

Institut für Physiologie

HABILITATIONSSCHRIFT

**Untersuchungen zur
Myokardkontraktilität,
elektrophysiologischen, biochemischen
und molekularen Veränderungen bei
kardialer Hypertrophie**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Physiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Herrn Dr. Kay-Dietrich Wagner

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.G. Zimmer
2. Prof. Dr. med. A. Deußen

eingereicht: 12. März 2003

Datum der Habilitation: 12. Februar 2004

Die chronisch ischämische Herzkrankheit und der Myokardinfarkt (MI) sind die häufigsten Gründe für schwere Krankheit und vorzeitigen Tod in den entwickelten Ländern. Langfristig kommt es als Folge des Infarktes zur Kollateralgefäßbildung und zur Entwicklung einer kompensatorischen Herzhypertrophie. Eine Vielzahl von adaptativen Veränderungen in diesem Prozess konnte identifiziert werden.

Wir konnten zeigen, dass in der akuten Phase nach MI Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit des Myokards erhöht waren. Die Expression der Hitzeschockproteine (HSP) 25 und 72 war verstärkt und korrelierte mit der Relaxationsgeschwindigkeit. In der chronischen Phase nach MI entwickelte sich eine signifikante Herzhypertrophie, die mit verminderter Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit einherging. Für die verlangsamte Relaxation war die verminderte Aktivität der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) als entscheidender Faktor anzusehen. Bei transgener Überexpression von Renin / Angiotensinogen ist die Relaxationsgeschwindigkeit des Myokards war wie auch nach MI durch geringere SERCA- Protein Expression vermindert. Die Empfindlichkeit der kontraktile Funktion gegenüber Sauerstoffmangel und Reoxygenierung war nach MI gegenüber dem Kontrollmyokard geringer. Dafür konnten die verstärkte Expression der antioxidativ wirksamen HSPs und die erhöhte Aktivität der Glutathionperoxidase und der Superoxiddismutase, eine Verschiebung des Kreatinkinase (CK)- Isoenzymmusters und eine verminderte SERCA- Aktivität verantwortlich gemacht werden. Die Repolarisation der Aktionspotentiale der Kardiomyozyten war nach MI gegenüber den Kontrolltieren signifikant verlangsamt. Bereits eine 10-fach geringere artifizielle Dehnung des Gewebes führte nach MI im Vergleich zu Kontrolltieren zum Auftreten von Nachdepolarisationen und Extra-Aktionspotentialen. Ausschließlich in MI ließ sich durch die artifizielle Dehnung Vorhofflimmern auslösen, d.h. nach Myokardinfarkt war der mechano-elektrische Feedback Mechanismus empfindlicher. Die dehnungsinduzierten Veränderungen konnten durch Gadolinium unterdrückt werden, was auf eine Beteiligung von dehnungsaktivierten Ionenkanälen an den beobachteten Phänomenen schließen ließ. Auch kardiale Fibroblasten zeigten nach MI signifikante Änderungen ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften, was zur Arrhythmieentstehung beitragen kann. Mittels molekularer Analysen konnten wir zeigen, dass der unter Sauerstoffmangel stabilisierte Transkriptionsfaktor Hif-1 α in der Lage ist, den Promoter des Wilms' Tumor Suppressor Gens 1 (WT1) direkt transkriptionell zu aktivieren. Das führte zu verstärkter Expression von WT1 in den Herzen nach Myokardinfarkt, und zu verstärkter Expression von WT1 in Herz und Niere bei systemischer normobarer Hypoxie. Die WT1 Expression im Herzen nach MI ließ sich in den Koronargefäßen lokalisieren. Koexpression mit Proliferations- und Vaskulogenesemarkern ließ vermuten, dass WT1 nach MI eine wichtige Rolle für die Neovaskulogenese spielt.

Die gewonnenen Ergebnisse tragen zum Verständnis der pathophysiologischen Veränderungen bei kardialer Hypertrophie nach Myokardinfarkt bei und eröffnen möglicherweise langfristig neue therapeutische Ansätze.

Hypertrophie, Myokardinfarkt, antioxidative Mechanismen, zelluläre Elektrophysiologie, WT1

Chronic ischemic heart disease and myocardial infarction are the most common causes for morbidity and mortality in industrialized countries. A survived myocardial infarction (MI) results in a long run in collateral formation and the development of cardiac hypertrophy. A variety of adaptive responses in this process had been identified.

We could show that in the acute phase after MI in rats, contraction- and relaxation rates of the myocardium are increased. The higher relaxation rate correlates to an increased expression of heat shock proteins. In the chronic phase after MI, with the development of cardiac hypertrophy, contraction and relaxation rates decrease. The decrease in the relaxation rate could be attributed to a reduced activity of the Ca-ATPase of the sarcoplasmic reticulum (SERCA2). Transgenic overexpression of renin / angiotensinogen also resulted in a reduced SERCA2 expression and, consequently, lower relaxation rate. The susceptibility of contractile function to hypoxia – reoxygenation was reduced after MI compared to sham operated control animals. The lower susceptibility to hypoxia – reoxygenation could be attributed to an increased expression of heat shock proteins, higher activities of the antioxidant enzymes glutathionperoxidase and superoxidismutase, shifts in the isoenzyme distribution of the creatine kinase, and a reduced SERCA2 activity. Repolarization of cardiomyocyte action potentials was found to be delayed after MI. A 10-fold lower artificial stretch of the tissue after MI than after sham operation caused afterdepolarizations and extra action potentials. Higher artificial stretch caused atrial fibrillation only after MI suggesting an intensified mechano-electrical feedback mechanism after MI. Stretch-induced electrical abnormalities could be suppressed by gadolinium suggesting the involvement of stretch-activated ion channels in the electrical abnormalities. Also electrophysiological properties of cardiac fibroblasts were significantly altered after MI, which may contribute to the increased risk for arrhythmia after infarction. Furthermore, we could show that the Hif-1alpha transcription factor, which is stabilized under hypoxic conditions is capable to directly activate the Wilms' tumor suppressor 1 (WT1) transcriptionally. This leads to an increased expression of WT1 in the heart after MI and in heart and kidneys after systemic hypoxia. After MI, WT1 is expressed mainly in coronary vessels. Co-expression of WT1 with markers of proliferation and vasculogenesis suggests a role of WT1 in neovasculogenesis.

These findings contribute to our understanding of pathophysiological alterations in the development of cardiac hypertrophy after MI and may contribute to the development of new therapeutic approaches.

Cardiac hypertrophy, myocardial infarction, antioxidative enzymes, cellular electrophysiology, WT1

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung und Problemstellung	9
Literaturangaben zu 2.	10
3. Ergebnisse und Schlussfolgerungen	13
3.1. Kontraktile Funktion und biochemische Veränderungen unter aeroben Kontrollbedingungen im hypertrophierten Myokard	13
Literaturangaben zu 3.1.	15
3.2. Kontraktile Funktion während Hypoxie / Reoxygenierung und assoziierte biochemische Parameter	18
Literaturangaben zu 3.2.	20
3.3. Elektrophysiologische Veränderungen an Kardiomyozyten bei kardialer Hypertrophie	23
Literaturangaben zu 3.3.	25
3.4. Elektrophysiologische Charakteristika kardialer Fibroblasten	28
Literaturangaben zu 3.4.	30
3.5. Untersuchungen zur Funktion des Wilms' Tumor Suppressor Genprodukts	33
Literaturangaben zu 3.5.	35
Danksagung	39
Erklärung	40
Lebenslauf	41

1 Zusammenfassung

Die chronisch ischämische Herzkrankheit und der Myokardinfarkt sind die häufigsten Gründe für schwere Krankheit und vorzeitigen Tod in den entwickelten Ländern. Ein überlebter Myokardinfarkt führt zum gehäuften Auftreten von Arrhythmien. Langfristig kommt es als Folge des Infarktes zur Kollateralgefäßbildung und zur Entwicklung einer kompensatorischen Herzhypertrophie. Eine Vielzahl von morphologischen, biochemischen und molekularen Veränderungen bei kardialer Hypertrophie, welche die kontraktile Funktion des Herzens beeinflussen, sind beschrieben. Über Veränderungen im Energiestoffwechsel, in antioxidativ wirksamen Schutzsystemen, an Proteinen des kardialen Ca^{2+} -Zyklus und deren Auswirkung auf die kontraktile Funktion nach Myokardinfarkt war zu Beginn meiner Arbeiten weniger bekannt. In dieser Arbeit wurden die kontraktile Funktion und assoziierte biochemische Modifikationen an einem Rattenmodell mit experimentell induziertem Myokardinfarkt untersucht. Zur Klärung der Rolle des Renin-Angiotensin-Systems für diese Modifikationen führten wir Experimente an Tieren mit Renin-Angiotensinogen-Überexpression durch. Weiterhin beschrieben wir elektro-physiologische Veränderungen an Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten unter Berücksichtigung des mechano-elektrischen Feedback Mechanismus und konnten außerdem eine potentielle Bedeutung des Wilmstumortranskriptionsfaktors für die Neovaskulogenese nach Myokardinfarkt (MI) aufklären.

Die wichtigsten Ergebnisse waren: 1) In der akuten Phase (15 h) nach Myokardinfarkt waren Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit isolierter Papillarmuskeln in MI gegenüber den Kontrollen wahrscheinlich über cAMP/ Proteinkinase A Signalwege unter Katecholaminwirkung erhöht. Die Expression der Hitzeschockproteine (HSP) 25 und 72 war verstärkt und korrelierte mit der Relaxationsgeschwindigkeit.

2) In der chronischen Phase (6 Wochen) nach MI entwickelte sich eine signifikante Herzhypertrophie, die mit verminderter Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit einherging. Die niedrigere Kontraktionsgeschwindigkeit beruhte wahrscheinlich auf relativen Änderungen der Isomyosine. Für die verlangsamte Relaxation war die verminderte Aktivität der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) als entscheidender Faktor anzusehen.

3) Transgene Überexpression von Renin / Angiotensinogen führte trotz signifikant erhöhter Plasma Renin Aktivität nur zu links- nicht aber zu rechtsventrikulärer Hypertrophie. Die Relaxationsgeschwindigkeit des Myokards war wie auch nach MI durch geringere SERCA- Protein Expression vermindert. Die Ansprechbarkeit des β -adrenergen Rezeptors war wie bei anderen Formen kardialer Hypertrophie reduziert. Dieser Defekt war nicht primär auf den Rezeptor zurückzuführen, sondern konnte durch eine verstärkte Expression inhibitorischer G-Proteine erklärt werden.

4) Die Empfindlichkeit der kontraktile Funktion gegenüber Sauerstoffmangel und Reoxygenierung war nach MI gegenüber dem Kontrollmyokard geringer. Dafür konnten die verstärkte Expression der antioxidativ wirksamen HSPs und die erhöhte Aktivität der Glutathionperoxidase in der akuten Phase nach MI verantwortlich gemacht werden. In der chronischen Phase nach MI ließen sich als

zusätzlich protektiv gegenüber Schädigungen durch Hypoxie / Reoxygenierung wirksame Veränderungen eine Aktivitätszunahme der Superoxiddismutase, eine Verschiebung des Kreatinkinase (CK)- Isoenzymmusters zu den „fetalen“ Isoenzymen CK-MB und CK-BB und eine verminderte SERCA- Aktivität nachweisen.

5) Transgene Überexpression von Renin / Angiotensinogen reduzierte ebenfalls die Empfindlichkeit des linksventrikulären Myokards gegenüber Hypoxie / Reoxygenierung. Verschiebungen des CK- Isoenzymmusters zu den „fetalen“ Isoenzymen und erhöhte HSP25 Expression waren nur im linksventrikulären Myokard nachweisbar, was für eine Hypertrophieassoziation spricht. Die Aktivität der Glutathionperoxidase war sowohl im linksventrikulären als auch im nicht hypertrophierten rechtsventrikulären Myokard der transgenen Tiere gesteigert, was eine Induktion durch das Renin-Angiotensin System wahrscheinlich macht.

6) Die Repolarisation der Aktionspotentiale der Kardiomyozyten war nach MI gegenüber den Kontrolltieren signifikant verlangsamt. Bereits eine 10-fach geringere artifizielle Dehnung des Gewebes führte nach MI im Vergleich zu Kontrolltieren zum Auftreten von Nachdepolarisationen und Extra-Aktionspotentialen. Ausschließlich in MI ließ sich durch die artifizielle Dehnung Vorhofflimmern auslösen, d.h. nach Myokardinfarkt war der mechano- elektrische Feedback Mechanismus empfindlicher. Die dehnungsinduzierten Veränderungen konnten durch Gadolinium unterdrückt werden, was auf eine Beteiligung von dehnungsaktivierten Ionenkanälen an den beobachteten Phänomenen schließen ließ.

7) Kardiale Fibroblasten hatten im Vergleich zu Kardiomyozyten ein deutlich positiveres Ruhemembranpotential und einen höheren Membranwiderstand. Sie waren elektrisch nicht erregbar und Kompression während der Myokardkontraktion führte zum Auftreten mechanisch-induzierter Potentiale, die in ihrem Verlauf der Kontraktion folgten. Die mechanisch- induzierten Potentiale wurden über Aktivierung von mechano- sensitiven Kanälen bei Kompression der Fibroblasten generiert. Die Aktivierung dieser Kanäle war zumindest teilweise über das Zytoskelett vermittelt.

8) Nach MI ließ sich eine Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials der Fibroblasten beobachten. Sie korrelierte mit der linksventrikulären Infarktgröße, hatte ein Maximum 8 Tage nach Infarkt und normalisierte sich darauffolgend. Die Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials der Fibroblasten korrelierte mit einer verminderten Herzfrequenz der Tiere mit MI *in vivo* und einer geringeren Spontanfrequenz *in vitro*. Ob ein kausaler Zusammenhang zwischen Hyperpolarisation des Fibroblastenpotentials und Bradykardie nach MI besteht, war allerdings ungeklärt.

9) Mittels molekularer Analysen konnten wir zeigen, dass der unter Sauerstoffmangel stabilisierte Transkriptionsfaktor Hif-1 α in der Lage ist, den Promoter des Wilms' Tumor Suppressor Gens 1 (WT1) direkt transkriptionell zu aktivieren. Das führte zu verstärkter Expression von WT1 in den Herzen nach Myokardinfarkt, und zu verstärkter Expression von WT1 in Herz und Niere bei systemischer normobarer Hypoxie. Die WT1 Expression im Herzen nach MI ließ sich in den

Koronargefäßen lokalisieren. Koexpression mit Proliferations- und Vaskulogenesemarkern ließ vermuten, dass WT1 nach MI eine wichtige Rolle für die Neovaskulogenese spielt.

Die gewonnenen Ergebnisse tragen zum Verständnis der pathophysiologischen Veränderungen bei kardialer Hypertrophie nach Myokardinfarkt bei und eröffnen möglicherweise langfristig neue therapeutische Ansätze.

2 Einleitung und Problemstellung

Ein nichtletaler Myokardinfarkt löst vielfältige strukturelle, biochemische und elektrophysiologische Veränderungen sowohl in den infarzierten als auch in den nichtinfarzierten Gebieten des Herzens aus. Dieser Prozess wird global als „Remodeling“ bezeichnet (Pfeffer et al., 1990, Pfeffer et al., 1991). In der chronischen Phase nach MI bildet sich im Bereich des Infarktes Narbengewebe aus; es kommt zu einer Abnahme der Wandstärke und zu einer Flächenzunahme. Im nichtinfarzierten Bereich des Herzens hypertrophieren die Kardiomyozyten, Fibroblasten proliferieren und das Bindegewebe vermehrt sich (Olivetti et al., 1991).

Aus elektrophysiologischen Untersuchungen war bekannt, dass die Aktionspotentialcharakteristik im hypertrophierten Myokard generell von Kontrollmyokard verschieden ist und außerdem starke Inhomogenitäten in Abhängigkeit von der Lokalisation der Zellen auftreten (Qin et al., 1996). In diesem Zusammenhang wurde auch das gehäufte Auftreten von Arrhythmien im hypertrophierten Herzen im Vergleich zu gesundem Myokard erklärt (Pye & Cobbe, 1992, Hart, 1994). Eine attraktive Begründung für das Auftreten von Arrhythmien nach MI ist der mechano- elektrische Feedback Mechanismus (Lab, 1996). Die veränderten Dehnungs- und Kontraktionsverhältnisse könnten so über Aktivierung von dehnungsabhängigen Ionenkanälen (Bustamante et al., 1991, Hu & Sachs, 1997) zur elektrischen Instabilität und dadurch zum Auftreten von Arrhythmien führen (Lab, 1996).

Neben dem erhöhten Risiko durch Arrhythmien ist aus klinischen Beobachtungen eine verstärkte Gefährdung des hypertrophierten Myokards durch Ischämie- und Reperfusionsschäden schon lange bekannt (Cooley et al., 1972). Da Hypoxie und Reoxygenierung wesentliche Komponenten von Ischämie und Reperfusion darstellen, waren Veränderungen der kontraktilen Funktion und metabolischer Parameter während Hypoxie und Reoxygenierung an verschiedenen Tiermodellen (Allen & Orchard, 1987) und an humanem Myokard (Lammerich et al., 1996) untersucht. Hinsichtlich des Ischämie- und Reperfusionsschadens bei vorbestehender kardialer Hypertrophie existierten kontroverse Ergebnisse in Abhängigkeit vom untersuchten Hypertrophiemodell (Anderson et al., 1990, Do et al., 1995, Kirshenbaum et al., 1995, Spencer et al., 1997). Wenig war zu Beginn meiner eigenen Arbeiten zur Hypoxieempfindlichkeit der kontraktilen Funktion nach MI bekannt.

Die kontraktile Funktion des hypertrophierten nichtinfarzierten Myokards nach MI ist bereits unter aeroben Kontrollbedingungen in Abhängigkeit von der Infarktgröße gegenüber gesundem Kontrollmyokard gestört (Wagner et al., 1997). Das kann damit erklärt werden, dass bei der Entwicklung kardialer Hypertrophie eine Verschiebung der Isomyosinexpression auftritt (Mercadier et al., 1981). Die Aktivitäten der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Reticulums (SERCA) bzw. des kardialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, die wesentlich die Geschwindigkeit der kardialen Relaxation bestimmen (Bers, 1997), ändern sich in charakteristischer Weise bei verschiedenen Hypertrophiemodellen und in Abhängigkeit von der Lokalisation der Zellen relativ zum Infarktareal (Lammerich et al., 1995, Yoshiyama et al., 1997).

Weiterhin sind Störungen im kardialen Energiemetabolismus bei Hypertrophie nach MI beschrieben, die einerseits die kontraktile Funktion des Myokards unter aeroben Bedingungen und andererseits die Empfindlichkeit der kontraktilen Funktion gegenüber Hypoxie / Reoxygenierung beeinflussen könnten. Eine Abnahme der Kreatinkinase (CK)- Aktivität, reduzierte Expression der mitochondrialen CK- Isoform und gesteigerte Expression der „fötalen“ CK-MB und CK-BB Isoformen sowie veränderte Verteilung der Laktatdehydrogenase- Isoformen nach MI waren bekannt (Laser et al, 1996).

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Empfindlichkeit der kontraktilen Funktion gegenüber Hypoxie / Reoxygenierung ist eine Zunahme der Expression antioxidativ wirksamer Enzyme, die für die Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase an einem Tiermodell kardialer Hypertrophie durch Drucküberlastung beschrieben war (Kirshenbaum et al., 1995).

Inwieweit solche adaptiven Veränderungen bei kardialer Hypertrophie nach MI auftreten und welchen Einfluss sie auf die kontraktile Funktion unter aeroben Bedingungen bzw. bei zusätzlich reduzierter Sauerstoffversorgung haben, war zu Beginn meiner Arbeiten nicht bekannt.

Daraus ergaben sich aufbauend auf die oben dargestellten publizierten Daten für meine Arbeit folgende Problemstellungen:

1. Wie ändert sich die kontraktile Funktion nichtinfarzierten Myokards zu verschiedenen Zeitpunkten nach MI und welche zellulären Modifikationen sind dafür verantwortlich?
2. Kommt es zu einer Anpassung der Empfindlichkeit der kontraktilen Funktion des nichtinfarzierten Myokards gegenüber Hypoxie / Reoxygenierung nach MI? In welchem Zeitraum ist eine solche Anpassung nachweisbar? Welche biochemischen Ursachen lassen sich dafür ermitteln?
3. Welche Rolle spielt die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems nach MI für eine mögliche geänderte kontraktile Funktion, Empfindlichkeit gegenüber Hypoxie / Reoxygenierung und assoziierte biochemische Parameter?
4. Lässt sich ein empfindlicherer mechano- elektrischer Feedback Mechanismus an elektrophysiologischen Parametern von Kardiomyozyten nach MI mit potentieller Bedeutung für verstärkte Arrhythmieentstehung nachweisen?
5. Welche elektrophysiologische Funktion haben kardiale Fibroblasten? Treten nach MI Veränderungen mit potentieller Relevanz für Arrhythmieentstehung auf?
6. Lassen sich neue molekulare Signalwege für die Hypertrophieentstehung identifizieren?

Die eigenen Ergebnisse und kritischen Wertungen zu diesen Fragestellungen stelle ich hier in Form einer Monografie mit Originalarbeiten dar.

Literaturangaben zu 2.

Pfeffer, J.M., Pfeffer, M.A., Fletcher, P.J., Braunwald, E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. Am. J. Physiol. 260:H1406-H1414, 1991.

Pfeffer, M.A., Braunwald, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental

- observations and clinical implications. *Circulation* 81:**1161-1172**, 1990.
- Olivetti, G., Capasso, J.M., Meggs, L.G., Sonnenblick, E.H., Anversa, P. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circ. Res.* 68:**856-859**, 1991.
- Qin, D., Zhang, Z.H., Caref, E.B., Boutjdir, M., Jain, P., El-Sherif, N. Cellular ad ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ. Res.* 79:**461-473**, 1996.
- Pye, M.P., Cobbe, S.M. Mechanisms of ventricular arrhythmias in cardiac failure and hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 26:**740-750**, 1992.
- Hart, G. Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* 28: **933-946**, 1994.
- Lab, M.J. Mechanoelectric feedback (transduction) in heart: concepts and implication. *Cardiovasc. Res.* 32:**3-14**, 1996.
- Hu, H., Sachs, F. Stretch-activated ion channels in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 9:**1511-1523**, 1997.
- Bustamante, J.O., Ruknudin, A., Sachs, F. Stretch-activated channels in heart cells: relevance to cardiac hypertrophy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17(Suppl.2):**S110-S113**, 1991.
- Cooley, D.A., Reul, G.J., Wukasch, D.A. Ischemic contracture of the heart: "stone heart". *Am. J. Cardiol.* 29:**575-577**, 1972.
- Allen, D.G., Orchard, C.H. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ. Res.* 60:**153-168**, 1987.
- Lammerich, A., Bohm, J., Schimke, I., Wagner, K.D., Storch, E., Günther, J. Effects of hypoxia, simulated ischemia and reoxygenation on the contractile function of human atrial trabeculae. *Mol. Cell. Biochem.* 160/161:**143-151**, 1996.
- Anderson, P.G., Allard, M.F., Thomas, G.D., Bishop, S.P., Digerness, S.B. Increased ischemic injury but decreased hypoxic injury in hypertrophied rat hearts. *Circ. Res.* 67:**948-959**, 1990.
- Do, E., Baudet, S., Gow, I.F., Ellis, D., Noireaud, J. Intracellular pH during hypoxia in normal and hypertrophied right ventricle of ferret heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27: **927-939**, 1995.
- Kirshenbaum, L.A., Hill, M., Singal, P.K. Endogenous antioxidants in isolated hypertrophied cardiac myocytes and hypoxia-reoxygenation injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27: **263-272**, 1995.
- Spencer, R.G.S., Buttrick, P.M., Ingwall, J.S. Function and bioenergetics in isolated perfused trained rat hearts. *Am. J. Physiol.* 272: **H409-H417**, 1997.
- Laser, A., Neubauer, S., Tian, R., Hu, K., Gaudron, P., Ingwall, J.S., Ertl, G. Long-term beta-

- blocker treatment prevents chronic creatine kinase and lactate dehydrogenase system changes in rat hearts after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 27:**487-493**, 1996.
- Wagner, K.D., Theres, H., Born, A., Strube, S., Wunderlich, N., Pfitzer, G., Baumann, G., Günther, J. Contractile function of papillary muscle from rats with different infarct size after β -adrenergic blockade and ACE-inhibition. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29:**22941-2951**, 1997.
- Mercadier, J.J., Lompré, A.M., Wisnewsky, C., Samuel, J.L., Bercovici, J., Swinghedauw, B., Schwartz, K. Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 49: **525-532**, 1981.
- Bers, D. Ca transport during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Basic Res. Cardiol.* 92(Suppl.1):**1-10**, 1997.
- Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Hanatani, A., Kim, S., Omura, T., Toda, I., Teragaki, M., Akioka, K., Iwao, H., Yoshikawa, J. Differences in expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and Na^{+} - Ca^{2+} exchanger genes between adjacent and remote noninfarcted myocardium after myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29:**255-64**, 1997.
- Lammerich, A., Günther, J., Pfitzer, G., Storch, E., Vetter, R. Alterations of cardiac contractile function are related to changes in membrane calcium transport in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertension* 13:**1313-1324**, 1995.

3 Ergebnisse und Schlussfolgerungen

3.1 Kontraktile Funktion und biochemische Veränderungen unter aeroben Kontrollbedingungen im hypertrophierten Myokard

Das "Remodeling" nach Myokardinfarkt beinhaltet die Entwicklung kardialer Hypertrophie (Pfeffer et al., 1992, Zimmer et al., 1990), linksventrikuläre Dilatation und verschiedene biochemische und molekulare Veränderungen, die die kontraktile Funktion des Herzens beeinflussen (Pfeffer & Braunwald, 1990, Laser et al., 1996). Über Veränderungen im Energiestoffwechsel, in antioxidativ wirksamen Schutzsystemen, an Proteinen des kardialen Ca^{2+} -Zyklus und deren Auswirkungen auf die kontraktile Funktion war zu Beginn meiner eigenen Arbeiten weniger bekannt. Wir untersuchten die kontraktile Funktion in der akuten (nach 15 Stunden) und in der chronischen Phase (6 Wochen) nach Myokardinfarkt (MI). Die Infarkte wurden experimentell an Ratten durch Ligatur der linken Koronararterie induziert; bei scheinoperierten Tieren (SO) erfolgte ein vergleichbarer operativer Eingriff ohne dass die Ligatur um die Koronararterie geschlossen wurde (Stauss et al., 1994). Die Infarktgröße betrug 15 Stunden nach Koronarligatur bei diesem experimentellen Vorgehen ca. 31% der endokardialen Zirkumferenz. Herz- und Körpergewichte waren vergleichbar, da sich die kardiale Hypertrophie langsam entwickelt (Wagner et al., 2001). Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit isolierter linksventrikulärer Papillarmuskeln waren in MI höher als bei SO, das Verhältnis von Kontraktions- zu Relaxationsgeschwindigkeit vermindert, d.h. die Relaxation wurde stärker beschleunigt als die Kontraktion. Dieser typische positiv lusitrope Effekt ist durch erhöhte Katecholaminspiegel nach MI zu erklären (Gross et al., 1989). Die Relaxationsgeschwindigkeit wird wesentlich von der Aktivität der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) bestimmt (SERCA2). Deren Aktivität steigt bei Phosphorylierung des regulatorischen Proteins Phospholamban über cAMP/ Proteinkinase A (PKA) Signalwege unter Katecholaminwirkung an (MacLennan et al., 1997, Brittsan & Kranias, 2000). cAMP/ PKA Stimulierung steigert außerdem die Expression von Hitzeschockproteinen (HSPs) (Pizurki & Polla, 1994, Osaki et al., 1998). Entsprechend konnten wir im Western Blot eine Erhöhung von HSP25 und HSP72 nachweisen. Diese korrelierte gut mit der Relaxationsgeschwindigkeit des Myokards.

6 Wochen nach Infarktinduktion waren die Herzgewichte in MI im Vergleich zu SO als Ausdruck der kardialen Hypertrophie signifikant erhöht (Wagner et al., 1998). Die Tiere mit Myokardinfarkt wiesen *in vivo* eine höhere Herzfrequenz und erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck, verminderte maximale Druckentwicklung sowie geringere Druckanstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeiten auf (Theres et al., 2000). Da linksventrikuläre Papillarmuskeln ebenfalls in der chronischen Phase nach Infarkt hypertrophiert waren, konnten sie als repräsentativ für linksventrikuläres Myokard angesehen werden und an ihnen wurde *in vitro* die kontraktile Funktion gemessen (Wagner et al., 1998). Die maximale isometrische Kraftentwicklung der Papillarmuskeln war in MI und SO vergleichbar, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten waren in MI vermindert. Das errechnete „ V_{\max} -Äquivalent“, das mit der Geschwindigkeit des

Querbrückenzyklus korreliert (Jacob et al., 1976) war in MI als Ausdruck einer Isomyosinverschiebung von der „schnellen“ V_1 zur „langsamen“ V_3 Untereinheit, die für dieses Hypertrophiemodel beschrieben ist (Mercadier et al., 1981) ebenfalls vermindert. Diese mögliche Isomyosinverschiebung erklärt auch die geringere Kontraktionsgeschwindigkeit in MI. Verlängerte intrazelluläre Ca^{2+} Transienten, die an Kardiomyozyten nach Infarkt gemessen wurden (Litwin & Morgan, 1992), können die Grundlage für die reduzierte Relaxationsgeschwindigkeit darstellen. Da die Ca^{2+} Rückbindung im Rattenmyokard hauptsächlich von der Aktivität der SR Ca^{2+} ATPase abhängt (Bers, 1997), untersuchten wir die SERCA- Aktivität *in vitro*. Diese war in MI vs. SO möglicherweise durch verminderte SERCA Expression (Zarain-Herzberg et al., 1996) signifikant vermindert. Eine vergleichbare Stimulation der SERCA- Aktivität durch PKA in beiden Gruppen weist auf eine vergleichbare *in vivo* Phosphorylierung hin. Die verminderte SERCA- Aktivität kann als entscheidender Faktor für die verlangsamte Relaxation in der chronischen Phase nach Myokardinfarkt angesehen werden.

Um die Bedeutung des aktivierten Renin-Angiotensin-Systems für Veränderungen der kontraktile Funktion nach Myokardinfarkt (Holtz, 1993) zu charakterisieren, führten wir Untersuchungen an Renin-Angiotensinogen transgenen Ratten (TGR) durch. Diese Tiere tragen das komplette humane Angiotensinogen Gen mit 1,6 Kilobasen (kB) 5'-flankierender und 3,5 kB 3'-flankierender Region sowie das komplette humane Renin Gen mit 10 Exons, 9 Introns, 3 kB Promoter Sequenz und 1,2 kB 3'-flankierender Region als Transgen (Bohlender et al., 1997). Gegenüber Kontrolltieren haben TGR eine 7-fach erhöhte Plasma Renin Aktivität (Bohlender et al., 2001), einen massiv erhöhten Blutdruck und entwickeln eine morphometrisch nachgewiesene (Bohlender et al., 1997) Herzhypertrophie, die sich auch in der erhöhten Ratio von linksventrikulärem Gewicht zu Körpergewicht widerspiegelt. Interessanterweise hypertrophiert aber trotz massiv erhöhten Reninspiegeln nur der linke nicht aber der rechte Ventrikel (Wagner et al., 2002). Die an isometrisch kontrahierenden linksventrikulären Papillarmuskeln gemessene Kontraktionsgeschwindigkeit war bei Wildtyptieren und TGR vergleichbar, die Relaxationsgeschwindigkeit aber niedriger. Dies korrespondierte wiederum mit einem verminderten SERCA2 Protein und geringerer Adenylatzyklase. Die im RNase Protektion Assay bestimmte SERCA2 mRNA war allerdings zwischen Kontrolltieren und TGR nicht verschieden. Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} Konzentration bewirkte in beiden Gruppen eine Zunahme der isometrischen Maximalkraft und der Kontraktionsgeschwindigkeit, die Relaxationsgeschwindigkeit wurde aber nur bei den Kontrolltieren beschleunigt, was ebenfalls auf die Rolle der verminderten SERCA bei TGR hinweist (Bohlender et al., 2001). Außerdem konnten wir bei TGR eine verminderte Ansprechbarkeit des β -adrenergen Rezeptors nachweisen. Stimulation der Papillarmuskelkontraktion mit Isoproterenol bewirkte bei TGR einen signifikant geringeren Anstieg der entwickelten Maximalkraft, sowie der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. Dieser Defekt ist nicht primär auf den Rezeptor zurückzuführen, da sowohl β_1 - als auch β_2 -Rezeptoren quantitativ vergleichbar im Western Blot nachweisbar waren. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die inhibitorischen G-Proteine $G_{i\alpha 2}$ und $G_{i\alpha 3}$ verstärkt exprimiert werden, während am

stimulatorischen G-Protein $G_{s\alpha}$ kein Unterschied feststellbar ist. Diese abnorme β -adrenerge Funktion bei TGR stimmt mit den Befunden für verschiedene Formen kardialer Hypertrophie überein (Bristow et al., 1982, Castellano & Böhm, 1997). Eine gestörte Relaxation, die in der chronischen Phase nach Myokardinfarkt im hypertrophierten Herzen auftritt ist auch bei direkter transgener Überexpression von Komponenten des Renin-Angiotensin Systems nachweisbar. Interessanterweise sind auch die Befunde hinsichtlich der SR Ca^{2+} ATPase vergleichbar. Inwieweit diese beobachteten Veränderungen Folge der Hypertrophieentwicklung oder ein direkter Effekt der Aktivierung des Renin- Angiotensin- Systems sind, lässt sich aus den durchgeführten Untersuchungen nicht feststellen, da auch bei TGR eine signifikante linksventrikuläre Hypertrophie auftritt.

Literaturangaben zu 3.1.

- Bers, D. Ca transport during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Basic Res. Cardiol.* 92(Suppl.1):**1-10**, 1997.
- Bohlender, J., Fukamizu, A., Lippoldt, A., Nomura, T., Dietz, R., Ménard, J., Murakami, K., Luft, F.C., Ganten, D. High human renin hypertension in transgenic rats. *Hypertension* 29:**428-434**, 1997.
- Bohlender, J., Hildenbrand, U., Wagner, K.D., Günther, J., Hempel, P., Schlegel, W.P., Luft, F.C., Krause, E.G., Bartel, S. Myocardial adrenergic dysfunction in rats with transgenic, human renin-dependent hypertension. *J. Hypertens.* 19:**1453-1463**, 2001.
- Bristow, M.R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R.S., Sageman, W.S., Lurie, K., Billingham, M.E., Harrison, D.C., Stinson, E.B. Decreased catecholamine sensitivity and β -adrenergic receptor density in failing human hearts. *N. Engl. J. Med.* 307:**205-211**, 1982.
- Brittsan, A.G. Kranias, E.G. Phospholamban and cardiac contractile function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32:**2131-2139**, 2000.
- Castellano, M., Böhm, M. The cardiac β -adrenoceptor-mediated signaling pathway and its alterations in hypertensive heart disease. *Hypertension.* 29:**715-722**, 1997.
- Gross, T., Günther, J., Storch, E. The isometric twitch of rabbit papillary muscle: reflection of the cellular calcium movements? *Gen. Physiol. Biophys.* 6:**521-528**, 1989.
- Holtz, J. Pathophysiology of heart failure and the renin-angiotensin system. *Basic Res. Cardiol.* 88(Suppl.1):**183-201**, 1993.
- Jacob, R., Kammereit, A., Medugorac, I., Wendt-Gallitelli, M.F. Maximum velocity of load-free

shortening Vmax, myocardial capacity and "contractility indices" in the hypertrophied myocardium. *Z. Kardiol.* 65:**392-400**, 1976.

- Laser, A. Neubauer, S., Tian, R. Hu, K., Gaudron, P., Ingwall, J.S., Ertl, G. Long-term beta-blocker treatment prevents chronic creatine kinase and lactate dehydrogenase system changes in rat hearts after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 27:**487-493**, 1996.
- Litwin, S.E., Morgan, J.P. Captopril enhances intracellular calcium handling and β -adrenergic responsiveness of myocardium from rats with postinfarction failure. *Circ. Res.* 71:**797-807**, 1992.
- Mac Lennon, D.H., Rice, W.J., Green, N.M. The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J. Biol. Chem.* 272:**28815-28818**, 1997.
- Mercadier, J.J., Lompré, A.M., Wisnewsky, C., Samuel, J.L., Bercovici, J., Swinghedauw, B., Schwartz, K. Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 49:**525-532**, 1981.
- Osaki, J. Haneda, T., Kashiwagi, Y., Oi, S., Fukuzawa, J., Sakai, H., Kikuchi, K. Pressure-induced expression of heat shock protein 70 mRNA in adult rat hearts is coupled both to protein kinase A-dependent and protein kinase C-dependent systems. *J. Hypertens.* 16:**1193-1200**, 1998.
- Pfeffer, M.A., Braunwald, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 81:**1161-1172**, 1990.
- Pfeffer, M.A., Braunwald, E., Moyé, L.A., Basta, L., Brown, E.J., Cuddy, T.E., Davis, B.R., Geltman, E.M., Goldman, S., Flaker, G.C., Klein, M., Lamas, G.A., Packer, M., Rouleau, J.L., Rutherford, J., Wertheimer, J.H., Hawkins, C.M. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of survival and ventricular enlargement trial. *N. Engl. J. Med.* 327:**669-677**, 1992.
- Pizurki, L., Polla, B.S. cAMP modulates stress protein synthesis in human monocytes-macrophages. *J. Cell. Physiol.* 161:**169-177**, 1994.
- Stauss, H.M., Zhu, Y.C., Redlich, T., Adamiak, D., Mott, A., Kregel, K.C., Unger, T. Angiotensin-converting enzyme inhibition in infarct-induced heart failure in rats: bradykinin versus angiotensin II. *J. Cardiovasc. Risk.* 1:**255-262**, 1994.
- Theres, H., Wagner, K.D., Romberg, D., Feig, C., Strube, S., Leiterer, K.P., Günther, J., Stangl, K., Baumann, G., Schimke, I. Combined treatment with ramipril and metoprolol prevents changes in the creatine kinase isoenzyme system and improves hemodynamic function in rat hearts after myocardial infarction. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 14:**597-606**, 2000.
- Wagner, K.D., Essmann, V., Mydlak, K., Wirth, M., Gmehling, G., Bohlender, J., Stauss, H.M., Günther, J., Schimke, I., Scholz, H. Decreased susceptibility of cardiac function to hypoxia-

reoxygenation in renin-angiotensinogen transgenic rats. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 283:**R153-R160**, 2002.

Wagner, K.D., Geil, D., Schimke, I., Stauss, H.M., Lammerich, A., Theres, H., Pfitzer, G., Vetter, R., Günther, J. Decreased susceptibility of contractile function to hypoxia/reoxygenation in chronic infarcted rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:**2341-2353**, 1998.

Wagner, K.D., Gmehling, G., Günther, J., Stauss, H.M., Mydlak, K., Theres, H., Scholz, H., Schimke, I. Contractile function of rat myocardium is less susceptible to hypoxia/reoxygenation after acute infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 228: **49-55**, 2001.

Zarain-Herzberg, A., Afzal, N., Elimban, V., Dhalla, N.S. Decreased expression of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-pump ATPase in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 163/164:**285-290**, 1996.

Zimmer, H.G., Gerdes, A.M., Lortet, S., Mall, G. Changes in heart function and cardiac cell size in rats with chronic myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22:**1231-1243**, 1990.

Anlagen zu 3.1.

Bohlender, J., Hildenbrand, U., Wagner, K.D., Günther, J., Hempel, P., Schlegel, W.P., Luft, F.C., Krause, E.G., Bartel, S. Myocardial adrenergic dysfunction in rats with transgenic, human renin-dependent hypertension. *J. Hypertens.* 19:**1453-1463**, 2001.

Wagner, K.D., Essmann, V., Mydlak, K., Wirth, M., Gmehling, G., Bohlender, J., Stauss, H.M., Günther, J., Schimke, I., Scholz, H. Decreased susceptibility of cardiac function to hypoxia-reoxygenation in renin-angiotensinogen transgenic rats. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 283:**R153-R160**, 2002.

Wagner, K.D., Geil, D., Schimke, I., Stauss, H.M., Lammerich, A., Theres, H., Pfitzer, G., Vetter, R., Günther, J. Decreased susceptibility of contractile function to hypoxia/reoxygenation in chronic infarcted rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:**2341-2353**, 1998.

Wagner, K.D., Gmehling, G., Günther, J., Stauss, H.M., Mydlak, K., Theres, H., Scholz, H., Schimke, I. Contractile function of rat myocardium is less susceptible to hypoxia/reoxygenation after acute infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 228: **49-55**, 2001.

3.2 Kontraktile Funktion während Hypoxie / Reoxygenierung und assoziierte biochemische Parameter

Da klinische Beobachtungen gezeigt haben, dass das hypertrophierte Myokard einem erhöhten Risiko des Auftretens von Ischämie- und Reperfusionsschäden ausgesetzt ist (Cooley et al., 1972), untersuchten wir, welchen Einfluss Hypoxie und Reoxygenierung als Hauptkomponenten von Ischämie/Reperfusion auf die kontraktile Funktion des Myokards nach Infarkt bzw. bei transgener Aktivierung des Renin- Angiotensin- Systems haben. Als mögliche Ursache einer veränderten kontraktile Funktion während Hypoxie und Reoxygenierung bestimmten wir die Aktivitäten der antioxidativen Enzyme Glutathionperoxidase (GSH-Px), Superoxiddismutase (SOD), die Expression von Hitzeschockproteinen und Kreatinkinase (CK) – Isoenzyme. Die Aktivität der antioxidativen Enzyme haben wir überprüft, da bekannt ist, dass erhöhte Enzymaktivität mit besserer Ventrikelfunktion während Ischämie / Reperfusion korreliert (Maulik et al., 1995a, Maulik et al., 1995b). GSH-Px knockout Mäuse zeigen dagegen eine stark verminderte kardiale Ischämietoleranz (Yoshida et al., 1997). Überexpression von Hitzeschockproteinen führte zu erhöhter Ischämietoleranz und bewirkte eine Verringerung der Infarktgröße (Marber et al., 1995, Hutter et al., 1996).

Experimentelle Myokardinfarkte wurden wie unter 3.1. beschrieben induziert. 15 h bzw. 6 Wochen nach Infarkt führten wir die Messungen an isometrisch kontrahierenden Papillarmuskeln durch; sofort nach Herzentnahme wurden Ventrikelpollen für die biochemischen Messungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Messung der kontraktile Funktion unter aeroben Kontrollbedingungen induzierten wir eine Hypoxie durch Äquilibration des Organbades mit N₂ (pO₂ 3 kPa), anschließend erfolgte die Reoxygenierung durch Äquilibration mit O₂ (pO₂ 80 kPa). Hypoxie führte 15 h nach MI bzw. in der scheinoperierten Kontrollgruppe (SO) innerhalb von 20 min zu einem Abfall der isometrischen Maximalkraft auf ca. 10% des aeroben Kontrollniveaus (Wagner et al., 2001, Wagner et al., 2002), der wahrscheinlich auf eine verminderte Ca²⁺ Sensitivität der Myofilamente durch intrazellulären Anstieg anorganischen Phosphats bei der schnellen Spaltung energiereicher Phosphate zurückzuführen ist (Allen & Orchard, 1987). Der Anstieg von $(dF/dt_{max})/PF$ weist darauf hin, dass die Kontraktionsgeschwindigkeit weniger hypoxieempfindlich ist als die Maximalkraft-entwicklung. Die Relaxationsgeschwindigkeit zeigte die geringste Hypoxietoleranz. Nach Reoxygenierung erholten sich Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit in MI besser als in SO. Diese bessere Erholung korrelierte mit einer erhöhten Aktivität der GSH-Px und einer verstärkten Expression des kleinen Hitzeschockproteins HSP25 nach Infarkt. Die Expression von HSP72 war in den Papillarmuskeln nach Infarkt ca. 3-fach erhöht, die SOD- Aktivität und Isoenzymverteilung weder im rechts- noch im linksventrikulären Myokard verändert. Die verstärkte HSP Expression ist möglicherweise durch lokale Ischämie des Papillarmuskels bei der Infarktentstehung zu erklären (Kilgore et al., 1996, Yu et al., 1999) und kann durch PKA / cAMP abhängige Signalwege vermittelt werden (Pizurki & Polla, 1994, Osaki et al., 1998). Zusammenfassend stellen die verstärkte HSP Expression und die höhere Aktivität der antioxidativ wirksamen GSH-Px wesentliche adaptive Mechanismen für eine erhöhte Toleranz des

Myokards gegenüber Hypoxie / Reoxygenierung in der akuten Phase nach Myokardinfarkt dar. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass *in vivo* bei Ischämie und Reperfusion weitere Mediatoren die kontraktile Funktion beeinflussen. So wurde am Rattenherz bei kardialer Hypertrophie eine verstärkte Hypoxie- und verminderte Ischämietoleranz beschrieben (Anderson et al, 1990), während an Humanmyokard simulierte Ischämie (zusätzliche Azidose während Hypoxie) einen protektiven Effekt hatte (Lammerich et al, 1996).

In der chronischen Phase 6 Wochen nach MI ist wie in der akuten Phase die Toleranz der kontraktilen Funktion gegenüber Hypoxie / Reoxygenierung erhöht (Wagner et al, 1998). Die Aktivität der GSH-Px als auch der SOD ist im hypertrophierten Myokard in MI höher als in SO. Zusätzlich zu den Veränderungen in der akuten Phase nach MI war eine reduzierte SR Ca^{2+} -ATPase Aktivität und eine Verschiebung des Kreatinkinase- Isoenzymmusters zu den „fetalen“ Isoenzymen CK-MB und CK-BB, das auch von anderen beschrieben wurde (Laser et al., 1996), nachweisbar. Diese biochemischen Modifikationen hatten charakteristische Auswirkungen auf die kontraktile Funktion während Hypoxie / Reoxygenierung. Im Gegensatz zu SO kam es in MI nach Einsetzen der Hypoxie zu einem initialen Anstieg der isometrischen Kraftentwicklung und während der ersten 10 min Hypoxie zu einem langsameren Kraftabfall. Diese Phänomene können durch die CK-Isoenzymverschiebung erklärt werden. Eine besonders rasche Kreatinphosphatspaltung bewirkt eine milde intrazelluläre Alkalose (Do et al., 1995) und dadurch einen positiv inotropen Effekt (Kentish, 1986). Außerdem ist der Phosphoryltransfer von Kreatinphosphat auf ATP durch den niedrigeren K_m -Wert von CK-MB und CK-BB beschleunigt (Younes et al., 1994). Auch der verminderte Beitrag der SR Ca^{2+} -ATPase zur Ca^{2+} Homöostase im chronisch infarzierten Herz kann zur erhöhten Hypoxietoleranz beitragen, da die SR Ca^{2+} -ATPase eine besonders hohe freie Energie der ATP Hydrolyse benötigt (Kammermeier, 1987), die durch das geringere ATP/ADP Verhältnis unter Hypoxie aber reduziert ist (Allen & Orchard, 1987). Der hohe Beitrag der SR Ca^{2+} -ATPase für die Ca^{2+} Rückbindung im Rattenmyokard bei SO führt damit unter Hypoxie zu einer schnelleren Störung der Ca^{2+} Homöostase als in MI. Für die bessere Erholung der kontraktilen Funktion nach Reoxygenierung in MI vs. SO spielt wahrscheinlich wie auch in der akuten Phase nach MI eine geringere Schädigung durch freie Sauerstoffradikale aufgrund der erhöhten antioxidativen Kapazität eine entscheidende Rolle.

Um die Bedeutung des aktivierten Renin- Angiotensin- Systems nach Myokardinfarkt für die veränderte Empfindlichkeit der kontraktilen Funktion gegenüber Hypoxie / Reoxygenierung sowie die assoziierten biochemischen Veränderungen zu charakterisieren, nutzten wir wiederum die Renin- Angiotensinogen transgenen Ratten. Von besonderem Vorteil an diesem Modell ist es, dass die Aktivierung des Renin- Angiotensin- Systems systemisch erfolgt, eine Hypertrophieentwicklung aber nur im linken Ventrikel auftritt. Damit lassen sich Veränderungen der biochemischen Parameter unterscheiden, die in direkter Abhängigkeit des Renin- Angiotensin- Systems auftreten bzw. hypertrophieassoziiert sind. Die maximale isometrische Kraftentwicklung war in TGR unter Hypoxie besser erhalten als in Papillarmuskeln von Kontrolltieren und erholte sich bei Reoxygenierung vollständig. (Wagner et al., 2002). Das traf auch auf Kontraktions- und

Relaxationsgeschwindigkeiten zu. Chronische Hemmung des Angiotensin- konvertierenden Enzyms (ACE) an Kontrolltieren (1 mg/kg/die Ramipril für 3 Wochen) hatte eine entgegengesetzte Wirkung auf die kontraktile Funktion während Hypoxie / Reoxygenierung, d.h. isometrische Maximalkraft, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten erholten sich nach Reoxygenierung signifikant schlechter als bei unbehandelten Kontrolltieren. Akute Angiotensin II Gabe hatte keinen Effekt auf die kontraktile Funktion der isolierten Papillarmuskeln. Verschiebungen des Kreatinkinase- Isoenzyimmusters zu den „fetalen“ Isoenzymen waren nur im linksventrikulären Myokard von TGR nachweisbar, was für eine Hypertrophieassoziation spricht. Das gleiche Phänomen war für HSP25 nachweisbar. Eine erhöhte Aktivität der GSH-Px konnte sowohl in links- als auch in rechtsventrikulärem Myokard von TGR nachgewiesen werden. Damit ist eine Induktion durch das Renin- Angiotensin- System wahrscheinlich. Die SOD- Aktivität und die HSP72 Expression waren weder in rechten noch in linken Ventrikeln von TGR signifikant verändert, was für eine komplexere Regulation spricht.

Adaptive Veränderungen, die zu einer erhöhten Toleranz der kontraktile Funktion gegenüber Hypoxie / Reoxygenierung führen, treten also schon in der akuten Phase nach Myokardinfarkt auf, werden im Verlauf der Hypertrophieentwicklung modifiziert und sind zumindest teilweise auf die Aktivierung des Renin- Angiotensin- Systems zurückzuführen. Für einige biochemische Veränderungen im hypertrophierten Myokard (z.B. SOD Expression) konnte bisher noch kein möglicher Stimulus identifiziert werden.

Literaturangaben zu 3.2.

Allen, D.G., Orchard, C.H. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ. Res.* 60:**153-168**, 1987.

Anderson, P.G., Allard, M.F., Thomas, G.D., Bishop, S.P. Digerness, S.B. Increased ischemic injury but decreased hypoxic injury in hypertrophied rat hearts. *Circ. Res.* 67:**948-959**, 1990.

Cooley, D.A., Reul, G.J., Wukasch, D.A. Ischemic contracture of the heart: „stone heart“. *Am. J. Cardiol.* 29:**575-577**, 1972.

Do, E., Baudet, S., Gow, I.F., Ellis, D., Noireaud, J. Intracellular pH during hypoxia in normal and hypertrophied right ventricle of ferret heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27:**927-939**, 1995.

Hutter, J.J., Mestril, R., Tam, E.K., Sievers, R.E., Dillmann, W.H., Wolfe, C.L. Overexpression of heat shock protein 72 in transgenic mice decreased infarct size in vivo. *Circulation* 94:**1408-1411**, 1996.

Kammermeier, H. High energy phosphate of the myocardium: Concentration vs. free energy

- change. *Basic Res. Cardiol.* 82(Suppl.2):**31-36**, 1987.
- Kentish, J.C. The effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle. *J. Physiol.* 370:**585-604**, 1986.
- Kilgore, J.L., Musch, T.I., Ross, C.R. Regional distribution of HSP70 proteins after myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 91:**283-288**, 1996.
- Lammerich, A., Bohm, J., Schimke, I., Wagner, K.D., Storch, E., Günther, J. Effects of hypoxia, simulated ischemia and reoxygenation on the contractile function of human atrial trabeculae. *Mol. Cell. Biochem.* 160/161:**143-151**, 1996.
- Laser, A., Neubauer, S., Tian, R., Hu, K., Gaudron, P., Ingwall, J.S., Ertl, G. Long-term beta-blocker treatment prevents chronic creatine kinase and lactate dehydrogenase system changes in rat hearts after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 27:**487-493**, 1996.
- Marber, M.S., Mestral, R., Chi, S.H., Sayen, M.R., Yellon, D.M., Dillmann, W.H. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat shock protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J. Clin. Invest.* 95:**1446-1456**, 1995.
- Maulik, N., Watanabe, W., Engelman, D.T., Engelman, R.M., Das, D.K. Oxidative stress adaptation improves postischemic ventricular recovery. *Mol. Cell. Biochem.* 144:**67-74**, 1995a.
- Maulik, N., Watanabe, W., Engelman, D.T., Engelman, R.M., Kagan, V.E., Kisin, E., Tyurin, V., Cordis, G.A., Das, D.K. Myocardial adaptation to ischemia by oxidative stress induced by endotoxin. *Am. J. Physiol.* 269:**C907-C916**, 1995b.
- Osaki, J., Haneda, T., Kashiwagi, Y., Oi, S., Fukuzawa, J., Sakai, H., Kikuchi, K. Pressure-induced expression of heat shock protein 70 mRNA in adult rat hearts is coupled both to protein kinase A-dependent and protein kinase C-dependent systems. *J. Hypertens.* 16:**1193-1200**, 1998.
- Pizurki, L., Polla, B.S. cAMP modulates stress protein synthesis in human monocytes-macrophages. *J. Cell. Physiol.* 161:**169-177**, 1994.
- Wagner, K.D., Essmann, V., Mydlak, K., Wirth, M., Gmehling, G., Bohlender, J., Stauss, H.M., Günther, J., Schimke, I., Scholz, H. Decreased susceptibility of cardiac function to hypoxia-reoxygenation in renin-angiotensinogen transgenic rats. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 283:**R153-R160**, 2002.
- Wagner, K.D., Geil, D., Schimke, I., Stauss, H.M., Lammerich, A., Theres, H., Pfitzer, G., Vetter, R., Günther, J. Decreased susceptibility of contractile function to hypoxia/reoxygenation in chronic infarcted rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:**2341-2353**, 1998.
- Wagner, K.D., Gmehling, G., Günther, J., Stauss, H.M., Mydlak, K., Theres, H., Scholz, H., Schimke, I. Contractile function of rat myocardium is less susceptible to

hypoxia/reoxygenation after acute infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 228: **49-55**, 2001.

Wagner, K.D., Gmehling, G., Günther, J., Theres, H., Mydlak, K., Schimke, I., Scholz, H. Time-dependent changes of the susceptibility of cardiac contractile function to hypoxia-reoxygenation after myocardial infarction in rats. *Mol. Cell. Biochem.* 241:**125-133**, 2002.

Yoshida, T., Maulik, N., Engelman R.M., Ho, Y.S., Rousou, J.A., Flack, J.E. III, Deaton, D., Das, D.K. Glutathion peroxidase knockout mice are susceptible to myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation* 96(Suppl. II):**216-220**, 1997.

Younes, A., Schneider, J.M., Bercovici, J., Swynhedauw, B. Redistribution of creatine kinase isoenzymes in chronically overloaded myocardium. *Cardiovasc. Res.* 19:**15-19**, 1994.

Yu, H., Yokoyama, M., Asano, G. Time course of expression and localisation of heat shock protein 72 in the ischemic and reperfused rat heart. *Jpn. Circ. J.* 63:**278-287**, 1999.

Anlagen zu 3.2.

Wagner, K.D., Essmann, V., Mydlak, K., Wirth, M., Gmehling, G., Bohlender, J., Stauss, H.M., Günther, J., Schimke, I., Scholz, H. Decreased susceptibility of cardiac function to hypoxia-reoxygenation in renin-angiotensinogen transgenic rats. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 283:**R153-R160**, 2002. [s. Anlagen zu 3.1]

Wagner, K.D., Geil, D., Schimke, I., Stauss, H.M., Lammerich, A., Theres, H., Pfitzer, G., Vetter, R., Günther, J. Decreased susceptibility of contractile function to hypoxia/reoxygenation in chronic infarcted rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:**2341-2353**, 1998. [s. Anlagen zu 3.1]

Wagner, K.D., Gmehling, G., Günther, J., Stauss, H.M., Mydlak, K., Theres, H., Scholz, H., Schimke, I. Contractile function of rat myocardium is less susceptible to hypoxia/reoxygenation after acute infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 228: **49-55**, 2001. [s. Anlagen zu 3.1]

3.3 Elektrophysiologische Veränderungen an Kardiomyozyten bei kardialer Hypertrophie

Neben der gestörten Kontraktilität nach Myokardinfarkt treten im hypertrophierten Herzen auch elektrophysiologische Veränderungen auf. Bei verschiedenen Hypertrophie-Modellen konnte gezeigt werden, dass Arrhythmien häufiger vorkommen als im normalen Myokard (Pye & Cobbe, 1992, Aronson & Ming, 1993, Hart, 1994). Der exakte Mechanismus, über den es zum verstärkten Auftreten von Arrhythmien im hypertrophierten Myokard kommt, ist bisher unbekannt, mechanisch-induzierte Störungen der elektrophysiologischen Funktion sind aber eine mögliche Erklärung (Lab, 1996, Nazir & Lab, 1996). Der sogenannte mechano-elektrische Feedback Mechanismus (Lab, 1968) kann für das Auftreten von Arrhythmien verantwortlich sein, indem mechanische Veränderungen (z.B. Dehnung oder Dilatation des Myokards) die elektrische Aktivität des Herzens modulieren. Das Auslösen von Rhythmusstörungen über diesen Mechanismus ist sowohl für ventrikuläres (Hansen et al., 1991, Franz, 1996, Lab, 1996) als auch atriales Myokard beschrieben (Nazir & Lab, 1996). Auch im humanen Myokard scheint dem mechano-elektrischen Feedback eine Bedeutung zuzukommen, da z.B. eine enge Korrelation zwischen atrialem Druck und gehäuftem Auftreten von Vorhofflattern besteht (Ravelli et al., 1994). Unter pathophysiologischen Bedingungen ist der mechano-elektrische Feedback Mechanismus möglicherweise empfindlicher. Es wurde gezeigt, dass bei experimentell induziertem Herzversagen die Schwelle zur Auslösung von Kammerflimmern vermindert ist (Pye & Cobbe, 1992). Inwieweit diesem Phänomen eine wirkliche Verstärkung des mechano-elektrischen Feedbacks zugrunde liegt oder ob es auf die größere Inhomogenität (Gallagher et al., 1986, Kramer et al., 1993, Qin et al., 1996) der elektrischen Eigenschaften der Kardiomyozyten im hypertrophierten Herzen zurückzuführen ist, bleibt allerdings fraglich.

Wir untersuchten deshalb, ob die Funktion des mechano-elektrischen Feedback Mechanismus in hypertrophierten Herzen nach Myokardinfarkt verstärkt ist, darüber potentiell arrhythmogene elektrophysiologische Veränderungen ausgelöst werden können und ob diese durch dehnungsaktivierte Ionenkanäle vermittelt sind. Zur Beantwortung dieser Fragestellung kam abermals das oben beschriebene Tiermodell mit experimentell induziertem Myokardinfarkt zum Einsatz. In der chronischen Phase nach Myokardinfarkt wurden Aktionspotentiale in multizellulären Präparaten der Infarkttrandzone (Kiseleva et al., 2000), des rechten Vorhofs (Kamkin et al., 2000) und linksventrikulärer Papillarmuskeln (Wagner et al., 2000) gemessen. Die Untersuchung des mechano-elektrischen Feedback Mechanismus erfolgte durch Dehnung der Präparate bei gleichzeitiger fortlaufender Registrierung der Aktionspotentiale an den Präparaten aus der Infarkttrandzone des linken Ventrikels und an den rechten Vorhöfen. Eine Blockade von nichtselektiven dehnungsgesteuerten Ionenkanälen ließ sich durch Applikation von Gadolinium (Gd^{3+}) erreichen (Ward & White, 1994).

In der chronischen Phase nach Myokardinfarkt ließ sich eine Hypertrophie der linken Ventrikel, der linksventrikulären Papillarmuskeln und auch der rechten Atria nachweisen. Die

Ruhemembranpotentiale waren bei rechtsatrialen Kardiomyozyten und Zellen der linksventrikulären Papillarmuskeln nach MI nicht signifikant von der scheinoperierten Kontrollgruppe (SO) verschieden. Das Ruhemembranpotential der ventrikulären Myozyten aus dem Infarkttrandbereich war negativer als in der entsprechenden Kontrollgruppe. Bei den verschiedenen Lokalisationen zeigte sich übereinstimmend eine Zunahme der Repolarisationsdauer in MI gegenüber SO, die auf eine beschriebene Reduktion des Kaliumausstroms (Qin et al., 1996) und eine gesteigerte Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Yoshiyama et al., 1997) nach Myokardinfarkt zurückzuführen ist. Die Frequenz der spontanen Kontraktionen war bei den rechtsatrialen Präparaten in MI im Vergleich zu SO reduziert. Mechanische Dehnung der Präparate hatte in allen Gruppen keinen Einfluss auf das Ruhemembranpotential und die Frequenz der Spontankontraktionen. Bei SO trat bei einer Dehnung der rechten Vorhöfe von 1,75 mN eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer bei 50% Repolarisation (APD50) und eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer bis zu 90% Repolarisation (APD90) durch das Einsetzen von Nachdepolarisationen auf. Weitere Dehnung führte zur Generierung von Extra-Aktionspotentialen, wenn die dehnungsinduzierten Nachdepolarisationen das Schwellenpotential erreichten. Nach Myokardinfarkt konnten die beschriebenen induzierten Nachdepolarisationen bereits bei einer 10-fach niedrigeren Dehnung der atrialen Präparate als in SO beobachtet werden. Extra-Aktionspotentiale wurden ebenfalls bei signifikant niedrigerer externer Dehnung ausgelöst und führten ausschließlich in MI zum Vorhofflimmern. All diese beschriebenen Effekte waren nach Entdehnung der Präparate reversibel, was eine Myokardschädigung durch Überdehnung ausschließen lässt. Die Unterschiede zwischen MI und SO waren qualitativ auch bei den Präparaten aus dem linksventrikulären Infarkttrandbereich nachweisbar. Allerdings war hierbei auffällig, dass ohne zusätzliche externe Dehnung bereits 90% der Präparate in MI kontraktile Spontanaktivität aufwiesen, die in den ventrikulären Präparaten in SO nie zu beobachten war.

Applikation von $40 \mu\text{M Gd}^{3+}$, eine Dosis die üblicherweise zur Unterdrückung von dehnungsinduzierten elektrophysiologischen Veränderungen benutzt wird (Ward & White, 1994, Hu & Sachs, 1997), führte 10 min nach Einbringen in die Perfusionskammer zum vollständigen Verschwinden von dehnungs-induzierten Nachdepolarisationen und Extra-Aktionspotentialen. Damit lässt sich auf eine Beteiligung von dehnungsabhängigen Ionenkanälen an den beobachteten Phänomenen schließen. Allerdings wurde gezeigt, dass Gd^{3+} an isolierten Kardiomyozyten ebenfalls spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle blockieren kann (Lacampagne et al., 1994). Dehnungsinduzierte Arrhythmien waren nur durch Gd^{3+} , nicht aber durch organische Ca^{2+} Kanal-Blocker zu unterdrücken (Hansen et al., 1991). Unsere Untersuchungen, in denen Gd^{3+} die dehnungsinduzierten elektrophysiologischen Veränderungen unterdrückte, machen eine Beteiligung von dehnungsaktivierten Ionenkanälen wahrscheinlich, ein Einfluss anderer Ionenkanäle für diese Phänomene ist nicht auszuschließen. Die Befunde werden durch andere Studien gestützt, in denen die Existenz von nichtselektiven dehnungsaktivierten Ionenkanälen an Kardiomyozyten gezeigt werden konnte (Craelius et al., 1988, Bustamante et al., 1991, Hu &

Sachs, 1994). In einer neueren Arbeit konnte ein vergrößerter Strom durch nichtselektive dehnungsabhängige Ionenkanäle bei verschiedenen Modellen kardialer Hypertrophie im Vergleich zu unbeeinflussten Kontrolltieren nachgewiesen werden (Kamkin et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass der mechano- elektrische Feedback Mechanismus im hypertrophierten Myokard verstärkt ist. Er kann zu dem erhöhten Risiko von Arrhythmien nach Myokardinfarkt beitragen und ist möglicherweise über die Aktivierung dehnungsabhängiger Ionenkanäle vermittelt. Der molekulare Mechanismus, über den eine verstärkte Aktivierung von dehnungsabhängigen Ionenkanälen im hypertrophierten Myokard geschieht, ist z. Zt. vollkommen unklar. Denkbar ist eine erhöhte Leitfähigkeit der Kanäle, eine veränderte Krafttransmission zum Kanalprotein oder aber eine verstärkte Kanalexpression. Dies zu untersuchen ist schwierig, da nichtselektive dehnungsabhängige Ionenkanäle bislang noch nicht molekular charakterisiert sind.

Literaturangaben zu 3.3.

- Aronson, R.S., Ming, Z. Cellular mechanisms of arrhythmias in hypertrophied and failing myocardium. *Circulation* 83(Suppl. VII):**76-83**, 1993.
- Bustamante, J.O., Ruknudin, A., Sachs, F. Stretch-activated ion channels in heart cells: relevance to cardiac hypertrophy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17 (Suppl.2):**S110-S1113**, 1991.
- Craelius, W., Chen, V., El-Sherif, N. Stretch activated ion channels in ventricular myocytes. *Biosci. Rep.* 8:**407-414**, 1988.
- Franz, M.R. Mechano-electrical feedback in ventricular myocardium. *Cardiovasc. Res.* 32:**15-24**, 1996.
- Gallagher, K.P., Gerren, R.A., Stirling, M.C., Choy, M., Dysko, R.C., McManimon, S.P., Dunham, W.R. The distribution of functional impairment across the lateral border of acutely ischemic myocardium. *Circ. Res.* 58:**570-83**, 1986.
- Hansen, D. E., Borganelli, M., Stacy, G.P. Jr., Taylor, L.K. Dose-dependent inhibition of stretch-induced arrhythmias by gadolinium in isolated canine ventricles. *Circ. Res.* 69:**820-831**, 1991.
- Hart, G. Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* 28:**933-946**, 1994.
- Hu, H., Sachs, F. Effects of mechanical stimulation on embryonic chick heart cells. *Biophys. J.* 66:**A170**, 1994.

- Hu, H., Sachs, F. Stretch-activated ion channels in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29:**1511-1523**, 1997.
- Kamkin, A., Kiseleva, I., Isenberg, G. Stretch-activated currents in ventricular myocytes: amplitude and arrhythmogenic effects increase with hypertrophy. *Cardiovasc Res* 48:**409-20**, 2000.
- Kamkin, A., Kiseleva, I., Wagner, K.D., Leiterer, K.P., Theres, H., Scholz, H., Gunther, J., Lab, M.J. Mechano-electric feedback in right atrium after left ventricular infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 32:**465-77**, 2000.
- Kiseleva, I., Kamkin, A., Wagner, K.D., Theres, H., Ladhoff, A., Scholz, H., Gunther, J., Lab, M.J. Mechanoelectric feedback after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc. Res.* 45:**370-8**, 2000.
- Kramer, C.M., Lima, J.A., Reichek, N., Ferrari, V.A., Llaneras, M.R., Palmon, L.C., Yeh, I.T., Tallant, B., Axel, L. Regional differences in function within noninfarcted myocardium during left ventricular remodeling. *Circulation* 88:**1279-88**, 1993.
- Lab, M.J. Is there mechano-electric transduction in cardiac muscle? The monophasic action potential of the frog ventricle during isometric and isotonic contraction with calcium deficient perfusions. *S. Afr. J. Med. Sci.* 33:**60**, 1968.
- Lab, M.J. Mechanoelectric feedback (transduction) in heart: concepts and implications. *Cardiovasc. Res.* 32:**3-14**, 1996.
- Lacampagne, A., Gannier, F., Argibay, J., Garnier, D., Le Guennec, J.C. The stretch-activated channel blocker gadolinium also blocks L-type calcium channels in isolated ventricular myocytes of the guinea-pig. *Biochim. Biophys. Acta* 1191:**205-208**, 1994.
- Nazir, S.A., Lab, M.J. Mechanoelectric feedback and atrial arrhythmias. *Cardiovasc. Res.* 32:**52-61**, 1996.
- Nazir, S.A., Lab, M.J. Mechanoelectric feedback in the atrium of the isolated guinea-pig heart. *Cardiovasc Res.* 32:**112-119**, 1996.
- Pye, M.P., Cobbe, S.M. Mechanisms of ventricular arrhythmias in cardiac failure and hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 26:**740-750**, 1992.
- Qin, D., Zhang, Z.H., Caref, E.B., Boutjdir, M., Jain, P., el-Sherif, N. Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ. Res.* 79:**461-73**, 1996.
- Ravelli, F., Disertori, M., Cozzi, F., Antolini, R., Allessie, M.A. Ventricular beats induce variations in cycle length of rapid (type II) atrial flutter in humans. Evidence of leading circle reentry. *Circulation* 89:**2107-2116**, 1994.
- Wagner, K., Kamkin, A., Kiseleva, I., Theres, H., Scholz, H., Gunther, J. Effects of metoprolol and

ramipril on action potentials after myocardial infarction in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 388:**263-6**, 2000.

Ward, H., White, E. Reduction in the contraction and intracellular calcium transient of single rat ventricular myocytes by gadolinium and the attenuation of these effects by extracellular NaH₂PO₄. *Exp. Physiol.* 79:**107-10**, 1994.

Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Hanatani, A., Kim, S., Omura, T., Toda, I., Teragaki, M., Akioka, K., Iwao, H., Yoshikawa, J. Differences in expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and Na⁺-Ca²⁺ exchanger genes between adjacent and remote noninfarcted myocardium after myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29:**255-64**, 1997.

Anlagen zu 3.3.

Kamkin, A., Kiseleva, I., Wagner, K.D., Leiterer, K.P., Theres, H., Scholz, H., Günther, J., Lab, M.J. Mechano-electric feedback in right atrium after left ventricular infarction in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32:**465-477**, 2000.

Kiseleva, I., Kamkin, A., Wagner, K.D., Theres, H., Ladhoff, A., Scholz, H., Günther, J., Lab, M.J. Mechanoelectric feedback after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc. Res.* 45:**370-378**, 2000.

Wagner, K.D., Kamkin, A., Kiseleva, I., Theres, H., Scholz, H., Günther, J. Effects of metoprolol and ramipril on action potentials after myocardial infarction in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 388:**263-266**, 2000.

3.4 Elektrophysiologische Charakteristika kardialer Fibroblasten

Neben den Kardiomyozyten sind in letzter Zeit auch kardiale Fibroblasten als ein mögliches zelluläres Substrat für einen gesteigerten mechano-elektrischen Feedback Mechanismus im hypertrophierten Herz in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Fibroblasten sind die zahlreichsten nichtmyozytären Zellen im Herzen. Im Sinusknotenbereich machen sie ca. 70% des Gesamtzellvolumens aus (Shiraishi et al., 1992). Im sogenannten „Remodeling“ bei der Entwicklung kardialer Hypertrophie kommt es zur Proliferation und zur Veränderung des Phänotyps der Fibroblasten (Whittaker, 1995). Während die vielfältige Bedeutung der Fibroblasten für biochemische und strukturelle Adaptation während der Herzentwicklung und im Remodeling gut untersucht ist (Dostal & Baker, 1999, Meszaros et al., 2000), war ihre elektrophysiologische Funktion bis vor einiger Zeit weitgehend unbekannt. Im Gegensatz zu Fibroblasten in anderen Organen (z.B. der Niere, De Roos et al., 1997) sind kardiale Fibroblasten elektrisch nicht erregbar (Kiseleva et al., 1987, Kohl et al., 1994, Kamkin et al., 1999). Sie haben im Vergleich zu Kardiomyozyten ein deutlich positiveres Ruhemembranpotential (E_0) von -22 ± 2 mV bei der Ratte (Kamkin et al., 2002) und -16 ± 2 mV im humanen Gewebe (Kamkin et al., 1999). Der Membranwiderstand ist mit 510 ± 10 M Ω bei der Ratte und 4.4 ± 0.1 G Ω bei humanen kardialen Fibroblasten signifikant höher als der von Kardiomyozyten. Mechanische Kompression der Fibroblasten während der Myokardkontraktion führt zu einer typischen phasischen Abnahme von E_0 . Diese mechanisch-induzierten Potentiale (MIP's) unterscheiden sich in ihrer Form deutlich vom Aktionspotential der Kardiomyozyten (Kiseleva et al., 1998). MIP's weisen im Gegensatz zu Aktionspotentialen keine schnelle Depolarisation und keinen overshoot auf. Sie beginnen verzögert nach dem Aktionspotential, folgen streng dem Kontraktionsverlauf und sind nur in kontrahierendem Myokard nachweisbar (Kiseleva et al., 1998). Applikation von Gd^{3+} zur Hemmung nichtselektiver dehnungsabhängiger Ionenkanäle reduziert die MIP Amplitude, was darauf hinweist, dass MIP's über Aktivierung von mechanosensitiven Kanälen bei Kompression der Fibroblasten während der Myokardkontraktion generiert werden (Kamkin et al., 2002). Dies konnte kürzlich an isolierten kardialen Fibroblasten bestätigt werden (Kamkin et al., 2003).

Die Frage, über welche zellulären Mechanismen Kompression der Fibroblasten zur Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle führt, war allerdings offen. Eine Möglichkeit ist die Übertragung der mechanischen Energie über Änderungen der Spannung der Lipid-Doppelschicht- Zellmembran (Sachs & Morris, 1998, Zhang et al., 2000). Alternativ ist es möglich, dass die Aktivierung dieser Ionenkanäle durch das Zytoskelett vermittelt wird. Um dies zu untersuchen, injizierten wir an spontan kontrahierenden rechtsatrialen Präparaten intrazellulär in Fibroblasten Cytochalasin D, was F-Aktin depolymerisiert bzw. Colchizin, das Tubulin degradiert. In beiden Fällen kam es zu einer Abnahme der Amplituden der mechanisch induzierten Potentiale, die allerdings auch bei Kombination beider Substanzen nicht vollständig unterdrückt wurden (Kamkin et al., 2001). Das kann darauf beruhen, dass entweder die Depolymerisation des Zytoskeletts durch die Pharmaka nicht vollständig war oder aber dass andere Zytoskelett- unabhängige Mechanismen eine Rolle für die Entstehung der MIP's spielen. Die verringerte MIP Amplitude durch Cytochalasin D ließ sich

durch intrazelluläre Applikation von Mg-ATP aufheben. Von ATP ist bekannt, dass es die Polymerisation von F-Aktin begünstigt (Chhabra et al., 2000). Daraus lässt sich ebenfalls eine wichtige Rolle des Zytoskeletts für die Entstehung der mechanisch induzierten Potentiale schlussfolgern. Ähnliche Befunde zur Bedeutung des Zytoskeletts für die Transduktion mechanischer Energie zum Kanalprotein sind für andere dehnungsaktivierte Ionenkanäle und spannungsgesteuerte Kanäle beschrieben (Galli & DeFelice, 1994, Johnson & Byerly, 1993, Maltsev & Undrovinas, 1997).

Weiterhin untersuchten wir, ob die elektrophysiologischen Eigenschaften kardialer Fibroblasten im hypertrophierten Herzen nach Infarkt verändert sind und sie damit möglicherweise über einen verstärkten mechano- elektrischen Feedback Mechanismus zum gehäuftem Vorkommen von Arrhythmien beitragen können. Eine wichtige Komplikation bei Patienten mit Myokardinfarkt ist das Auftreten von Bradyarrhythmien (Brady & Harrigan, 2001). An dieser pathologischen Verminderung der Herzfrequenz im hypertrophierten Myokard nach Infarkt können einerseits strukturelle und funktionelle Schäden der Schrittmacherzellen und des Erregungsleitungssystems (Aronson & Ming, 1993) und andererseits veränderte elektrophysiologische Eigenschaften der kardialen Fibroblasten beteiligt sein.

An rechtsatrialen Präparaten konnten wir zeigen, dass das Ruhemembranpotential der Fibroblasten in Abhängigkeit von der linksventrikulären Infarktgröße hyperpolarisierte (Kiseleva et al., 1998). Artificielle Dehnung der Präparate führte in allen Versuchsgruppen zu einer Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials der Fibroblasten, die allerdings nach Myokardinfarkt signifikant verstärkt war (Kamkin et al., 2002). Der dehnungsinduzierte Abfall der Ruhemembranpotentiale korrelierte positiv mit der Infarktgröße. Ein Zusammenhang mit der Hypertrophieentwicklung konnte ausgeschlossen werden, da die Hypertrophie im Zeitverlauf nach Myokardinfarkt zunahm, die dehnungsinduzierte Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials aber ein Maximum 8 Tage nach Infarkt hatte und sich darauffolgend normalisierte. Die Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials der Fibroblasten korrelierte gut mit einer verminderten Herzfrequenz der untersuchten Tiere *in vivo* und einer reduzierten Frequenz der spontanen kontraktiven Aktivität der rechtsatrialen Präparate *in vitro* (Kamkin et al., 2002). Trotz dieser engen Korrelation lässt sich aus den durchgeführten Untersuchungen nicht ableiten, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen der Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials der Fibroblasten und der Bradykardie besteht. Weiterhin ist bisher unklar, in welcher Weise Veränderungen des Membranpotentials der Fibroblasten die Spontanaktivität des Herzens beeinflussen. Falls es nach Myokardinfarkt zu einer effektiveren interzellulären Kopplung zwischen Schrittmacherzellen und Fibroblasten im rechten Vorhof kommt, sollte man eine Abnahme des Membranwiderstands der Fibroblasten erwarten. Diese konnte allerdings in unseren Experimenten nicht beobachtet werden (Kamkin et al., 2002). Frühere morphologische Studien mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (De Maziere et al., 1992) konnten keinen Nachweis für die Existenz von gap junctions, die für eine effektive interzelluläre Kopplung zwischen Fibroblasten und Kardiomyozyten notwendig sind (Kohl & Noble, 1996), im Vorhof des Kaninchens darstellen,

während eine Kopplung in Zellkulturen von Rattenvorhöfen nachweisbar war (Rook et al., 1992). Kürzlich ließen sich allerdings mit einer Kombination von Immunhistochemie und konfokaler Mikroskopie die gap junction Proteine Connexin (Cx) 40, Cx43 und Cx45 zwischen Fibroblasten und Kardiomyozyten des Kaninchenvorhofs sichtbar machen (Camelliti et al., 2002). Damit ist es wahrscheinlich, dass Fibroblasten und Kardiomyozyten im Sinusknotenbereich tatsächlich über gap junctions elektrisch gekoppelt sind. Die Konstanz des Membranwiderstands der Fibroblasten in unseren Experimenten kann folglich als Hinweis dafür gewertet werden, dass sich nicht die Art bzw. das Ausmaß der Kopplung zwischen beiden Zelltypen ändert, sondern dass die Bradykardie möglicherweise eine direkte Folge der veränderten elektrophysiologischen Eigenschaften individueller Fibroblasten ist.

Literaturangaben zu 3.4.

- Brady, W.J. Jr., Harrigan, R.A. Diagnosis and management of bradycardia and atrioventricular block associated with acute coronary ischemia. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 19:**371-84**, 2001.
- Camelliti, P., Kohl, P., Green, C. Myocyte/non-myocyte interactions in the heart: clues to an alternative mechanosensor for cardiac MEF. *Proc. Physiol. Soc. University of Leeds*, 10th to 12th September, **21P**, 2002.
- Chhabra, D., Nosworthy, N.J., dos Remedios, C.G. The role of ATP, ADP and divalent cations in the formation of binary and ternary complexes of actin, cofilin and DNase I. *Electrophoresis* 21:**3863-9**, 2000.
- De Maziere, A.M., van Ginneken, A.C., Wilders, R., Jongasma, H.J., Bouman, L.N. Spatial and functional relationship between myocytes and fibroblasts in the rabbit sinoatrial node. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24:**567-78**, 1992.
- De Roos, A., Willems, P.H., van Zoelen, E.J., Theuvsen, A.P. Synchronized Ca²⁺ signaling by intercellular propagation of Ca²⁺ action potentials in NRK fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 273:**C1900-7**, 1997.
- Dostal, D.E., Baker, K.M. The cardiac rennin-angiotensin system – Conceptual or a regulator of cardiac function? *Circ. Res.* 85:**643-650**, 1999.
- Galli, A., DeFelice, L.J. Inactivation of L-type Ca channels in embryonic chick ventricle cells: dependence on the cytoskeletal agents colchicine and taxol. *Biophys. J.* 67:**2296-304**, 1994.
- Johnson, B.D., Byerly, L. A cytoskeletal mechanism for Ca²⁺ channel metabolic dependence and

- inactivation by intracellular Ca^{2+} . *Neuron*. 10:**797-804**, 1993.
- Kamkin, A., Kiseleva, I., Isenberg, G. Activation and inactivation of a non-selective cation conductance by local mechanical deformation of acutely isolated cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 57:**793-803**, 2003.
- Kamkin, A., Kiseleva, I., Wagner, K.D., Lammerich, A., Bohm, J., Persson, P.B., Gunther, J. Mechanically induced potentials in fibroblasts from human right atrium. *Exp Physiol* 84:**347-56**, 1999.
- Kamkin, A., Kiseleva, I., Wagner, K.D., Pylaev, A., Leiterer, K.P., Theres, H., Scholz, H., Gunther, J., Isenberg, G. A possible role for atrial fibroblasts in postinfarction bradycardia. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 282:**H842-9**, 2002.
- Kamkin, A., Kiseleva, I., Wagner, K.D., Scholz, H., Theres, H., Kazanski, V., Lozinsky, I., Gunther, J., Isenberg, G. Mechanically induced potentials in rat atrial fibroblasts depend on actin and tubulin polymerisation. *Pflugers Arch* 442:**487-97**, 2001.
- Kiseleva, I.S., Kamkin, A.G., Kirkheis, R., Kositskii, G.I. Intercellular electrotonic interactions in the cardiac sinus node in the frog. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 292:**1502-5**, 1987.
- Kiseleva, I., Kamkin, A., Pylaev, A., Kondratjev, D., Leiterer, K.P., Theres, H., Wagner, K.D., Persson, P.B., Gunther, J. Electrophysiological properties of mechanosensitive atrial fibroblasts from chronic infarcted rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:**1083-93**, 1998.
- Kohl, P., Kamkin, A.G., Kiseleva, I.S., Noble, D. Mechanosensitive fibroblasts in the sino-atrial node region of rat heart: interaction with cardiomyocytes and possible role. *Exp Physiol* 79:**943-56**, 1994.
- Kohl P, Noble D. Mechanosensitive connective tissue: potential influence on heart rhythm. *Cardiovasc. Res.* 32:**62-8**, 1996.
- Maltsev, V.A., Undrovinas, A.I. Cytoskeleton modulates coupling between availability and activation of cardiac sodium channel. *Am J Physiol.* 273:**H1832-40**, 1997.
- Meszaros, J.G., Gonzalez, A.M., Endo-Mochizuki, Y., Villegas, S., Villarreal, F., Brunton, L.L. Identification of G protein-coupled signaling pathways in cardiac fibroblasts: cross talk between G(q) and G(s). *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 278:**C154-62**, 2000.
- Rook, M.B., van Ginneken, A.C., de Jonge, B., el Aoumari, A., Gros, D., Jongsma, H.J. Differences in gap junction channels between cardiac myocytes, fibroblasts, and heterologous pairs. *Am. J. Physiol.* 263:**C959-77**, 1992.
- Sachs, F., Morris, C.E. Mechanosensitive ion channels in nonspecialized cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 132:**1-77**, 1998.
- Shiraishi, I., Takamatsu, T., Minamikawa, T., Onouchi, Z., Fujita, S. Quantitative histological

analysis of the human sinoatrial node during growth and aging. *Circulation* 85:**2176-84**, 1992.

Whittaker, P. Unravelling the mysteries of collagen and cicatrix after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 29:**758-762**, 1995.

Zhang, Y., Gao, F., Popov, V.L., Wen, J.W., Hamill O.P. Mechanically gated channel activity in cytoskeleton-deficient plasma membrane blebs and vesicles from *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 523 Pt 1:**117-30**, 2000.

Anlagen zu 3.4.

Kamkin, A., Kiseleva, I., Wagner, K.D., Pylaev, A., Leiterer, K.P., Theres, H., Scholz, H., Günther, J., Isenberg, G. A possible role for atrial fibroblasts in postinfarction bradycardia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282:**H842-H849**, 2002.

Kamkin, A., Kiseleva, I., Wagner, K.D., Scholz, H., Theres, H., Kazanski, V., Lozinsky, I., Günther, J., Isenberg, G. Mechanically induced potentials in rat atrial fibroblasts depend on actin and tubulin polymerisation. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 442:**487-497**, 2001.

Kiseleva, I., Kamkin, A., Pylaev, A., Kondratjev, D., Leiterer, K.P., Theres, H., Wagner, K.D., Persson, P.B., Günther, J. Electrophysiological properties of mechanosensitive atrial fibroblasts from chronic infarcted rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:**1083-1093**, 1998.

3.5 Untersuchungen zur Funktion des Wilms' Tumor Suppressor Genprodukts

Eine wesentliche Herausforderung ist die Identifizierung von Genen, die eine Rolle für die Entwicklung kardialer Hypertrophie spielen. Dabei liegt natürlich ein besonderes Augenmerk auf solchen Genen, von denen eine Bedeutung für das normale Herzwachstum während der Entwicklung bereits bekannt ist. Eines dieser Gene ist das Wilms' Tumor Suppressor Gen WT1.

WT1 kodiert einen Transkriptionsfaktor vom Zinkfingertyp (Bonetta et al., 1990, Call et al., 1990, Gessler et al., 1990), der eine GC- und TC-reiche DNA-Konsensussequenz bindet (Rauscher et al., 1990, Wang et al., 1993). Durch alternatives Spleißen von Exon 5 (+/- 17 Aminosäuren) und eine Spleißinsertion in Exon 9 (+/- KTS) werden mindestens 4 WT1 Isoformen gebildet (Haber et al., 1991). Die WT1 Spleißvarianten kodieren Proteine von unterschiedlicher DNA Bindungsspezifität und -affinität (Drummond et al., 1994). Weitere WT1 Transkripte resultieren aus einer Edition der primären WT1 mRNA (Sharma et al., 1994).

WT1 spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des Herzens, des Urogenitalsystems, der Keimdrüsen, mesothelialer Gewebe (Armstrong et al., 1993) und der Netzhaut (Wagner et al., 2002a). Homozygote Deletion von WT1 verursachte bei der Maus eine schwere Herzhypoplasie, Mesotheldefekte, sowie eine komplette Agenesie von Nieren und Gonaden (Kreidberg et al., 1993) und eine Entwicklungsstörung der Retina (Wagner et al., 2002a). Aufgrund des charakteristischen Expressionsmusters und wegen des Phänotyps der WT1 "Knockout" Mäuse wird dem WT1 Genprodukt eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung von Mesenchym in epitheliales Gewebe zugeschrieben (Armstrong et al., 1993, Kreidberg et al., 1993, Pritchard-Jones et al., 1990, Moore et al., 1999). Der kardiale Phänotyp lässt sich ebenfalls in diesem Zusammenhang erklären. WT1 wird während der frühen Embryonalentwicklung im Epikard exprimiert (Moore et al., 1999). Die epikardialen Zellen sind in der Lage, zwischen mesenchymalen und epithelialen Eigenschaften zu wechseln (Moore et al., 1999). Sie lösen sich im Laufe der Embryonalentwicklung teilweise aus dem Epithelverband, wandern ins Myokard ein, und sind dort an der Ausbildung der Koronargefäße beteiligt (Moore et al., 1998, Moore et al., 1999). Unter physiologischen Bedingungen ist WT1 im adulten Herzen nur im Epikard nachweisbar.

Wichtige Informationen über die WT1 Funktion lassen sich aus der Identifizierung von Genen gewinnen, die durch WT1 reguliert werden. Mit Hilfe von Reportergerneassays wurde nachgewiesen, dass WT1 u.a. die Promotoren von insulinähnlichem Wachstumsfaktor II (IGF-II) (Drummond et al., 1992), plättchenabgeleitetem Wachstumsfaktor Kette A (PDGF-A) (Gashler et al., 1992) und epidermalem Wachstumsfaktor Rezeptor (EGF-R) (Englert et al., 1995) inhibiert. Aufgrund dieser Befunde wurde spekuliert, dass WT1 das Zellwachstum und die Zellproliferation hemmt und dadurch epitheliale Differenzierung mesenchymaler Gewebe ermöglicht. Neuere Untersuchungen deuten auf einen komplexen Wirkungsmechanismus von WT1 Protein hin. Beispielsweise wurde eine Assoziation von WT1 +KTS Isoformen mit nukleären Spleißfaktoren nachgewiesen (Larsson et al., 1995). Möglicherweise beeinflusst WT1 deshalb neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor auch posttranskriptionelle Mechanismen der Genregulation. Weiterhin wurde

kürzlich gezeigt, daß WT1 nicht nur als Genrepressor, sondern auch als Transkriptionsaktivator wirken kann. Beispielsweise induzierte WT1 in Kotransfektionsexperimenten die Promotoren von Forkhead-Gen FREAC-4 (Ernstsson et al., 1996) und Syndecan-1 (Cook et al., 1996). Weiterhin stimuliert WT1 die Expression des Vitamin D Rezeptors (Wagner et al., 2001, Maurer et al., 2001) und vermittelt während der Embryonalentwicklung Vitamin-D-abhängige Apoptose, was zur normalen Nierenentwicklung beiträgt (Wagner et al., 2001). Eine Aktivierung des Pou4f2 Gens durch WT1 (Wagner et al., 2003a) ist für die normale Ausbildung der Retina wesentlich (Wagner et al., 2002a). Auch bei Retinoblastomzellen, die sich von pluripotenten retinalen Vorläuferzellen ableiten, spielt WT1 eine wichtige Rolle für neuronale Differenzierung (Wagner et al., 2000, Wagner et al., 2002b).

Diese Befunde sprechen dafür, dass WT1 für die Entwicklung und Differenzierung verschiedener Gewebe notwendig ist. Am Herzen war bisher nur die Bedeutung von WT1 für die normale Embryonalentwicklung beschrieben.

Da die Entwicklung kardialer Hypertrophie häufig mit der Reaktivierung eines fetalen Genexpressionsmusters verbunden ist, untersuchten wir die WT1 Expression in normalem und hypertrophiertem Myokard.

Die WT1 mRNA Expression bestimmten wir mittels RNase Protektion Assay in unbeeinflusstem Myokard, in rechts- und linksventrikulärem Gewebe nach Scheinoperation (SO) und Myokardinfarkt (MI), in Herzgewebe von spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Renin-Angiotensinogen transgenen Tieren (TGR). Die WT1 Expression war innerhalb von 24 Stunden nach Myokardinfarkt im linksventrikulären Gewebe ca. 3-fach gegenüber SO vermehrt und blieb bis zu 9 Wochen nach Infarkt erhöht (Wagner et al., 2002c). In rechtsventrikulärem Gewebe sowie im Myokard von SHR und TGR konnten wir keine veränderte WT1 Expression gegenüber Kontrolltieren nachweisen. Dies sprach gegen die initiale Hypothese, dass eine Re-Expression bei Hypertrophieentwicklung auftritt. Eine Bedeutung des Renin-Angiotensin Systems für die verstärkte WT1 Expression nach MI konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da bei TGR kein Unterschied feststellbar war.

Die Lokalisation der verstärkten WT1 Expression nach MI wurde mittels Immunhistochemie und *in-situ* Hybridisierung untersucht. WT1 mRNA und Protein waren im Epikard von SO und MI sowie im linken Ventrikel, verstärkt in der Infarkttrandzone bei MI nachweisbar. Mittels Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen konnten wir zeigen, dass es sich bei den WT1 exprimierenden Zellen um Endothel- und glatte Muskelzellen der Koronargefäße handelt. Die Lokalisation der WT1 Expression überlappt stark mit der von Proliferations- und Vaskulogenesemarkern wie z.B. dem nukleären Antigen proliferierender Zellen (PCNA), Plättchen- und Endothelzell- Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1) und dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF). Der entscheidende Stimulus für die WT1 Expression nach Infarkt scheint der O₂-Mangel im Gewebe zu sein, da sich 3- bis 4-fach erhöhte WT1 mRNA auch an Herzen von Ratten nach systemischer normobarer Hypoxie (8% O₂) bzw. CO Exposition (0,1%) nachweisen ließ. Im Gegensatz zu den Infarkttieren war nach Hypoxie- bzw. CO-Exposition WT1 in den Gefäßen beider Ventrikel nachweisbar, was

ebenfalls für die Bedeutung eines lokalen O₂-Mangels für die Induktion von WT1 spricht. Weitergehende Untersuchungen weisen darauf hin, dass die verstärkte WT1 Expression bei O₂-Mangel durch den hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor 1 α vermittelt wird (Wagner et al., 2003b).

Normobare Hypoxie führte neben dem Herzen auch in der Niere zu einem Anstieg der WT1 mRNA, was wir mittels RNase-Protektions-Assay nachweisen konnten. In anderen Organen mit bekannter WT1 Expression (z.B. Milz und Gehirn) traten keine Unterschiede auf. Wie am Herzen war mittels Immunhistochemie ebenfalls in der Niere eine ektopische WT1 Expression (in proximalen Tubuli) nachweisbar. In den Tubuli konnte bei hypoxischen Nieren auch eine verstärkte Expression des hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor 1 α (HIF-1 α) und des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 gezeigt werden. Über diesen Signalweg kommt es an der Niere zur Verminderung des programmierten Zelltodes, was wir anhand einer geringeren Anzahl TUNEL-positiver Zellen und reduzierter Caspase-3/7-Aktivität demonstrieren konnten. Um zu prüfen, ob die Stimulation der WT1 Expression durch direkte transkriptionelle Aktivierung über HIF-1 α erfolgt, führten wir transiente Ko-Transfektionsexperimente durch. Ko-Transfektion von HIF-1 α Expressionsplasmid bewirkte eine ca. 20-fache Zunahme der WT1-Promoter-Aktivität. Weiterhin konnten wir im WT1 Promoter ein hypoxie-responsibles Element identifizieren. Gezielte Mutation dieses Elementes führte zu einem vollständigen Verlust der WT1-Induzierbarkeit durch HIF-1 α . Mittels Gelelektrophorese-Mobilitäts-Shift-Assay ließ sich die direkte physikalische Bindung von HIF-1 α Protein an die Sequenz dieses identifizierten Elementes nachweisen. Die Ergebnisse beweisen, dass WT1 in Herz und Niere durch HIF-1 α stimuliert wird. Funktionell ergeben sich in den verschiedenen Organen unterschiedliche Konsequenzen; verstärkte WT1 Expression in der Niere geht mit verminderter Apoptose einher; am Herzen korreliert die WT1 Expression unter Hypoxie und nach Myokardinfarkt mit der von Vaskulogenesemarkern.

Die Befunde lassen vermuten, dass WT1 eine wichtige Rolle für die Ausbildung der Koronargefäße und die Neovaskulogenese unter pathophysiologischen Bedingungen spielt. Die molekularen Mechanismen, über die WT1 möglicherweise bei der Vaskulogenese im Herzen wirkt, sind zur Zeit allerdings noch unklar.

Literaturangaben zu 3.5.

Armstrong, J.F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W.A., Hastie, N.D., Bard, J.B. The expression of the Wilms' tumor gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech. Dev.* 40: **85-97**, 1993.

Bonetta, L., Kuehn, S.E., Huang, A., Law, D.J., Kalikin, L.M., Koi, M., Reeve, A.E., Brownstein,

- B.H., Yeger, H., Williams, B.R.G., Feinberg, A.P. Wilms'tumor locus on 11p13 defined by multiple CpG island-associated transcripts. *Science* 250: **994-997**, 1990.
- Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose, E.A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W.H., Jones, C., Housman, D.E. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms'tumor locus. *Cell* 60: **509-520**, 1990.
- Cook, D.M., Hinkes, M.T., Bernfield, M., Rauscher, F.J. Transcriptional activation of the syndecan-1 promoter by the Wilms'tumor protein WT1. *Oncogene* 13: **1789-1799**, 1996.
- Drummond, I.A., Madden, S.L., Rohwer-Nutter, P., Bell, G.I., Sukhatme, V.P., Rauscher, F.J. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms'tumor suppressor WT1. *Science* 257: **674-678**, 1992.
- Drummond, I.A., Rupprecht, H.D., Rohwer-Nutter, P., Lopez-Guisa, J.M., Madden, S.L., Rauscher, F.J., Sukhatme, V.P. DNA recognition by splicing variants of the Wilms'tumor suppressor, WT1. *Mol. Cell. Biol.* 14: **3800-3809**, 1994.
- Englert, C., Hou, X., Maheswaran, S., Bennett, P., Ngwu, C., Re, G.G., Garvin, A.J., Rosner, M.R., Haber, D.A. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J.* 14: **4662-4675**, 1995.
- Ernstsson, S., Pierrou, S., Hulander, M., Cederberg, A., Hellqvist, M., Carlsson, P., Enerbäck, S. Characterization of the human forkhead gene FREAC-4. *J. Biol. Chem.* 271: **21094-21099**, 1996.
- Gashler, A.L., Bonthron, D.T., Madden, S.L., Rauscher, F.J., Collins, T., Sukhatme, V.P. Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms'tumor suppressor WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: **10984-10988**, 1992.
- Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R.L., Orkin, S.H., Bruns, G.A. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343: **774-778**, 1990.
- Haber, D.A., Sohn, R.L., Buckler, A.J., Pelletier, J., Call, K.M., Housman, D.E. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms'tumor gene WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: **9618-9622**, 1991.
- Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., Jaenisch, R. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74: **679-691**, 1993.
- Larsson, S.H., Charlieu, J.-P., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., Cuzin, F., van Heyningen, V., Hastie, N.D. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81: **391-401**, 1995.

- Maurer, U., Jehan, F., Englert, C., Hubinger, G., Weidmann, E., DeLuca, H.F., Bergmann, L. The Wilms' tumor gene product (WT1) modulates the response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 by induction of the vitamin D receptor (VDR). *J. Biol. Chem.* 276: **3727-3732**, 2001.
- Moore, A., Mc Innes, L., Kreidberg, J., Hastie, N.D., Schedl, A. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 126: **1845-1857**, 1999.
- Moore, A., Schedl, A., McInnes, L., Doyle, M., Hecksher-Sorensen, J., and Hastie, N.D. YAC analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mech. Dev.* 79: **169-184**, 1998.
- Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Porteous, D., Gosden, C., Bard, J., Buckler, A., Pelletier, J., Housman, D., van Heyningen, V., Hastie, N. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346: **194-197**, 1990.
- Rauscher, F.J., III, Morris, J.F., Tournay, O.E., Cook, D.M., Curran, T. Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* 250: **1259-1262**, 1990.
- Sharma, P.M., Bowman, M., Madden, S.L., Rauscher III, F.J., Sukumar, S. RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes & Dev.* 8: **720-731**, 1994.
- Wagner, K.D., Wagner, N., Bondke, A., Nafz, B., Flemming, B., Theres, H., Scholz, H. The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J* 16:**1117-1119**, 2002c.
- Wagner, K.D., Wagner, N., Schley, G., Theres, H., Scholz, H. The Wilms' tumor suppressor Wt1 encodes a transcriptional activator of the class IV POU-domain factor Pou4f2 (Brn-3b) *Gene* 305:**217-213**, 2003a.
- Wagner, K.D., Wagner, N., Sukhatme, V.P., Scholz, H. Activation of the vitamin D receptor by the Wilms' tumor gene product mediates apoptosis of renal cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: **1188-1196**, 2001.
- Wagner, K.D., Wagner, N., Wellmann, S., Schley, G., Bondke, A., Theres, H., Scholz, H. Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *FASEB J*, 2003b, in press.
- Wagner, K.D., Wagner, N., Vidal, V.P.I., Schley, G., Wilhelm, D., Schedl, A., Englert, C., Scholz, H. The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina. *EMBO J.* 21: **1398-1405**, 2002a.
- Wagner, N., Wagner, K.D., Schley, G., Coupland, S., Heimann, H., Grantyn, R., Scholz, H. The Wilms' tumor suppressor Wt1 is associated with the differentiation of retinoblastoma cells. *Cell Growth Diff.* 13:**297-305**, 2002b.

- Wagner, N., Wagner, K.D., Sefton, M., Rodriguez-Tebar, A., Grantyn, R. An abnormal response of retinoblastoma cells (Y-79) to neurotrophins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:**1932-9**, 2000.
- Wang, Z.Y., Qiu, Q.Q., Enger, K.T., Deuel, T.F. A second transcriptionally active DNA-binding site for the Wilms' tumor gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: **8896-8900**, 1993.

Anlagen zu 3.5.

- Wagner, K.D., Wagner, N., Sukhatme, V.P., Scholz, H. Activation of the vitamin D receptor by the Wilms' tumor gene product mediates apoptosis of renal cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: **1188-1196**, 2001.
- Wagner, K.D., Wagner, N., Vidal, V.P.I., Schley, G., Wilhelm, D., Schedl, A., Englert, C., Scholz, H. The Wilms' tumor gene *Wt1* is required for normal development of the retina. *EMBO J.* 21: **1398-1405**, 2002.
- Wagner, N., Wagner, K.D., Schley, G., Coupland, S., Heimann, H., Grantyn, R., Scholz, H. The Wilms' tumor suppressor *Wt1* is associated with the differentiation of retinoblastoma cells. *Cell Growth Diff.* 13:**297-305**, 2002.
- Wagner, K.D., Wagner, N., Bondke, A., Nafz, B., Flemming, B., Theres, H., Scholz, H. The Wilms' tumor suppressor *Wt1* is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J* 16:**1117-1119**, 2002.
- Wagner, K.D., Wagner, N., Wellmann, S., Schley, G., Bondke, A., Theres, H., Scholz, H. Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor *Wt1* involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *FASEB J*, 2003, in press.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. H. Scholz und Herrn Dr. J. Günther für die umfassende Unterstützung der experimentellen Arbeit über viele Jahre und für die Beharrlichkeit und Gründlichkeit in der gemeinsamen Arbeit sowie für wertvolle Anregungen und kritische Hinweise.

Herrn Prof. A. Kamkin und Frau Prof. I. Kiseleva (Institut für Physiologie, Russische Medizinische Universität, Moskau) gilt mein Dank für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der kardialen Elektrophysiologie.

Herrn Prof. H.M. Stauß (Iowa State University) danke ich für die Überlassung der Infarkttratten und scheinoperierten Tiere, Herrn Prof. I. Schimke (Medizinische Klinik I, Charité) für die Kreatinkinase-, SOD-, GSH-Px-, MDA- und HSP Bestimmungen, Herrn Dr. R. Vetter (Institut für Toxikologie, FU Berlin) für die Messungen der oxalatstimulierten Ca^{2+} -Aufnahme in das SR und Herrn Dr. A. Lammerich für die Bereitstellung der von ihm entwickelten Messwerterfassungs- und Analysesoftware.

Mein Dank gilt weiterhin PD Dr. H. Theres (Medizinische Klinik I, Charité) für die Zusammenarbeit bei den Untersuchungen zur chronischen pharmakologischen Behandlung nach Myokardinfarkt und seine Unterstützung der experimentellen Arbeit während meiner AIP Zeit.

Herrn Dr. J. Bohlender (Klinik für Nephrologie, Universität Jena) danke ich für die Überlassung der Renin-Angiotensinogen transgenen Ratten, Prof. C. Englert (Institut für Biochemie, Universität Würzburg) für die WT1 knock-out Mäuse und Prof. A. Schedl (University of Newcastle upon Tyne) für die Zusammenarbeit bei der Charakterisierung des neuronalen Phänotyps von WT1 knock-out Mäusen und die Überlassung der YAC rescue Tiere.

Frau I. Grätsch, Frau A. Richter und Frau B. Schröter gilt mein Dank für die technische Assistenz.

Besonderer Dank gilt meiner Frau Nicole für die kontinuierliche Zusammenarbeit in den letzten Jahren, viele kritische hilfreiche Diskussionen, kreative Anregungen für den Fortgang unserer Experimente und ein großes Maß an Verständnis bis zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, meinen Eltern und Freunden, die mich bei der Arbeit unterstützt und ein sehr großes Maß an Geduld bis zu ihrer Niederschrift aufgebracht haben.

Erklärung

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

- der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

.....

Datum

.....

Unterschrift

Lebenslauf

Name: Kay- Dietrich WAGNER

Anschrift (dienstlich): Johannes-Müller-Institut für Physiologie
Humboldt-Universität zu Berlin (Charité)
Tucholskystr. 2
10117 Berlin
Tel. : +49 30 450 528177
Fax : +49 30 450 528928
e-mail: kay-dietrich.wagner@charite.de

Anschrift (privat): Pankstr. 48
13357 Berlin
Tel. : +49 30 4656709

Geburtsdatum: 07. Februar 1971

Geburtsort: Spremberg

Eltern: Siegfried Wagner und Helga Wagner, geb. Puppe

Familienstand: verheiratet mit Dr. Nicole Wagner

Kinder: Stella Maria Wagner, geb. am 01.06.2000

Staatsangehörigkeit: BRD

Schulbildung: 09/1977 - 08/1987
10-klassige allgemeinbildende Oberschule
Lübbenau / Spreewald
09/1987 - 08/1989
Erweiterte Oberschule Calau, Abschluss: Abitur

Vorpraktikum: 09/1989 - 06/1990
Frauenklinik Altdöbern

Studium: 09/1990 - 09/1996
Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin,
Medizinische Fakultät (Charité)

Berufliche Tätigkeit: 11/1996 - 04/1998 Arzt im Praktikum, Medizinische Klinik I (Charité)
05/1998 – 04/2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter
Institut für Physiologie (Charité)
Ab 05/2003 EMBO Long-term Fellowship
INSERM 470, Nice, France

Promotion: 04/1998 an der Medizinischen Fakultät (Charité)
Suma cum laude, Robert-Koch-Preis der Charité 1998