die von der cAMP-abhängigen PKA phosphoryliert wird. Die zweite Stelle befindet sich an der Aminosäure Threonin-17 (Thr¹⁷), die von der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (Ca²⁺/CaMKII) phosphoryliert wird (Simmerman und Jones 1998, Wegener et al. 1989). Beide Phosphorylierungsstellen, an Ser¹⁶ und Thr¹⁷, wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels spezifischer Antikörper untersucht. Es wurde eine verminderte PLB-Phosphorylierung an Ser¹⁶ und Thr¹⁷ im ischämischen LAD-Areal festgestellt. Dieser Befund entspricht vorherigen Arbeiten. Lüss et al. (2000b; Hund) und Kim et al. (2001; Schwein) haben übereinstimmend gezeigt, daß die Phosphorylierung an PLB-Ser¹⁶ im ischämischen LAD-Areal vermindert war. Die reduzierte PLB-Phosphorylierung könnte zu reduzierter SERCA 2a-Aktivität, nachfolgend zu veränderter Ca²⁺-Homöostase und verlangsamter Relaxation beitragen. Untersuchungen dieser Arbeit haben zum erstenmal gezeigt, daß auch die Phosphorylierung der Phosphorylierungsstelle an Thr¹⁷ im gestunnten Herzgewebe vermindert ist.

Die verminderte PLB-Phosphorylierung könnte auf einer reduzierten Aktivität der PKA und/oder Ca²⁺/CaMKII beruhen. Die PKA phosphoryliert eine Reihe von regulatorischen Phosphoproteinen, z.B. PLB an Ser¹⁶, die α -Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanals und die inhibitorische Untereinheit des Troponins (Tnl) (Charnet et al. 1995, Gao et al. 1997, Kamp und Hell 2000, Rapundalo 1998).

Die Aktivität der PKA wurde unter basalen Bedingungen (in Abwesenheit von cAMP) sowie unter maximaler Stimulation durch Zugabe von 2 μ M cAMP untersucht. Es wurden keine Unterschiede in der Aktivität der PKA unter basalen Bedingungen sowie nach maximaler Stimulation zwischen dem ischämischen LAD- und RCX-Kontrollareal beobachtet. Des weiteren war auch das Verhältnis der Aktivität in Abwesenheit und Anwesenheit von cAMP, welches ein Maß für den Aktivierungszustand der PKA darstellt, unverändert. Vorherige Untersuchungen am Hund haben gezeigt, daß der myokardiale Gehalt von cAMP bei Stunning vermindert war (Lüss et

al. 2000). Eine Abnahme des Gehaltes an cAMP könnte über eine verringerte Aktivierung der PKA eine Abnahme der Phosphorylierung von PLB bewirken. Auch bei menschlicher Herzinsuffizienz wurde trotz der Veränderung des β -adrenergen Signaltransduktionsweges (reduzierte Anzahl von β -Adrenoceptoren: Bristow et al. 1982, Brodde 1991; Erhöhung von G_i -Proteine: Neumann et al. 1988, Ungerer et al. 1993) und des reduzierten cAMP-Gehaltes (Danielsen et al. 1989) keine entsprechende Abnahme der PKA-Aktivität unter basalen Bedingungen nachgewiesen (Böhm et al. 1994, Kirchhefer et al. 1999). Dies weist darauf hin, daß eine Veränderung der PKA-Aktivität der kontraktilen Dysfunktion bei Stunning nicht zugrunde liegen kann.

An der Phosphorylierung von regulatorischen Proteinen in der Herzmuskelzelle ist auch die Ca^{2+} /CaMKII beteiligt, die unter anderem PLB an Thr¹⁷ phosphoryliert. Mishra et al. 2003 haben bei chronisch herzinsuffizienten Hunde-Herzen eine verminderte Phosphorylierung an PLB-Thr¹⁷ und eine verminderte Aktivität der Ca^{2+} /CaMKII festgestellt. Dieser Befund wurde auch bei herzinsuffizienten Ratten beobachtet (Huang et al. 1999). Möglicherweise hängt die in dieser Arbeit gefundene verminderte Phosphorylierung an PLB-Thr¹⁷ mit einer veränderten Ca^{2+} /CaMKII-Aktivität zusammen. Dies könnte teilweise den verminderten Phosphorylierungszustand von PLB erklären. Die Bedeutung der Ca^{2+} /CaMKII-Aktivität wird kontrovers diskutiert, z.B. haben die Untersuchungen an menschlichen Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie eine erhöhte Ca^{2+} /CaMKII-Aktivität gezeigt (Kirchhefer et al. 1999). Möglicherweise liegen zwischen den Spezies Unterschiede vor. Daher wäre eine Untersuchung der Ca^{2+} /CaMKII-Aktivität der gestunnten Hunde-Herzen angebracht.

Der Phosphorylierungszustand von PLB wird durch die Aktivität der PP vom Typ 1 und 2A reguliert (Boknik et al. 2001, MacDougall et al. 1991, Neumann et al. 1993, 1999). Für die verminderte PLB-Phosphorylierung könnte eine erhöhte Aktivität der PPs verantwortlich sein. Viele Befunde deuten auf eine pathophysiologische Bedeutung von PP im Herzen hin (Bokník et al. 2000, Neumann et al. 1997). In Membranvesikeln aus insuffizienten menschlichen Herzen war die PP-Aktivität erhöht und ging mit einer erhöhten mRNA-Expression von PP1 α einher (Neumann et al. 1997). Außerdem war der Phosphorylierungszustand myokardialer regulatorischer Proteine (PLB, Tnl) in insuffizienten menschlichen Herzen vermindert (Bartel et al. 1996; Schwinger et al. 1999, Zakhary et al. 1999). In einem Ratten-Modell, das die Situation bei der menschlichen Herzinsuffizienz simuliert, führte die chronische

β -adrenerge Stimulation zu einem Anstieg der PP-Aktivität, wobei der Phosphorylierungszustand von PLB an Ser¹⁶ und Thr¹⁷ vermindert war (Bokník et al. 2000).

Unsere Untersuchungen zu den Ursachen der verminderten PLB-Phosphorylierung bei Stunning zeigten keine Hinweise auf eine Veränderung der PP-Aktivität. Die PP-Aktivität war zwischen den Homogenaten aus dem ischämischen LAD- und RCX-Kontrollareal unverändert. Ferner wurde untersucht, ob es bei Stunning zu einer lokalen Veränderung der PP-Aktivität im SR kommt. Daher wurde eine Messung der PP-Aktivität in SR-Membranvesikeln aus dem ischämischen LAD- und RCX-Kontrollareal durchgeführt. Die Experimente zeigten auch hier keinen Unterschied der Gesamt-PP-Aktivität zwischen den SR-Membranvesikeln aus dem ischämischen LAD- und RCX-Kontrollareal.

Da PLB vorwiegend von PP1 dephosphoryliert wird (MacDougall et al. 1991), wäre es möglich, daß das Verhältnis zwischen PP1 und PP2A-Aktivität im ischämischen LAD-Areal verändert ist ohne Änderung der Gesamt-PP-Aktivität. Daher wurde die PP-Aktivität in An- und Abwesenheit von 1 nM Okadasäure gemessen, welche spezifisch nur die PP2A-Aktivität hemmt (Neumann et al. 1995, 1999). Die PP2A-Aktivität wurde als Differenz zwischen der Gesamt-PP-Aktivität und der PP1-Aktivität ermittelt. Es wurde kein Unterschied des Verhältnisses der PP1- und der PP2A-Aktivität festgestellt. Zusammenfassend wurden keine Hinweise auf eine Veränderung der PP-Aktivität in SR-Membranvesikeln gefunden.

Denkbar wäre, daß in Hunde-Herzen eine bisher unbekannte bzw. in Herzen nicht näher charakterisierte Proteinphosphatase involviert ist, welche sich an dem β -adrenergen Signaltransduktionsweg beteiligt. Die Abnahme der PLB-Phosphorylierung könnte somit auf einer erhöhten Aktivität einer anderen Proteinphosphatase beruhen. Andererseits wäre es vorstellbar, daß eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung bei gestunnten und nicht-gestunnten Myokard vorliegt, jedoch ist durch die Membranpräparation der Aufbau des Herzens zerstört und damit können die *In vitro*-Untersuchungen Informationen über die veränderte Translokation nicht wiedergeben.

2. Überexpression von Junctin

Junctin (JUN) ist ein wichtiges transmembranäres Protein des kardialen junctionalen SR (Jones et al. 1995). Es bindet an das Ca²⁺-speichernde Protein Calsequestrin

(CSQ), Triadin 1 (TRD) und an den Ryanodin-Rezeptor (RyR). Zusammen bilden sie einen quartären Proteinkomplex (Zhang et al. 1997), der die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR reguliert. Die transmembranären Proteine JUN und TRD, die strukturell stark homolog sind, verankern CSQ funktionell am RyR (Zhang et al. 1997). Die Bindung an CSQ legt die Vermutung einer Funktion von JUN innerhalb der Ca^{2+} -Homöostase der Herzmuskelzelle nahe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein transgenes Maus-Modell verwendet, welches unter der Kontrolle des α -MHC-Promotors kardiospezifisch JUN überexprimierte. Diese JUN-Expression der transgenen, heterozygoten Mäuse war im Vergleich zu WT-Mäusen 10-fach erhöht (Zhang et al. 2001). Sie wiesen gegenüber den WT-Mäusen keine erhöhte Mortalitätsrate und keine Anzeichen einer beginnenden Herzinsuffizienz auf. Die Arbeitsgruppe Hong et al. (2002) stellte ebenso unter der Kontrolle des α -MHC-Promotors transgene, jedoch homozygote, 29-fach-JUN-überexprimierende Mäuse her. Diese starben im Gegensatz zu den 10-fach-überexprimierenden JUN-Mäusen frühzeitig im Alter von 9-11 Wochen an Herzinsuffizienz. Die 29-fache Überexpression war mit einer 131% Hypertrophie, Vorhoffibrrose, Vorhofflimmern und Bradykardie verbunden (Hong et al. 2002). Das Herzgewicht (bei gleichbleibendem Körpergewicht) war bei adulten 10-fach-JUN-überexprimierenden Mäusen im Alter zwischen 16-20 Wochen dagegen nur leicht erhöht (14%). Trotzdem wurde die 14% Hypertrophie mit 2-fach erhöhter ANF mRNA-Expression begleitet, die als Hypertrophie- und Herzinsuffizienz-Indikator gilt. Die leichte Herzhypertrophie ist mit dem Phänotyp bei der Überexpression des homologen Proteins Triadin 1 vergleichbar (Kirchhefer et al. 2001 und 2003). Eine Fibrose wurde nicht beobachtet. Weiterhin war die ermittelte Zellkapazität der Kardiomyozyten der 10-fach-überexprimierenden JUN-Mäuse, die als Maß für die Zellgröße gilt, um 12 % erhöht. Denkbar wäre, daß die Herzhypertrophie durch eine Zellvergrößerung entstanden ist.

Mikrostrukturelle Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie von Herzmuskelgewebe mit einer Überexpression von JUN wiesen Veränderungen im Bereich der Ultrastrukturen innerhalb des SR nach. Die SR-Zisternen waren teils in ihrer Größe verändert, oder die Kontaktflächen zwischen junctionalem SR und T-Tubuli zeigten sich stark vergrößert (Zhang et al. 2001). Diese strukturellen Veränderungen des SR bei einer JUN-Überexpression könnten ein Grund für die gestörte Ca^{2+} -Homöostase der JUN-Zellen sein. Dafür sprechen die Relaxationsstörungen der Zelle, reduzierter

Ca^{2+} -Gehalt des SR, eingeschränkte Kontraktionskraft und erniedrigte Expression von TRD und RyR (Kirchhefer et al. 2003). Möglich wäre, daß einerseits die veränderte Ca^{2+} -Homöostase sekundär Veränderungen des Calciumstromes (I_{Ca}) oder der Inaktivierung der L-Typ-Calciumkanäle hervorruft, andererseits veränderte L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle primär Änderungen an der Ca^{2+} -Homöostase verursachen. Daher wurden die L-Typ-Calciumkanäle mit Patch-Clamp-Technik genauer untersucht.

Die Stromdichte der L-Typ-Calciumkanäle, die aus dem Quotienten von Stromamplitude und Zellkapazität berechnet wird, war unter Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator unverändert. Da die Zellkapazität der JUN-Zellen vergrößert war, kann man einen erhöhten Ca^{2+} -Strom durch den L-Typ-Calciumkanal vermuten. Andererseits ist es möglich, daß die Expression des L-Typ-Calciumkanals erhöht ist. Um eine veränderte Expression auszuschließen, müßte man im Anschluß an diese Arbeit die Expression durch Western-Blotting fortführen. Die Stromdichte war bei Untersuchungen der Arbeitsgruppe Hong et al. (2002) unter identischen Bedingungen vergrößert. Sie stellten als Ursache für den erhöhten Einstrom von Calcium eine erhöhte L-Typ-Calciumkanalprotein-Expression fest. Dies wurde in Verbindung mit einer Verlängerung des Aktionspotentials der Zelle und Bradykardie des Herzen gebracht (Hong et al. 2002). Im Gegensatz dazu, wurde keine veränderte Herzfrequenz bei 10-fach-JUN-überexprimierenden Mäusen beobachtet (Kirchhefer et al. 2003) Dies weist darauf hin, daß sich die zwei JUN-Maus-Modelle nicht nur morphologisch, sondern auch physiologisch unterscheiden. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Hong et al. 2002 und Kirchhefer et al. 2003 wiesen darauf hin, daß es einen Gen-Dosis-Effekt gibt. Je nachdem, wie stark die Überexpression ist, kommt es zu einem unterschiedlichen Phänotyp.

Der Zusammenhang von der Inaktivierung des I_{Ca} und intrazellulärer Ca^{2+} -Homöostase ist von großer Bedeutung. Die Regulation der Inaktivierung des L-Typ-Calciumkanals erfolgt sowohl calciumabhängig als auch spannungsabhängig (Eckert und Chad 1984, Hadley und Lederer 1991, Masaki et al. 1997, McDonald et al. 1994). Für die calciumabhängige Regulation des Öffnungsverhaltens des Kanals ist sowohl das durch den Kanal einströmende als auch das aus dem SR freigesetzte Ca^{2+} von Bedeutung (Sun et al. 1997). Vermutlich wird die schnelle Inaktivierungszeitkonstante τ_1 in stärkerem Maße durch Ca^{2+} beeinflusst, während die langsame Inaktivierungszeitkonstante τ_2 vermehrt spannungsabhängig sein soll (Sun et al. 1997). Die Zuordnung des calciumabhängigen sowie des spannungs-

abhängigen Anteils zu den jeweiligen Zeitkonstanten wird jedoch kontrovers diskutiert. Bei 10-fach-JUN-überexprimierenden Zellen waren die Inaktivierungszeiten τ_1 und τ_2 der L-Typ-Calciumkanäle unter Verwendung von EGTA sowohl für basale Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation vergrößert. Verlängerte Inaktivierungszeiten wurden auch von anderen Arbeitsgruppen bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz beschrieben und können die Auswirkung einer gestörten elektromechanischen Kopplung sein (Kirchhefer et al. 2001, Knollmann et al. 2000, Rossner 1991).

Ob die calciumabhängige und/oder spannungsabhängige Regulation des Öffnungsverhaltens der L-Typ-Kanäle verändert ist, wurde durch zwei verschiedene Ansätze untersucht. Zuerst wurde BAPTA als Ca^{2+} -Chelator (Cohen und Lederer 1988, Sham 1997) eingesetzt. BAPTA besitzt eine deutlich höhere Affinität zu Ca^{2+} -Ionen als EGTA (Smith et al. 1984, Stern 1992). Als Folge werden Ca^{2+} -Ionen, die durch den L-Typ-Calciumkanal einströmen, schneller und wirksamer komplexiert als durch EGTA. So kann man die Inaktivierung, die durch Entleerung des Calciums aus dem SR verursacht wird, isoliert untersuchen. Die Inaktivierungskurve des I_{Ca} unter Verwendung von BAPTA wurde mit einer Inaktivierungszeitkonstante (τ) ausgewertet, die hier unverändert war. Dies deutet darauf hin, daß die durch EGTA entstandene Verzögerung des calciumabhängigen Anteils des L-Typ-Calciumkanals nicht von aus dem SR freigesetztem Ca^{2+} , sondern durch das den Kanal einströmende Calcium verursacht wurde. Weiterhin wurde die Stromdichte des L-Typ-Calciumkanals unter Verwendung von BAPTA untersucht. Sie war unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation bei den JUN-Zellen vergrößert. Die molekulare Basis für die Vergrößerung der Stromdichte ist noch weitgehend unklar. Der entscheidende Ca^{2+} -Sensor des L-Typ-Calciumkanals befindet sich am Ende der α_{1c} -Untereinheit (Soldatov 2003, Zhong und Hofmann 1996). Eine Modifikation der Kanalproteine auf molekularer Ebene, wodurch deren Konfiguration und Öffnungsverhalten verändert werden, ist denkbar. Möglich wäre, daß die Expression und/oder die Empfindlichkeit des L-Typ-Calciumkanals zu Ca^{2+} verändert sind. So wird z.B. eine reduzierte mRNA-Menge der α_{1c} -Untereinheit und der β -Untereinheit des Calciumkanals bei Herzinsuffizienz beobachtet (Hullin et al. 1997, Takahashi et al. 1992).

Um die spannungsabhängige Regulation des Öffnungsverhaltens des L-Typ-Kanals näher zu untersuchen, wurden Ba^{2+} -Ionen statt Ca^{2+} -Ionen als Ladungsträger

verwendet (Ferreira et al. 1997, Josephson et al. 1984, Sako et al. 1997). Ba^{2+} -Ionen sind durch den L-Typ-Calciumkanal durchgängig, verursachen jedoch keine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Damit wurde eine calciumabhängige Inaktivierung des L-Typ-Calciumkanals ausgeschlossen und der Ba^{2+} -leitende Calciumkanalstrom (I_{Ba}) wurde nur spannungsabhängig inaktiviert (Shi und Soldatov 2002). Die Inaktivierungskurve verlief flacher und ließ sich mit nur einer Zeitkonstanten (τ) beschreiben (Masaki et al. 1997, Lee et al. 1985). Die Inaktivierungszeitkonstante τ war verlängert. Die festgestellte Verzögerung der Inaktivierungszeit bei Verwendung von Ba^{2+} deutet auf eine Veränderung der spannungsabhängigen Inaktivierung des I_{Ca} hin. Möglich wäre, daß der Spannungssensor, der sich auf der α_{1c} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals befindet, verändert ist. Ein weiterer Hinweis dafür ist das veränderte Potential der halbmaximalen Leitfähigkeit. Es sagt primär etwas über die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung aus. Hier war es unter basalen Bedingungen vergrößert. Dies deutet auf eine Veränderung des Spannungssensors am Kanal hin. Die Stromdichte des I_{Ba} war reduziert. Da der Spannungssensor sich ebenso wie der Calciumsensor auf der α_{1c} -Untereinheit befindet, wäre es möglich, daß ein Ungleichgewicht zwischen beiden Sensoren existiert. Dies könnte möglicherweise die erhöhte Stromdichte unter Einsatz von BAPTA und reduzierte Stromdichte unter Ba^{2+} -Ionen erklären.

Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Unterschied auf der L-Typ-Calciumkanalebene zwischen den Geschlechtern getestet. Es gibt Hinweise darauf, daß in der Elektrophysiologie geschlechtsspezifische Unterschiede vorliegen (Trépanier-Boulay et al. 2001). So hat man bei WT-Zellen deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Repolarisation beobachtet. Die Repolarisation war bei weiblichen WT-Zellen deutlich verlängert. Die Ursache dafür wurde in einer verminderten Expression des Proteins Kv1.5, das den ultraschnell verzögerten Gleichrichterstrom (I_{kur}) kodiert, auf mRNA- und Protein- Ebene festgestellt.

Bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung der Daten wurde beobachtet, daß z.B. die reduzierte Stromdichte unter Ba^{2+} -Ionen nur bei Zellen der männlichen Mäuse signifikant ist. Anders war es unter Verwendung von BAPTA. Hier zeigten die Zellen der weiblichen Mäuse signifikante Unterschiede. Da die Signifikanzen in keine einheitliche Richtung gehen, deutet es darauf hin, daß keine relevanten geschlechtsspezifischen Unterschiede bei JUN-überexprimierenden Zellen vorliegen.

3. Überexpression einer Doppelmutante der SERCA 2a

SERCA 2a hat eine wichtige Rolle sowohl für die postnatale kardiale Entwicklung als auch für die kardiale Kontraktion und Relaxation. Ein Hinweis dafür sind z.B. die Untersuchungen mit der Deletion SERCA 2a, die zu erhöhter embryonalen und neonatalen Mortalität und kardialen Mißbildungen führte. Die adulten heterozygoten SERCA 2a-knock-out-Mäuse zeigten eine milde kardiale Hypertrophie und eine reduzierte kardiale Kontraktilität und Relaxation (Ver Heyen et al. 2001).

Vorherige Studien haben gezeigt, daß die Expression von SERCA 2a sowohl bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz als auch bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie vermindert und mit einer reduzierten myokardialen Funktion und kontraktile Dysfunktion verbunden ist (Hasenfuss et al. 1994, Hasenfuss 1998). Unstrittig ist auch eine verminderte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR und verlängerte Ca^{2+} -Transienten bei der terminalen Herzinsuffizienz des Menschen (Gwathmey et al. 1987, Hasenfuß et al. 1994). Daher ist es möglicherweise ein langfristiges gentherapeutisches Ziel, eine Überexpression der SERCA 2a im menschlichen insuffizienten Herzen zu realisieren (Del Monte et al. 2001, Meyer und Dillmann 1998, Müller et al. 2003).

Die Effekte einer Überexpression der SERCA 2a (Wildtyp-Form; WT-SERCA 2a) wurden bereits in transgenen Maus-Modellen untersucht. Die gezielte Überexpression von SERCA 2a (20% bzw. 54%) im Herzen transgener Mäuse erhöhte die maximale Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme in das SR und die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten in isolierten Herzmuskelzellen. Dies ging mit einer verbesserten Kontraktilität und Relaxation des Myokards einher (He et al. 1997, Baker et al. 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine transgene Mauslinie verwendet, die eine SERCA 2a-Doppelmutante in Herzen unter der Kontrolle eines α -MHC-Promotors überexprimierte. Bei der Doppelmutante wurden die Aminosäuren Isoleucin 235 und Threonin 446 durch Phenylalanin bzw. Isoleucin ersetzt (I235F und T446I). Die beiden Mutationen befinden sich in bisher wenig untersuchten Bereichen von SERCA 2a. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, neue Erkenntnisse über die Auswirkung der Veränderung der Doppelmutation zu bringen. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, daß die Aminosäuren der SERCA 2a im Bereich 336 bis 412 der Interaktion mit PLB entsprechen, während die Aminosäuren der SERCA 2a 467-762 die hohe Ca^{2+} -Affinität für SERCA 2a bestimmen (Toyofuku et al. 1993).

Die Überexpression der SERCA 2a-Doppelmutante resultierte in einer 2-fach erhöhten Expression der gesamten SERCA 2a in den Herzen der transgenen Mäuse (Kirchhefer et al. 2000, Neumann et al. 2001). Die transgenen SERCA 2a-I235F/T446I-Mäuse wiesen keine erhöhte Mortalität gegenüber der WT-Kontrollgruppe auf. Symptome einer Herzinsuffizienz waren nicht feststellbar. Körpergewicht, Herzgewicht und das daraus resultierende relative Herzgewicht waren in beiden Gruppen gleich. Auch die Zellkapazität, die als direktes Maß für die Zellgröße angesehen wird, war unverändert. Dies entspricht den Resultaten der Wildtyp-SERCA 2a-überexprimierenden Mäusen und Ratten anderer Arbeitsgruppen (Baker et al. 1998, Müller et al. 2003). Letztlich ist die Kontraktilität der SERCA 2a-I235F/T446I-Herzen verbessert. Dies zeigten die Versuche am Modell des arbeitenden Herzen, wo die Kontraktilität in den transgenen Herzen um ca. 30% erhöht war (Kirchhefer et al. 2000, Neumann et al. 2001). Dies ergibt sich als Folge erhöhter Amplituden der Calciumtransienten sowie einer Beschleunigung ihres Abfalls und der Relaxation (Kirchhefer et al. 2000, Neumann et al. 2001).

Es wurden die Stromdichte, die Inaktivierungskinetik und die Leitfähigkeit der SERCA 2a-I235F/T446I-Zellen untersucht, um zu charakterisieren, wie sich die Überexpression auf den L-Typ-Calciumkanal auswirkt. Unter Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator wurde für basale Bedingungen bei SERCA 2a-I235F/T446I-Zellen zwischen -20 mV bis +40 mV eine geringere Stromdichte ermittelt. Die β -adrenerge Stimulation glich die Verminderung der Stromdichte nicht aus. Ebenso wurde im Bereich zwischen -20 mV bis +40 mV eine verringerte Stromdichte festgestellt. Denkbar wäre, daß die verminderte Stromdichte auf eine reduzierte Expression des Calciumkanalproteins zurückzuführen ist. Erste Untersuchungen der Expression des L-Typ-Calciumkanals haben gezeigt, daß die Expression bei der Doppelmutante im Vergleich zu WT um 25 % reduziert ist (unveröffentlicht, Kirchhefer und Neumann durch persönliche Mitteilung). Dies würde den Daten der Arbeitsgruppe Lalli et al. 2001 entsprechen, welche ventrikuläre Kardiomyozyten der SERCA 1-überexprimierenden Maus untersucht hat. Sie stellte ebenso als Ursache für einen verminderten Einstrom von Calcium eine Reduzierung der L-Typ-Calciumkanalprotein-Expression fest. Genau wie bei der in dieser Arbeit verwendeten transgenen SERCA 2a-Maus zeigte sich trotz reduziertem Calciumstrom eine verbesserte Kontraktion und Relaxation. Zusammen mit Versuchen, die einen erhöhten Ca^{2+} -Gehalt des SR zeigten, wird als Hypothese möglich, daß ein geringerer Ca^{2+} -Einwärtsstrom

ausreicht, um die Calcium-induzierte Freisetzung von im SR gespeicherten Ca^{2+} -Ionen auszulösen (Lalli et al. 2001). Weitere Untersuchungen zu Veränderungen der Sensitivität des RyR-Rezeptors für Ca^{2+} -Ionen sind notwendig, wurden aber bei der Überexpression der SERCA 1 nicht beobachtet (Lalli et al. 2001).

Als Folge des geringeren Ca^{2+} -Einwärtsstroms zeigte sich die geringere Leitfähigkeit der L-Typ-Calciumkanäle bei SERCA 2a-I235F/T446I-Zellen. Die Untersuchungen der Leitfähigkeits-Spannungs-Kurve wiesen unter basalen Bedingungen eine geringere maximale Leitfähigkeit auf sowie eine Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Leitfähigkeit zu positiveren Werten. Die Effekte wurden auch durch β -adrenerge Stimulation nicht ausgeglichen. Des weiteren waren nach Zugabe von Isoprenalin die Steigungswerte der Kurven verschieden. Verschiebungen der Leitfähigkeit zu positiveren Potentialen sind auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden (Josephson et al. 1984). Möglicherweise beeinflusst die Überexpression den Spannungssensor innerhalb der Kanalpore, der für die spannungsbedingte Öffnung des Kanals von Bedeutung ist (Papazian und Bezanilla 1997). Um dennoch eine Kanalöffnung und somit den Ionendurchtritt zu ermöglichen, beinhaltet dies infolgedessen die Notwendigkeit stärkerer Depolarisationen zu positiveren Potentialbereichen. Des weiteren könnten die sowohl systolisch als auch diastolisch festgestellten erniedrigten Ca^{2+} -Konzentrationen im Zytoplasma eine Rechtsverschiebung der Leitfähigkeitskurven zu positiveren Potentialen verursachen. So wurden auch von anderen Arbeitsgruppen Potentialverschiebungen zu positiveren Werten durch Änderung der Ca^{2+} -Konzentrationen, die vermutlich auf veränderten Oberflächenpotentialen beruht, festgestellt (Reuter und Scholz 1977, Hille 1992).

Der inaktivierende Anteil des I_{Ca} läßt sich unter Verwendung von EGTA als Ca^{2+} -Chelator mit zweier Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 und τ_2 mathematisch beschreiben (Ludwig et al. 1998). Dabei ergaben sich unter basalen Bedingungen für die schnelle Inaktivierungszeitkonstante τ_1 keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Demnach ist die calciumabhängige Inaktivierung des L-Typ-Calciumkanals unverändert geblieben. Im Gegensatz dazu war die langsame Inaktivierungszeitkonstante τ_2 bei SERCA 2a-I235F/T446I-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen verlängert. Nach β -adrenerger Stimulation war die τ_2 ebenso bei SERCA 2a-I235F/T446I-Zellen verlängert. Die Verlängerungen der langsamen Inaktivierungszeitkonstanten τ_2 sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach

β -adrenerger Stimulation stehen möglicherweise im Zusammenhang mit der Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Leitfähigkeit. Schon dabei zeigte sich eine durch die Überexpression der SERCA-Doppelmutante bedingte spannungsabhängige Veränderung der Leitfähigkeit, die möglicherweise als eine Veränderung des Kanalproteins auf molekularer Ebene oder in Bezug auf seinen Spannungssensor zu werten ist (Soldatov et. al. 1998).

Die Ergebnisse der Stromdichte, der Inaktivierungszeitkonstanten und der Leitfähigkeit wurden nach Geschlecht getrennt und ausgewertet. Es ergab sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied.

4. Überexpression des humanen Inhibitors 2 der Proteinphosphatase 1 in Herzen der Maus

Neuere Befunde deuten auf eine pathophysiologische Rolle der Phosphatasen (PP) bei der Entwicklung einer Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz hin. Beispielsweise waren die Aktivität und die Expression der katalytischen Untereinheit der PP1 in ventrikulärem Gewebe von menschlichen insuffizienten Herzen erhöht (Neumann et al. 1997). Dies kann zu der beobachteten verminderten Effektivität β -adrenerger positiv-inotrop wirkenden Substanzen in terminal insuffizienten Herzen beitragen (Bristow et al. 1982). Durch Hemmung der PP1 mittels Überexpression eines konstitutiv aktiven Inhibitors konnte die Kontraktilitätszunahme auf β -adrenerge Stimulation in Kardiomyozyten aus terminal insuffizienten Herzen verbessert werden (Carr et al. 2002). Dies zeigt die Bedeutung der PP1 als möglichem Regulator der Herzkontraktion.

Die katalytische Untereinheit der PP1 wird durch zwei spezifische endogene Inhibitoren, I_1 und I_2 , reguliert (Cohen 1989, Connor et al. 2000, Tao et al. 1978). Um zu untersuchen, wie sich die reduzierte PP-Aktivität auf die Ca^{2+} -Homöostase und auf den L-Typ-Calciumkanal auswirkt, wurde eine transgene Maus hergestellt, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Dieses transgene Maus-Modell überexprimierte unter der Kontrolle des α -MHC-Promotors kardiospezifisch humanen I_2 der PP1 als C-terminal trunke Form (AS 1-135). Dies führte zu einer 80%-igen Reduzierung der gesamten PP-Aktivität in den transgenen Herzen (Neumann et al. 2002). Die transgenen Mäuse waren unauffällig und wiesen keine Zeichen einer Herzinsuffizienz sowie keine erhöhte Mortalitätsrate auf. Es war weder ein erhöhtes

Körper- noch ein höheres Herzgewicht gegenüber den I_2 - und WT-Mäusen festzustellen (Kirchhefer et al. 2001). Ebenso war die Zellkapazität, die als direktes Maß für die Zellgröße angesehen wird, unverändert.

Hinsichtlich der Strom-Spannungs-Beziehung zeigte sich unter basalen Bedingungen über den gesamten Meßbereich von -30 mV bis +60 mV kein Unterschied zwischen den I_2 - und WT-Zellen. Auffällig war jedoch der Befund nach β -adrenerger Stimulation. Hierbei zeigte sich eine deutlich verringerte Stromdichte der I_2 -Zellen zwischen 0 mV und +40 mV. Während bei den WT-Zellen die Stromzunahme nach β -adrenerger Stimulation 137 % betrug, konnte in der Gruppe der I_2 -Zellen lediglich nur ein Stromanstieg auf 86 % festgestellt werden. Ähnliche Befunde eines verringerten Ansprechens des L-Typ-Calciumstromes auf β -adrenerge Stimulation, wurden auch schon bei anderen Experimenten mit PP-Inhibitoren beobachtet (Herzig et al. 1995). Normalerweise ließe eine Überexpression des I_2 , der einen hemmenden Einfluß auf die dephosphorylierende PP 1 ausübt, eine verringerte Dephosphorylierung des L-Typ-Calciumkanals und damit einen erhöhten Einstrom von Calcium vermuten. Möglich wäre, daß die Dephosphorylierung des L-Typ-Calciumkanals verstärkt ist. Da in den transgenen Herzen ein Anstieg der Expression der katalytischen Untereinheit der PP 1 beobachtet wurde (Carr et al. 2002), wäre es denkbar, daß die PP1, die im Sarkolemma lokalisiert ist, zur Dephosphorylierung des L-Typ-Calciumkanals führt. Möglicherweise kommt es nun auf Grund dieser gegenregulatorisch erhöhten Phosphatase 1-Expression zu einer dadurch bedingten stärkeren Dephosphorylierung des L-Typ-Calciumkanals und letztlich zu einer prozentual geringeren Stromzunahme nach β -adrenerger Stimulation.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die PP-Aktivität maximal mit dem Hemmstoff Calyculin A (Ishihara et al. 1989) blockiert. Calyculin A hemmt sowohl PP1 als auch PP2A (Neumann et al. 1995a). So wurden auch mögliche Auswirkungen von PP2A, die in Verbindung mit dem L-Typ-Calciumkanal steht (Davare et al. 2000), blockiert. Die Stromdichte und die Stromzunahme nach Gabe von Calyculin A war über den gesamten Meßbereich von -30 mV bis +60 mV zwischen der I_2 - und WT-Zellen unverändert. Dies weist darauf hin, daß die geringere Stromdichte nach β -adrenerger Stimulation nicht durch die veränderte Dephosphorylierung des L-Typ-Calciumkanals ausgelöst wurde, sondern über einen anderen Mechanismus verursacht wurde.

Denkbar wäre, daß die geringere Stromdichte nach β -adrenerger Stimulation auf einer geringeren Sensitivität oder Anzahl β -adrenerger Rezeptoren beruht, wie es in ähnlicher Weise auch von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben wird (Ouadid et al. 1995). Eine Phosphorylierung der β -adrenergen Rezeptoren kann zu einer Entkopplung und einer Desensibilisierung der β -adrenergen Rezeptoren führen (Wallukat 2002). Dies kann z.B. durch die G-Protein-Rezeptorkinase (GRK) verursacht werden. Die GRK wird aktiviert, wenn der β -adrenergen Rezeptor durch Agonisten, z.B. Isoprenalin stimuliert wird. Es wäre möglich, daß die GRK in den transgenen Zellen verstärkt exprimiert wurde. Dies kann als Folge zu Veränderungen des β -adrenergen Signaltransduktionsweges und anschließend des L-Typ-Calciumkanals führen.

Interessanterweise wurde ein geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt. Die reduzierte Stromdichte des L-Typ-Calciumkanals und die verringerte prozentuale Stromzunahme nach β -adrenerger Stimulation wurde ausschließlich bei I_2 -Zellen der männlichen Mäuse beobachtet.

Ein möglicher Grund für die Geschlechtsunterschiede kann ein Einfluß von Steroidhormonen auf den L-Typ-Calciumkanal sein. Fraglich ist, inwieweit die Geschlechtshormone eine Rolle bei der Regulation der L-Typ-Calciumkanal-Genexpression spielen. Die Arbeitsgruppe Johnson et al. 1997 zeigte, daß die Deletion des Estrogen-Rezeptor-Gens die Expression des L-Typ-Calciumkanals erhöht. Ein weiterer Effekt war eine Verlängerung des Aktionspotentials und des QT-Intervalls mit erhöhtem kardiovaskulären Erkrankungsrisiko, z.B. Herzrhythmusstörungen. Einige Studien schrieben 17β -Estradiol eine Rolle als L-Typ-Calciumkanal-Antagonist zu (Grohe et al. 1996, Jiang et al. 1992, Shan et al. 1994).

Eine 5-wöchige Behandlung von kastrierten weiblichen und männlichen Kaninchen mit 17β -Estradiol und 5α -Dihydroxytestosteron zeigte, daß die Steroidhormone unterschiedliche Auswirkungen auf weibliche und männliche Tiere haben. Bei Zellen von kastrierten weiblichen Kaninchen, die entweder mit 17β -Estradiol oder 5α -Dihydroxytestosteron behandelt wurden, war die Stromdichte des L-Typ-Calciumkanals erhöht. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen von männlichen Kaninchen keinen Unterschied. Dies könnte eine Ursache für die geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der Repolarisation darstellen (Pham et al. 2002).

Weiterhin können sich Schilddrüsenhormone an der Regulation des L-Typ-Calciumkanals beteiligen. Das T₃-Schilddrüsenhormon beeinflusst die Stromdichte des L-Typ-Calciumkanals (Watanabe et al. 2003). Da die geschlechtsspezifischen Unterschiede nicht nur auf der L-Typ-Calciumkanalebene sondern auch bei hämodynamischen Untersuchungen und Ca²⁺-Transienten von transgenen Herzen festgestellt wurden, wäre es denkbar, daß die Überexpression unterschiedliche Auswirkung auf Zellen von weiblichen und männlichen Tieren hat. Um die genaue Ursache des geschlechtsspezifischen Unterschieds festzustellen, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

5. Überexpression einer katalytischen Untereinheit α der Proteinphosphatase 2A

Vorherige Studien haben gezeigt, daß in Herzen Serin/Threonin-PPs vom Typ 1, Typ 2A, Typ 2B und Typ 2C vorliegen (Cohen 1989, DePaoli-Roach et al. 1994). Die im Herzen vorhandenen PP1 und PP2A bilden etwa 90% der Phosphataseaktivität (Cohen 1989, Ingebritsen et al. 1983, Lüss et al. 2000a). PP2A α ist erforderlich für die Herzentwicklung. Dies konnte durch Knock-out-Experimente gezeigt werden. Die fehlende katalytische Untereinheit α der PP2A führte am 6. Post-coitum-Tag zum Tod (Gotz et al. 1998). PP2A ist an der Dephosphorylierung der regulatorischen Proteine wie PLB und Tnl beteiligt (MacDougall et al. 1991), an der Regulation der ATP-sensitiven Kaliumkanäle (Light et al. 1995) und der L-Typ-Calciumkanäle (Davare et al. 2000) sowie an der Modulation des MAP-Kinase-Signalwegs (Bogoyevitch et al. 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die Überexpression der katalytischen Untereinheit α der PP2A auf den L-Typ-Calciumkanal auswirkt. Dafür wurde ein transgenes Maus-Modell verwendet. Die Expression der katalytischen Untereinheit α der PP2A im Herzen der Mäuse war unter der Kontrolle des α -MHC-Promotors im Vergleich zu WT-Mäusen um 110 % erhöht (Gergs et al. 2003). Während die PP1-Aktivität in transgenen Herzen unverändert war, wurde die PP2A-Aktivität um 68 % erhöht. Die PP2A-Mäuse wiesen gegenüber den WT-Mäusen keine erhöhte Mortalitätsrate auf. Anders war es bei den transgenen Mäusen, die eine dominante negativ Mutante der strukturellen A-Untereinheit von PP2A überexprimierten (Brewis et al. 2000). Dort wurde eine erhöhte Sterblichkeit und

postnatale Herzvergrößerung mit einem charakteristischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie beobachtet. Dies wurde durch die Veränderung der Bindungsstellen der PP2A verursacht. Durch die Überexpression band die strukturelle A-Untereinheit nur die katalytische Untereinheit, jedoch nicht die regulatorische Untereinheit der PP2A und führte damit zu Veränderung der PP2A-Aktivität (Brewis et al. 2000). Bei den für unsere Untersuchungen verwendeten PP2A-Mäusen war das absolute und relative Herzgewicht erhöht (56 %). Eine zelluläre Herzhypertrophie mit Nekrose und Fibrose wurde durch histologische Untersuchungen nachgewiesen und von einer um 25 % höheren Zellkapazität, die als Maß der Zellgröße angesehen wird, reflektiert (Gergs et al. 2003). Außerdem hatte die Überexpression der PP2A eine dilatative Kardiomyopathie, reduzierte Kontraktilität und veränderte Ca^{2+} -Homöostase der transgenen Herzen zu Folge (Gergs et al. 2003). Auf die veränderte Ca^{2+} -Homöostase deuten die reduzierte Phosphorylierung von PLB und Tnl, ein erhöhter diastolischer Ca^{2+} -Gehalt, verlängerte Relaxationszeiten und reduzierte maximale Kontraktion der PP2A-Kardiomyozyten hin.

Ein weiterer Hinweis für eine kardiale Dysfunktion des transgenen Herzens ist die reduzierte Stromdichte des L-Typ-Calciumkanals bei PP2A-überexprimierenden Zellen. Die Stromdichte war sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation verringert. Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen an verschiedenen Modellen für Herzhypertrophie oder Herzinsuffizienz beschrieben (He et al. 2001, Ming et al. 1994, Tomaselli und Marban 1999). Die verminderte Stromdichte kann durch die PP2A-Überexpression verursacht werden. Biochemische Untersuchungen deuten darauf hin, daß PP2A die α_1 -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung der α_1 -Untereinheit an Serin 1928 wirkt der PKA Phosphorylierung entgegen (Davare et al. 2000). PKA phosphoryliert nicht nur die α_1 -Untereinheit an Serin 1928, sondern auch an Serin 478, 479 sowie die β -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals (Bunemann et al. 1999). Daher kann teilweise die Phosphorylierung durch PKA weiterhin ablaufen. Dies könnte die unveränderte prozentuale Stromzunahme nach β -adrenerger Stimulation zwischen PP2A-Zellen und WT-Zellen erklären.

Die α_1 -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals bildet die Ca^{2+} -leitende Pore und beinhaltet die Bindungsstellen für alle bekannten Calciumkanalblocker, den Calciumsensor, den Spannungssensor, den Selektivitätsfilter und die Phosphorylierungs-

stellen (Mitterdorfer et al. 1998, Regulla et al. 1991). Die durch die PP2A entstehende Dephosphorylierung der α_1 -Untereinheit kann eine reduzierte Offenwahrscheinlichkeit des L-Typ-Calciumkanals verursachen (DuBell et al. 1996, Klein et al. 2003, Ono und Fozzard 1993). Dafür sprechen die reduzierte Stromdichte und die verminderte maximale Leitfähigkeit bei PP2A-Zellen unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation. Die geringere Leitfähigkeit reflektiert einen geringeren Stromfluß. Dies könnte durch eine geringere Offenwahrscheinlichkeit des L-Typ-Calciumkanals ausgelöst werden.

Ein weiterer Hinweis auf eine eingeschränkte Herzfunktion ist die veränderte Inaktivierungskinetik des L-Typ-Calciumstromes. Auffällig war die Verlängerung der schnellen (τ_1) und der langsamen (τ_2) Inaktivierungszeitkonstante des L-Typ-Calciumkanalstromes unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation bei den Zellen von PP2A-überexprimierenden Mäusen. Die Regulation der Inaktivierung des L-Typ-Calciumkanals erfolgt sowohl calciumabhängig als auch spannungsabhängig (Eckert und Chad 1984, Hadley und Lederer 1991, Masaki et al. 1997, McDonald et al. 1994). Für die calciumabhängige Regulation des Öffnungsverhaltens des Kanals ist sowohl das durch den Kanal einströmende als auch das aus dem SR freigesetzte Ca^{2+} von Bedeutung (Sun et al. 1997). Vermutlich wird die schnelle Inaktivierungszeitkonstante τ_1 in stärkerem Maße durch Ca^{2+} beeinflusst, während die langsame Inaktivierungszeitkonstante τ_2 vermehrt spannungsabhängig sein soll (Sun et al. 1997). Daher deutet die Verlängerung der schnellen Inaktivierungszeitkonstante τ_1 auf eine calciumabhängige und die Verlängerung der langsamen Inaktivierungszeitkonstante τ_2 auf eine spannungsabhängige Beeinflussung des L-Typ-Calciumkanalstromes hin. Es wäre möglich, daß durch den verminderten Ca^{2+} -Einstrom des L-Typ-Calciumkanals eine verzögerte Inaktivierungszeit von τ_1 entsteht. Die Verlängerung von τ_2 deutet darauf hin, daß ebenfalls der spannungsabhängige Anteil des L-Typ-Calciumkanals verändert ist. Das Potential der halbmaximalen Leitfähigkeit, welche eine Aussage über die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung erlaubt, war unter basalen Bedingungen und nach β -adrenerger Stimulation vermindert. Dies deutet auf eine Veränderung des Spannungssensors am Kanal hin.

Verzögerte Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten wurden bei Herzhypertrophie oder Herzinsuffizienz auch von anderen Arbeitsgruppen festgestellt (Knollmann et al.

2000, Rossner 1991). Diese Veränderungen wurden in Zusammenhang mit einer gestörten elektromechanischen Kopplung gebracht.

Nach geschlechtsspezifischer Aufteilung der Daten konnte kein Unterschied ermittelt werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Mechanismen der bei Stunning entstehenden reversiblen kontraktile Dysfunktion sollten näher charakterisiert werden. Für diese Untersuchungen standen ventrikuläre Homogenate des Modells für myokardiales Stunning aus dem ischämischen LAD- und dem nicht-ischämischen RCX-Kontrollareal desselben Herzens zur Verfügung. Im ischämischen Areal war der Phosphorylierungszustand des Phospholamban an den Phosphorylierungsstellen Serin-16 und Threonin-17 vermindert. Die Enzymaktivitäten der Proteinphosphatase 1 und 2A sowie der cAMP-abhängigen Proteinkinase waren unverändert. Eine Veränderung des Verhältnisses zwischen der Aktivität der Proteinphosphatase 1 und 2A wurde ebenfalls nicht beobachtet. Diese Ergebnisse lassen dem Schluß zu, daß eine bisher unbekannte bzw. in Herzen nicht näher charakterisierte Proteinphosphatase an der Regulierung der Phosphorylierungszustände in ischämischen Arealen involviert sein kann.

Weiterhin sollte die pathophysiologische Rolle der Ca^{2+} -regulierenden Proteinen durch die Überexpression auf die Ca^{2+} -Homöostase und ihr direkter und indirekter Einfluß auf den kardialen L-Typ-Calciumkanal untersucht werden. Für die Durchführung der Untersuchungen standen transgene Mausmodelle zur Verfügung. Zu den untersuchten Proteinen gehörten Junctin, eine Doppelmutante der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase 2a, der Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1 sowie die Proteinphosphatase 2A.

Junctin-überexprimierende Mäuse zeigten eine leichte Hypertrophie im gesamten Herzen und auf einzelner Zellebene. Die Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanals waren unter Verwendung des Ca^{2+} -Chelators EGTA und des Ladungsträger Barium-Ionen verlängert und die Stromdichte war unter Einsatz von Barium-Ionen erniedrigt sowie im Gegenwart des Ca^{2+} -Chelators BAPTA erhöht. Dies könnte durch Veränderungen des Calcium- und Spannungssensors auf der α_1 -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals verursacht worden sein.

Die Untersuchungen an Mäusen, die eine Doppelmutante der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase 2a überexprimierten, zeigten eine erhöhte kardiale Kontraktilität sowie eine beschleunigte Relaxation. Die Stromdichte war bei diesen Zellen unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation verringert. Des weiteren wurden neben einer Verschiebung der Leitfähigkeits-Spannungs-Kurve zu positiveren

Werten verlängerte Zeiten für die langsame Inaktivierung des L-Typ-Calciumkanals ermittelt. Diese Veränderungen des L-Typ-Calciumkanals können auf einen veränderten Spannungssensor zurückgeführt werden.

Bei einer Überexpression des Inhibitors 2 der Proteinphosphatase 1 tritt eine geringere Stromdichte des L-Typ-Calciumkanals gegenüber β -adrenerger Stimulation auf. Eine veränderte Dephosphorylierung des L-Typ-Calciumkanals konnte durch die elektrophysiologischen Versuche mit dem PP-Hemmstoff Calyculin A ausgeschlossen werden, da die Stromdichte unter diesen Bedingungen unverändert war. Demnach kann entweder eine verminderte Sensitivität oder eine reduzierte Anzahl von β -Adrenorezeptoren oder ein veränderter β -adrenerger Signaltransduktionsweg an der verminderten Sensitivität des L-Typ-Calciumkanals beteiligt sein. Zusätzlich wurden bei den I_2 -transgenen Mäusen geschlechtsspezifische Unterschiede für die Stromdichte und die Inaktivierungszeit des L-Typ-Calciumkanals beobachtet. Die Ursachen dieser Veränderungen verbleiben bisher ungeklärt. Vermutlich hängen die geschlechtsspezifischen Unterschiede mit einer Veränderung des Geschlechtshormonspiegels zusammen.

Die Überexpression der katalytischen Untereinheit α der Proteinphosphatase 2A war von einer Herzhypertrophie im gesamten Herzen sowie auf einzelner Zellebene begleitet und führte unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation zu einer Reduktion der Stromdichte und zu verzögerten Inaktivierungszeitkonstanten des L-Typ-Calciumkanals. Des Weiteren waren die maximale Leitfähigkeit, das Potential der halbmaximalen Leitfähigkeit sowie der Steigungswert vermindert. Die Veränderungen des L-Typ-Calciumkanals gehen mit einer eingeschränkten kontraktile Funktion des transgenen Herzens einher.

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine sind für die Kopplung von Erregung und Kraftentwicklung im Herzen von entscheidender Bedeutung. Veränderungen in ihrer Expression bzw. Aktivität können somit auch pathophysiologische Veränderungen bei der Herzinsuffizienz mitbedingen.

VII. ANHANG

1. Arbeitsmaterialien

Alle Chemikalien wurden in z. A.-Qualität oder im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Das für die Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde durch zweifache Destillation (Bi-Dest 2304, GFL, Burgwedel) oder als Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (TKA-LAB, TKA, Niederelbert) gewonnen.

Präparation des Gewebes und der Membranvesikeln

- N,N,N',N'-Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA); Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- β -Mercaptoethanol; Bio-Rad-Laboratories, Hercules, CA, USA
- Natriumfluorid; Sigma Chemie, Deisenhofen
- Kaliumchlorid; Merck, Darmstadt
- Trishydroxymethylaminomethan; Merck, Darmstadt
- Filter 0.22 μ m; GS Typ, Millipore, Bedford, England

Quantifizierung von Phospholamban

- [¹²⁵I]-anti-Maus-IgG; ICN Biomedicals, Eschwege
- Acrylamid; ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
- Ammoniumpersulfat; Sigma Chemie, Deisenhofen
- Anti-Phospholamban monoklonaler Antikörper; PhosphoProtein Research, Bardsey, England
- N,N'-Bis-Methylen-Ethylen-Acrylamid; Bio-Rad-Laboratories, Hercules, CA, USA
- Bromphenolblau; Merck, Darmstadt
- Di-natriumhydrogenphosphat-Dihydrat; Merck, Darmstadt
- DL-Dithiothreitol (DL-DTT); Sigma Chemie, Deisenhofen
- N,N,N',N'-Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA); Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Glycerin; Sigma Chemie, Deisenhofen
- Glycin; Merck, Darmstadt
- Molmassenstandard (low molecular weight, 94 – 14 kDa); Pharmacia LKB, Piscataway, NJ, USA
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED); Sigma Chemie, Deisenhofen
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat; Merck, Darmstadt

- Natriumdodecylsulfat (SDS); Merck, Darmstadt
- Natriumhydrogencarbonat; Merck, Darmstadt
- Nitrozellulosemembran, Schleicher&Schüll, Dassel
- Ponceau-Rot; Sigma Chemie, Deisenhofen
- Rinderalbumin (BSA); Sigma Chemie, Deisenhofen
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris); Merck, Darmstadt
- Tween 20; Sigma Chemie, Deisenhofen

Messung der Aktivität der Proteinphosphatasen

- Adenosin-5'-triphosphat (ATP); Boehringer Mannheim, Mannheim
- Ammoniumsulfat; Sigma Chemie, Deisenhofen
- β -Mercaptoethanol; Bio-Rad-Laboratories, Hercules, CA, USA
- N,N,N',N'-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- γ -[³²P]-ATP; Hartmann Analytic, Braunschweig
- Calciumchlorid-Dihydrat; Merck, Darmstadt
- Dialyseschauch Servapor 6 mm; Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Koffein; Sigma Chemie, Deisenhofen
- Magnesiumchlorid; Merck, Darmstadt
- Natriumazid; Merck, Darmstadt
- Okadarsäure; ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
- Phosphorylase b; Sigma Chemie, Deisenhofen
- Phosphorylase-Kinase; Sigma Chemie, Deisenhofen
- Reaktionsgefäße mit Deckelverriegelung 1.5 ml; Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
- Rinderalbumin (BSA); Sigma Chemie, Deisenhofen
- Szintillationsgefäße Pony Vial 6000292; Canberra Packard, Dreieich
- Trichloressigsäure (TCA); Merck, Darmstadt
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris); Merck, Darmstadt

Messung der Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A

- Adenosin-5'-triphosphat (ATP); Roche, Großostheim
- DL-Dithiothreitol (DL-DTT); Sigma Chemie, Deisenhofen
- N,N,N',N'-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- γ -[³²P]-ATP; Hartmann Analytic, Braunschweig

- Kemptid; Sigma Chemie, Deisenhofen
- Magnesiumsulfat; Merck, Darmstadt
- Natriumacetat; Merck, Darmstadt
- Phosphorsäure; Merck, Darmstadt
- Zellulosephosphatpapier P-81; Whatman, Maidstone, England
- Zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat (cAMP); Sigma Chemie, Deisenhofen

Nachweis der Transgene durch PCR

Proteinase K-Lösung:	Tris	50 mM
	EDTA	100 mM
	SDS	0.5 %
	Proteinase K	0.5 mg/ml
	pH 8.0	
TE-Puffer	Tris	50 mM
	EDTA	100 mM
	pH 8.0	
Amplifikationspuffer	Tris	20 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	16 mM
	dATP, dGTP, dCTP, dTTP	je 0.2 mM
	pH 8.6	
TBE-Puffer (1×)	Tris	90 mM
	Borsäure	100 mM
	EDTA	2 mM
	pH 8.0	

- Agarose MP; Boehringer, Ingelheim
- dATP, dGTP, dCTP, dTTP; AGS, Heidelberg
- Ethidiumbromid; Sigma, Deisenhofen
- Mineralöl; Sigma, Deisenhofen
- PCR-Wasser (Licrosolv®); Merck, Darmstadt
- Proteinase K; Sigma, Deisenhofen
- Taq-Polymerase; Gibco BRL, Eggenstein
- GeneRuler™ 100 bp Standard, MBI Fermentas, Heidelberg

Isolation der murinen Kardiomyozyten

Ca ²⁺ -freie Tyrode-Lösung	NaCl	140 mM
	KCl	5.8 mM
	KH ₂ PO ₄	0.5 mM
	Na ₂ HPO ₄	0.4 mM
	MgSO ₄	0.9 mM
	Glukose	11 mM
	HEPES	10 mM
	pH 7.1	
„Kraftbrühe“	Glutaminsäure	50 mM
	Taurin	20 mM
	Glukose	10 mM
	MgSO ₄	3 mM
	EGTA	0.5 mM
	KCl	30 mM
	KH ₂ PO ₄	30 mM
	HEPES	20 mM
	pH 7.3 mit KOH	

Messung des L-Typ-Calciumkanalstromes

Extrazelluläre Lösung	TEA-Cl	130 mM
	CaCl ₂	2 mM
	MgCl ₂	1 mM
	4-Aminopyridin	4 mM
	HEPES	10 mM
	Glukose	10 mM
	pH 7.3	
	Intrazelluläre Lösung	KCl
KH ₂ PO ₄		10 mM
MgCl ₂		0.5 mM
EGTA		1 mM
K-Aspartat		80 mM
HEPES		5 mM
Mg-Adenosintriphosphat		3 mM
pH 7.4		
Isoprenalin-Stammlösung	Isoprenalin (24,7mg/10ml)	10 mM
	Askorbinsäure	20 mg

- Microfil-Pipetten MF 34 G-5; WPI World Precision Instr., Berlin

- Sodaklarglaskapillaren 1413022; Hilgenberg GmbH, Malsfeld

2. Geräte und Bezugsquelle

<i>Gerät</i>	<i>Bezugsquelle</i>
β -Flüssigkeitsszintillationszähler 1600 TR	Canberra Packard, Dreieich
Computergesteuertes Aufnahmesystem 486er PC	TLK Computer GmbH, Münster
Destillieranlage Bi-Dest 2304	Gesellschaft für Labortechnik (GFL) mbH, Burgwedel
Dopplerflußsonde	Baylor College of Medicine, Houston, Texas
Dopplerkristall	Baylor College of Medicine, Houston, Texas
Drucksignal (LVP-Signal)	Gould Inc., Cleveland, Ohio, USA
Elektrophoresekammer SE 600	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA
γ -Szintillationszähler Cobra 2	Canberra Packard, Dreieich
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
CO ₂ -Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf
ImageQuant [®] -Software	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Katheter Tygon [®]	Serpi-Erpa S.A., Wilsela, Belgien
Kühlbad Haake F3 digital	Haake, Karlsruhe
Kühlzentrifuge Centrikon T-124	Kontron Instruments, Zürich, Schweiz
Membran-Filter	Schleicher&Schuell, Dassel
Mikromanipulatorblock Mini 25	Luigs & Neumann, Ratingen
Mikroskop (invers) Leitz DM IL	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Patch-Clamp-Verstärker L/M-PC	HEKA Elektronik, Lambrecht
Photometer Uvikon 922	Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz
PhosphorImager TM -Kassetten	Molecular Dynamics, Krefeld
Pipettenziehgerät PC-10	Narishige, London, England
Polystyrenpartikel	Triton Technologies, San Diego, Kalifornien, USA
Polytron PT 3000	Kinematika, Luzern, Schweiz
Reinstwasseranlage TKA-LAB Typ HP4	TKA Wasseraufbereitungssysteme mbH, Niederelbert
Rüttler Belly Dancer	Stovall Life Science, Greenboro, USA
Rüttler Unimag ZX3	UniEquip Laborgerätebau, Martinsried
Software Iso 2	MFK, Niedernhausen
Thermocycler Omnigene TR3 CM220	HYBAID, Heidelberg
Thermomixer Modell 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Modell 5451C	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Transferkammer TE 62X	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA
Wasserbadthermostat Haake DC 30	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge Centrikon T-124	Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Universal 16	Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf
Zentrifuge Varifuge 3.0 R	Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf

3. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Tab. 7.1.: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Zellen der JUN-Mäuse

Dargestellt sind die Ergebnisse der Untersuchungen an Zellen der Wildtyp-(WT)- und an Junctin-überexprimierenden Mäusen (JUN). n gibt vor dem Querstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Querstrich die Anzahl der untersuchten Tiere an. ★ p<0.05 vs. WT; † p<0.05 vs. Basal

τ: Inaktivierungszeitkonstante; τ_{1/2}: schnelle/langsame Inaktivierungszeitkonstante; ♀/♂: weibliche/männliche Zellen; Iso: Isoprenalin

	WT (n=60/20-29)	JUN (n=66/20-31)	WT ♀ (n=29/10-14)	JUN ♀ (n=31/10-14)	WT ♂ (n=31/10-15)	JUN ♂ (n=35/10-17)
Körpergewicht (g)	31.3 ± 1.1	31.6 ± 1.1	27.4 ± 0.7	27.3 ± 0.4	36.0 ± 0.8	36.0 ± 0.9
Herzgewicht (mg)	159 ± 5	182 ± 7 ★	138 ± 4	158 ± 4 ★	179 ± 4	205 ± 9 ★
Relatives Herzgewicht (mg/g)	5.1 ± 0.1	5.7 ± 0.1 ★	5.1 ± 0.1	5.8 ± 0.1 ★	5.0 ± 0.1	5.7 ± 0.2 ★
Zellkapazität (pF)	214 ± 7	253 ± 8 ★	189 ± 8	223 ± 10 ★	235 ± 10	280 ± 11 ★
EGTA 10 mV						
	(n=22/11)	(n=20/12)	(n=10/5)	(n=10/6)	(n=12/6)	(n=10/6)
Stromdichte _{Basal} des I _{Ca} (pA/pF)	7.0 ± 0.4	6.5 ± 0.3	7.0 ± 0.6	6.0 ± 0.3	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5
Stromdichte _{Iso} des I _{Ca} (pA/pF)	11.7 ± 0.7 †	11.0 ± 0.6 †	13.0 ± 1.1 †	11.0 ± 0.6 †	10.8 ± 0.9 †	11.4 ± 1.0 †
Stromzunahme nach β-adrenerger Stimulation (%)	54.5 ± 5.1	50.3 ± 5.3	61.5 ± 9.7	54.2 ± 8.1	48.6 ± 4.4	46.3 ± 7.0
τ _{1 Basal} (ms)	4.6 ± 0.2	5.3 ± 0.2 ★	4.1 ± 0.2	5.4 ± 0.2 ★	5.0 ± 0.2	5.2 ± 0.3
τ _{1 Iso} (ms)	4.7 ± 0.3	5.5 ± 0.2 ★	3.9 ± 0.2	5.6 ± 0.3 ★	5.3 ± 0.5	5.5 ± 0.4
τ _{2 Basal} (ms)	43.8 ± 2.2	59.8 ± 2.9 ★	38.7 ± 3.6	57.3 ± 3 ★	48.1 ± 2.3	62.4 ± 4.9 ★
τ _{2 Iso} (ms)	42.9 ± 2.4	55.4 ± 2.0 ★ †	36.9 ± 3.8	52.3 ± 2.7 ★	48.0 ± 2.2	58.5 ± 2.8 ★

Ba²⁺	10 mV	WT (n=19/10)	JUN (n=23/10)	WT ♀ (n=9/5)	JUN ♀ (n=11/4)	WT ♂ (n=10/5)	JUN ♂ (n=12/6)
Stromdichte des I_{Ba} (pA/pF)		9.0 ± 0.7	7.4 ± 0.3 [★]	8.2 ± 0.8	7.3 ± 0.5	9.8 ± 1.1	7.5 ± 0.3 [★]
τ des I_{Ba} (ms)		61.9 ± 2.2	76.7 ± 3.6 [★]	60.9 ± 2.3	70.3 ± 2.1 [★]	62.9 ± 3.7	82.6 ± 6.3 [★]
BAPTA							
BAPTA	10 mV	WT (n=19/8)	JUN (n=23/9)	WT ♀ (n=10/4)	JUN ♀ (n=10/4)	WT ♂ (n=9/4)	JUN ♂ (n=13/5)
Stromdichte _{Basal} des I_{Ca} (pA/pF)		8.8 ± 0.8	11.9 ± 0.8 [★]	6.9 ± 0.9	13.4 ± 1.0 [★]	11.0 ± 1.1	10.6 ± 1.1
Stromdichte _{Iso} des I_{Ca} (pA/pF)		19.3 ± 1.1 [‡]	22.9 ± 1.2 ^{★‡}	17.5 ± 1.4	25.0 ± 1.7 ^{★‡}	21.3 ± 1.3 [‡]	20.9 ± 1.6 [‡]
Stromzunahme nach β -adrenerger Stimulation (%)		139 ± 16	102 ± 9 [★]	176 ± 25	90.0 ± 8 [★]	98.8 ± 9	111 ± 14
τ_{Basal} (ms)		31.4 ± 1.1	29.2 ± 1.3	29.7 ± 1.3	28.0 ± 2.5	33.3 ± 1.8	30.1 ± 1.4
τ_{Iso} (ms)		42.2 ± 4.1 [‡]	36.7 ± 2.6 [‡]	35.5 ± 2.2 [‡]	42.2 ± 4.5 [‡]	49.6 ± 7.8 [‡]	32.5 ± 2.7 [★]

Tab. 7.2.: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Zellen der SERCA-Mäuse

Dargestellt sind die Ergebnisse der Untersuchungen an Zellen der Wildtyp-(WT)-Mäuse und an Zellen der Mäuse, die die Doppelmutante der SERCA 2a überexprimieren (SERCA). n gibt vor dem Querstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Querstrich die Anzahl der untersuchten Tiere an. ★ p<0.05 vs. WT; † p<0.05 vs. Basal

$\tau_{1/2}$: schnelle/langsame Inaktivierungszeitkonstante; ♀/♂: weibliche/männliche Zellen; Iso: Isoprenalin

	WT (n=22/11-20)	SERCA (n=24/12-20)	WT ♀ (n=13/5-11)	SERCA ♀ (n=13/6-11)	WT ♂ (n=9/4-9)	SERCA ♂ (n=11/6-10)	
Körpergewicht (g)	28.2 ± 1.1	28.7 ± 0.9	26.2 ± 1.1	25.6 ± 0.6	30.7 ± 1.7	31.8 ± 1.0	
Herzgewicht (mg)	168 ± 10	179 ± 6	161 ± 8	163 ± 8	187 ± 8	198 ± 6	
Relatives Herzgewicht (mg/g)	5.9 ± 0.3	6.2 ± 0.1	6.2 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.2 ± 0.3	6.2 ± 0.1	
Zellkapazität (pF)	231 ± 10	220 ± 12	232 ± 14	225 ± 14	230 ± 15	214 ± 22	
EGTA	10 mV	(n=22/11)	(n=24/12)	(n=13/5)	(n=13/6)	(n=9/4)	(n=11/6)
Stromdichte _{Basal} des I_{Ca} (pA/pF)	7.8 ± 0.5	4.5 ± 0.4 ★	7.3 ± 0.7	4.9 ± 0.6 ★	8.5 ± 0.5	3.9 ± 0.3 ★	
Stromdichte _{Iso} des I_{Ca} (pA/pF)	12.8 ± 0.7 †	7.7 ± 0.5 ★ †	12.5 ± 1.2 †	7.8 ± 0.7 ★ †	13.2 ± 0.6 †	7.6 ± 0.9 ★ †	
Stromzunahme nach β-adrenerger Stimulation (%)	66.1 ± 5.1	83.9 ± 11.2	72.3 ± 6.9	74.8 ± 16.0	57.1 ± 6.9	94.6 ± 15.6	
$\tau_{1 \text{ Basal}}$ (ms)	4.4 ± 0.3	4.8 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.4 ± 0.3	4.9 ± 0.5	5.3 ± 0.3	
$\tau_{1 \text{ Iso}}$ (ms)	4.9 ± 0.3 †	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.3 †	4.2 ± 0.3	5.6 ± 0.6	4.9 ± 0.6	
$\tau_{2 \text{ Basal}}$ (ms)	39.0 ± 2.2	62.4 ± 3.1 ★	38.0 ± 1.6	57.7 ± 3.7 ★	42.1 ± 5.8	68.5 ± 4.6 ★	
$\tau_{2 \text{ Iso}}$ (ms)	40.2 ± 2.6	55.7 ± 3.5 ★	35.8 ± 1.2	51.6 ± 5.0 ★	45.1 ± 4.9	60.1 ± 5.0 ★	

Tab. 7.3.: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Zellen der I₂-Mäuse

Dargestellt sind die Ergebnisse der Untersuchungen an Zellen der Wildtyp-(WT)-Mäuse und an Zellen der Mäuse, die den Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1 überexprimieren (I₂). Der intrazellulären Pipettenlösung wurde 10mM BAPTA als Ca²⁺-Chelatbildner zugesetzt. n gibt vor dem Querstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Querstrich die Anzahl der untersuchten Tiere an. ★ p<0.05 vs. WT; † p<0.05 vs. Basal

τ: Inaktivierungszeitkonstante; τ_{1/2}: schnelle/langsame Inaktivierungszeitkonstante; ♀/♂: weibliche/männliche Zellen; Iso: Isoprenalin

	WT (n=35/18-34)	I₂ (n=33/18-31)	WT ♀ (n=9/5-15)	I₂ ♀ (n=8/5-12)	WT ♂ (n=26/13-19)	I₂ ♂ (n=25/13-19)
Körpergewicht (g)	28.4 ± 0.7	27.3 ± 0.7	25.1 ± 0.7	23.6 ± 0.7	30.9 ± 0.7	29.2 ± 0.8
Herzgewicht (mg)	180 ± 8	163 ± 8	156 ± 5	145 ± 6	199 ± 13	172 ± 10
Relatives Herzgewicht (mg/g)	6.4 ± 0.3	6.1 ± 0.3	6.2 ± 0.1	6.2 ± 0.5	6.5 ± 0.4	5.9 ± 0.4
Zellkapazität (pF)	253 ± 14	219 ± 10	290 ± 28	224 ± 14	240 ± 16	218 ± 13
BAPTA 10 mV						
	(n=23/11)	(n=21/11)	(n=9/5)	(n=8/5)	(n=14/6)	(n=13/6)
Stromdichte _{Basal} des I _{Ca} (pA/pF)	10.7 ± 0.8	11.1 ± 1.0	10.2 ± 2.1	9.0 ± 1.0	11.6 ± 1.0	11.7 ± 1.1
Stromdichte _{Iso} des I _{Ca} (pA/pF)	23.9 ± 1.3 †	19.7 ± 1.3 ★ †	20.8 ± 1.7 †	18.3 ± 2.7 †	25.9 ± 1.6 †	20.6 ± 1.4 ★ †
Stromzunahme nach β-adrenerger Stimulation (%)	137 ± 12	86.0 ± 9 ★	147 ± 26	92.2 ± 18	131 ± 12	82.6 ± 11 ★
τ _{Basal} (ms)	33.2 ± 1.0	33.0 ± 1.0	31.9 ± 1.7	31.2 ± 2.1	33.9 ± 1.2	34.2 ± 0.8
τ _{Iso} (ms)	37.8 ± 2.1 †	35.8 ± 1.7 †	33.1 ± 2.2	30.5 ± 1.7	40.8 ± 2.8 †	39.0 ± 2.0 †

	WT ♂	I ₂ ♂
EGTA 10 mV	(n=12/7)	(n=12/7)
Stromdichte _{Basal} des I _{Ca} (pA/pF)	8.3 ± 0.5	7.0 ± 0.6
Stromdichte _{Cal A} des I _{Ca} (pA/pF)	12.7 ± 0.9 ⁺	11.1 ± 0.9 ⁺
Stromzunahme nach Stimulation mit Cal A (%)	54.2 ± 6.0	59.5 ± 9.0
τ _{1 Basal} (ms)	4.4 ± 0.4	4.2 ± 0.3
τ _{1 Cal A} (ms)	5.0 ± 0.6	4.3 ± 0.4
τ _{2 Basal} (ms)	45.3 ± 5.4	54.9 ± 4.6
τ _{2 Cal A} (ms)	47.5 ± 4.6	49.9 ± 4.4

Tab. 7.4.: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Zellen der PP2A-Mäuse

Dargestellt sind die Ergebnisse der Untersuchungen an Zellen der Wildtyp-(WT)-Mäuse und an Zellen der Mäuse, die die α -katalytische Untereinheit der Protein-Phosphatase 2A überexprimieren (PP2A). n gibt vor dem Querstrich die Anzahl der gemessenen Zellen und nach dem Querstrich die Anzahl der untersuchten Tiere an. ★ $p < 0.05$ vs. WT; † $p < 0.05$ vs. Basal

$\tau_{1/2}$: schnelle/langsame Inaktivierungszeitkonstante; ♀/♂: weibliche/männliche Zellen; Iso: Isoprenalin

	WT (n=15/9-12)	PP2A (n=17/7-11)	WT ♀ (n=9/5-7)	PP2A ♀ (n=11/4-6)	WT ♂ (n=6/4-5)	PP2A ♂ (n=6/3-5)	
Körpergewicht (g)	34.9 ± 1.1	36.4 ± 0.9	33.7 ± 1.4	34.2 ± 0.6	37 ± 1.8	39 ± 0.7	
Herzgewicht (mg)	188 ± 8	305 ± 18 ★	178 ± 9	294 ± 31 ★	203 ± 13	321 ± 18 ★	
Relatives Herzgewicht (mg/g)	5.4 ± 0.1	8.4 ± 0.5 ★	5.3 ± 0.2	8.6 ± 0.9 ★	5.5 ± 0.2	8.2 ± 0.5 ★	
Zellkapazität (pF)	226 ± 9	282 ± 10 ★	220 ± 12	274 ± 11 ★	235 ± 16	295 ± 22 ★	
EGTA	10 mV	(n=15/9)	(n=17/7)	(n=9/5)	(n=11/4)	(n=6/4)	(n=6/3)
Stromdichte _{Basal} des I_{Ca} (pA/pF)	5.9 ± 0.3	4.6 ± 0.2 ★	6.1 ± 0.4	4.7 ± 0.3 ★	5.8 ± 0.3	4.5 ± 0.3 ★	
Stromdichte _{Iso} des I_{Ca} (pA/pF)	9.8 ± 0.5 †	7.8 ± 0.3 ★ †	10.5 ± 0.5 †	7.7 ± 0.4 ★ †	8.9 ± 1.0 †	8.2 ± 0.4 †	
Stromzunahme nach β -adrenerger Stimulation (%)	69.5 ± 6.5	72.9 ± 5.3	73.9 ± 9.2	66.8 ± 6.9	54.3 ± 14	86.1 ± 6.9	
$\tau_{1 \text{ Basal}}$ (ms)	5.7 ± 0.3	7.9 ± 0.4 ★	5.2 ± 0.2	7.4 ± 0.3 ★	6.3 ± 0.5	8.9 ± 0.7 ★	
$\tau_{1 \text{ Iso}}$ (ms)	6.4 ± 0.4	13.7 ± 0.8 ★ †	5.9 ± 0.5	13.1 ± 0.7 ★ †	7.1 ± 0.7	14.8 ± 1.9 ★ †	
$\tau_{2 \text{ Basal}}$ (ms)	53.9 ± 1.5	61.4 ± 2.8 ★	53.2 ± 2.1	61.3 ± 3.9	54.9 ± 2.1	61.5 ± 4.1	
$\tau_{2 \text{ Iso}}$ (ms)	57.0 ± 2.8	85.5 ± 4.7 ★ †	56.3 ± 4.7	85.1 ± 5.3 ★ †	58.0 ± 3.4	86.4 ± 9.5 ★	

8. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmad Z, Green FJ, Subushi HS, Watanabe AM (1989) Autonomic regulation of type 1 protein phosphatase in cardiac muscle. *J Biol Chem* 264: 3859-3863

Armstrong SC, Kao R, Gao W, Shivell LC, Sowney JM, Honkanen RE, Ganote CE (1997) Comparison of in vitro preconditioning responses of isolated pig and rabbit cardiomyocytes: effects of a protein phosphatase inhibitor, fostriecin. *J Mol Cell Cardiol* 29: 3009-3024

Armstrong SC, Gao W, Lane JR, Ganote CE (1998) Protein phosphatase inhibitors calyculin A and fostriecin protect rabbit cardiomyocytes in late ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 30: 61-73

Atar D (1997) Die Reperfusion des Myokards: Rettung oder Gefahr für den Herzmuskel? *Schweiz Med Wochenschrift* 127: 2008-2013

Baker DL, Hashimoto K, Grupp IL, Ji Y, Reed T, Loukianov E, Grupp G, Bhagwat A, Hoit B, Walsh R, Marbàn E, Periasamy M (1998) Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts. *Circ Res* 83: 1205-1214

Barancik M, Htun P, Maeno Y, Zimmermann R, Schaper W (1997) Differential regulation of distinct protein kinase cascades by ischemia and ischemia/reperfusion in porcine myocardium. *Circulation* 96 (Suppl. 1) Abstract: I-252

Bartel S, Krause EG, Wollenberger A (1985) Assay of cyclic AMP-dependent protein kinase activity in canine myocardium: Effect of coronary artery ligation on the cytosolic enzyme. *Biomed Biochim Acta* 44: 1303-1313

Bartel S, Stein B, Eschenhagen T, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Krause EG, Karczewski P, Scholz H (1996) Impaired phosphorylation of phospholamban, troponin I, and C-protein in the failing human heart. *Mol Cell Biochem* 157: 171-179

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM (1994) Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476: 279-293

Bassani JW, Yuan W, Bers DM (1995) Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 268: 1313-1319

Bers DM und Perez-Reyes E (1999) Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovas Res* 42: 339-360

Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 10:198-205

Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1992) Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85: 1046-1055

Beuckelmann DJ, Näbauer M, Krüger C, Erdmann E (1995) Altered diastolic $[Ca^{2+}]_i$ handling in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Heart J* 129: 684-689

Bogoyevitch MA, Glennon PE, Sugden PH (1993) Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett* 317: 271-275

Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA (1997) Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 96: 1495-1500

Bokník P, Fockenbrock M, Kirchhefer U, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Müller T, Neumann J, Vahlensieck U, Schmitz W (1997) Protein phosphatases are functionally increased in a model of heart hypertrophy. *Circulation* 96 (Suppl. 1) Abstract: I-744

Bokník P, Unkel C, Kirchhefer U, Kleideiter U, Klein-Wiele O, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Schmitz W, Vahlensieck U, Zimmermann N, Jones LR, Neumann J (1999) Regional expression of phospholamban in the human heart. *Cardiovasc Res* 43: 67-76

Bokník P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Müller T, Schmitz W, Schröder F, Neumann J (2000) Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term β -adrenergic stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 222-231

Bokník P, Khorchidi S, Bodor GS, Huke S, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Schmitz W, Neumann J (2001) Role of protein phosphatases in regulation of cardiac inotropy and relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H786-794

Bolli R (1990) Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 82: 723-738

Bolli R. (1992) Myocardial „Stunning“ in man. *Circulation* 86: 1671-1691

Böhm M, Reiger B, Schwinger R, Erdmann E (1994) cAMP concentrations, cAMP dependent protein kinase activity and phospholamban in non-failing and failing myocardium. *Cardiovasc Res* 28: 1713-1719

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Brandl CJ, Green NM, Korczak B, MacLennan DH (1986) Two Ca²⁺ATPase genes. Homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell*. 44: 597-607

Brandl CJ, DeLeon S, Martin DR, MacLennan DH (1987) Adult form of the Ca²⁺ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 262: 3768-3774

Brand T, Sharma HS, Fleischmann KE, Duncker DJ, McFalls EO, Verdouw PD, Schaper W (1992) Proto-oncogene expression in porcine myocardium subjected to ischemia and reperfusion. *Circ Res* 71: 1351-1360

Braunwald E, Kloner RA (1982) The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 66: 1146-1149

Brewis N, Ohst K, Fiels K, Rapacciuolo A, Chou D, Bloor C, Dillmann W, Rockmann H, Walter G (2000) Dilated cardiomyopathy in transgenic mice overexpressing a mutant A subunit of protein phosphatase 2A. *Am J Physiol* 279: H1307-H1318

Brinster RL, Allen JM, Behringer RR, Gelinias RE, Palmiter RD (1988) Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 836-840

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *New Engl J Med* 307: 205-211

Brittsan AG, Kranias EG (2000) Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol.* 32: 2131-2139

Brodde OE (1991) β 1- and β 2-adrenoceptors in the human heart: Properties, function and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43: 203-242

Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, delMonte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing SL, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RL, DePaoli-Roach AA, Kranias EG (2002) Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 22: 4124-4135

Charnet P, Lory P, Bourinet E, Collin T, Nargeot J (1995) cAMP-dependent phosphorylation of the cardiac L-Type Ca channel: A missing link? *Biochem* 77: 957-962

Chomczynski P und Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159

Cohen NM, Lederer WJ (1988) Changes in the calcium current of rat heart ventricular myocytes during development. *J Physiol* 406: 115-146

Cohen P, Cohen PTW (1989) Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem* 264: 21435-21438

Cohen PTW (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* 22(7): 245-251

Cohen PTW (2002) Protein phosphatase 1 - targeted in many directions. *J Cell Sci* 115: 241-256

Colucci WS, Braunwald E (1997) Pathophysiology of heart failure. In: E Braunwald (Hrsg.), *Heart Disease*, WB Saunders company, Philadelphia, 5. Auflage: 394-420

Connor JH, Frederick D, Huang HB, Yang J, Helps NR, Cohen PT, Nairn AC, DePaoli-Roach A, Tatchell K, Shenolikar S (2000) Cellular mechanisms regulating protein phosphatase-1. A key functional interaction between inhibitor-2 and the type 1 protein phosphatase catalytic subunit. *J Biol Chem* 275: 18670-18675

Danielsen W, von der Leyen H, Meyer W, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Starbatty J, Stein B, Doring V, Kalmar P (1989) Basal and isoprenaline-stimulated cAMP content in failing versus nonfailing human cardiac preparations. *J Cardiovasc Pharmacol* 14: 171-173

Davare MA, Home MC, Hell JW (2000) Protein phosphatase 2A is associated with class C L-type calcium channels (Cav1.2) and antagonizes channel phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275: 39710-39717

Del Monter F, Hajjar RJ, Harding SE (2001) Overwhelming evidence of the beneficial effects of SERCA gene transfer in heart failure. *Circ Res* 88: E66-E67

DePaoli-Roach AA, Park JK, Cerosovsky V, Csontos C, Durbin SD, Kuntz MJ, Sitikov A, Tang PM, Verin A, Zolnierowicz S (1994) Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Adv Enzyme Regul* 34: 199-224

Domenech RJ, Hoffmann JIE, Noble MIM (1969) Total and regional coronary blood flow measured by radioactive microspheres in conscious and anesthetized dogs. *Circ Res* 25: 581

Drago GA, Colyer J (1994) Discrimination between two sites of phosphorylation on adjacent amino acids by phosphorylation site-specific antibodies to phospholamban. *J Biol Chem* 269: 25073-25077

DuBell WH, Lederer WJ, Rogers TB (1996) Dynamic modulation of excitation-contraction coupling by protein phosphatases in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 493: 793-800

DuBell WH, Gigena MS, Guatimosim S, Long X, Lederer WJ, Rogers TB (2001) Effects of PP1/PP2A inhibitor calyculin A on the E-C coupling cascade in murine ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H38-H48

Eckert R und Chad JE (1984) Inactivation of calcium channels. *Prog Biophys Mol Biol* 44: 215-267

Erdmann E, Kirsch CM (1993) The stunned and hibernating myocardium-diagnosis and clinical implications. *Z Kardiol* 82: 143-147

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

Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW (1996) The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* 10: 615-624

Ferreira G, Yi J, Rios E, Shirokov R (1997) Ion-dependent inactivation of barium current through L-type Ca channels. *J Gen Physiol* 109: 449-461

Gao T, Yatani A, Dell'Acqua ML, Sako H, Green SA, Dascal N, Scott JD, Hosey MM (1997) cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels require

membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron* 19: 185-196

Glossmann H, Striessnig J (1990) Molecular properties of calcium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 114: 1-105

Götz J, Probs A, Ehler E, Hemmings B, Kues W (1998) Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12370-12375

Gordon JW (1989) Transgenic animals. *Int Rev Cytol* 115: 171-230

Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Meyer R, Linz KW, Karas RH, Vetter H (1996) Modulation of hypertensive heart disease by estrogen. *Steroids* 61: 201-204

Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem* 266: 9180-9185

Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM, Lesch M, Sabbah HN (1996) Evidence for the existence and hormonal regulation of protein phosphatase inhibitor-1 in ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* 270: H1159-H1164

Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM, Sabah HN (2002) Inhibition of type 1 protein phosphatase activity by activation of β -adrenoceptors in ventricular myocardium. *Biochem Pharmacol* 63: 1069-1076

Gwathmey JK, Cjopelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, Morgan JP (1987) Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 61: 70-76

Hadley RW und Lederer WJ (1991) Ca^{2+} and voltage inactivate Ca^{2+} channels in guinea-pig ventricular myocytes through independent mechanisms. *J Physiol (Lond)* 444: 257-268

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

Hartley CJ, Hanley HG, Lewis RM, Cole JS (1977) Synchronized pulsed Doppler blood flow and ultrasonic dimension measurement in conscious dogs. *Ultrasound in Med Biol* 4: 99

Hartley CJ, Latson LA, Michael LH, Seidel CL, Lewis RM, Entman ML (1983) Doppler measurement of myocardial thickening with a single epicardial transducer. *Am J Physiol* 245: H 1066

Hartzell HC (1988) Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine, and second messenger systems. *Prog Biophys Mol Biol* 52: 165-247

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994) Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75: 434-442

Hasenfuss G, Meyer M, Schillinger W, Preuss M, Pieske B, Just H (1994) Calcium handling proteins in the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 92: 87-93

Hasenfuss G (1998) Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 37: 279-289

He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R, Choi DJ, Rockman HA, McDonough PM, Bluhm WF, Meyer M, Sayen MR, Swanson E, Dillmann WH (1997) Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest* 100: 380-389

He JQ, Conklin MW, Foell JD, Wolff MR, Haworth RA, Coronado R, Kamp TJ (2001) Reduction in density of transverse tubules and L-type Ca^{2+} -channels in canine tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res* 49: 298-307

Herzig S, Meier A, Pfeiffer M, Neumann J (1995) Stimulation of protein phosphatases as a mechanism of the muscarinic-receptor-mediated inhibition of cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 429: 531-538

Herzig S, Neumann J (2000) Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80: 173-210

Heusch G (1998) Stunning-great paradigmatic, but little clinical importance. *Basic Res Cardiol* 93: 164-166

Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner F (1975) Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 56: 978-985

Hofmann F, Biel M, Flockerzi V (1994) Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 17: 399-418

Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N (1999) Voltage dependent calcium channels: From structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139: 33-87

Hong CS, Cho MC, Kwak YG, Song CH, Lee YH, Lim JS, Kwon YK, Chae SW (2002) Cardiac remodeling and atrial fibrillation in transgenic mice overexpressing junctin. *FASEB J* 16: 1310-1312

Hosey MM, Chien AJ, Puri TS (1996) Structure and regulation of L-type calcium channels: a current assessment of the properties and roles of channel subunits. *Trends in Cardiovascular Medicine* 6: 265-273

Horn R, Marty A (1988) Muscarinic activation of ion currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 92: 145-159

Huang B, Wang S, Qin D, Mohamed B, El-Sherif N (1999) Diminished basal phosphorylation level of phospholamban in the postinfarction remodeled rat ventricle. *Circ Res* 85: 848-855

Hullin RA, Asmus F, Berger HJ, Boekstegers P (1997) Differential expression of the subunits of the cardiac L-type calcium channel in diastolic failure of the transplanted heart. *Circulation* 96: 1-55

Ingebritsen TS, Stewart AA, Cohen P (1983) The protein phosphatases involved in cellular regulation. 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles. *Eur J Biochem* 132: 297-307

Isenberg G, Klöckner U (1982) Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a „KB Medium“. *Pflügers Arch* 395: 6-18

Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, and Uemura D (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 871-877

Jiang C, Poole-Wilson PA, Sarrel PM, Mochizuki S, Collins P, MacLeod KI (1992) Effect of 17 β -oestradiol on contraction, Ca²⁺ current and intracellular free Ca²⁺ in guinea-pig isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 106: 739-745

Jones LR (1985) Sarcolemmal enzymes mediating β -adrenergic effects on the heart. *Curr Top Membr Transp* 25: 11-41

Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J (1995) Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270: 30787-30796

Jorgensen AO, Shen AC, Campbell KP (1985) Ultrastructural localization of calsequestrin in adult rat atrial and ventricular muscle cells. *J Cell Biol* 101: 257-268

Josephson IR, Sanchez-Chapula J, Brown AM (1984) A comparison of calcium currents in rat and guinea pig single ventricular cells. *Circ Res* 54: 144-156

Kamp TJ, Hell JW (2000) Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* 87: 1095-1102

Kim SJ, Kudej RK, Yatani A, Kim YK, Takagi G, Honda R, Colantonio DA, Van Eyk JE, Vatner DE, Rasmusson RL, Vatner SF (2001) A novel mechanism for myocardial stunning involving impaired Ca^{2+} handling. *Circ Res* 89: 831-837

Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J (1999) Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovascular Res* 42: 254-261

Kirchhefer U, Autry JM, Begrow F, Schmitz W, Neumann J, Jones LR (2000) Ca^{2+} affinity, not V_{max} , of SERCA2a critically regulates the strength of the heartbeat. *Circulation* 102 (Suppl. II) Abstract: II-267

Kirchhefer U, Neumann J, Baba HA, Begrow F, Kobayashi YM, Reinke U, Schmitz W, Jones LR (2001) Cardiac hypertrophy and impaired relaxation in transgenic mice overexpressing triadin 1. *J Biol Chem* 276: 4142-4149

Kirchhefer U, Boknik P, Schmitz W, Neumann J (2001) Generation of mice that overexpress protein phosphatase inhibitor-2 in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (Suppl. 4): R98

Kirchhefer U, Neumann J, Bergs DM, Buchwalow IB, Fabritz L, Hanske G, Justus I, Riemann B, Schmitz W, Jones LR (2003) Impaired relaxation in transgenic mice overexpressing junctin. *Cardiovascular Research* 59: 369-379

Klein G, Schroeder F, Vogler D, Schaefer A, Haverich A, Schieffer B, Korte T, Drexler H (2003) Increased open probability of single cardiac L-type calcium channels in patients with chronic atrial fibrillation: Role of phosphatase 2A. *Cardiovascular Research* 59: 37-45

Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E (1998) Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation*. 97: 1848-67

Kloner RA, Jennings RB (2001) Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications. *Circulation* 104: 2981-2989

Knollmann BC, Knollmann-Ritschel BEC, Weissman NJ, Jones LR, Morad M (2000) Remodelling of ionic currents in hypertrophied and failing hearts of transgenic mice overexpressing calsequestrin. *J Physiol* 525: 483-498

Kodama I, Kondo N, Shibata S (1986) Electromechanical effects of okadaic acid isolated from black sponge in guinea pig ventricular muscles. *J Physiol* 378: 359-373

Krause SM, Jacobus WE, Becker LC (1989) Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic "stunned" myocardium. *Circ Res* 65: 526-530

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

Ladilov YV, Siegmund B, Balsler C, Piper HM (1997) Simulated ischemia increases susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res* 80: 69-75

Lalli MJ, Yong Ji, Prashad V, Hashimoto K, Plank D, Babu GJ, Kirkpatrick D, Walsh RA, Sussman M, Yatani A, Marban E, Periasamy M (2001) SERCA1a structurally substitutes for SERCA2a in the cardiac sarcoplasmic reticulum and increase cardiac Ca^{2+} handling capacity. *Circ Res* 89: 160-167

Lansman JB, Hess P, Tsien RW (1986) Blockade of current through single calcium channels by Cd^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} . Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J Gen Physiol* 88: 321-347

Lee JA, Allen DG (1991) Mechanisms of acute ischemic contractile failure of the heart. Role of intracellular calcium. *J Clin Invest* 88: 361-367

Lee KS, Marban E, Tsien RW (1985) Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 364: 395-411

Li XY, McCay PB, Zughaib M, Jeroudi MO, Triana JF, Bolli R (1993) Demonstration of free radical generation in the "stunned" myocardium in the conscious dog and identification of major differences between conscious and open-chest dogs. *J Clin Invest* 92: 1025-1041

Li M, Guo H, Damuni Z (1995) Purification and characterization of two potent heat stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochemistry* 34: 1988-1996

Li M, Makkinje A, Damuni Z (1996) Molecular identification of I_1^{PP2A} , a novel potent heat-stable inhibitor of protein phosphatase 2. *Biochemistry* 35: 6998-7002

Linck B, Bokník P, Knapp J, Müller FU, Neumann J, Schmitz W, Vahlensieck U (1996) Effects of cantharidin on force of contraction and phosphatase activity in nonfailing and failing human hearts. *Br J Pharmacol* 119: 545-550

Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG, Watanabe AM (1983) β -adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca^{2+} -ATPase activity in guinea pig ventricles. *J Biol Chem* 258: 464-471

Lowry OH, Rosebrough NJ, Fass AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275

Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-591

Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG (1994) Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of β -agonist stimulation. *Circ Res* 75: 401-409

Lüss H, Bokník P, Heusch G, Müller FU, Neumann J, Schmitz W, Schulz R (1998) Expression of calcium regulatory proteins in short-term hibernation and stunning in the in situ porcine heart. *Cardiovasc Res* 37:606-617.

Lüss H, Klein-Wiele O, Bokník P, Herzig S, Knapp J, Linck B, Müller FU, Scheld HH, Schmid C, Schmitz W, Neumann J (2000a) Regional expression of protein

phosphatase type 1 and 2A catalytic subunit isoforms in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 32: 2349-2359

Lüss H, Meißner A, Rolf N, Van Aken H, Boknik P, Kirchhefer U, Knapp J, Läer S, Link B, Lüss I, Müller FU, Neumann J, Schmitz W (2000b) Biochemical mechanism(s) of stunning in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H176-H184

Lüss H, Neumann J, Schmitz W, Schulz R, Heusch G (2000c) The stress-responsive MAP kinase p38 is activated by low-flow ischemia in the in situ porcine heart. *J Mol Cell Cardiol* 32:1787-1794.

Lüss H, Schafers M, Neumann J, Hammel D, Vahlhaus C, Baba HA, Janssen F, Scheld HH, Schober O, Breithardt G, Schmitz W, Wichter T (2002) Biochemical mechanisms of hibernation and stunning in the human heart. *Cardiovasc Res* 56: 411-421

Lytton J, Zarain-Herzberg A, Periasamy M, MacLennan DH (1989) Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase. *J Biol Chem* 264: 7509-7065

MacDougall LK, Jones LR, Cohen P (1991) Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 196: 725-734

MacLennan DH (1970) Purification and properties of an adenosine triphosphate sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 245: 4508-4518

MacLennan DH, Wong PT (1971) Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1231-1235

Masaki H, Sato Y, Luo W, Kranias EG, Yatani A (1997) Phospholamban deficiency alters inactivation kinetics of L-type Ca^{2+} channels in mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol* 272: 606-612

Masaki H, Sako H, Kadambi VJ, Sato Y, Kranias EG, Yatani A (1998) Overexpression of phospholamban alters inactivation kinetics of L-type Ca^{2+} channel currents in mouse atrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30: 317-325

McCright B, Rivers AM, Audlin S, Virshup DM (1996) The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced

phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem* 271: 22081-22089

McDonald TF, Cayalie A, Trautwein W, Pelzer D (1986) Voltage-dependent properties of macroscopic and elementary calcium channel currents in guinea pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 406: 437-448

McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ (1994) Regulation and modulation of calcium channels in cardiac skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 74: 465-507

Meissner A, Lüss I, Rolf N, Boknik P, Kirchhefer U, Kehm V, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Weber T, Schmitz W, Van Aken H, Neumann J (2000) The early response genes c-jun and HSP-70 are induced in regional cardiac stunning in conscious mammals. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119: 820-825

Meyer M and Dillmann WH (1998) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase overexpression by adenovirus mediated gene transfer and in transgenic mice. *Cardiovasc Res* 37: 360-366

Ming Z, Nordin C, Siri F, Aronson RS (1994) Reduced calcium current density in single myocytes isolated from hypertrophied failing guinea pig hearts. *J Mol Cell Cardiol* 26: 1133-1143

Mishra S, Sabbah HN, Jain JC, Gupta RC (2003) Reduced Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase activity and expression in LV myocardium of dogs with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H876-883

Mitra R, Morad M (1986) Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5340-5344

Mitterdorfer J, Grabner M, Kraus R (1998) Molecular basis of drug interaction with L-type Ca^{2+} channels. *J Bioenerg Biomemb* 30: 319-334

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93: 215-228

Müller OJ, Lange M, Rattunde H, Lorenzen HP, Müller M, Frey N, Bittner C, Simonides W, Katus HA, Franz WM (2003) Transgenic rat hearts overexpressing

SERCA2a show improved contractility under baseline conditions and pressure overload. *Cardiovasc Res* 59: 380-389

Mumby MC, Walter G (1993) Protein serine/threonine phosphatases structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* 73: 673-699

Neher E, Sakmann B (1992a) Die Erforschung von Zellsignalen mit der Patch-Clamp-Technik. *Spektrum der Wissenschaft* 5: 48-56

Neher E, Sakmann B (1992b) The patch clamp technique. *Sci Am* 1992

Neumann J, Schmitz W, Scholz H, v Meyerinck L, Döring V, Kalmar P (1988) Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. *Lancet* 2: 936-937

Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC, Watanabe AM (1991) Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res* 69: 1450-1457

Neumann J, Bokník P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Gupta RC, Watanabe AM (1993) Evidence for physiological functions of protein phosphatases in the heart: evaluation with okadaic acid. *Am J Physiol* 265: 257-266

Neumann J, Bokník P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Wiechen K, Zimmermann N (1994) Biochemical and electrophysiological mechanisms of the positive inotropic effect of calyculin A, a protein phosphatase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 535-541

Neumann J, Bokník P, Kaspereit G, Bartel S, Krause EG, Pask HT, Schmitz W, Scholz H (1995a) Effects of the phosphatase inhibitor calyculin A on the phosphorylation of C-protein in mammalian ventricular cardiomyocytes. *Biochem Pharmacol* 49: 1583-1588

Neumann J, Herzig S, Bokník P, Apel M, Kaspereit G, Schmitz W, Scholz H, Tepel M, Zimmermann N (1995b) On the cardiac contractile, biochemical and electrophysiological effects of cantharidin, a phosphatase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 530-539

Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997) Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29: 265-272

Neumann J, Gombosova I, Suzuki YJ, Field LJ, DePaoli-Roach AA (1998) Cardiac overexpression of the catalytic subunit of phosphatase 1. *Circulation* 98 (Suppl I): I-836

Neumann J, Maas R, Bokník P, Jones LR, Zimmermann N, Scholz H (1999) Pharmacological characterization of protein phosphatase activities in preparations from failing human hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 188-193

Neumann J, Kirchhefer U, Begrow F, Reinke U, Schmitz W, Autry JM, Jones LR (2001) Functional characterization of SERCA 2a overexpressing mice. *FASEB J* 15 Abstract: A 210

Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW (1985) A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 316: 443-446

Ogata R, Inoue Y, Nakano H, Ito Y, Kitamura K (1996) Oestradiol-induced relaxation of rabbit basilar artery by inhibition of voltage-dependent Ca channels through GTP-binding protein. *Br J Pharmacol* 117: 351-359

Ono K, Fozzard HA (1993) Two phosphatase sites on the Ca²⁺ channel affecting different kinetic functions. *J Physiol* 470: 73-84

Ouadid H, Albat B, Nargeot J (1995) Calcium currents in diseased human cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 25: 282-291

Papazian DM, Bezanilla F (1997) How does an ion channel sense voltage? *News Physiol Sci* 12: 203-210

Perez-Reyes E, Schneider T (1995) Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int* 48: 1111-1124

Periasamy M, Reed TD, Liu LH, Ji Y, Loukianov E, Paul RJ, Nieman ML, Riddle T, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Shull GE (1999) Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase Isoform 2 (SERCA2) Gene. *J Biol Chem* 274: 2556-2562

Periasamy M, Huke S (2001) SERCA pump level is a critical determinant of Ca²⁺ homeostasis and cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1053-1063

Pfeffer MA, Braunwald E (1990) Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81: 1161-1172

Pham TV, Robinson RB, Danilo P, Roser MR (2002) Effects of gonadal steroids on gender-related differences in transmural dispersion of L-type calcium current. *Cardiovasc Res* 53: 752-762

Prashad N (1985) Reduced levels of cardiac cAMP-dependent protein kinase in spontaneously hypertensive rat. *J Biol Chem* 260: 10125-10131

Protasi F (2002) Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front Biosci* 7: 650-658

Rapundalo ST, Solaro RJ, Kranias EG (1989) Inotropic responses to isoproterenol and phosphodiesterase inhibitors in intact guinea pig hearts: Comparison of cyclic AMP levels and phosphorylation of sarcoplasmic reticulum and myofibrillar proteins. *Circ Res* 64: 104-111

Rapundalo ST (1998) Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* 38: 559-588

Regulla S, Schneider T, Nastainczyk W, Meyer HE, Hofmann F (1991) Identification of the site of interaction of the dihydropyridine channel blockers nitrendipine and azidopine with the calcium-channel alpha 1 subunit. *Embo J* 10: 45-49

Reuter H (1973) Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Prog Biophys Mol Biol* 26: 1-43

Reuter H, Scholz H (1977) A study of the ion selectivity and the kinetic properties of the calcium dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle. *J Physiol* 264: 17-47

Rolf N, Meißner A, Van Aken H, Weber TP, Hammel D, Möllhoff T (1997) The effects of thoracic epidural anesthesia on functional recovery from myocardial stunning in propofol-anesthetized dogs. *Anesth Analg* 84: 723-729

Rossner KI (1991) Calcium current in congestive heart failure of hamster cardiomyopathy. *Am J Physiol* 260: 1179-1186

Sako H, Green SA, Kranias EG, Yatani A (1997) Modulation of cardiac Ca²⁺ channels by isoproterenol studied in transgenic mice with altered SR Ca²⁺ content. *Am J Physiol* 273: 1666-1672

Sato S, Sato N, Kudej RK, Uechi M, Asai K, Shen YT, Ishikawa Y, Vatner SF, Vatner DE (1997) Beta-adrenergic receptor signalling in stunned myocardium of conscious pigs. *J Mol Cell Cardiol* 29:1387-1400

Schwinger RHG, Münch G, Bölck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E (1999) Reduced Ca^{2+} -sensitivity of SERCA2a in failing human myocardium due to reduced serine-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 31: 479-491

Sekili S, McCay PB, Li XY, Zughaib M, Sun JZ, Tang L, Thornby JI, Bolli R (1993) Direct evidence that the hydroxyl radical plays a pathogenetic role in myocardial "stunning" in the conscious dog and demonstration that stunning can be markedly attenuated without subsequent adverse effects. *Circ Res* 73: 705-723

Sham JS, Cleemann L, Morad M (1995): Functional coupling of Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 121-125

Sham JS (1997) Ca^{2+} release induced inactivation of Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes: evidence for local Ca^{2+} signalling. *J Physiol* 500: 285-295

Shan J, Resnick LM, Liu QY, Wu XC, Barbagallo M, Pang PK (1994) Vascular effects of 17 β -estradiol in male Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol* 266: H967-973

Shenolikar S, Nairn AC (1991) Protein phosphatases: recent progress. In: Greengard PG, Roginson GA (Hrsg.), *Advances in second messenger and phosphoprotein Res*, Raven Press, New York: 1-121

Shenolikar S (1994) Protein serine/threonine phosphatases – New avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol* 10: 55-86

Sheppeck JE, Gauss CM, Chamberlin AR (1997) Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorg Med Chem* 5: 1739-1750

Shi C, Soldatov NM (2002) Molecular determinants of voltage-dependent slow inactivation of the Ca^{2+} channel. *J Biol Chem* 277: 6813-6821

Shirokov R, Levis R, Shirokova N, Rios E (1992) Two classes of gating current from L-type Ca channels in guinea pig ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 99: 863-895

Simmermann HK, Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78: 921-47

Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N (1991) The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 253: 1553-1557

Smith PD, Liesegang GW, Berger RL, Czerlinski G, Podolshy RJ (1984) A stopped-flow investigation of calcium ion binding by ethylene glycol bis (beta-aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid. *Anal. Biochem.* 143: 188-195

Smith R (2003) <http://www.omedon.co.uk/ionchan/channels/calcium/> Ion channels in biological membranes.

Solaro RJ, Robertson SP, Johnson JD, Holroyde MJ, Potter JD (1981) Troponin-I phosphorylation: *Cold Spring Harb Conf Cell Prolif* 8: 901-911

Soldatov NM, Oz M, O'Brien KA, Abernethy DR, Morad M (1998) Molecular determinants of L-type Ca²⁺ channel inactivation. *J Biol Chem* 273: 957-963

Stein B, Bartel S, Kirchhefer U, Kokott S, Krause EG, Neumann J, Schmitz W, Scholz H (1996) Contractile response to β -adrenergic stimulation and phosphorylation of regulatory proteins in hypertrophied hearts. *Am J Physiol* 270: 2021-2028

Stern MD (1992) Buffering of calcium in the vicinity of a channel pore. *Cell Calcium* 13: 183-192

Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J (1991) Tissue-specific regulation of the α -myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 266: 24613-24620

Sun H, Leblanc N, Nattel S (1997) Mechanisms of inactivation of L-type calcium channels in human atrial myocytes. *Am J Physiol* 41: 1625-1635

Tada M, Katz AM (1982) Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol* 44: 401-423

Takahashi T, Allen PD, Lacro RV, Marks AR, Dennis AR, Schoen FJ, Grossman W, Marsh JD, Izumo S (1992) Expression of dihydropyridine receptor (Ca²⁺ channel) and calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure. *J Clin Invest* 90: 927-935

Tao SH, Huang F, Lynch A, Glinsmann WH (1978) Control of rat skeletal-muscle phosphorylase phosphatase activity by adrenaline. *Biochem J* 176: 347-350

Tehrani MA, Mumby MC, Kamibayashi C (1996) Identification of a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit highly expressed in muscle. *J Biol Chem* 271: 5164-5170

Tomaselli GF, Marban E (1999) Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 42: 270-283

Toyofuku T, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH (1993) Identification of regions in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum that affect functional association with phospholamban. *J Biol Chem* 268: 2809-2815

Trépanier-Boulay V, St-Michel Ch, Tremblay A, Fiset C (2001) Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 89: 437-444

Triana JF, Li XY, Jamaluddin U, Thornby JI, Bolli R (1991) Postischemic myocardial "stunning". Identification of major differences between the openchest and the conscious dog and evaluation of the oxygen radical hypothesis in the conscious dog. *Circ Res* 96: 731-747

Tsien RW, Hess P, McCleskey EW, Rosenberg RL (1987) Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation and block. *Ann Rev Biophys Chem* 16: 265-290

Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ (1993) Altered expression of β -adrenergic receptor kinase and β_1 -adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87: 454-463

Vassort G und Alvarez J (1994) Cardiac T-type calcium current. *J Cardiovasc Electrophysiol* 5: 376-393

Ver Heyen M, Heymans S, Antoons G, Reed T, Periasamy M, Awede B, Lebacqz J, Vangheluwe P, Dewerchin M, Collen D, Sipido K, Carmeliet P, Wuytack F (2001) Replacement of the muscle-specific sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase Isoform SERCA2a by the nonmuscle SERCA2b homologue causes mild concentric hypertrophy and impairs contraction-relaxation of the heart. *Circ Res*. 89: 838-846

Walter G, Mumby M (1993) Protein serine/threonine phosphatases and cell transformation. *Biochim Biophys Acta* 1155: 207-226

Wang P, Zweier JL (1996) Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. *J Biol Chemistry* 271: 29223-29230

Wegener AD, Simmerman HKB, Lindemann JP, Jones LR (1989) Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to β -adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 264: 11468-11474

Weinbrenner C, Baines CP, Liu GS, Armstrong SC, Ganote SC, Walsh AH, Honkanen RE, Cohen MV, Downey JM (1998) Fostriecin, an inhibitor of protein phosphatases 2A, limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Circulation* 98: 899-905

Wera S, Hemmings BA (1995) Serin/threonine protein phosphatases. *Biochem J* 311, 17-29

Wiechen K, Yue DT, Herzig S (1995) Two distinct functional effects of protein phosphatase inhibitors on guinea pig L-type Ca^{2+} channels. *J Physiol* 484: 583-592

Wolska BM, Solaro RJ (1996) Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry. *Am J Physiol* 271: 1250-1255

Zakhary DR, Moravec CS, Stewart RW, Bond M (1999) Protein kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 99: 505-510

Zarain-Herzberg A, MacLennan DH, Periasamy M (1990) Characterization of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase gene. *J Biol Chem* 265: 4670-4677

Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 272: 23389-23397

Zhang L, Franzini-Armstrong C, Ramesh V, Jones LR (2001) Structural alterations in cardiac calcium release units resulting from overexpression of junctin. *J Mol Cell Cardiol* 33: 233-247

Zhu WX, Meyers ML, Hartley CJ, Roberts R, Bolli R (1986) Validation of a single crystal for measurement of transmural and epicardial thickening. *Am J Physiol* 251: H 1045

Zimmermann N, Gams E, Neumann J, Bokník P, Scholz H (1994) Effects of cyclosporin A on protein phosphorylation in the heart. *Transplant Proc* 26: 2875-2876

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits wie folgt publiziert:

ORIGINALARBEITEN

Weber T, Hanske G, Neumann J, Schmitz W, Boknik P (2003) Decreased phosphorylation of phospholamban in short-term stunning in conscious dogs. (Manuskript in Vorbereitung)

Kirchhefer U, Baba HA, Hanske G, Jones LR, Kirchhof P, Schmitz W, Neumann J (2003) New insights into the regulation of SR-Ca²⁺ handling in atrium from study of transgenic mice overexpressing junctin. (eingereicht)

Kirchhefer U, Neumann J, Bergs DM, Buchwalow IB, Fabritz L, Hanske G, Justus I, Riemann B, Schmitz W, Jones LR (2003) Impaired relaxation in transgenic mice overexpressing junctin. *Cardiovas Res* 59: 369-379

Neumann J, Boknik P, Begrow F, Hanske G, Justus IA, Máťuš M, Reinke U, Matherne GP, Schmitz W (2003) Altered signal transduction in cardiac ventricle overexpressing A₁-adenosine receptors. *Cardiovas Res* 60: 529-537

Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Máťuš M, Justus I, Hanske G, Schmitz W, Neumann J (2003) Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function (eingereicht)

ABSTRACTS

Hanske G, Gergs U, Justus I, Neumann J, Schmitz W (2003) Altered current density and inactivation kinetics of the L-type calcium channel in cardiomyocytes of transgenic mice overexpressing the catalytic subunit α of protein phosphatase 2A. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367 (Suppl 1): R 96

Justus I, Gergs U, Hanske G, Neumann J, Schmitz W (2003) Impaired response to β -adrenergic stimulation in PP2A-overexpressing mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367 (Suppl 1): R 95

Kirchhefer U, Hanske G, Jones LR, Schmitz W, Neumann J (2003) Altered function in atrium of transgenic mice overexpressing junctin. *Z Kardiol* 92 (Suppl): I/190

Boknik P, Grote S, Hanske G, Jian M, Brinbaumer L, Schmitz W, Neumann J (2003) Genetic disruption of $G\alpha_2$ and $G\alpha$ does not abolish inotropic and chronotropic effects of M-cholinoceptor stimulation in atria. Frühjahrstagung Mainz 2004 (im Druck)