

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie des Zentrums für Experimentelle  
Medizin

Direktor: Prof. Dr. med. H. Ehmke

## **Einfluss von Angiotensin II auf die molekularen Strukturen des $I_{to}$ in Kardiomyozyten der Maus unter Berücksichtigung von Herzhypertrophie, Blutdruck und Herzfrequenz**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Till Hagenström  
aus Hamburg

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 17.08.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. H. Ehmke

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. Willems

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Piv. Doz. Dr. Sydow

Für meine Mutter

# Inhaltsverzeichnis

1. Fragestellung.....	1
2. Einleitung.....	2
2.1. Kalziumunabhängiger transientser Kaliumauswärtsstrom (Ito).....	4
2.1.1. Molekulares Korrelat des Ito.....	6
2.1.2. Molekulare Veränderungen im hypertrophierten oder insuffizienten Herz.....	9
2.2. Angiotensin II.....	10
2.2.1. Ang II und seine Bedeutung für Erkrankungen.....	12
2.2.2. Wirkung von Ang II auf das Herz.....	13
2.2.3. Einfluss auf die funktionelle und molekulare Expression des Ito.....	14
3. Material und Methoden.....	16
3.1. Versuchstiere und ihre Haltung.....	16
3.2. Implantation der osmotischen Pumpen.....	16
3.3. Entnahme und Zerteilung der Herzen.....	17
3.4. Dosisfindung.....	17
3.5. Telemetrie.....	18
3.5.1. Transmitter.....	19
3.5.2. Implantation der Telemetriesender.....	19
3.5.3. Telemetrische Messung mit 1,6 µg und 3,2 µg Ang II.....	20
3.6. Isolierung der RNA.....	20
3.7. Messung der RNA-Konzentration.....	23
3.8. Reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA.....	24
3.9. Quantitative Real Time PCR.....	25
3.11. Datenauswertung.....	29
4. Ergebnisse.....	30
4.1. Telemetrie.....	30
4.1.1. Herzfrequenz.....	30
4.1.2. Mittlerer Arterieller Blutdruck.....	31
4.1.3. Systolischer Blutdruck.....	31
4.1.4. Diastolischer Blutdruck.....	32
4.2. Herzgewichte.....	33
4.2.1. Relatives ventrikuläres Herzgewicht bei 1,6 µg Ang II für 14 Tage.....	33
4.2.2. Relatives ventrikuläres Herzgewicht bei 3,2 µg Ang II für 14 Tage.....	34
4.2.3. Relatives ventrikuläres Herzgewicht bei 3,2 µg Ang II für 24 Stunden.....	35

4.3. Transkriptionelle Regulation unter Ang II.....	36
4.3.1. 3,2 µg Ang II für 14 Tage.....	36
4.3.1.1. β-Aktin.....	36
4.3.1.2. HGPRT.....	37
4.3.1.3. ANF.....	38
4.3.1.4. Kv4.2.....	39
4.3.1.5. Kv4.3 .....	40
4.3.1.6. KChIP2.....	41
4.3.1.7. Kv1.4.....	42
4.3.2. 3,2 µg Ang II für 24 Stunden .....	43
4.3.2.1. ANF.....	43
4.3.2.2. Kv4.2.....	43
4.3.2.3. Kv4.3.....	44
4.3.2.4. KChIP2.....	45
4.3.2.5. Kv1.4.....	46
5. Diskussion.....	47
5.1. Effekte auf die Herzfrequenz und den Blutdruck.....	47
5.2. Effekte auf das Herzgewicht.....	49
5.3. Effekte auf molekularer Ebene.....	50
6. Zusammenfassung.....	56
7. Literaturverzeichnis .....	57
8. Abkürzungsverzeichnis.....	72
9. Danksagung.....	74
10. Lebenslauf .....	75
11. Erklärung.....	77

# 1. Fragestellung

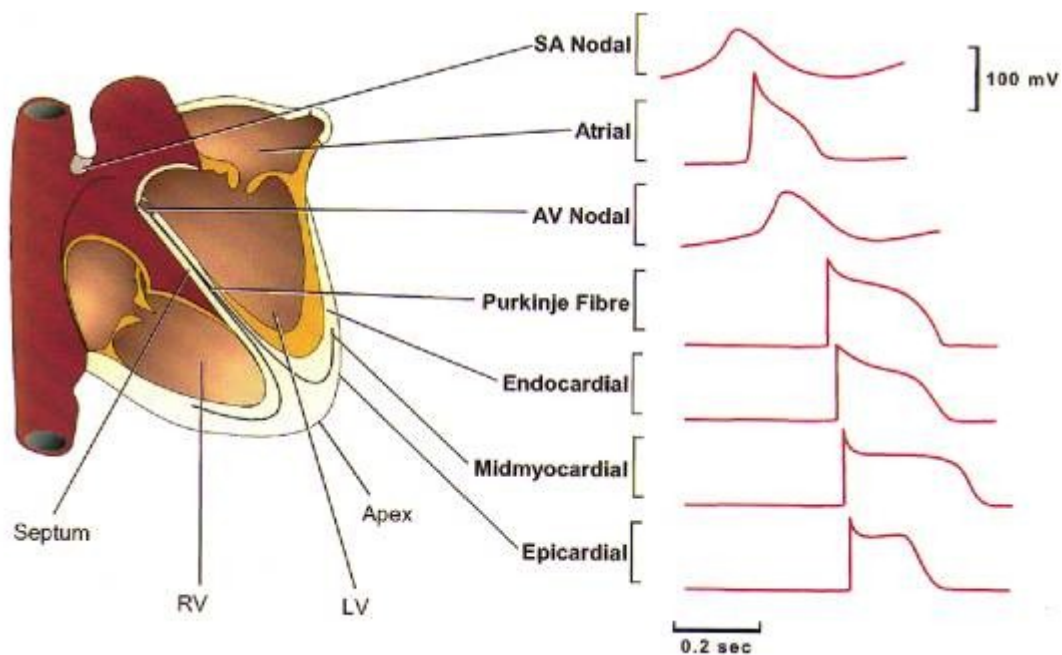
Verschiedene pathologische Einflüsse führen am Herzen zu Umbauprozessen, die eine Art der Kompensation darstellen. Die Reduktion des Kalziumunabhängigen transienten Kaliumauswärtsstroms ( $I_{to}$ ) ist ein frühes Ereignis während dieses Umbaus und spielt eine große Rolle für die Krankheitsentwicklung und deren Fortschreiten. Die Ursache für den  $I_{to}$ -Verlust im hypertrophen oder insuffizienten Herzen ist nicht vollständig geklärt, allerdings sprechen einige Beobachtungen dafür, dass Angiotensin II ein entscheidender Faktor bei der Entstehung dieser elektrischen Veränderungen am Herzen ist. Es konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass Angiotensin II in vitro einen reduzierenden Einfluss auf den  $I_{to}$  hat. Die Wirkung von Angiotensin II auf den  $I_{to}$  sowie auf die molekulare Zusammensetzung der Kaliumkanäle, die ihn generieren, im intakten Organismus ist jedoch bisher nicht untersucht worden.

Als erste Schritte einer solchen Analyse hat die vorliegende Arbeit zum Ziel, folgende Fragen zu beantworten:

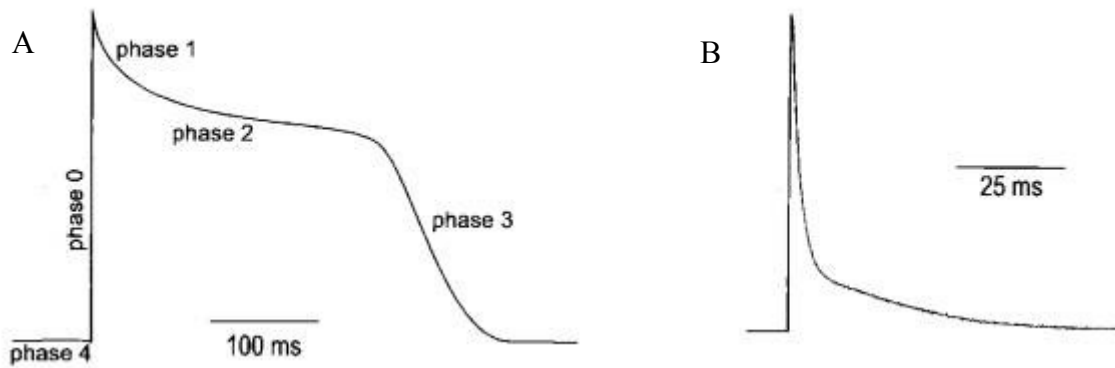
- 1.) Welchen Einfluss hat eine Erhöhung der Plasmaspiegel von Angiotensin II auf die transkriptionelle Expression von den wichtigsten molekularen Komponenten der Kaliumkanäle, die  $I_{to}$  im Herzen generieren (Kv4.2, Kv4.3, Kv1.4, KCHIP2)?
- 2.) Hat die Dauer der Angiotensin II-Gabe einen Einfluss auf das Genexpressionsmuster?

## 2. Einleitung

Durch unterschiedliche Elektrolytverteilungen zwischen dem Zellinneren und dem Zelläußeren entsteht eine Polarität der Zelle, der kleinsten funktionellen Einheit eines Lebewesens. Dieses wird als Ruhemembranpotential bezeichnet und beträgt  $-50$  mV bis  $-100$  mV, innen negativ gegenüber außen. Die Polarität ist die Grundlage für die Erregbarkeit, die beim Herz die Kontraktion und damit den Blutauswurf ermöglicht. Die Erregung des Herzens wird im Sinusknoten gebildet (Automatie des Herzens) und in Form eines Aktionspotentials über die Vorhöfe und das folgende spezifische Erregungsleitungssystem in die Ventrikel geleitet. Bei Ableitungen des Aktionspotentials an einzelnen Zellen aus den verschiedenen Bereichen des Herzens zeigt sich eine deutliche regionale Variabilität bezüglich der Dauer und der Form (**Abb. 1**). Aber auch zwischen den verschiedenen Spezies existieren große Unterschiede in der Form des Aktionspotentials (vergl. **Abb. 2**).



**Abb. 1)** Aktionspotential des menschlichen Herzens in verschiedenen Abschnitten; aus: Nerbonne (2000)



**Abb. 2)** Ventrikuläres Aktionspotential A) eines Menschen, B) einer Maus; aus: Nerbonne et al. (2001)

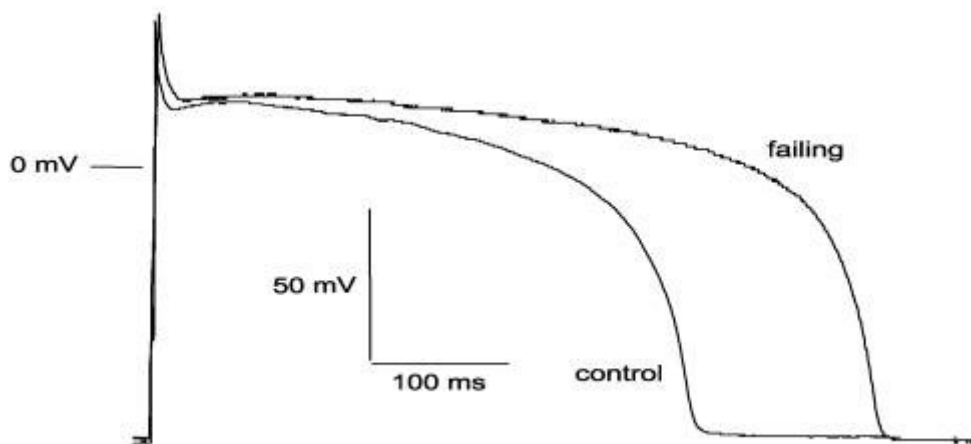
Diese Unterschiede entstehen durch eine unterschiedliche funktionelle Expression von Ionenkanälen, die in der Summe der von ihnen gebildeten Ströme das ableitbare Aktionspotential bilden. Bei einer ganzen Reihe von Erkrankungen kommt es zu Veränderungen der Erregungsausbreitung und Rückbildung des Herzens, die sich in veränderten Aktionspotentialen messen lassen. Zu nennen wären z. B. die Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen, Myokardinfarkt oder Kardiomyopathien. Dabei geht man alleine für die Herzinsuffizienz in Deutschland von einer Prävalenz von 1% und einem Lebenszeitrisiko von 20% aus, mit einem deutlich häufigeren Vorkommen im hohen Alter [Bauriedel et al. 2005, Lloyd-Jones et al. 2002]. Der Hypertonus, die koronare Herzerkrankung, der Myokardinfarkt und Klappenfehler stellen einige der häufigsten Ursachen dieser Erkrankung dar. Die Herzinsuffizienz ist dadurch gekennzeichnet, dass das Herz durch seine Pumpleistung den Bedarf des Körpers an sauerstoffreichem Blut nur unzureichend decken kann. Auf die ungenügende Pumpleistung reagiert der Organismus mit Adaptationsmechanismen. Funktionell kann das Herz durch die Erhöhung der Vorlast und der damit erhöhten Kontraktionskraft die Pumpfunktion, zumindest vorübergehend, aufrechterhalten (Frank-Straub-Starling-Mechanismus). Neurohumoral reagiert der Körper durch die vermehrte Aktivierung des sympathischen Nervensystems, des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) sowie der Freisetzung des Antidiuretischen Hormons (ADH) und des Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP) sowie weiteren Hormonen und Transmittern. Morphologisch adaptiert das Herz durch eine Vergrößerung des Herzmuskels. Diese Vergrößerung wird durch eine Hypertrophie der Zellen erreicht. Den Prozess des Herzumbaus bezeichnet man als Remodeling. Anfangs ist diese Veränderung eine Art der Kompensation, jedoch stellt sie im weiteren Verlauf selber eine Komplikation dar, da sich unter anderem die Erregbarkeit des Herzens verändert. Dieses führt in der Folge zu einer erhöhten Arrhythmieeigung, was im Wesentlichen auf die Veränderung von



Repolarisationsströmen zurückgeführt wird [Tomaselli & Marban 1999]. Menschen, die an einer Herzinsuffizienz leiden, haben daher im Vergleich zum Normalkollektiv eine sechs- bis neunmal so hohe Wahrscheinlichkeit, an einem plötzlichen Herztod zu versterben [American Heart Association 2005].

## 2.1. Kalziumunabhängiger transientser Kaliumauswärtsstrom ( $I_{to}$ )

Ist es zu einer Hypertrophie des Herzens oder in der Folge sogar zu einer Insuffizienz gekommen, lassen sich charakteristische elektrophysiologische Merkmale ausmachen: Die Aktionspotentialdauer (APD) ist verlängert und das Plateau des Aktionspotentials zu positiveren Werten hin verschoben [Gelband & Basset 1973] (**Abb. 3**).



**Abb. 3)** Aktionspotential aus einem gesunden und einem versagenden menschlichen Herzen; aus: Rose *et al.* (2004)

Ursächlich an der Ausprägung dieser Veränderungen der Morphologie des Aktionspotentials ist wahrscheinlich eine Reduktion des  $I_{to}$  beteiligt, die bei zahlreichen Formen von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz beobachtet wurde [Beuckelmann *et al.* 1993; Tomita *et al.* 1994; Wettwer *et al.* 1994; Pontreau *et al.* 1995; Näbauer *et al.* 1996; Kääb *et al.* 1998; Wickenden *et al.* 1999; Volk *et al.* 2001; Rose *et al.* 2005; Goltz *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007]. Der  $I_{to}$  folgt nach dem steilen Aufstrich des Aktionspotentials, hat großen Einfluss auf die 1. Phase (notch) der insgesamt vier Phasen des Aktionspotentials (**Abb. 2**) und ist damit an der Repolarisation der Herzmuskelzelle beteiligt [Boyden & Jeck 1995; Kääb *et al.* 1996; Yu *et al.* 2000]. Mit seiner repolarisierenden Wirkung bestimmt der  $I_{to}$  wesentlich die APD, indem sie sich bei einem reduzierten  $I_{to}$  verlängert und bei einem verstärkten  $I_{to}$  verkürzt [Guo *et al.*

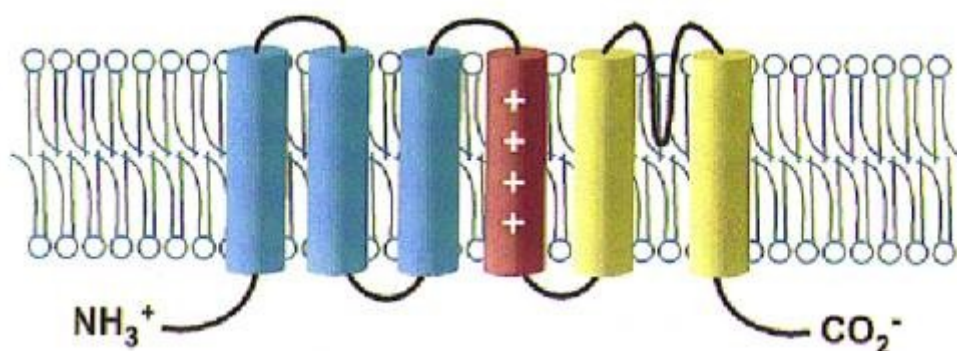
2000; Greenstein et al. 2000; Hoppe et al. 2000]. Außerdem hat der  $I_{to}$  maßgeblichen Einfluss auf die Höhe der Plateauphase des Aktionspotentials einer Herzmuskelzelle. Bei einem reduzierten  $I_{to}$  liegt das Plateau höher als bei einem normalen  $I_{to}$  [Käab et al. 1996; Hoppe et al. 2000] (**Abb. 3**). Diese Befunde verdeutlichen die Relevanz des  $I_{to}$  für die Herzinsuffizienz, bei der man genau diese elektrischen Phänomene findet.

Der  $I_{to}$  lässt sich elektrophysiologisch in eine schnell inaktivierende Komponente ( $I_{to,f}$ ) und in eine langsam inaktivierende ( $I_{to,s}$ ) differenzieren [Amos et al. 1996; Guo et al. 1999; Xu et al. 1999a]. Die Größe des  $I_{to}$  variiert sowohl zwischen den verschiedenen Spezies als auch zwischen verschiedenen Herzarealen einer Art [Xu et al. 1999a; Brunet et al. 2004]. Bei der Maus ist der  $I_{to,f}$  im Ventrikel stärker ausgeprägt als im Atrium [Xu et al. 1999b], wo der  $I_{to,s}$  vorherrscht. Über das Vorhandensein des  $I_{to,s}$  im Ventrikel der Maus herrscht Uneinigkeit, Brunet et al. (2004) konnten den  $I_{to,s}$  nicht detektieren, Xu et al. (1999a) hingegen schon. Im Vergleich der Ventrikel liegt ein größerer  $I_{to,f}$  im rechten als im linken Ventrikel vor, ebenso ist dieser an der Herzspitze stärker messbar als an der Herzbasis [Brunet et al. 2004]. Innerhalb des linken Ventrikels ist der  $I_{to,f}$  im subepikardialen Myokard (Subepikardium) deutlich stärker ausgeprägt als im subendokardialen [Litovsky & Antzelevitch 1988; Wettwer et al. 1994; Näbauer et al. 1996; Yu et al. 2000; Volk et al. 2001; Deschenes et al. 2002; Rosati et al. 2003; Rose et al. 2004; Zicha et al. 2004; Goltz et al. 2007; Wang et al. 2007]. Dieses korreliert mit der APD, welche subepikardial kürzer ist als subendokardial (**Abb. 1**) [Litovsky & Antzelevitch 1988; Volk et al. 2001; Anumonwo et al. 2001; Rose et al. 2005]. Das führt dazu, dass das im Erregungszyklus zuletzt erregte subepikardiale Myokard schon vor den subendokardialen Anteilen mit der Repolarisation beginnt. Die verlängerte APD in hypertrophierten Herzen lässt sich zumindest zum Teil mit der Abnahme des  $I_{to,f}$  erklären, wie in verschiedenen Modellen mit verkleinertem oder aufgehobenem  $I_{to,f}$  deutlich wurde [Tomita et al. 1994; Käab et al. 1996; Barry et al. 1998; Xu et al. 1999b; Guo et al. 2000; Hoppe et al. 2000; Volk et al. 2001; Kuo et al. 2001; Rose et al. 2005]. Die Verlängerung der APD im hypertrophen Herzen zeigt sich auch elektrokardiographisch als verlängertes QT-Intervall als Folge der verlängerten Repolarisation [Barry et al. 1998; Xu et al. 1999b; Guo et al. 2000; Volk et al. 2001]. Da der  $I_{to,f}$  in hypertrophierten Herzen jedoch nicht homogen reduziert wird, sondern vor allem im Subepikardium [Näbauer et al. 1996; Bryant et al. 1999; Volk et al. 2001, Zicha et al. 2004; Goltz et al. 2007], kann es zu heterogenen, abnormalen Repolarisationen kommen [Volk et al. 2001]. Dadurch können sogenannte Reentry-Phänomene entstehen, bei denen die Erregung von gerade noch erregten Zellen auf

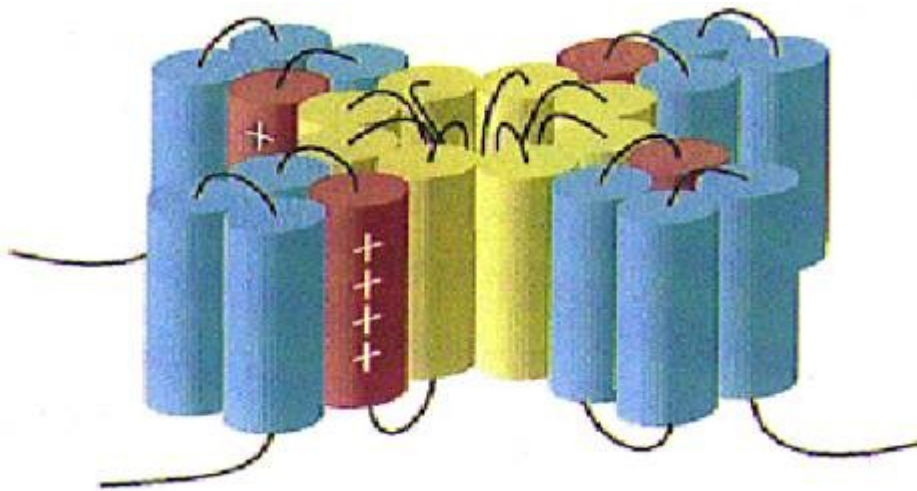
schon wieder erregbare Zellen überleitet wird und somit im Myokard verbleibt, woraus Arrhythmien resultieren können [Kääb et al. 1996; Winslow et al. 1998; Akar et al. 2002]. Dies zeigt sich vor allem bei Lebewesen mit hohen Herzfrequenzen wie Mäusen oder Ratten, die bei einem reduzierten  $I_{to,f}$  und einer verlängerten APD eine erhöhte Rate von Arrhythmien aufweisen [Barry et al. 1998; Guo et al. 2000; Kuo et al. 2001].

### 2.1.1. Molekulares Korrelat des $I_{to}$

Die molekulare Grundlage für den  $I_{to}$  stellen spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $K^+$ -Kanäle) dar, die integral in den Zellmembranen liegen und außer in Kardiomyozyten vor allem in Nervenzellen vorkommen [Liss et al. 2001]. Sie setzen sich aus vier  $\alpha$ -Untereinheiten sowie akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten zusammen [MacKinnon 1991]. Die  $\alpha$ -Untereinheiten der  $K^+$ -Kanäle ( $Kv \alpha$ ) bilden eine kaliumselektive Pore in der Zellmembran. Die  $\alpha$ -Untereinheiten werden in Subgruppen unterteilt, je nach dem Gen, auf dem sie kodiert sind. Bei den Säugetieren unterscheidet man zwischen  $Kv1$ ,  $Kv2$ ,  $Kv3$ ,  $Kv4$  [Butler et al. 1989] sowie  $Kv5-9$  [Drewe et al. 1992]. Die für den  $I_{to}$  interessanten Subgruppen sind  $Kv1$  und  $Kv4$ . Die Subgruppe  $Kv4$  besteht aus  $Kv4.1$ ,  $Kv4.2$  und  $Kv4.3$ . In der Subgruppe  $Kv1$  unterscheidet man zwischen  $Kv1.1$  bis  $Kv1.8$ . Während sich die Amino- und Carboxytermini zwischen den Mitgliedern einer Subgruppe unterscheiden, besteht in den sechs Transmembrandomänen eine hohe Homologie [Butler et al. 1989], was es möglich macht, dass sich verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten einer  $Kv$ -Subgruppe zu einem Kanal zusammenlagern. Es resultiert die Generierung vieler, in ihren Eigenschaften unterschiedlicher Kanäle. Die vierte ihrer sechs durch die Membran ziehenden Domänen ist durch einen hohen Gehalt der Aminosäuren Arginin und Lysin stark geladen und stellt den Ort der Spannungsmessung dar (**Abb. 4 und 5**).



**Abb. 4)**  $\alpha$ -Untereinheit eines Kv-Kanals; aus: Nerbonne (2000)



**Abb. 5)** Zusammenlagerung von vier  $\alpha$ -Untereinheiten zu einem Kv-Kanal; aus: Nerbonne (2000)

Die  $\alpha$ -Untereinheiten der  $K^+$ -Kanäle, die den  $I_{to}$  bilden, variieren je nach Spezies. Bis vor kurzem ging man davon aus, dass der  $I_{to,f}$  der Maus durch die tetramere Zusammenlagerung von Kv4.2 und Kv4.3 gebildet wird, da diese zusammen in heterologen Expressionssystemen elektrophysiologisch sehr ähnliche Eigenschaften wie der  $I_{to,f}$  besitzen und der Großteil der Kv4.2 Proteine in vivo mit Kv4.3 zusammengelagert vorkommen [Guo et al. 2002; Xu et al. 1999b]. Guo et al. (2005) zeigten mit ihrer Arbeit, dass der  $I_{to,f}$  ohne das Vorhandensein von Kv4.2 eliminiert ist, Kv4.3 also alleine nicht in der Lage ist, einen dem  $I_{to,f}$  ähnlichen Strom zu generieren. Neueste Ergebnisse deuten sogar darauf hin, dass als  $\alpha$ -Untereinheit für die Generierung des  $I_{to,f}$  der Maus alleine Kv4.2 in Frage kommt [Niwa et al. 2008]. Bei Mensch und Hund wird dagegen vor allem Kv4.3 verantwortlich gemacht, da diese Kv4.2 nicht exprimieren [Dixon et al. 1996; Kääh et al. 1998]. Der  $I_{to,s}$  wird hingegen durch Kv1.4 generiert [Guo et al. 1999, 2000].

Als  $\beta$ -Untereinheiten, die die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals modulieren, kommen die Kv $\beta$  1-3, MinK, MIRP, KChAP, DPPX und KChIP1-4 in Betracht [Deschenes & Tomaselli 2002]. Von besonderem Interesse ist hier KChIP2 (Kalium Channel Interacting Protein 2) sowie DPPX (Dipeptidyl-Aminopeptidase-like Protein). KChIP2 wird als die wesentliche modulierende  $\beta$ -Untereinheit für die Bildung des  $I_{to,f}$  der Maus angesehen [Guo et al. 2002], während beim Menschen auch noch DPPX eine Rolle zu spielen scheint [Radicke et al. 2005]. Beide lassen die Ströme von heterolog exprimierten Kv4  $\alpha$ -Untereinheiten dem des  $I_{to,f}$  sehr ähnlich aussehen [An et al. 2000; Radicke et al. 2005]. Inzwischen sind etliche Splice-Varianten von KChIP2 bekannt, welches das einzige der KChIP-Familie ist, das im Herzen exprimiert ist [Decher et al. 2004]. Neben seiner Funktion als Strom modulierende  $\beta$ -Untereinheit wirkt KChIP2 jedoch auch noch auf die Verteilung der Kanalproteine in der Zelle, dem sogenannten „Trafficking“ [An et al. 2000; Bähring et al. 2001]. Die Kanaluntereinheiten werden in Gegenwart von KChIP2 an die Zelloberfläche transportiert, phosphoryliert und haben eine deutlich längere Halbwertszeit [Bähring et al. 2001; Shibata et al. 2003]. Die heterogene Erscheinung des  $I_{to,f}$  zwischen den verschiedenen Herzabschnitten lässt sich durch ein unterschiedliches hohes Vorkommen der zusammenwirkenden Einheiten erklären [Serodio et al. 1996; Deschenes & Tomaselli 2002]. Bei den Nagetieren (Maus und Ratte) sind subepikardial signifikant höhere Kv4.2 mRNA Konzentrationen ermittelt worden als subendokardial [Goltz et al. 2007; Teutsch et al. 2007, Marionneau et al. 2008]). Für Kv4.3 und KChIP2 sind unterschiedliche Ergebnisse publiziert. Teutsch et al. (2007) und Marionneau et al. (2008) geben an, dass die mRNA von Kv4.3 gleich stark exprimiert ist, Goltz et al. (2007) ermittelten ein sehr signifikant erhöhtes Vorkommen in subepikardialen Schichten. Auch für KChIP2 wurde sowohl eine gleichmäßige Exprimierung publiziert [Janzen 2003, Marionneau et al. 2008] als auch ein häufigeres Vorkommen in subepikardialen Schichten [Goltz et al. 2007; Teutsch et al. 2007]. Die Korrelation von Kv4.2 und  $I_{to,f}$  deutet jedoch darauf hin, dass der Größenunterschied des  $I_{to,f}$  bei der Maus zwischen subepi- und subendokardialem Myokard im Wesentlichen durch die Menge an Kv4.2 [Guo et al. 2002] und untergeordnet durch KChIP2 [Kuo et al. 2001] reguliert wird.

Für Mensch und Hund wurden unterschiedliche, zum Teil sich widersprechende Daten publiziert. Einigkeit herrscht darin, dass die KChIP2 mRNA in subepikardialen Herzarealen in größerer Zahl vorkommt als in subendokardialen [Deschenes et al. 2002; Rosati et al. 2001, 2003; Zicha et al. 2004], jedoch widersprechen sich die Arbeiten in Bezug auf Kv4.3. Es scheint jedoch so zu sein, dass die Reduktion von Kv4.3 die

Grundlage für die Abnahme des  $I_{to,f}$  in pathologischen Situationen darstellt [Zicha et al. 2004].

### **2.1.2. Molekulare Veränderungen im hypertrophierten oder insuffizienten Herz**

Die Verlängerung der APD und die Reduktion des  $I_{to,f}$  im hypertrophierten oder insuffizienten Herzen werden begleitet von einer Abnahme der Kanalbestandteile, die den  $I_{to,f}$  generieren. In den hypertrophierten Herzen von spontan hypertensiven Ratten kommt es zu einer signifikanten Reduktion der mRNA sowohl von Kv4.2 als auch Kv4.3 in epikardnahen, jedoch nicht in endokardnahen Myozyten [Goltz et al. 2007]. Ratten mit Herzinsuffizienz nach induzierter Myokarditis zeigten zumindestens in den ersten Wochen signifikante Reduktionen von Kv4.2, Kv4.3 sowie KChIP2 [Wakisaka et al. 2004]. Bei menschlichen Herzen ist die Kv4.3 mRNA aus myokardialen Zellen von Patienten mit Herzversagen deutlich geringer als bei den gesunden Kontrollherzen [Käab et al. 1998; Zicha et al. 2004]. Hunde mit Tachykardie-induzierter Herzinsuffizienz zeigten ebenfalls eine deutliche Abnahme der mRNA von Kv4.3. Diese trat hier sowohl im Subepi-, als auch im Subendokardium auf. Bei Kaninchen reduzierte sich die mRNA von Kv4.2 sowie KChIP2 [Rose et al. 2005]. Für Mäuse hingegen gibt es bisher lediglich wenige Veröffentlichung zu den Veränderungen der Kanalbestandteile im hypertrophen oder versagenden Herzen. Wang et al. (2007) etablierten ein Mausmodell mit Herzhypertrophie und  $I_{to,f}$ -Reduktion durch thorakale Stenosierung der Aorta. Auf Protein-Ebene konnte für Kv4.2 unter Kontrollbedingungen ein Gradient mit einem signifikant vermehrten Vorkommen im Subepikardium ermittelt werden. Bei den Mäusen mit hypertrophen Herzen lag Kv4.2 in beiden Arealen in etwa gleich häufig vor. Für Kv4.3 und KChIP2 konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, wobei KChIP2 bei den Tieren mit Ligation der Aorta im subepikardialen Gewebe an Menge abnahm. Unter ähnlichen Bedingungen zeigten Marionneau et al. (2008) ebenfalls eine  $I_{to,f}$ -Reduktion, jedoch ohne die zu erwarteten Veränderungen auf mRNA-Ebene, abgesehen von Kv1.4. Dieses führen die Autoren darauf zurück, dass der  $I_{to,f}$ -Verlust in erster Linie relativ durch eine Größenzunahme der Einzelzelle entsteht, bei gleichbleibender Transkription der Kanaluntereinheiten. Bodi et al. (2003) zeigten bei Mäusen mit Herzversagen infolge einer Überexpression von Kalziumkanälen eine Abnahme der Kv4.2-Proteinmenge in Kombination mit  $I_{to,f}$ -Reduktion. Ein ähnliches Ergebnis brachte die Arbeit von Petkova-Kirova et al. (2006), die bei Mäusen mit Herzversagen und erhöhter Mortalität durch überexprimierten Tumornekrosefaktor- $\alpha$  eine Abnahme sowohl von Kv4.2 als

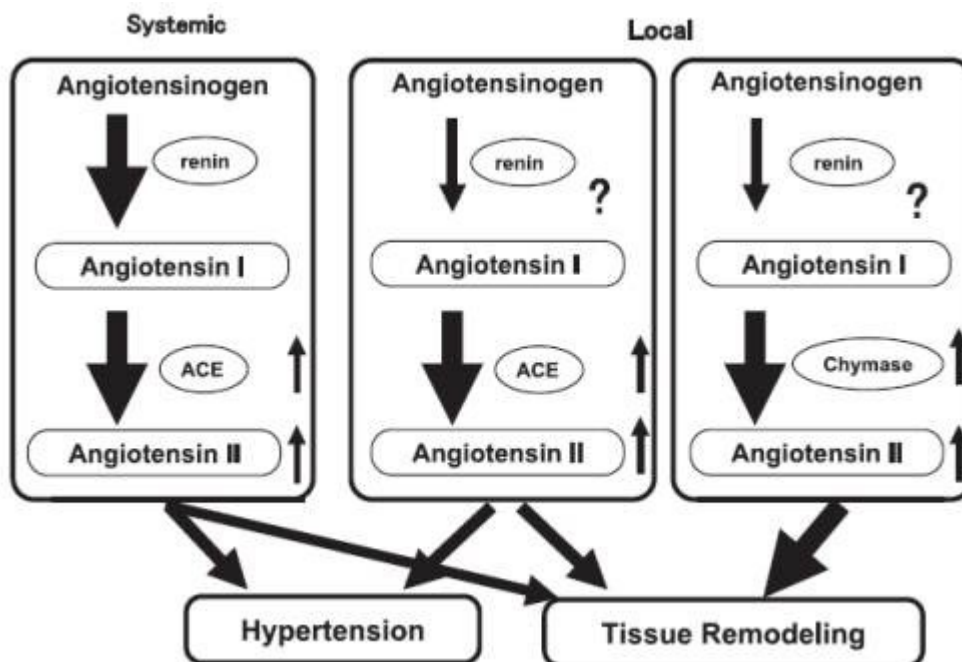
auch Kv4.3 Proteinen detektierten. In verschiedenen Arbeiten wurde darüber hinaus über einen Anstieg von Kv1.4 im kranken Herzen der Maus sowie anderer Arten berichtet [Wickenden et al. 2000; Bodi et al. 2003, Akar et al. 2005, Guo et al. 2005; Marionneau et al. 2008]. Aber nicht nur im hypertrophen Herzen kommt es zu dieser Überexpression von Kv1.4, sondern auch in nicht hypertrophierten Mäusezellen mit deletiertem Kv4.2 [Guo et al. 2005]. Dies wird als eine Art der Kompensation des Verlustes an  $I_{to,f}$  und als möglicher Arrhythmieschutz gedeutet. Kv1.4 ist die wesentliche Komponente des  $I_{to}$  in der Fetalzeit der Maus, während es nachgeburtlich durch Kv4 ersetzt wird [van der Heyden et al. 2006]. Genetische Untersuchungen mit Deletion oder Veränderung von Kv4.2 brachten unterschiedliche Phänotypen bei den Mäusen hervor. Diese reichten von Mäusen mit  $I_{to,f}$ -Verlust und leichter QT-Verlängerung mit einem völlig normalen Habitus [Guo et al. 2000] bis zu Mäusen, die entweder einem plötzlichen Herzversagen erlagen oder nach 10-12 Wochen eine Hypertrophie und Herzversagen mit  $I_{to}$ -Reduktion und Aktionspotentialverlängerung entwickelten [Wickenden et al. 1999]. Die Veränderungen der APD und des  $I_{to}$  ließen sich jedoch in kultivierten Myozyten durch Überexpression von Kv4.2 oder Kv4.3 aufheben [Zobel et al. 2002; Lebeche et al. 2006]. Dass durch die Abnahme oder den völligen Verlust des  $I_{to,f}$  nicht zwingend eine Herzhypertrophie entstehen muss, zeigen die Arbeiten von Guo et al. (2000, 2005) und Kuo et al. (2001), die entdeckten konnten, dass bei Mäusen mit einem kompletten Verlust von KCHIP2 der  $I_{to,f}$  komplett eliminiert ist, jedoch keine Hypertrophie entstand.

## 2.2. Angiotensin II

Das Hormon Angiotensin II (Ang II) besteht aus acht Aminosäuren und stellt den wichtigsten Effektor des RAS dar. Es entsteht aus dem Dekapeptid Angiotensin I durch Abspaltung von zwei Aminosäuren, katalysiert durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE). Angiotensin I wird durch Renin aus Angiotensinogen gebildet, welches in der Leber synthetisiert wird und im Blut zirkuliert. Renin wird im juxtaglomerulären Apparat der Niere produziert. Neben seiner Funktion als Enzym, das die Ang II-Produktion katalysiert, spielt das ACE aber auch noch eine Rolle bei der Synthese anderer Proteine wie z.B. dem Bradykinin. Außerdem gibt es noch weitere Enzyme, die die Bildung von Ang II katalysieren, wie die Chymase, Cathepsin G, Tonin und Gewebs-Plasminogen-Aktivator [Unger 2002]. Ang II wirkt an den Zielzellen hauptsächlich über AT1- und AT2-Rezeptoren, die sich durch die Affinität zu Hemmstoffen unterscheiden. AT1-Rezeptor-Aktivierung führt zu Zellwachstum,

Gefäßkontraktion, inflammatorischen Reaktionen sowie zu Salz- und Wasser-Retentionen über die vermehrte Synthese von Aldosteron. Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor aktiviert die Apoptose, Vasodilatation und Natriurese [Touyz & Berry 2002]. Außerdem wirkt Ang II auf die einzelnen Komponenten des RAS aktivierend, was eine positive Rückkoppelung darstellt [Bader 2002].

Jedoch wird Ang II nicht nur durch diesen systemischen Weg erzeugt, sondern auch noch lokal in verschiedenen Organen, wie dem Herz, dem Gehirn, der Nebenniere und den Blutgefäßen (**Abb. 6**) [Sawa et al. 1992; Zhang et al. 1995; Van Kats et al. 1998].



**Abb. 6** Ang II-Synthese systemisch und lokal; aus: Miyazaki & Takai (2006)

Es konnte gezeigt werden, dass die nötigen Zwischenprodukte für die Ang II-Synthese im Myokard synthetisiert werden. Lediglich bei Renin herrscht Unklarheit, ob es nicht doch aus dem Blut aufgenommen werden muss [Dzau & Re 1994; Von Lutterotti et al. 1994]. Außerdem existiert im Herzen mit der Chymase ein weiteres Enzym, das Ang I in Ang II umwandeln kann [Urata et al. 1996]. Im menschlichen Herzen entstehen bis zu 80 % an Ang II durch die Chymase [Urata et al. 1996].

Die Signaltransduktion von Ang II am Herzen ist äußerst komplex und trotz intensiver Forschung nicht vollständig geklärt. Je nach AT-Rezeptor, an dem Ang II bindet, laufen unterschiedliche Schritte ab, die dann entweder in Richtung Hypertrophie (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) oder Anti-Hypertrophie führen. Sowohl der AT<sub>1</sub>- als auch der AT<sub>2</sub>-Rezeptor sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (G<sub>αq</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>α</sub>). Nach Aktivierung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors werden die unterschiedlichsten Signalpfade der Zelle beschriftet. So weiß man, dass Phospholipasen, Inositolphosphat, Calcineurin, Proteinkinasen, MAP-



Kinasen, der JAK/STAT-Weg und einige andere Moleküle daran beteiligt sind, letztendlich verschiedene Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Dadurch werden Gene für das Zellwachstum vermehrt abgelesen und die Proteinsynthese erhöht [Bader 2001; Shimoni et al. 2003]. Der aktivierte AT<sub>2</sub>-Rezeptor bedient sich Stickstoffmonoxid und einiger Phosphatasen zur Signaltransduktion [Unger 2002]. (Abb. 7)

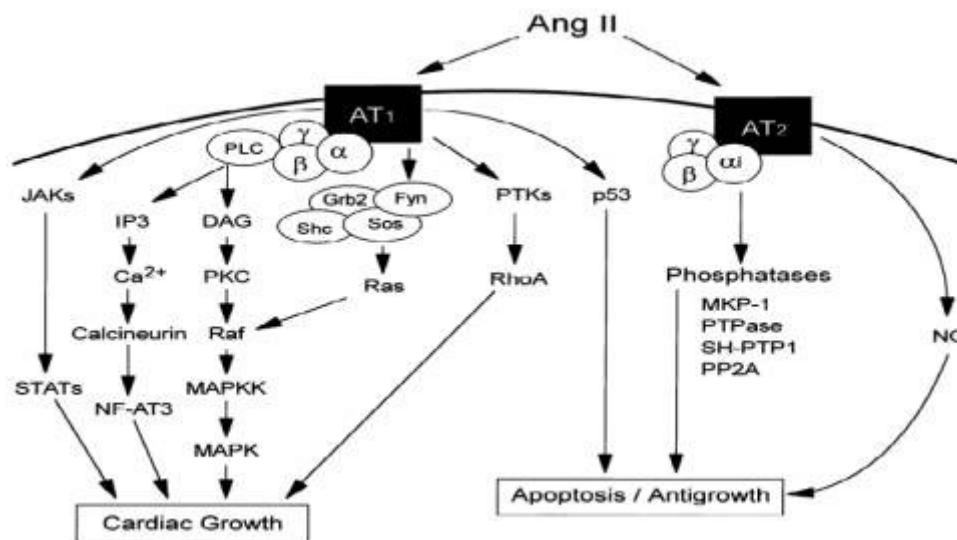


Abb. 7) Intrazelluläre Signalkaskade am Herzen durch Ang II; aus: Dostal (2000)

### 2.2.1. Ang II und seine Bedeutung für Erkrankungen

Ang II spielt in der Pathogenese oder den Komplikationen etlicher Krankheiten eine wichtige Rolle, zum Beispiel beim akuten Nierenversagen, bei der renalen Hypertonie, nach einem Myokardinfarkt oder bei der Herzinsuffizienz [Harrissons Innere Medizin 2005]. Bei einem verminderten Blutauswurf des Herzens wie bei der Herzinsuffizienz reagiert der Körper mit einer Aktivitätssteigerung des Sympathikus. Dieser Bestandteil des autonomen Nervensystems kann durch Noradrenalin- oder Adrenalin-Freisetzung die Niere zu einer verstärkten Renin-Ausschüttung über  $\beta_1$ -Rezeptoren anregen, so dass letztendlich vermehrt Ang II entsteht [van de Wal et al. 2006]. Aber auch die lokale Ang II-Produktion ist in hypertrophierten oder insuffizienten Herzen aktiviert [Zhang et al. 1995; Danser et al. 1997; Wollert & Drexler 1999; Serner et al. 2001]. Darüber hinaus kann mechanische Dehnung, die z. B. bei insuffizienten, dilatierten Herzen auftritt, die Ang II-Freisetzung im Herzen erhöhen [Cingolani et al. 2005; Usui et al. 2006].

Die Relevanz des Renin-Angiotensin-Systems für die Herzinsuffizienz wird in klinischen Studien deutlich. Es konnte bewiesen werden, dass Medikamente, die die Funktion von Ang II hemmen wie ACE-Hemmer oder AT<sub>1</sub>-Blocker, die kardialen

Parameter verbessern sowie die Letalität deutlich senken [CONSENSUS 1987, Stevenson et al. 1999; Swedberg et al. 1999; Yusuf et al. 2000; Pfeffer et al. 2003]. Auch auf die Häufigkeit von Arrhythmien wie z. B. dem Kammerflimmern bei Hypertonikern haben diese einen positiven Effekt. Da diese Wirkung nicht auf der Blutdrucksenkung alleine beruht [Fogari et al. 2006], kann man davon ausgehen, dass Ang II spezifisch in die Erregungs- und Repolarisierungsvorgänge des Herzens eingreift.

### **2.2.2. Wirkung von Ang II auf das Herz**

Die positive Wirkung der ACE-Hemmer oder AT1-Blocker erklären sich aus den Wirkungen von Ang II am Herzen. In überphysiologischen Dosierungen erzielt Ang II einen inotropen Effekt [Koch-Weser 1964]. Vermittelt über den AT1-Rezeptor führt Ang II zu einer Hypertrophie des Herzens [Van Kesteren et al. 1997; Bader 2001], über den AT2-Rezeptor jedoch zur Anti-Hypertrophie [Stoll et al. 1995]. Die Hypertrophie kann zu einer diastolischen Dysfunktion mit Relaxationstörungen des Herzens führen, die mit einer Veränderung des  $Ca^{2+}$ -Haushalts im Myokard einhergeht [Rothermund et al. 2001]. Darüber hinaus führt die Hypertrophie jedoch auch zu einer systolischen Dysfunktion der Einzelzelle und des Gesamtherzens bis hin zu einem Herzversagen [Domenighetti et al. 2005]. Ang II hat auf das Herz einen fibrotisierenden Effekt [Bader 2001]. Durch den AT1-Rezeptor vermittelt kann Ang II in Myokardzellen den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten [Cigola et al. 1997]. Im Tiermodell führen stark erhöhte Ang II-Plasmaspiegel zu einer Herzhypertrophie und zum plötzlichen Herztod bei Mäusen [Caron et al. 2004]. Die hypertrophierende Wirkung von Ang II auf das Herz konnte in einem transgenen Tiermodell sogar ohne den normalerweise auftretenden Blutdruckanstieg gezeigt werden [Domenighetti et al. 2005]. Bei diesen Tieren waren außerdem Veränderungen im Kalziumhaushalt, eine systolische und diastolische Dysfunktion sowie eine erhöhte Mortalität zu erkennen. Ein ähnliches Bild brachte auch ein Versuch mit Ratten, bei denen Ang II trotz Hydralazin-Gabe und daraus resultierendem normalem Blutdruck einen hypertrophen Effekt hatte [Kim et al. 1995]. Der Einfluss von Ang II am Herzen wird an den Kardiomyozyten sowohl über AT1- als auch AT2-Rezeptoren vermittelt, während interstitielle Fibroblasten lediglich AT1-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche besitzen [Bader 2001]. Angaben zu Veränderungen der Dichte der AT-Rezeptoren in krankhaften Zuständen wie dem Herzversagen divergieren in verschiedenen Arbeiten [Zhang et al. 1995; Harada et al. 1998; Tszumi et al. 1998; Zisman et al. 1998; Seneri et al. 2001]. Jedoch scheint es

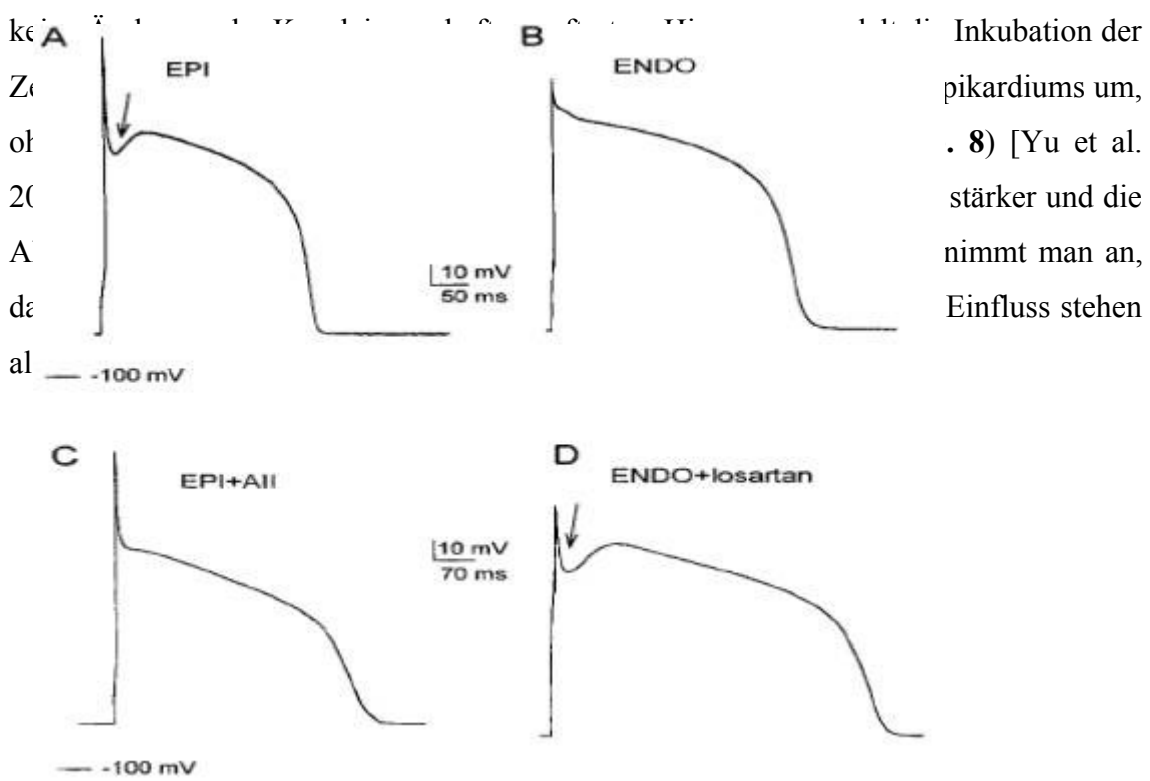
so zu sein, dass die Wirkung von Ang II in dem jeweiligen Gewebe davon abhängt, wie das Verhältnis der beiden Rezeptoren zueinander ist [Unger 2002].

### 2.2.3. Einfluss auf die funktionelle und molekulare Expression des $I_{to}$

Auch auf molekularer Ebene lassen sich Wirkungen von Ang II ermitteln. In einer Arbeit konnte bei heterolog exprimierten Kv4.3, KChIP2 und AT1-Rezeptoren der  $I_{to,f}$  nach Inkubation mit Ang II um bis 90% reduziert werden [Doronin et al. 2004]. Eine ähnliche Reduktion des  $I_{to,f}$  durch Ang II wird auch in nativen Myozyten aus epikardnahen Zellen beobachtet [Yu et al. 2000]. Durch AT1-Rezeptorblockade ist es anders herum aber auch möglich, den  $I_{to,f}$  sowie die APD bei spontan hypertensiven Ratten wieder zu normalisieren [Cerbai et al. 2000]. Die bei renovaskulär hypertensiven Ratten ermittelten Reduktionen von Kv4.2 und Kv4.3 können ebenfalls durch die Gabe von Losartan, einem AT1-Rezeptorblocker, und ACE-Hemmern wieder normalisiert und die Entstehung einer Herzhypertrophie verhindert werden [Takimoto et al. 1997].

In kultivierten neonatalen Rattenmyozyten konnte außerdem gezeigt werden, dass Ang II sowohl die mRNA als auch die Proteinmenge von Kv4.3 um bis zu 50% reduziert [Zhang et al. 2001]. Des Weiteren wirkt Ang II auch auf die zelluläre Verteilung von heterolog exprimiertem Kv4.3. Nach Ang II Gabe wird der überwiegende Teil von Kv4.3 und der AT1-Rezeptoren internalisiert und intrazellulär einen stabilen molekularen Komplex bildend gespeichert [Doronin et al. 2004], eine Reaktion, die durch NADPH-Oxidasen gesteuert wird [Zhou et al. 2006]. Erstaunlicherweise reagieren Zellen aus subepikardialen Herzarealen gänzlich anders auf Ang II als Zellen aus subendokardialen Herzarealen. Ang II lässt den  $I_{to,f}$  von subepikardialen Zellen dem  $I_{to,f}$  aus subendokardialen stark ähneln, während bei subendokardialen Zellen mit Ang II

keine Veränderung der APD beobachtet werden konnte. In subepikardialen Myozyten führt die Inkubation der Zellen mit Ang II zu einer Reduktion der APD um 20% [Yu et al. 2000]. In subendokardialen Myozyten führt die Inkubation mit Ang II zu einer stärkeren Reduktion der APD um 40% [Yu et al. 2000]. In subepikardialen Myozyten nimmt man an, dass die Reduktion der APD durch den Einfluss stehen



**Abb.8)** Aktionspotentiale von Hundemyozyten. A) Subepikardialer Myozyt mit „notch“, B) Subendokardialer Myozyt ohne „notch“, C) Epi inkubiert mit Ang II ohne „notch“, D) Endo inkubiert mit Losartan mit „notch“; aus: Yu et al. (2000)

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Versuchstiere und ihre Haltung**

Für die Versuche wurden 90 männliche Mäuse der Art C57 black mit einem Gewicht von ca. 25–30 g verwendet. Diese wurden einzeln in Käfigen bei freiem Zugang zu normaler Kost und Trinkwasser sowie einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus bei  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  gehalten. Sämtliche Versuche wurden von der Behörde für Soziales und Gesundheit Hamburg genehmigt (Nr.73/04).

### **3.2. Implantation der osmotischen Pumpen**

Um die Wirkung von Ang II auf das Mäuseherz zu untersuchen, wurde den Mäusen eine osmotische Pumpe implantiert, die über einen bestimmten Zeitraum eine konstante Menge Ang II (Sigma, LOT 064K51182) oder zum Vergleich lediglich die Lösungsflüssigkeit des Ang II freisetzt.

Das Ang II wurde in einem Flüssigkeitsansatz nach Larkin et al. (2004) gelöst, bestehend aus:

- Milli-Q-H<sub>2</sub>O (destilliertes und gefiltertes Wasser)
- 0,5 mol/l NaCl (J. T. Baker)
- 1 mmol/l Essigsäure (100 %) (Merck)

Vor der Befüllung der Pumpen wurden diese für 10 Minuten mit 5%igem Rinderserum (Biochrom, LOT 961 E) von innen sowie außen gespült, um eine Anheftung des Ang II an die Oberflächen im Pumpeninneren zu verhindern. Das Spülserum wurde dann mittels einer Spritze aus der Pumpe entfernt, mehrfach mit NaCl nachgespült und die Pumpe von außen mit NaCl gewaschen.

Für die Narkose wurde O<sub>2</sub> mit Isofluran (Forene, Abbott) vermischt. Dieses wurde zuerst 4,9%ig in einer kleinen Acrylschachtel und dann während der Operation 2%ig über eine Gesichtsmaske (umgedrehte 20 ml Spritze ohne Nadel und Schieber) an die Mäuse appliziert. Zur gleichmäßigen Dosierung diente ein Perfusor (Univentor, TSE).

Nach Einsetzen der Narkose wurden die Mäuse am Rücken enthaart (Pilcamed Enthaarungscreme) und nach der Fixierung auf einer Wärmeplatte mit Betaisodona desinfiziert. Für die Implantation der Pumpen wurde im Nacken ein Stück Haut eingeschnitten und im Rückenbereich die Haut von den darunter liegenden Faszien durch spreizen der eingeführten Schere getrennt. In diese Tasche konnte dann die

Pumpe mit der Öffnung zum Schwanz zeigend eingesetzt werden. Am Ende der Operation wurde die Wunde vernäht (Mersilene 5-0, Ethicon) und die Maus nach ca. 10 Minuten zurück in ihren Käfig gesetzt.

### **3.3. Entnahme und Zerteilung der Herzen**

Je nach Versuch wurden nach 24 Stunden oder 14 Tagen die Mäuse dann erneut gewogen, von dem gemessenen Gewicht jedoch das Pumpengewicht abgezogen. Danach wurden die Tiere wie oben beschrieben in Narkose versetzt, um die Herzen für die molekularbiologischen Untersuchungen zu entnehmen. Dazu wurden die Herzen nach abdominal-diaphragmalem Zugang durch Abtrennung am Gefäßstiel mit einer Schere aus dem Mäusethorax gelöst und anschließend unter fließendem Wasser gewaschen. Nun wurden die Vorhöfe bis zur Ventilebene entfernt und die verbliebenen Ventrikel mit einer Feinwaage (Sartorius) gewogen. Die Ventrikel wurden dann auf einem bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlten Metallblock gefroren und mit einem Skalpell in rechten Ventrikel, Septum sowie Endo-, Mid- und Epikard des linken Ventrikels getrennt, von denen jedoch nur Endo- und Epikard molekularbiologisch untersucht wurden. Alle Proben wurden im Anschluss sofort auf Trockeneis liegend in beschriftete Alufolie eingewickelt und in Stickstoff eingefroren. Zur Lagerung kamen die Schnitte in einen Eisschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4. Dosisfindung**

Zu Beginn sollte in einem 14-tägigen Versuch die für eine Herzhypertrophie nötige Dosis bestimmt werden. Unpublizierte laborinterne Vorversuche (23.12.2004 – 07.01.2005) mit  $0,8 \mu\text{g/Kg KG/min}$  hatten lediglich eine sehr leichte, nicht signifikante Vergrößerung der Herzen erzielt. Daher wurde zuerst eine Dosierung von  $1,6 \mu\text{g/Kg KG/min}$  festgelegt. Dieses ergab sich aus einer errechneten Dosierung von  $2 \mu\text{g/Kg KG/min}$  abzüglich eines Restbestandes der Pumpen von ca. 20%. Für diese Dosierung wurde in der Literatur ein signifikanter Anstieg des Blutdrucks beschrieben [Larkin et al. 2004]. Da diese Dosierung nicht ausreichend war, um eine Steigerung des relativen ventrikulären Herzgewichtes zu erzeugen, wurde die Dosierung auf  $3,2 \mu\text{g/Kg KG/min}$  verdoppelt. Das relative ventrikuläre Herzgewicht (ventrikuläres Herzgewicht geteilt durch das Körpergewicht) wurde als Indikator für das Ausmaß der Ventrikelhypertrophie verwendet.

Für die Dosierung von 1,6 µg/Kg KG/min wurden jeweils 5 Tiere zufällig für die Ang II-Gruppe und für die Kontrollgruppe ausgewählt. Die 5 Mäuse der Kontrollgruppe hatten ein Durchschnittsgewicht von 26,5 g, die 5 Tiere der Ang II-Gruppe ein Durchschnittsgewicht von 26,2 g. Die Mäuse der Ang II-Kohorte erhielten somit eine Dosierung von 41,9 ng Ang II/min. Während der Versuchsreihe verstarb ein Tier der Ang II-Gruppe, die restlichen 4 Mäuse hatten bei Beendigung ein Durchschnittsgewicht von 29,0 g und ein ventrikuläres Herzgewicht von 0,12 g. Die Kontrollgruppe wog im Schnitt 27,2 g bei einem ventrikulären Herzgewicht von 0,1 g.

Die Dosierung von 3,2 µg/Kg KG/min über 14 Tage wurde zuerst 5 Mäusen in der Ang II-Gruppe gegeben, im Vergleich zu 5 Tieren als Kontrolle. Die Ang II-Tiere wogen zu Beginn durchschnittlich 30,5 g, so dass sie 97,5 ng Ang II/min erhielten. Da jedoch eine Maus der Ang II-Gruppe verstarb, wurden weitere 5 Kontrolltiere und 6 Ang II-Mäuse unter gleichen Bedingungen eingeschlossen. Die sechs Ang II-Tiere wogen durchschnittlich 28,9 g und erhielten 92,4 ng Ang II/min.

Die 24 Stunden Versuchsreihe mit 3,2 µg/Kg KG/min wurde mit jeweils 10 Mäusen durchgeführt, wobei die Ang II-Mäuse im Durchschnitt 25,2 g wogen und durchschnittlich 80,7 ng Ang II/min erhielten.

### **3.5. Telemetrie**

Die telemetrische Erfassung von bestimmten Versuchstierparametern hat den Vorteil, dass die zu messenden Werte ohne Fixierung der Tiere oder sonstige Beeinflussung ermittelt werden und sie darüber hinaus sehr genau ist [Butz & Davisson 2001]. Indirekte Verfahren wie die Schwanzplethysmographie sind zwar ohne vorherige Operation durchführbar, aber weitaus ungenauer und erfordern eine Fixierung des Versuchstiers. Darüber hinaus misst die Schwanzplethysmographie lediglich den systolischen Blutdruck [Butz & Davisson 2001].

### **3.5.1. Transmitter**

Die Blutdruckmessung erfolgte radiotelemetrisch durch einen Transmitter (TA11PA-C20, PhysioTel PA Implants). Bei einem Gewicht von 3,4 g und einer Katheterlänge von 5 cm betrug der Katheterdurchschnitt 4 mm.

Nach magnetischer Aktivierung des Transmitters wurde die Herzfrequenz, der mittlere arterielle Blutdruck (MAD), der systolische und der diastolische Blutdruck kontinuierlich alle fünf Minuten eine Minute lang gemessen und radiotelemetrisch auf einen Receiver übertragen. Dieser leitete die Informationen nach Umschreibung in eine kompatible Form an einen Computer weiter, wo diese mit Hilfe der entsprechenden Software (Dataquest A.R.T. Data Acquisition, DSI Data Sciences int.) gespeichert und mit dem Computerprogramm Dataquest A.R.T. Data Analysis ausgewertet wird. Durch 12stündiges Spülen in NaCl-Lösung vor der Implantation wurden die Katheter stabilisiert, daran anschliessend folgte eine 24stündige Messung vor der Implantation zur Nulllinienermittlung der Sender.

### **3.5.2. Implantation der Telemetriesender**

Die Narkose erfolgte wie unter *Implantation der osmotischen Pumpen* beschrieben. Nach Entfernung der Haare am Hals der Tiere durch Enthaarungscreme wurde die Fläche mit Betailsodona desinfiziert und die Maus auf einer Wärmeplatte in Rückenlage fixiert. Der Hals wurde mit einem um die oberen Schneidezähne gelegten Faden gestreckt und fixiert. Mit einem Skalpell wurde ein medianer Hautschnitt zwischen Sternum und Mandibula durchgeführt. Danach konnte die Haut auf der linken Seite mobilisiert werden, um dort nach der Implantation des Katheters den Telemetriesender zu platzieren. Die linke Arteria carotis communis wurde stereomikroskopisch (LEICA MZ 75) ohne Verletzung der regionalen Nerven freipräpariert. Zur Ligation und Spannung des Gefäßes wurden zwei Fäden an beweglichen Klemmen befestigt, von denen der erste Faden an der Carotisgabel und der zweite ca. 0,5 cm proximal vom ersten befestigt wurde. Der zweite Haltefaden sollte bei der folgenden Katheterimplantation den Blutfluss unterbrechen. Der Telemetriesender wurde auf einer sterilen Kompresse gelagert und der Sender mit NaCl-Lösung angefeuchtet. Die Katheterspitze wurde mit einem biokompatiblen Gel gefüllt und nach Punction der Arterie gleich proximal des ersten Fadens mit einer Kanüle (Sterican® 25 G, Braun), der Katheter mit einer Spezialpinzette implantiert. Nach Lockerung des zweiten Fadens wurde der Katheter bis ca. 2 mm in den Aortenbogen hinein platziert. Der Katheter wurde durch das Zuknoten der Fäden sowie durch den Einsatz von Gewebekleber



(Histoacryl) fixiert. Jetzt konnte der Telemetriesender unter die Haut geschoben und ebenfalls mit Gewebekleber befestigt werden. Nach Reposition der Speicheldrüsen wurde die Wunde mit einer Einzelknopfnah (Mersilene 5-0, Ethicon) verschlossen und mit Betaisodona desinfiziert. Zum Abschluss erfolgten eine subkutane Injektion von 1 ml NaCl zum Flüssigkeitsausgleich und das Zurücksetzen in den Käfig. Nach diesem Verfahren wurden vier 30 bis 40 g schwere Tiere mit einem Sender ausgestattet.

### **3.5.3. Telemetrische Messung mit 1,6 µg und 3,2 µg Ang II**

Fünf Tage postoperativ wurde mit der ersten Messung begonnen. Zuerst sollten die Ausgangswerte vor Ang II-Applikation bestimmt werden. Dazu wurden über drei Tage die Parameter gemessen und gemittelt. Am vierten Tag folgte die Implantation der osmotischen Pumpen. Ab dem fünften Tag begann dann die telemetrische Messung unter Ang II.

Während der telemetrischen Messungen blieben die Tiere in ihren Einzelkäfigen (Makrolon, Eurostandard type II cages, Techniplast, Italy) in einem Messraum, der ausschließlich für die telemetrischen Messungen genutzt wurde. Für die Messung mit 1,6 µg Ang II/Kg KG/min wurden vier Mäuse eingesetzt.

Die Telemetriemäuse erhielten bei einem Gewicht von:

Maus 1:	40,5 g	64,7 ng Ang II/min
Maus 2:	34,2 g	54,7 ng Ang II/min
Maus 3:	37,1 g	59,3 ng Ang II/min
Maus 4:	36,1 g	57,7 ng Ang II/min

Für die telemetrischen Messungen mit 3,6 µg Ang II/Kg KG/min wurden die gleichen Mäuse verwandt, diese bekamen bei Gewichten von:

Maus 1:	42,8 g	136,9 ng Ang II/min
Maus 2:	35,2 g	112,5 ng Ang II/min
Maus 3:	27,1 g	86,6 ng Ang II/min
Maus 4:	28 g	89,6 ng Ang II/min

## **3.6. Isolierung der RNA**

Im Vorfeld der Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden der Isolierung durchgeführt und die Proben auf ihren RNA-Gehalt hin verglichen. Die von Chromczynsk & Sacchi (1986) beschriebene „Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction“ (AGPC-Methode) hatte einen deutlich höheren RNA-Gehalt als

die laboreigene Methode. Es zeigte sich außerdem, dass es von wesentlicher Bedeutung ist, ausschließlich RNase freies und nur für diese Arbeit verwendetes Arbeitsmaterial sowie Reagenzien zu verwenden. Wegen ihrer Instabilität wurde die RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und während der Isolierungsarbeiten auf Eis gestellt.

Der erste Schritt war das Homogenisieren der Mäuseherzen. Dazu wurde 2 ml Lösung D (Denaturation) + Mercaptoethanol (EtSH) in einen (14 ml) Falcon (Greiner) pipettiert. Lösung D wurde als größere Menge angerührt und dann immer als Aliquot abgefüllt, um die nächsten RNA-Ansätze vor Verunreinigungen zu schützen.

**Lösung D:** 250 g GTC, Guanidin Thiocyanat (Fluka) direkt aus dem Lieferbehälter in das Reaktionsgefäß geschüttet  
293 ml DEPC- $\text{H}_2\text{O}$   
17,6 ml Natrium Citrat (0,75 M) ca. pH 7 (Merck)  
26,5 ml 10% Sarcosyl, N-Lauroylsarcosin Natriumsalz (Fluka)

Dieses Gemisch wurde dann im Wasserbad (Julabo) bei  $64^{\circ}\text{C}$  gelöst. Das EtSH wurde erst vor einer RNA-Isolierung in den Lsg. D Aliquot zugegeben, da es sonst flüchtig gewesen wäre. Hierbei wurden 360  $\mu\text{l}$  EtSH auf 50 ml Lösung D gegeben.

**DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ :** 400 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
400  $\mu\text{l}$  DEPC, Diethyl Pyrocarbonat (Sigma)

Dieses wurde nach einer Nacht unter dem Abzug noch autoklaviert (Kelvitron, Heraeus Instruments) (8 Stunden bei  $160^{\circ}\text{C}$ ).

**Natrium Citrat (0,75 M) pH 7:** 55,1 g Natrium Citrat  
ca. 6 ml HCL 1 mol/l (Merck)  
mit Milli-Q- $\text{H}_2\text{O}$  bis auf 250 ml auffüllen

Der pH-Wert wurde mit einem Gerät von Mettler (Toledo 320 pH Meter) gemessen.

**Sarcosyl 10%:** 10 g Sarcosyl  
100 ml DEPC- $\text{H}_2\text{O}$

Natrium Citrat und Sarcosyl 10% wurden mit dem RCT basic (Jahnke und Kumpel) in Lösung gebracht.

In den Falcon mit Lösung D + EtSH wurde nun das gefrorene Gewebe hinzugegeben, möglichst ohne dabei aufzutauen. Mit einem Mörser (Ultra-Turrax, Janke und Kumpel) wurde das Herzgewebe zerkleinert und gelöst. Vor und zwischen den einzelnen Proben wurde der Mörser mit DEPC-H<sub>2</sub>O gereinigt. In die Falcons mit den gemörserten Herzen wurde nun mit anschließend starkem Schütteln gegeben:

200 µl Natriumacetat (2 M) pH 4,8-5,2  
2 ml saures, H<sub>2</sub>O gesättigtes Phenol (Roth)  
400 µl Chloroform (Merck)

**2 M Natriumacetat pH 4,8-5,2 :** 41 g Natriumacetat (Merck)  
ca. 75 ml Essigsäure (100%)  
mit DEPC-H<sub>2</sub>O bis auf 250 ml auffüllen

Nach 15 minütiger Ruhezeit auf Eis wurde der Ansatz auf zwei bis drei 2 ml Eppendorf-Gefäße verteilt und das ganze für 20 Minuten bei 4°C mit 12000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5417 R). Nach der dabei auftretenden Phasentrennung wurde die obere, die RNA enthaltende Phase vorsichtig abpipettiert und mit 2 ml Isopropanol (Riedel) gemischt. Anschließend wurde das Gemisch für mindestens 1 Stunde bei –20°C ruhen gelassen und erst danach wieder mit gleicher Einstellung zentrifugiert. Wichtig war hierbei, die Eppendorf Gefäße in einer bestimmten Anordnung, z. B. mit den Deckelspitzen nach innen in die Zentrifuge zu setzen, da man für das nachfolgende Abpipettieren wissen musste, wo sich die RNA Pellets befanden. Ansonsten wäre man Gefahr gelaufen, bei einem sehr kleinen, nicht sichtbaren Pellet dieses mit zu entfernen. Nun erfolgte eine Resuspendierung des Pellets mit:

400 µl Lösung D + EtSH,  
40 µl Natriumacetat  
440 µl Ethanol (100%) (Merck)

sowie eine mindestens einstündige Ruhephase bei –20°C. Nach dieser Kühlung wurde zunächst zentrifugiert (20 Minuten, 4°C, 12000 rpm) und wieder die Flüssigkeit abpipettiert. Im Anschluss wurde ein Waschvorgang mit Ethanol (70%), bestehend aus 7 Teilen 100% Ethanol und 3 Teilen DEPC-H<sub>2</sub>O, durchgeführt und bei gleicher Einstellung zentrifugiert. Zum Abschluss wurde die Flüssigkeit abpipettiert, das Pellet für 10-15 Minuten im „Speed vac“ getrocknet (Concentrator 5301, Eppendorf) und

dann je nach Gewebegröße in 10 bis 100  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Die RNA aus den Herzen war nun von DNA und Proteinen gereinigt und weiter verwertbar.

### **3.7. Messung der RNA-Konzentration**

Die Messung der RNA-Konzentration war nötig, um für die Reverse Transkription die richtige Menge an RNA-Flüssigkeit einzusetzen. Zu diesem Zweck war es möglich, ein Gerät des Zentrums für Molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg (ZMNH) zu benutzen. Dieses Messgerät (Agilent 2100 bioanalyzer) detektiert RNA im Vergleich zu einer RNA-Leiter im Bereich von 5 – 500  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Hierfür war ein Farbstoff nötig, der in dem zugehörige RNA 6000 Nano Assay Kit enthalten war. Zu Beginn wurden die verwendeten Substanzen aus dem Kühlschrank geholt und innerhalb einer halben Stunde auf Raumtemperatur erwärmt. Danach wurde der Gelmix in einem befilterten Eppendorf-Gefäß zentrifugiert (10 Minuten, 1500 rpm) und zu je 65  $\mu\text{l}$  als Aliquot in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt. In einen dieser Aliquots wurde jetzt 1  $\mu\text{l}$  des vorher für 10 Sekunden geschüttelten Dyes (Farbstoff) gegeben und anschließend lichtdicht verpackt, da der Farbstoff durch Licht zerfällt. Nach dem Transport aller Utensilien in das ZMNH, die Proben und die RNA-Leiter auf Eis liegend, wurde dieser Gel-Dye-Mix nun für 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und anschließend wieder lichtdicht verpackt. Nun folgend wurden 2-3  $\mu\text{l}$  der auf ihre RNA-Konzentration hin zu untersuchenden Flüssigkeit sowie die RNA-Leiter (RNA-Ladder 6000, Ambion) für 2 min bei  $70^\circ\text{C}$  denaturiert. Der Agilent 2100 wurde zu Beginn für eine min mit 350  $\mu\text{l}$  RNaseZap in einem Reinigungs-Chip von RNasen befreit. Hieran schloss sich ein Spülen in DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  in einem gesonderten Chip an. Erst jetzt wurde der eigentliche Analyse Nano-Chip aus der RNase freien Packung genommen und in der Priming-Station wie folgt beladen. Nachdem 9  $\mu\text{l}$  Gel-Dye-Mix in die mit G markierte Öffnung pipettiert wurden, wurde die Priming-Station geschlossen und die vormontierte Spritze für 30 Sekunden herunter gedrückt, bis sie arretiert war. Dadurch wurden die 9  $\mu\text{l}$  im Chip mit Druck verteilt. Nach dem Lösen der Arretierung wurde in zwei weitere Öffnungen ebenfalls 9  $\mu\text{l}$  Gel-Dye-Mix gegeben. Nun wurden 5  $\mu\text{l}$  Nano Marker in die 12 Probenöffnungen sowie in die für die RNA-Leiter gefüllt. In diese kamen jetzt jeweils 1  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Probe und in eine die RNA-Leiter. Um die Flüssigkeit gut im Chip zu verteilen, wurde dieser jetzt für eine Minute bei 2400 rpm mit einem Adapter (Agilent) geschüttelt. Schließlich konnte dieser in den Agilent 2100 gesteckt und analysiert werden. Das zugehörige Programm ermittelte dann die RNA-Konzentration sowie das Verhältnis von 28 S RNA zu 18 S RNA, welches als Ausdruck

für die Qualität der Isolierung steht. Durch die Kenntnis des RNA-Gehaltes einer jeden Probe ließ sich nun errechnen, wie viel aus jeder entnommen werden musste, um die für die folgende Reverse Transkription nötige RNA-Konzentration (0,14 µg auf 38,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O) zu erhalten. Da in diesem Pipettierschritt jedoch eine weitere ungewollte Veränderung der RNA-Konzentration möglich war, wurde ein kleiner Teil eines jeden RNA-DEPC-H<sub>2</sub>O-Ansatzes noch einmal mit dem Agilent 2100 bioanalyser vermessen. Da in den Proben jetzt jedoch deutlich weniger RNA enthalten war, wurde das Agilent RNA 6000 Pico Kit verwendet. Der Ablauf war dem des Nano Kit sehr ähnlich, nach dem Einpipettieren des Gel-Dye-Mix wurden jedoch 9 µl Conditioning Solution in die mit Cs markierte Öffnung gegeben und im Anschluss hieran 5 µl Pico Marker in die Probenöffnungen. Diese Messung mit dem Pico Kit wurde pro Probe dreimal durchgeführt und anschließend ein Mittelwert gebildet. Durch diesen weiteren Schritt war es möglich, die genaue Menge der in die Reverse Transkriptase eingesetzte RNA zu bestimmen und die späteren PCR-Ergebnisse auf die nun sehr genau vermessenen Ausgangskonzentrationen an RNA zu beziehen.

### **3.8. Reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA**

In diesem Schritt sollte die isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden, da diese durch die PCR (Polymerase Chain Reaktion) vervielfältigt werden und die Menge eines Genproduktes bestimmt werden kann. Für diese Reverse Transkription (RT) wurde das Enzym Reverse Transkriptase verwendet. Es wurde hier im Folgenden mit dem RT Kit von Roche gearbeitet. Für einen 20 µl RT Ansatz wurde verwendet:

- 2 µl 10 x Reaction Buffer
- 4,4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 4 µl desoxy Nukleotide (dNTPs)
- 1 µl Primer
- 0,4 µl RNase Inhibitor
- 0,5 µl Reverse Transkriptase (50 U/µl)
- 7,7 µl DEPC-H<sub>2</sub>O mit gelöster RNA (0,14 µg auf 38,5 µl, Konzentration war aus der RNA Messung mit dem Agilent 2100 bekannt)

Diese 20 µl RT Ansatz wurden für 10 min bei 25°C, danach für 30 min bei 48°C und zum Beenden der Reaktion für 5 min bei 95°C erhitzt (TB1Whatman, Biometra). Als

negative Kontrolle wurde bei einem Ansatz keine Reverse Transkriptase hinzugegeben, so dass in diesem Gefäß später keine cDNA enthalten sein konnte. Um eine Standardreihe als Vergleich für die PCR zu haben, wurden 2 µg RNA eines Herzseptums auf 38,5 µl DPC-H<sub>2</sub>O in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde, wenn nicht gleich weiter verwandt, bei -20°C gelagert.

### 3.9. Quantitative Real Time PCR

Die quantitative Real Time PCR diente zur Amplifikation der mit der RT gewonnenen cDNA bei gleichzeitiger Darstellung des Verlaufes und Mengenangabe der Ausgangs-DNA. Es wurde der „LightCycler“ sowie das TaqMan Master Kit von Roche eingesetzt. Das Prinzip dieser PCR-Form ist, dass in den Reaktionsansatz Sonden zugefügt werden, die aus einem fluoreszierenden (Reporter) und einem unterdrückenden Teil (Quencher) bestehen. Diese binden komplementär an die cDNA und werden während der Elongationsphase von der 5'-3'-Nukleaseaktivität der Taq Polymerase zerschnitten, so dass der unterdrückende Teil nicht mehr so dicht bei dem fluoreszierenden Teil liegt und damit die Fluoreszenz nicht mehr unterdrücken kann. Diese kann von dem LightCycler gemessen werden und steht dabei für die Menge an amplifizierter DNA, die auf die jeweilige mRNA-Menge eines jeden Gens rückschließen lässt. Im Einzelnen wurden verwandt:

5 µl PCR-H<sub>2</sub>O

4 µl PCR MIX (bestehend aus FastStart Taq DNA Polymerase, Puffer, MgCl<sub>2</sub> und dNTPs)

2 µl Primer forward

2 µl Primer reverse

2 µl Primer als Sonde

Um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen, wurden zuerst die Bestandteile in einen Ansatz für alle Proben zusammengegeben und dann à 15 µl auf Glaskapillaren (Roche) verteilt, die in einem gekühlten Zentrifugier-Adapter (Roche) standen. Da bei dem Pipettieren immer ein wenig Flüssigkeit an den Spitzen verblieb, wurde für den gemeinsamen Ansatz eine Probe mehr angesetzt, als zu testen war. Um die zum Teil empfindlichen Substanzen zu schonen, wurden alle Behälter auf Eis gelagert. Hierzu kamen nun jeweils 5 µl cDNA der zu testenden Probe.

Diese insgesamt 20 µl PCR-Ansätze wurden danach für 5 Sekunden bei 3000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5417R), so dass sie sich in den dünnen Kapillaren absenkten. Um die Menge an Ausgangs-DNA in der zu testenden Probe zu bestimmen, war es nötig, eine Vergleichsreihe als Standard einzusetzen, welche wie bei *Reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA* beschrieben hergestellt wurde. Von dieser wurden je zwei Ansätze mit der unverdünnten cDNA Konzentration, zwei im Verdünnungsverhältnis 1:10, drei im Verhältnis 1:100 sowie drei 1:1000 durch Hinzugabe von PCR-Wasser angesetzt. Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurde aus dem unverdünnten cDNA Ansatz 5 µl abpipettiert und in 45 µl PCR-Wasser gegeben, von dieser dann 1:10 verdünnten Lösung dann wieder 5 µl in 45 µl PCR-Wasser usw. Die Zweit- oder Drittansätze dienten zur Kontrolle insbesondere bei den höheren Verdünnungen, bei denen häufiger ein Wert streut. Als 11. Probe wurde eine Negativkontrolle eingesetzt, bestehend aus 15 µl PCR-Mix und 5 µl aus dem bei *Reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA* beschriebenen negativem RT-Ansatz, der keine cDNA beinhaltet. Um festzustellen, ob das verwendete Wasser (Roche) wirklich DNA frei war, wurde in die 12. Glaskapillare zu den 15 µl des gemeinsamen PCR-Mix 5 µl Wasser gegeben. Dadurch, dass die cDNA der Standardreihe in mehreren unterschiedlichen Konzentrationen amplifiziert wurde, war es nun möglich, die Ausgangsmenge an DNA zu ermitteln. Dieses geschah, in dem der LightCycler den CT-Wert (Cycle Threshold) einer jeden Probe feststellte. Die zugehörige Software errechnete nun mit den CT-Werten der Standardreihe die Konzentration an Ausgangs-DNA pro Probe. Durch den fortwährenden Einsatz einer Standardreihe war es dann auch zulässig, verschiedene PCR-Durchgänge miteinander zu vergleichen.

Die Primer wurden ausgewählt anhand von Daten des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Es wurden folgende Primer von Operon verwendet:

#### **Kv 4.2**

*Forward:* 5'-CGT GAC CAC AGC AAT AAT TAG CA-3'

*Reverse:* 5'-TTC CTC CCG AAT ACT CAG GAG ACT-3'

*Sonde:* 5'-[6-FAM]-TCC AAC ACC TCC AGT AAC CAC CCC A-[TAMRA-Q]-3'

#### **Kv 4.3**

*Forward:* 5'-CAG CGG TGT CCT GGT CAT T-3'

*Reverse:* 5'-CTC TCT GAT TCT GGT GGT AGA TCC T-3'

*Sonde:* 5'-[6-FAM]-CCGGTCCCTGTGATAGTCTCCAACCTTTAGC-[TAMRA-Q]-3'

## **KChIP 2**

*Forward:* 5'-ACA GAC CAA GTT CAC ACG CA-3'

*Reverse:* 5'-TCG TTC TTG AAG CCT CGG T-3'

*Sonde:* 5'-[6-FAM]-CGG TAC AGG ACC TGC AGC TCT C-[TAMRA-Q]-3'

## **Kv1.4**

*Forward:* 5'-CAG TAA CGA GGA CTC TGC AAT ACC-3'

*Reverse:* 5'-TCC CAA ATA TCC ACG GAA CAA-3'

*Sonde:* 5'-[6-FAM]-CCC CCT GGC CAA GAC AAC CGA-[TAMRA-Q]-3'

## **β-Aktin**

*Forward:* 5'-ACC TTC AAC ACC CCA GCC A-3'

*Reverse:* 5'-CAG TGG TAC GAC CAG AGG CA-3'

*Sonde:* 5'-[6-FAM]-ACG TAG CCA TCC AGG CTG TGT TGT CC-[TAMRA-Q]-3'

## **HGPRT**

*Forward:* 5'-GTT GCA AGC TTG CTG GTG AA-3'

*Reverse:* 5'-GAT TCA AAT CCC TGA AGT ACT CA-3'

*Sonde:* 5'-[6-FAM]-CCT CTC GAA GTG TTG GAT ACA GGC CA-[TAMRA-Q]-3'

## **ANF**

*Forward:* 5'-GCC TTG CGG TGT GTC A-3'

*Reverse:* 5'-TGC AGC TCC AGG AGG GTA TT-3'

*Sonde:* 5'-[6-FAM]-CAG CTT GTC GCA TTG CCA CT-[TAMRA-Q]-3'

β-Aktin und HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) wurden auf ihre Verwendbarkeit als Haushaltsgene hin geprüft. Haushaltsgene kodieren für Proteine, deren Bildung nicht durch äußere Faktoren wie z.B. die Ang II-Dosis reguliert wird, sondern die im Idealfall konstitutiv produziert werden. Diese benötigt man, wenn man unterschiedliche PCR-Verläufe von verschiedenen Genen miteinander vergleichen will. Dafür normalisiert man die erhaltenen Ergebnisse der Proben auf die Werte der Haushaltsgene.

Das verwendete PCR-Programm entstammte dem TaqMan-Handbuch. Es begann mit einer 10minütigen Präinkubationsphase zur Aktivierung der Taq-Polymerase und DNA-Denaturation. Hieran schloss sich die Amplifikationsphase an, die aus 45 sich wiederholenden Zyklen bestand. Ein Zyklus begann jeweils mit einer 10 Sekunden dauernden Denaturationsphase bei 95°C, um gepaarte Stränge von einander zu trennen.



An diese schloss sich das 20 Sekunden dauernde Annealing bei 57°C-59°C (je nach Primer) an, während dessen die Primer komplementär an die Matrizen banden. Der eigentliche Vermehrungsschritt folgte in der abschließenden 1 sekundigen Elongationsphase bei 72°C, innerhalb derer die Taq-Polymerasen an die Primer banden und einen komplementären Strang der Matrize herstellten. Am Ende eines jeden Zyklus wurde die Intensität der Fluoreszenz ermittelt und durch die Software graphisch nach Intensität und Zyklus dargestellt. Den 45 Zyklen folgte zuletzt eine 30 Sekunden lange Kühlungsphase bei 40°C.

Nach Beendigung der Real Time PCR sollte mittels der Gelelektrophorese nachgewiesen werden, dass nur eine DNA amplifiziert wurde und diese somit für die Fluoreszenz verantwortlich war. Dafür wurden diese in Eppendorf-Röhrchen zentrifugiert und jeweils mit 1,5 µl Loading-Buffer vermischt.

**Loading-Buffer:** 50 % Glycerol  
1 % Bromphenolblau gesättigt  
1 % Xylenecyanol (10 %)  
2 % 50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA):

**50 x TAE:** 242 g Tris-Base  
57,1 g Eisessig  
100 ml EDTA (0,5 M) pH 8,0

Das **Gel** wurde hergestellt aus: 1 g Agarose auf  
100 ml 0,5 x TBE (Tris-Borat-EDTA):

100 ml 0,5 x **TBE:** 54 g Tris-Base  
27,5 g Borsäure  
20 ml EDTA (0,5 M) pH 8,0 auf 1:10 verdünnt

Diese wurden in einem Becherglas gemischt, in einer Mikrowelle zum Sieden gebracht und anschließend noch 6 µl (0,5 µg/ml) Ethidiumbromid (Sigma) zur Anfärbung der DNA hinzugegeben. Die verfestigten Gele kamen anschliessend in 0,5 x TBE als Laufpuffer. Nun konnten die PCR-Produkte sowie eine DNA-Leiter (1 kb Plus,

Invitrogen) als Vergleich in die jeweilige Tasche hinzugegeben werden. Nach 45 minütiger Auftrennung durch Anlage einer Spannung von 110 Volt konnte das Gel dann mit Hilfe von UV-Licht (UV-Transilluminator Kaiser RS 1, Biometra) der Wellenlänge 254 nm auf die Anzahl der Amplifikate untersucht werden. Diese wurden mit einer Kamera (Computar) fotografiert und mit der DNA-Leiter auf die Anzahl von Basenpaaren verglichen.

### **3.11. Datenauswertung**

Aus den in den Versuchen gewonnenen Daten wurden mittels PC-Software (Microsoft Excel) Mittelwerte gebildet und die Standardmessfehler (SEM) errechnet. Außerdem wurden die Daten hinsichtlich der Signifikanzprüfung einem einfaktoriellen ANOVA unterzogen. Die Signifikanzniveaus wurden vorher für signifikant  $p < 0,05$ , sehr signifikant  $p < 0,01$  und hoch signifikant  $p < 0,001$  festgelegt.

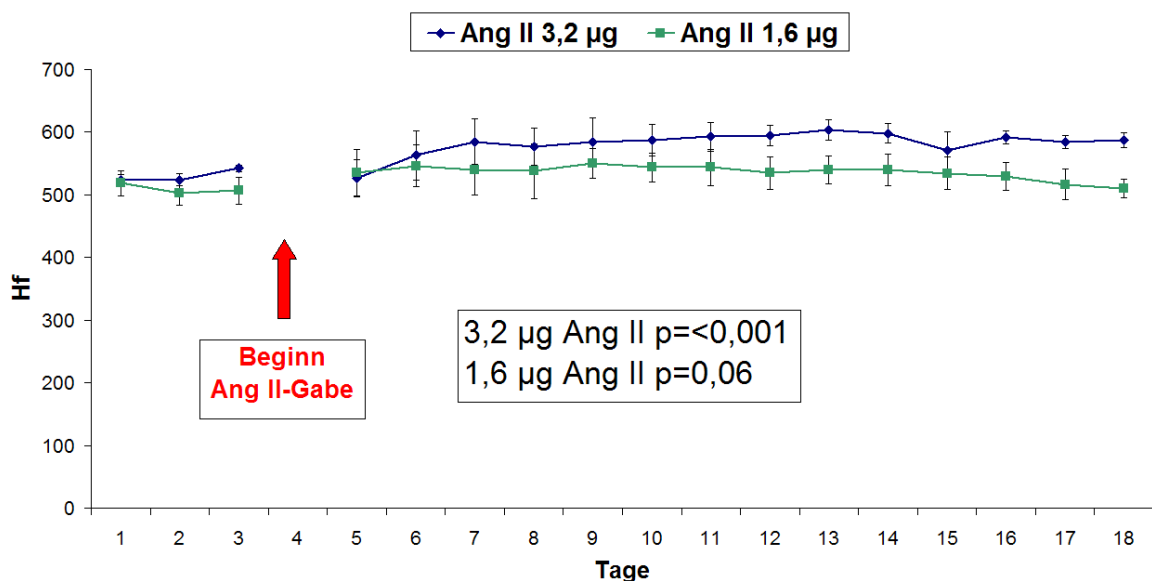
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Telemetrie

Vier Mäusen mit implantierten Telemetriesendern wurde für 14 Tage Ang II über osmotische Pumpen verabreicht, um Veränderungen der Herzfrequenz, des MAD, des systolischen und des diastolischen Blutdruckes zu ermitteln. Dabei reagierten die Versuchstiere deutlich bei der Messreihe mit 3,2  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  KG/min und weniger stark mit 1,6  $\mu\text{g}$  Ang II/Kg KG/min mit einem Anstieg der Herzfrequenz, des MAD, des systolischen und des diastolischen Blutdruckes. Der Anstieg aller vier Parameter erfolgte über drei Tage.

#### 4.1.1. Herzfrequenz

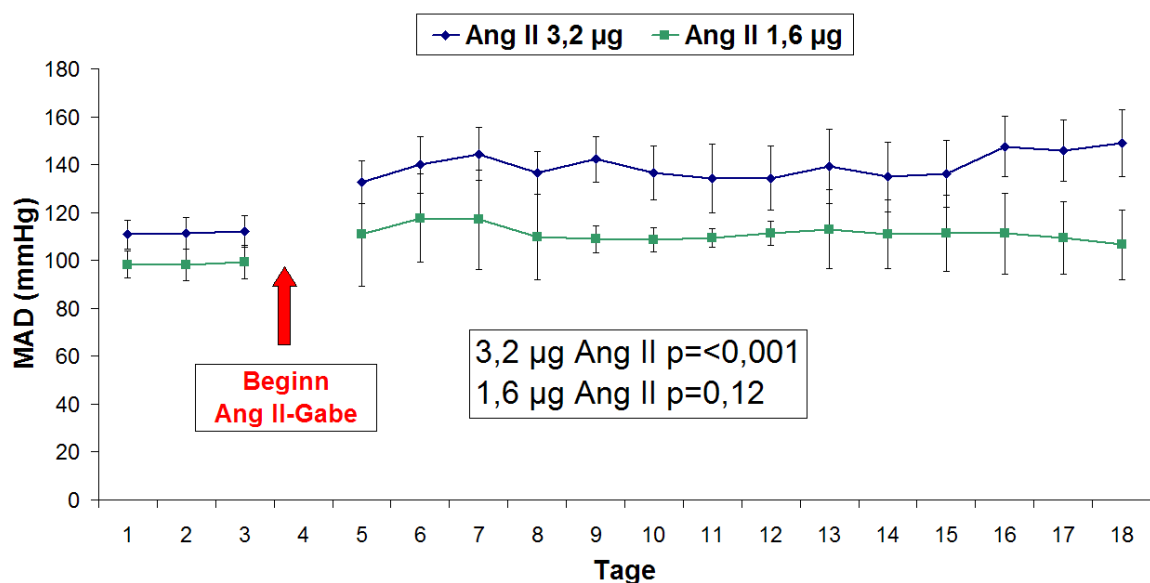
Die basale Herzfrequenz vor Beginn der Infusion war in der Messreihe mit 3,2  $\mu\text{g}$  Ang II mit  $530 \pm 5$  um 21 Schläge pro Minute etwas schneller als in der Messreihe mit 1,6  $\mu\text{g}$  Ang II ( $509/\text{min} \pm 11$ ). Unter Ang II-Applikation stieg die Herzfrequenz bei 1,6  $\mu\text{g}$  nach fünf Tagen auf maximal  $550/\text{min} \pm 24$  und war in der Summe der gemessenen Herzfrequenzen über die 14 Tage nicht signifikant erhöht ( $p=0,06$ ). Unter 3,2  $\mu\text{g}$  stieg die Herzfrequenz auf maximal  $604/\text{min} \pm 17$  nach 9 Tagen und war im Vergleich der Mittelwerte der Ausgangsmessung und Ang II-Messung hoch signifikant erhöht. Gegen Ende der Applikation von 1,6  $\mu\text{g}$  Ang II erreichte die Herzfrequenz wieder nahezu den Ausgangswert (**Abb. 9**).



**Abb. 9) Darstellung der Herzfrequenz unter Ang II.** Mittelwert der Herzfrequenz (Hf) von vier Mäusen mit Telemetrie-Sendern, denen nach drei Tagen Ausgangswertbestimmung 1,6  $\mu\text{g}$  Ang II/Kg KG/min und später 3,2  $\mu\text{g}$  Ang II verabreicht wurden. Angegeben sind die SEM.

#### 4.1.2. Mittlerer Arterieller Blutdruck

Die mittleren Ausgangswerte des MAD differierten zwischen den beiden Versuchsreihen. Bei der Messung mit 3,2 µg Ang II, die mit den gleichen Tieren im Abstand von 4 Wochen nach Beendigung der ersten Messung mit 1,6 µg durchgeführt wurden, lag der Ausgangs-MAD im Schnitt 13 mmHg höher. Der MAD stieg nach Ang II-Gabe rasch an, bei 1,6 µg Ang II von einem Ausgangsmittelwert von 98,6 mmHg  $\pm$ 12,8 auf maximal 117,6 mmHg  $\pm$ 18,4 und durchschnittlich auf nicht signifikante 111,2 mmHg  $\pm$ 3,6 ( $p=0,12$ ). Bei 3,2 µg Ang II stieg der MAD von 111,5 mmHg  $\pm$ 3,3 auf maximal 144,4 mmHg  $\pm$ 11, durchschnittlich auf 139,6 mmHg  $\pm$ 3, was eine hoch signifikante Steigerung des MAD darstellte. Die Maxima wurden nach zwei bzw. nach drei Tagen gemessen. Bei beiden Messungen folgte hierauf ein leichter Abfall des MAD. Bei der Messung mit 3,2 µg Ang II war am 11. Tag ein erneuter Anstieg des MAD auf 149 mmHg  $\pm$ 13,9 festzustellen, während zum Ende der ersten Messung mit 1,6 µg ein leichter Abfall auf 106,5 mmHg  $\pm$ 11,4 eintrat (**Abb. 10**).

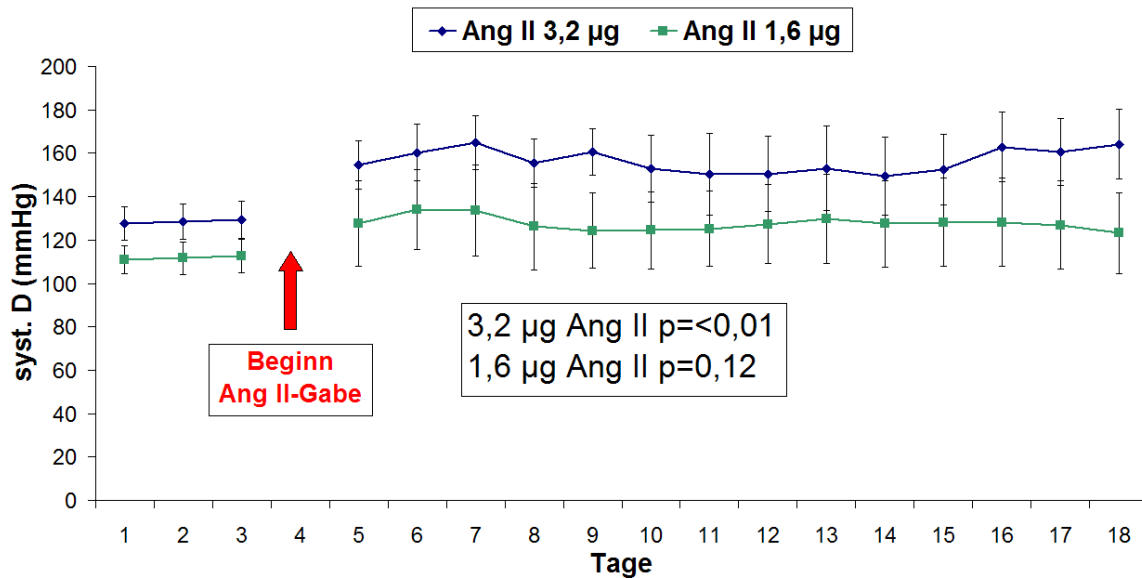


**Abb. 10) Darstellung des MAD unter Ang II.** Mittelwert des MAD in mmHg von vier Mäusen mit Telemetrie-Sendern, denen nach drei Tagen Ausgangswertbestimmung 1,6 µg Ang II/Kg KG/min und später 3,2 µg Ang II verabreicht wurden. Angegeben sind die SEM.

#### 4.1.3. Systolischer Blutdruck

Der Durchschnitt der Ausgangswerte des systolischen Blutdruck lag in der ersten Messreihe bei 111,7 mmHg  $\pm$ 3,8 und stieg im Durchschnitt auf nicht signifikante 127,6 mmHg  $\pm$ 4,5 an. Zu Beginn der Messung mit 3,2 µg Ang II hatten die Tiere bereits einen systolischen Blutdruck von 128,5 mmHg  $\pm$ 4,3, der im Schnitt auf 156,6 mmHg  $\pm$ 3,7 kletterte, was einen sehr signifikant Anstieg darstellt. Wie bei dem MAD beschrieben,

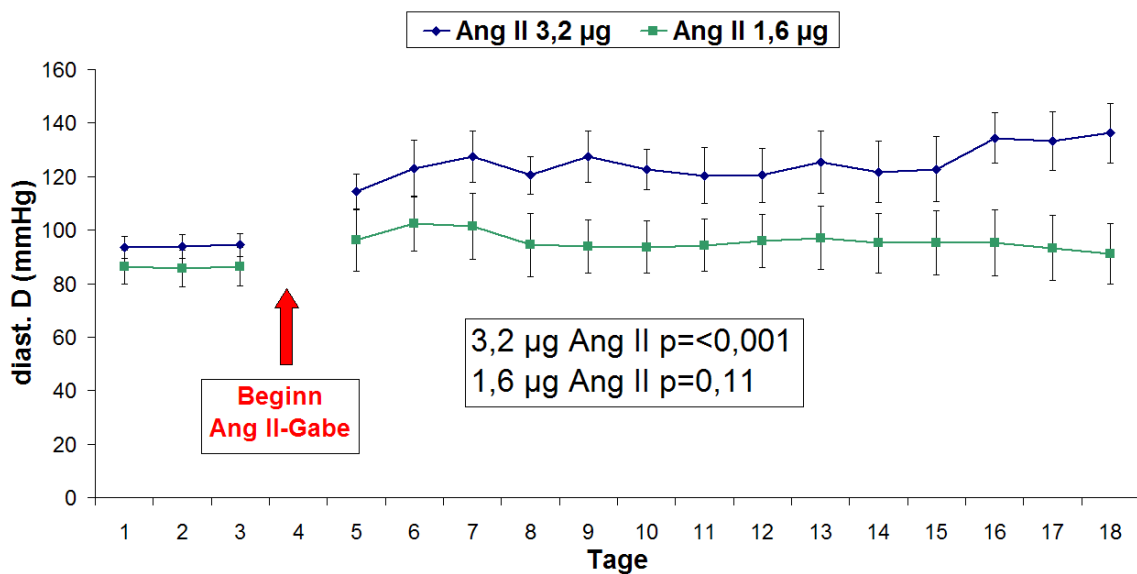
trat auch hier unter 1,6 µg Ang II gegen Ende ein Abfall des systolischen Blutdrucks auf, während unter der höheren Dosierung ein zweiter Anstieg auf 162,1 mmHg ±16,1 zu sehen war (Abb. 11).



**Abb. 11) Darstellung des systolischen arteriellen Blutdrucks unter Ang II.** Mittelwert des systolischen arteriellen Drucks in mmHg von vier Mäusen mit Telemetrie-Sendern, denen nach drei Tagen Ausgangswertbestimmung 1,6 µg Ang II/Kg KG/min und später 3,2 µg Ang II verabreicht wurden. Angegeben sind die SEM.

#### 4.1.4. Diastolischer Blutdruck

Die diastolischen Ausgangswerte lagen bei 86,1 mmHg ±3,6 für die Messung mit 1,6 µg Ang II und 94 mmHg ±7,8 für die doppelte Dosis. Nach Ang II-Gabe kam es in der ersten Versuchsreihe zu einem nicht signifikanten Anstieg auf durchschnittlich 95,7 mmHg ±2,6 sowie zu einem hoch signifikanten Anstieg bei 3,2 µg Ang II auf 125 mmHg ±2,5. Auch der diastolische Blutdruck fiel in der geringeren Dosis gegen Ende ab, während bei der doppelten Dosis eine erneute Steigerung auftrat (Abb. 12).

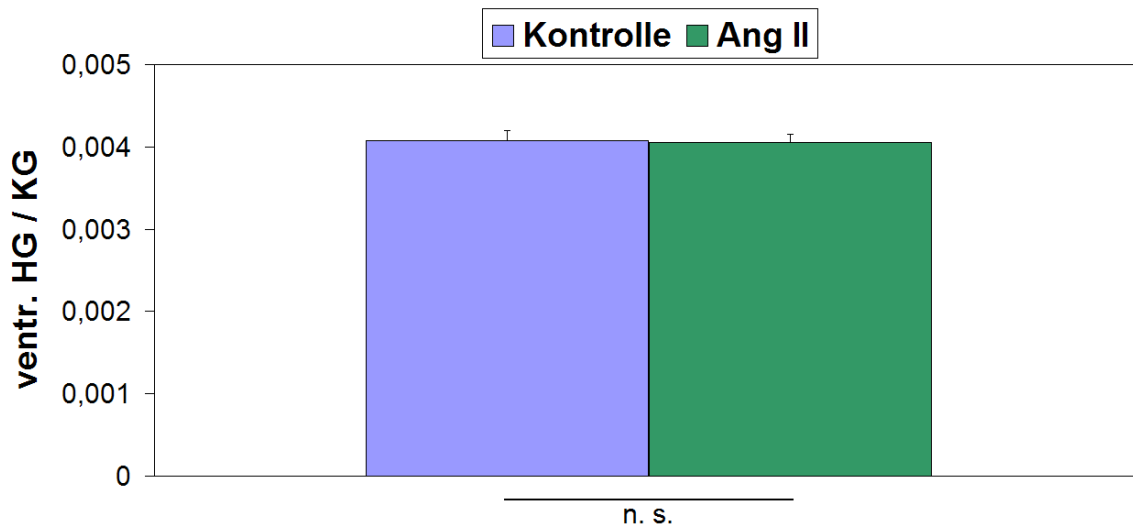


**Abb. 12) Darstellung des diastolischen arteriellen Blutdrucks unter Ang II.** Mittelwerte des diastolischen Blutdrucks in mmHg von vier Mäusen mit Telemetrie-Sendern, denen nach drei Tagen Ausgangswertbestimmung 1,6 µg Ang II/Kg KG/min und später 3,2 µg Ang II verabreicht wurden. Angegeben sind die SEM.

## 4.2. Herzgewichte

### 4.2.1. Relatives ventrikuläres Herzgewicht bei 1,6 µg Ang II für 14 Tage

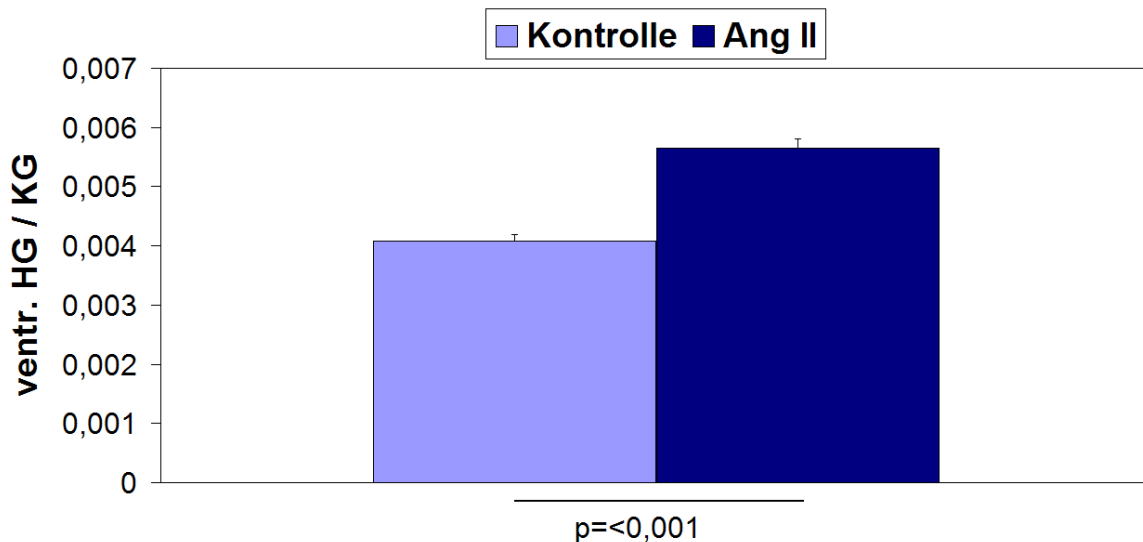
Zur Ermittlung des prohypertrophen Effekts von Ang II auf das Herz der Maus wurden zwei Gruppen gebildet. Diesen wurde über 14 Tage entweder 1,6 µg Ang II/Kg KG/min oder lediglich die Ang II-Lösungsflüssigkeit infundiert. Während der 14 Tagen starb eine Maus aus der Ang II-Gruppe (nach Versuchende n=4). Die fünf Tiere der Kontrollgruppe hatten bei einem mittleren Körpergewicht von 27,2 g und einem ventrikulären Herzgewicht von 0,1 g ein durchschnittliches relatives ventrikuläres Herzgewicht von  $0,004 \pm 0,0003$ . Die verbleibenden 4 Mäuse aus der Ang II-Gruppe hatten ein Körpergewicht von 29 g, ein ventrikuläres Herzgewicht von 0,1 g und ein relatives ventrikuläres Herzgewicht von  $0,004 \pm 0,0001$  (**Abb. 13**).



**Abbildung 13) Relatives ventrikuläres Herzgewicht bei 1,6 µg Ang II für 14 Tage.** Ventrikuläre Herzgewichte (HG) bezogen auf das Körpergewicht (KG) von Mäusen nach 14-tägiger Infusion von 1,6 µg Ang II/Kg KG/min im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Angegeben sind die Mittelwerte sowie die SEM. n=5 (Kontrolle), n=4 (Ang II)

#### 4.2.2. Relatives ventrikuläres Herzgewicht bei 3,2 µg Ang II für 14 Tage

Um quantitative Effekte des prohypertrophen Effekts von Ang II auf das Mausherz zu untersuchen, wurden wiederum zwei Gruppen aus jeweils 10 Mäusen gebildet, denen über 14 Tage entweder 3,2 µg Ang II/Kg KG/min oder lediglich die Ang II-Lösungsflüssigkeit infundiert wurde. Während der 14 Tage starb ebenfalls eine Maus aus der Ang II-Gruppe. Die Kontrollgruppe hatte bei Abschluss des Versuches ein durchschnittliches Körpergewicht von 30,8 g, bei einem ventrikulären Herzgewicht von 0,1 g, was einem mittleren relativen ventrikulären Herzgewicht von  $0,004 \pm 0,0001$  entsprach. Die Mäuse, die Ang II erhalten hatten, wogen 27,6 g und hatten im Durchschnitt 0,16 g schwere Ventrikel, was einem mittleren relativen ventrikulären Herzgewicht von  $0,006 (\pm 0,0002)$  entsprach. Der Vergleich der beiden Gruppen ergab eine hoch signifikante Zunahme des relativen ventrikulären Herzgewichts und eine signifikante Zunahme des absoluten Herzgewichts unter Ang II. Die mit Ang II behandelten Mäuse verloren während der zwei Wochen an Gewicht (von ursprünglich durchschnittlich 29,6 g auf 27,6 g);  $p=0,07$  (**Abb. 14**).

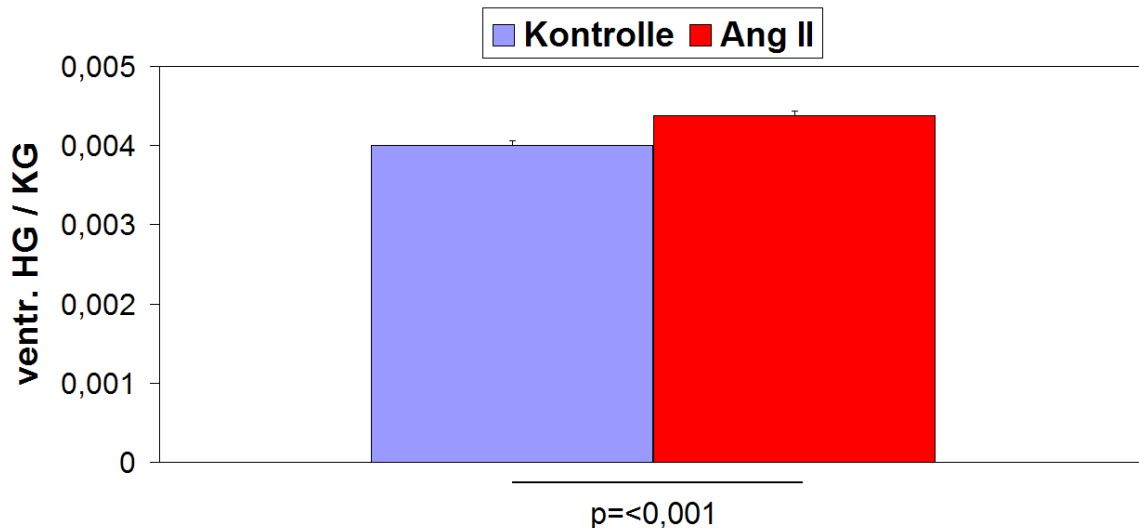


**Abb. 14) Relatives ventrikuläres Herzgewicht bei 3,2 µg Ang II für 14 Tage.** Ventrikuläre Herzgewichte (HG) bezogen auf das Körpergewicht (KG) von Mäusen nach 14-tägiger Infusion von 3,2 µg Ang II/Kg KG/min verglichen mit einer Kontrollgruppe. Angegeben sind die Mittelwerte sowie die SEM. n=10

#### 4.2.3. Relatives ventrikuläres Herzgewicht bei 3,2 µg Ang II für 24 Stunden

Die beiden Versuchsgruppen bestanden jeweils wieder aus 10 Mäusen, wobei die Zufuhr von Ang II oder der Kontrollflüssigkeit nur über 24 Stunden erfolgte. Das sich 24 Stunden nach Pumpenimplantation anschließende Wiegen ergab für die Kontrollgruppe 26,3 g als Körpergewicht, 0,11 g für die Ventrikel und  $0,004 \pm 5,63 \times 10^{-5}$  als errechnetes relatives ventrikuläres Herzgewicht. Die Mäuse der Ang II-Gruppe wogen 24,6 g und hatten damit ca. 10 % Gewicht verloren (Ausgangsgewicht 26,5 g), was eine signifikante Abnahme darstellte. Sie hatten 0,11 g schwere Ventrikel und ein relatives ventrikuläres Herzgewicht von  $0,004 (\pm 5,22 \times 10^{-5})$ . Eine signifikante Änderung des absoluten Herzgewichtes trat somit unter Ang II nicht auf. Durch die Abnahme des Körpergewichts war die Erhöhung des relativen ventrikulären Gewichts unter Ang II hoch signifikant (**Abb. 15**).





**Abb. 15) Relatives ventrikuläres Herzgewicht bei 3,2 µg Ang II für 24 Stunden.** Ventrikuläre Herzgewichte (HG) bezogen auf das Körpergewicht (KG) von Mäusen nach Infusion von 3,2 µg Ang II/Kg KG/min für 24 Stunden im Vergleich mit einer Kontrollgruppe. Angegeben sind die Mittelwerte sowie der SEM. n=10

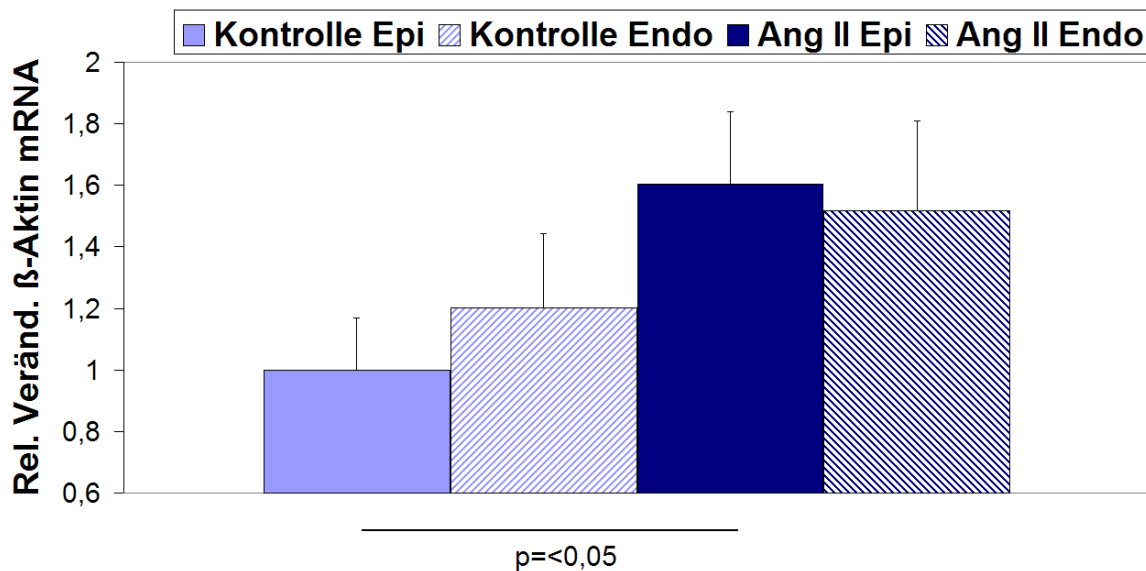
### 4.3. Transkriptionelle Regulation unter Ang II

Um zu ermitteln, ob die Dauer der Applikation einen Einfluss auf die mRNA-Verteilungsmuster hat, wurde Ang II in einer Versuchsreihe chronisch zugeführt (für 14 Tage) und in der zweiten lediglich für 24 Stunden.

#### 4.3.1. 3,2 µg Ang II für 14 Tage

##### 4.3.1.1. β-Aktin

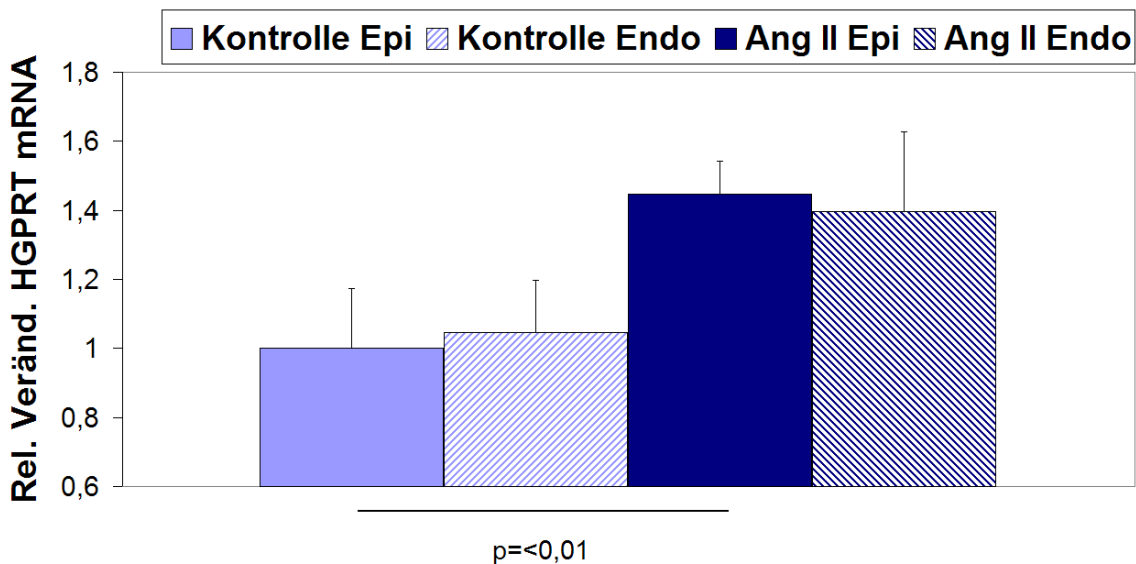
Die quantitative Expression der β-Aktin mRNA wurde errechnet, indem die Effizienz des PCR-Laufes potenziert mit dem CT-Wert der jeweiligen Probe durch 1 dividiert wurde ( $1/\text{Effizienz}^{\text{CT-Probe}}$ ). Bei einer Effizienz der PCR von 1,85 ergab das für das subepikardiale Gewebe der Kontrollgruppe einen Wert von  $8,29 \times 10^{-8} \pm 1,43 \times 10^{-8}$  und für das subendokardiale Gewebe von  $1,04 \times 10^{-7} \pm 2,45 \times 10^{-8}$ . Für Ang II im Subepikardium errechnete sich ein Wert von  $2,1 \times 10^{-7} \pm 4,92 \times 10^{-8}$  und für das Subendokardium  $1,72 \times 10^{-7} \pm 4,1 \times 10^{-8}$ . Der Verständlichkeit wegen wurden diese Werte auf den Subepikardialen-Wert der Kontrollgruppe relativiert. Unter Ang II wurde somit die mRNA von β-Aktin im subepikardialen Gewebe signifikant erhöht. n=7 (Kontrolle Endo und Ang II Epi); n=8 (Kontrolle Epi); n=9 (Ang II Endo) (**Abb. 16**)



**Abb. 16)  $\beta$ -Aktin mRNA Epi/Endo bei 3,2  $\mu$ g Ang II für 14 Tage.** Angegeben sind die relativen Veränderungen der  $\beta$ -AktinmRNA-Mengen bezogen auf den Wert für Kontrolle „Epi“. Diese stammen aus epi- und endokardnahen Schichten einer Kontrollgruppe und der Ang II-Gruppe (3,2  $\mu$ g Ang II/Kg KG/min über 14 Tage). Angabe der Mittelwerte und SEM. n=7 (Kontrolle Endo und Ang II Epi); n=8 (Kontrolle Epi); n=9 (Ang II Endo)

#### 4.3.1.2. HGPRT

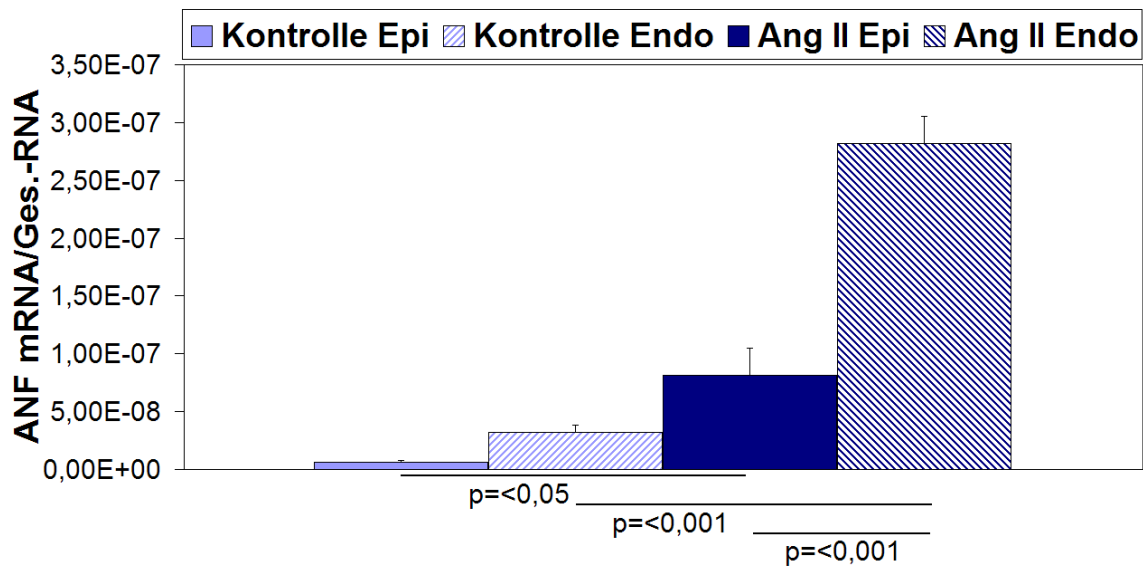
In analoger Weise wurde die quantitative Expression der HGPRT mRNA errechnet. Die Effizienz der PCR lag bei 1,93. Die Werte für die Kontrollgruppe lagen im Subepikardium bei  $9,53 \times 10^{-9} \pm 1,65 \times 10^{-9}$  und im Subendokardium bei  $1 \times 10^{-8} \pm 1,51 \times 10^{-9}$ . Bei Ang II-Gabe war der Wert im Subepikardium mit  $1,73 \times 10^{-8} \pm 1,64 \times 10^{-9}$  signifikant erhöht, im Subendokardium mit  $1,58 \times 10^{-8} \pm 3,66 \times 10^{-9}$  jedoch nicht. n=7 (Kontrolle Epi/Endo und Ang II Epi); n=9 (Ang II Endo) (**Abb. 17**)



**Abb. 17) HGPRT mRNA Epi/Endo bei 3,2 µg Ang II für 14 Tage.** Angegeben sind die relativen mRNA-Mengen von HGPRT bezogen auf den Wert Kontrolle „Epi“. Die Einzelwerte errechnen sich aus der Effizienz der PCR und dem CT-Wert aus epi- und endokardnahen Schichten einer Kontrollgruppe und der Ang II-Gruppe (3,2 µg Ang II/Kg KG/min über 14 Tage). Angabe der Mittelwerte und SEM. n=7 (Kontrolle Epi/Endo und Ang II Epi); n=9 (Ang II Endo)

#### 4.3.1.3. ANF

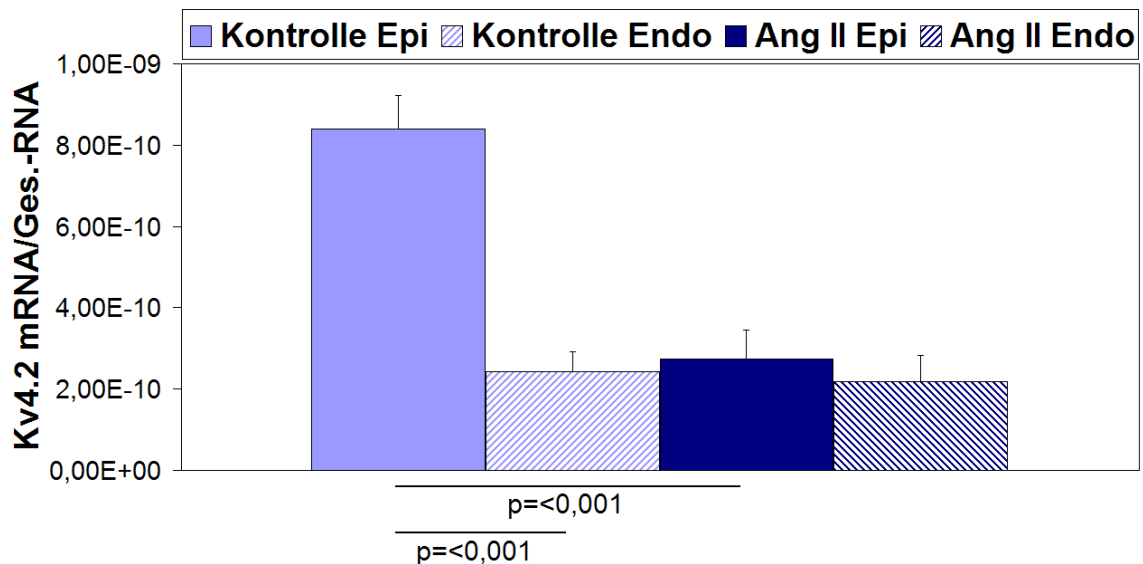
Die mRNA-Mengen von ANF und der aller anderen untersuchten Gene wurden wie folgt ermittelt. Die Konzentration, die in der Realtime PCR anhand der Standards ermittelt wurde, wurde auf die Ausgangsmenge RNA vor der Reversen Transkription normalisiert. Der RNA-Inhalt des RT-Ansatzes wurde mit dem Agilent im Pico Modus bestimmt. Dies war nötig, um für alle Proben Vergleichbarkeit herzustellen. Dies wäre sonst durch geringfügig unterschiedlich hohe Ausgangsmengen an mRNA im Ansatz für die Reverse Transkription nicht gegeben. Mit diesem Verfahren konnte für die subepikardialen Herzabschnitte der Kontrollgruppe ein Wert für die mRNA von ANF von  $6,29 \times 10^{-9} \pm 1,81 \times 10^{-9}$  und für die subendokardialen von  $3,23 \times 10^{-8} \pm 6,15 \times 10^{-9}$  bestimmt werden. In der Ang II-Gruppe war eine deutliche Steigerung des Vorkommens an ANF zu erkennen. Die Steigerung war im Subepikardium mit  $8,11 \times 10^{-8} \pm 2,37 \times 10^{-8}$  im Vergleich zur Kontrolle signifikant und im Subendokardium mit  $2,82 \times 10^{-7} \pm 2,38 \times 10^{-8}$  sogar hoch signifikant (n=6). Darüber hinaus war der nicht signifikante Konzentrationsunterschied aus der Kontrollgruppe hier hoch signifikant, mit einem stärkeren Vorkommen in subendokardialen Abschnitten (**Abb. 18**).



**Abb. 18) ANF mRNA Epi/Endo bei 3,2 µg Ang II für 14 Tage.** Angegeben ist das Verhältnis der mRNA-Menge von ANF bezogen auf die Gesamt-RNA einer Probe. Diese stammen aus epi- und endokardnahen Schichten einer Kontrollgruppe und der Ang II-Gruppe (3,2 µg Ang II/Kg KG/min über 14 Tage). Angabe der Mittelwerte und SEM. n=6

#### 4.3.1.4. Kv4.2

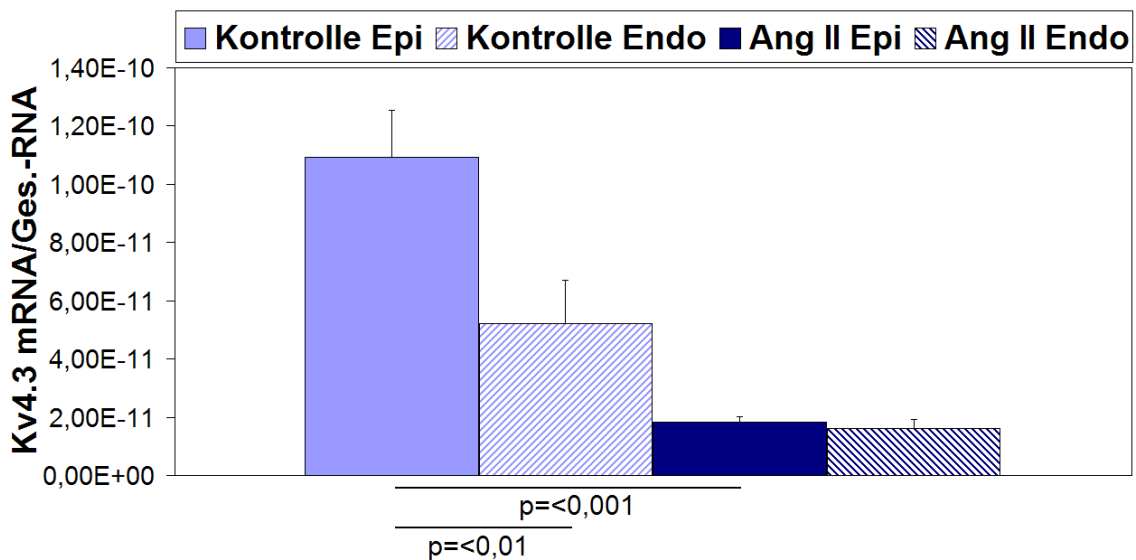
Die mRNA von Kv4.2 zeigte in der Kontrollgruppe eine regional inhomogene Verteilung, sie war in den epikardialen Schichten mit  $8,39 \times 10^{-10} \pm 8,3 \times 10^{-11}$  hoch signifikant höher exprimiert als in den endokardialen mit  $2,42 \times 10^{-10} \pm 5,04 \times 10^{-11}$ . Durch Ang II wurde dieser Gradient nahezu aufgehoben. Für das subepikardiale Gewebe ergab sich ein Wert von  $2,73 \times 10^{-10} \pm 7,13 \times 10^{-11}$  und für das subendokardiale von  $2,19 \times 10^{-10} \pm 6,29 \times 10^{-11}$ , die Reduktion von Kv4.2 mRNA in den epikardialen Schichten unter Ang II war hoch signifikant. n=4 (Kontrolle Endo); n=5 (Kontrolle Epi und Ang II Endo); n=6 (Ang II Epi) (**Abb. 19**)



**Abb. 19) Kv4.2 mRNA Epi/Endo bei 3,2 µg Ang II für 14 Tage.** Angegeben ist das Verhältnis der mRNA-Menge von Kv4.2 bezogen auf die Gesamt-RNA einer Probe. Diese stammen aus epi- und endokardnahen Schichten einer Kontrollgruppe und der Ang II-Gruppe (3,2 µg Ang II/Kg KG/min über 14 Tage). Angabe der Mittelwerte und SEM. n=4 (Kontrolle Endo); n=5 (Kontrolle Epi und Ang II Endo); n=6 (Ang II Epi)

#### 4.3.1.5. Kv4.3

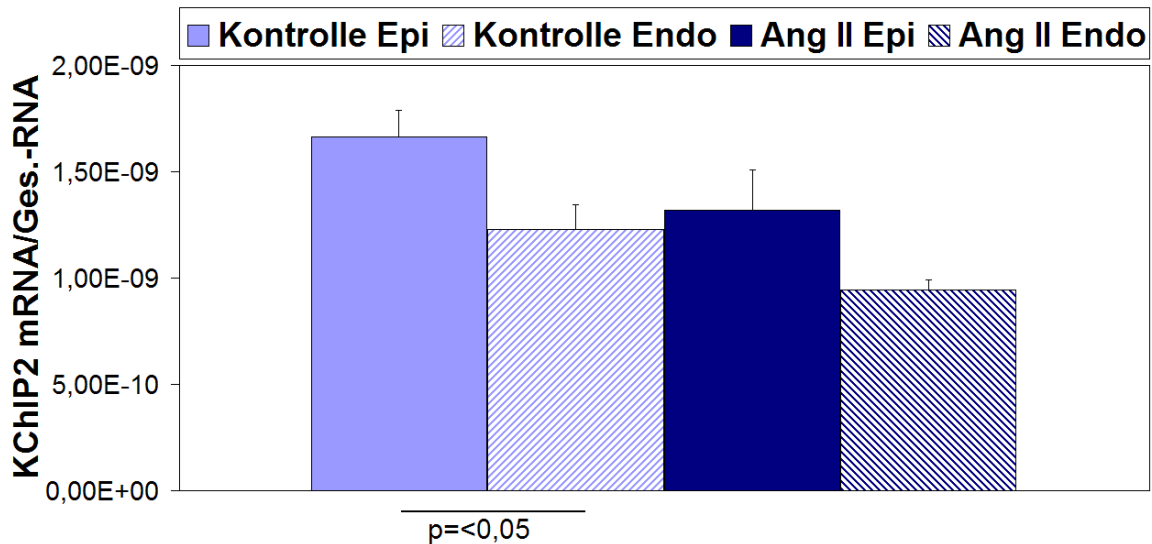
In den subepikardialen Abschnitten der Kontrollgruppe war die Kv4.3 mRNA Expression mit  $1,09 \times 10^{-10} \pm 1,63 \times 10^{-11}$  sehr signifikant höher als in den subendokardialen Abschnitten mit  $5,22 \times 10^{-11} (\pm 1,47 \times 10^{-11})$ . In der Ang II-Gruppe lag die Kv4.3 mRNA-Expression in beiden Schichten fast identisch vor, im Subepikardium mit  $1,82 \times 10^{-11} \pm 2,05 \times 10^{-12}$ , im Subendokardium mit  $1,62 \times 10^{-10} \pm 3,19 \times 10^{-12}$ . Die Abnahme der Kv4.3 mRNA in den subepikardialen Arealen unter Ang II war hoch signifikant. n=5 (Kontrolle Endo); n=6 (Kontrolle Epi und Ang II Epi/Endo) (**Abb. 20**)



**Abb. 20) Kv4.3 mRNA Epi/Endo bei 3,2 µg Ang II für 14 Tage.** Angegeben ist das Verhältnis der mRNA-Menge von Kv4.3 bezogen auf die Gesamt-RNA einer Probe. Diese stammen aus epi- und endokardnahen Schichten einer Kontrollgruppe und der Ang II-Gruppe (3,2 µg Ang II/Kg KG/min über 14 Tage). Angabe der Mittelwerte und SEM. n=5 (Kontrolle Endo); n=6 (Kontrolle Epi und Ang II Epi/Endo)

#### 4.3.1.6. KChIP2

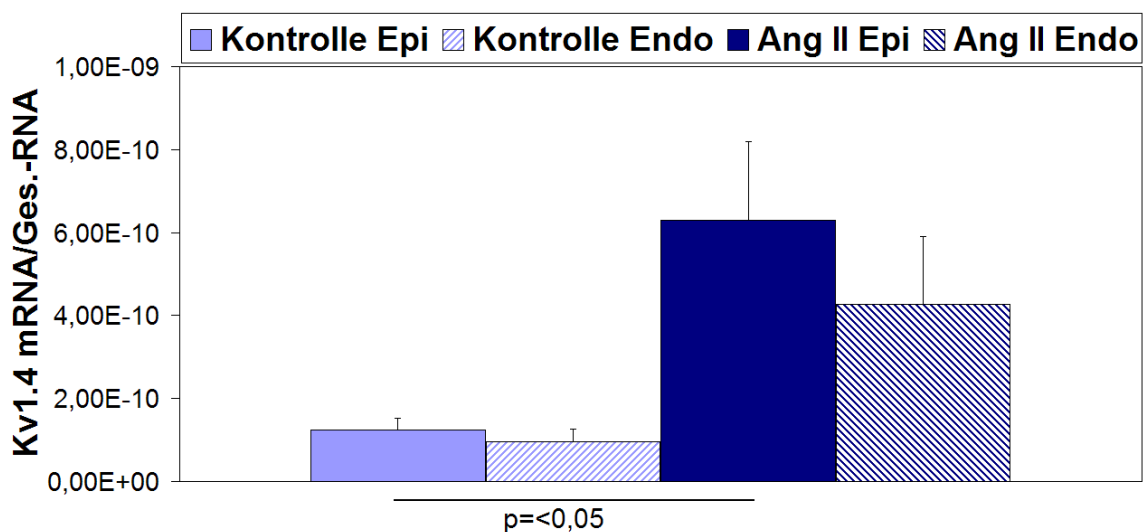
In der Kontrollgruppe lag die KChIP2 mRNA mit  $1,66 \times 10^{-9} \pm 1,24 \times 10^{-10}$  signifikant häufiger im Subepikardium als im Subendokardium mit  $1,23 \times 10^{-9} \pm 1,77 \times 10^{-10}$  vor. Die Ang II-Gruppe zeigte diesen Unterschied zwischen beiden Schichten zwar auch, jedoch war er hier nicht signifikant. In epikardnahen Herzarealen ergab sich unter Ang II ein Wert von  $1,39 \times 10^{-9} \pm 1,90 \times 10^{-10}$  und in dem Endokard benachbarten Herzgewebe von  $9,42 \times 10^{-10} \pm 4,94 \times 10^{-11}$ . Des Weiteren erkannte man hier eine ebenfalls nicht signifikante Verringerung der KChIP2 mRNA in beiden Abschnitten im Vergleich zur Kontrollgruppe. n=4 (Ang II Endo); n=5 (Kontrolle Epi/Endo und Ang II Epi) (**Abb. 21)**



**Abb. 21) KChIP2 mRNA Epi/Endo bei 3,2 µg Ang II für 14 Tage.** Angegeben ist das Verhältnis der mRNA-Menge von KChIP2 bezogen auf die Gesamt-RNA einer Probe. Diese stammen aus epi- und endokardnahen Schichten einer Kontrollgruppe und der Ang II-Gruppe n=4 (Ang II Endo); n=5 (Kontrolle Epi/Endo und Ang II Epi)

#### 4.3.1.7. Kv1.4

Ang II erhöhte die Kv1.4 mRNA-Expression in beiden Herzabschnitten, dabei war jedoch nur die Erhöhung im Subepikardium signifikant. Im subepikardialen Gewebe der Kontrollgruppe ergab sich ein Wert von  $1,42 \times 10^{-10} \pm 2,82 \times 10^{-11}$  und im subendokardialen von  $9,54 \times 10^{-11} \pm 3,11 \times 10^{-11}$ . Für die Gruppe, die Ang II erhielt, wurde für das Subepikardium  $6,31 \times 10^{-10} \pm 1,88 \times 10^{-10}$  und für das Subendokardium  $4,27 \times 10^{-10} \pm 1,64 \times 10^{-10}$  an Kv1.4 mRNA gemessen. n=5 (Kontrolle Endo); n=6 (Kontrolle Epi und Ang II Epi/Endo) (**Abb. 22**)

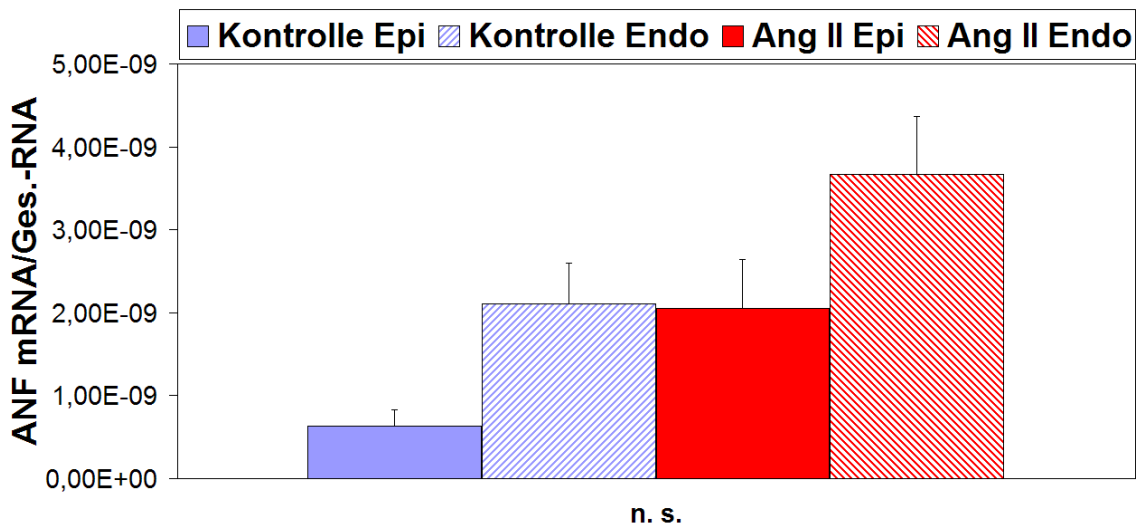


**Abb. 22) Kv1.4 mRNA Epi/Endo bei 3,2 µg Ang II für 14 Tage.** Angegeben ist das Verhältnis der mRNA-Menge von Kv1.4 bezogen auf die Gesamt-RNA einer Probe. Diese stammen aus epi- und endokardnahen Schichten einer Kontrollgruppe und der Ang II-Gruppe n=5 (Kontrolle Endo); n=6 (Kontrolle Epi und Ang II Epi/Endo)

### 4.3.2. 3,2 µg Ang II für 24 Stunden

#### 4.3.2.1. ANF

Die mRNA von ANF zeigte in beiden Gruppen eine nicht signifikante, höhere Konzentration im subendokardialen Gewebe. Ermittelt wurden für das Subepikardium der Kontrolle  $6,33 \times 10^{-10} \pm 1,93 \times 10^{-10}$  und für das Subendokardium  $2,1 \times 10^{-9} \pm 5,01 \times 10^{-10}$ . In der Ang II-Gruppe konnte man in beiden Herzabschnitten im Vergleich zur Kontrollgruppe einen Anstieg der ANF mRNA-Konzentration erkennen, welcher jedoch bei einer Gruppengröße von  $n=6$  nicht signifikant war. Hier hatte das Subepikardium einen Wert von  $2,05 \times 10^{-9} \pm 5,87 \times 10^{-10}$  und das Subendokardium einen Wert von  $3,67 \times 10^{-9} \pm 6,93 \times 10^{-10}$ . (Abb. 23)

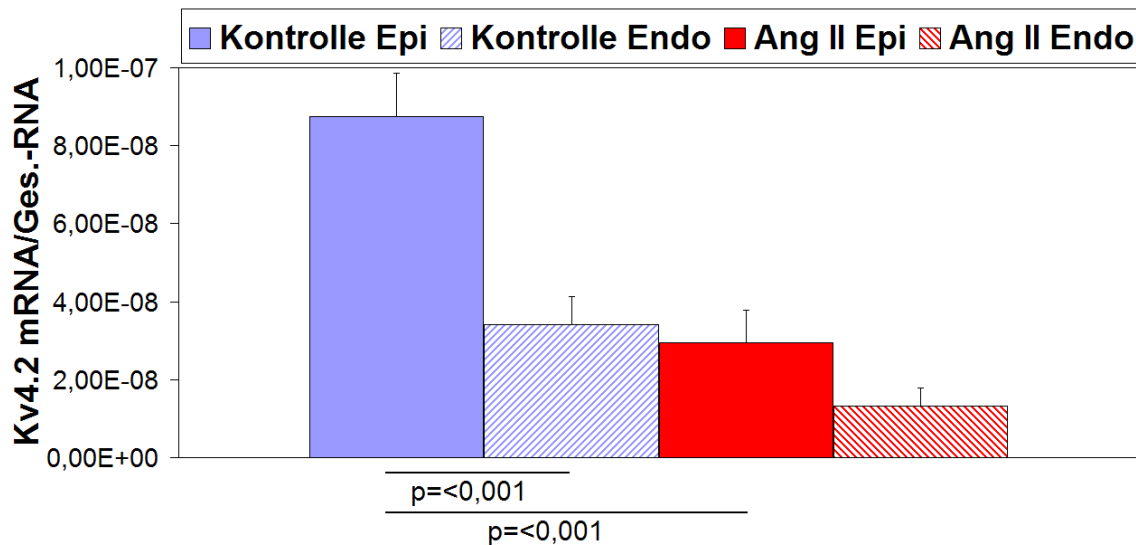


**Abb. 23) ANF mRNA Epi/Endo bei 3,2 µg Ang II für 24 Stunden.** Angegeben ist das Verhältnis der mRNA-Menge von ANF bezogen auf die Gesamt-RNA einer Probe. Diese stammen aus epi- und endokardnahen Schichten einer Kontrollgruppe und der Ang II-Gruppe (3,2 µg Ang II/Kg KG/min über 24 Stunden). Angabe der Mittelwerte und SEM.  $n=6$

#### 4.3.2.2. Kv4.2

Die Kv4.2 mRNA wurde in den epikardialen Herzabschnitten mit  $8,74 \times 10^{-8} \pm 1,11 \times 10^{-8}$  hoch signifikant häufiger exprimiert als in endokardialen mit  $3,42 \times 10^{-8} \pm 7,11 \times 10^{-9}$ . Das Subepikardium der Ang II-Gruppe zeigte mit  $2,94 \times 10^{-8} \pm 8,33 \times 10^{-9}$  eine hoch signifikant niedrigere Konzentration an Kv4.2 mRNA als die der Kontrollgruppe, was einer Reduktion von fast 70% entspricht. Die Reduktion von Kv4.2 im Endokardium unter Ang II auf  $1,31 \times 10^{-8} \pm 4,64 \times 10^{-9}$  war hingegen nicht signifikant.  $n=6$  (Abb. 24)

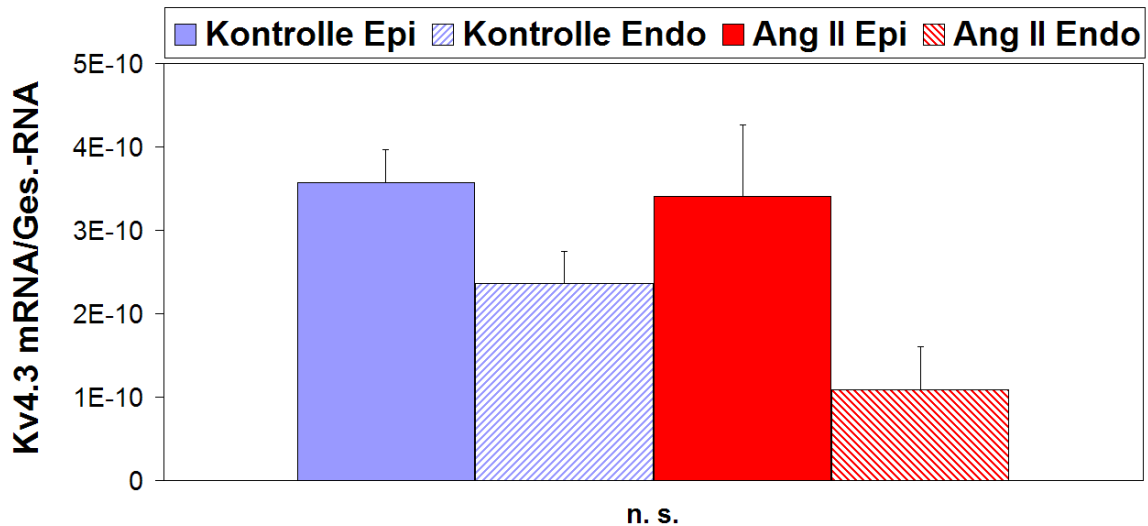




**Abb. 24) Kv4.2 mRNA Epi/Endo bei 3,2 µg Ang II für 24 Stunden.** Angegeben ist das Verhältnis der mRNA-Menge von Kv4.2 bezogen auf die Gesamt-RNA einer Probe. Diese stammen aus epi- und endokardnahen Schichten einer Kontrollgruppe und der Ang II-Gruppe (3,2 µg Ang II/Kg KG/min über 24 Stunden). Angabe der Mittelwerte und SEM. n=6

#### 4.3.2.3. Kv4.3

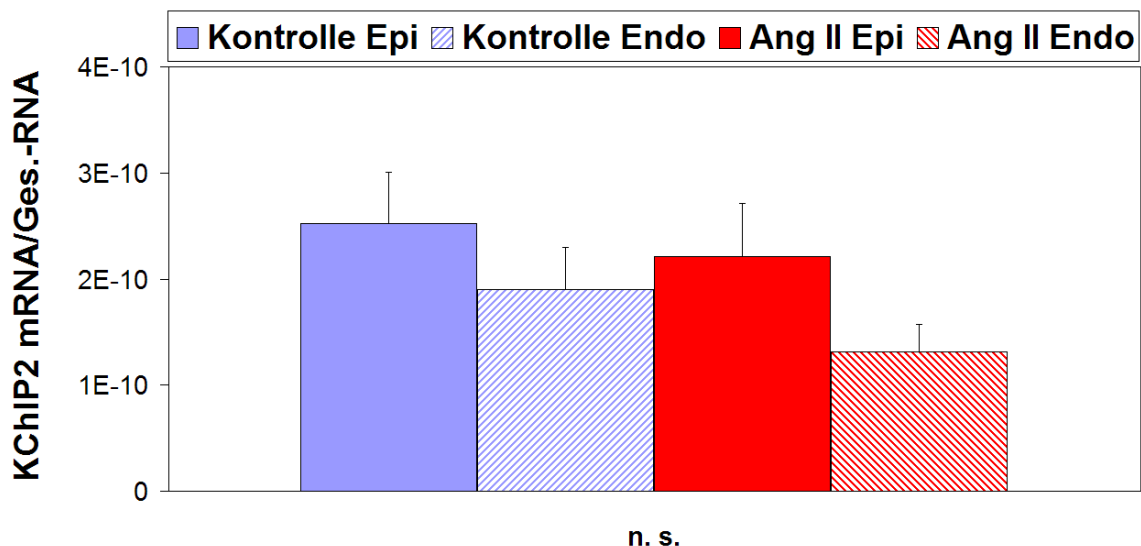
Es bestand in beiden Gruppen ein leichter quantitativer Unterschied in der Expression der mRNA von Kv4.3 in den untersuchten Herzregionen, mit einer etwas höheren Konzentration in den epikardialen Schnitten, die jedoch nicht signifikant war. Der Wert für das subepikardiale Gewebe der Kontrollgruppe lag bei  $3,58 \times 10^{-10} \pm 7,27 \times 10^{-11}$  und für das subendokardiale Gewebe bei  $2,36 \times 10^{-10} \pm 3,88 \times 10^{-11}$ . Unter Ang II ergab sich für das subepikardiale Gewebe  $3,4 \times 10^{-10} \pm 8,6 \times 10^{-11}$ , im subendokardialen Gewebe kam es mit  $1,09 \times 10^{-10} \pm 5,2 \times 10^{-11}$  zu einer nicht signifikanten Reduktion an Kv4.3 mRNA. n=6 (Abb. 25)



**Abb. 25) Kv4.3 mRNA Epi/Endo bei 3,2 µg Ang II für 24 Stunden.** Angegeben ist das Verhältnis der mRNA-Menge von Kv4.3 bezogen auf die Gesamt-RNA einer Probe. Diese stammen aus epi-endokardnahen Schichten einer Kontrollgruppe und der Ang II-Gruppe (3,2 µg Ang II/Kg KG/min über 24 Stunden). Angabe der Mittelwerte und SEM. n=6

#### 4.3.2.4. KChIP2

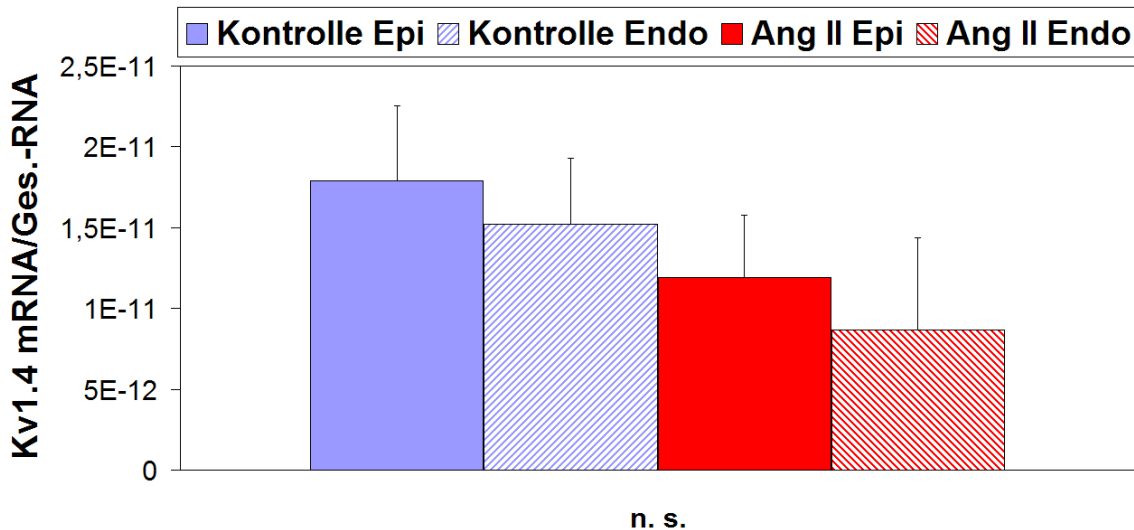
Für die mRNA von KChIP2 ließ sich in den epikardnahen Schichten ein Wert von  $2,52 \times 10^{-10} \pm 4,86 \times 10^{-11}$  und in den endokardnahen Schichten von  $1,9 \times 10^{-10} \pm 4,01 \times 10^{-11}$  messen. Ang II hatte keine Einfluß auf die KChIP2 mRNA-Expression (Subepikardium:  $2,21 \times 10^{-10} \pm 4,99 \times 10^{-11}$ ; Subendokardium:  $1,35 \times 10^{-10} \pm 2,54 \times 10^{-11}$ . n=6 (**Abb. 26.**)



**Abbildung 26) KChIP2 mRNA Epi/Endo bei 3,2 µg Ang II für 24 Stunden.** Angegeben ist das Verhältnis der mRNA-Menge von KChIP2 bezogen auf die Gesamt-RNA einer Probe. Diese stammen aus epi- endokardnahen Schichten einer Kontrollgruppe und der Ang II-Gruppe (3,2 µg Ang II/Kg KG/min über 24 Stunden). Angabe der Mittelwerte und SEM. n=6

#### 4.3.2.5. Kv1.4

Für die Kv1.4 mRNA wurden folgende Werte gemessen. Die Kontrolle des Subepikardiums lag bei  $1,79 \times 10^{-11} \pm 4,68 \times 10^{-12}$ , die Kontrolle des Subendokardiums bei  $1,51 \times 10^{-11} \pm 4,09 \times 10^{-12}$ , das subepikardiale Gewebe der mit Ang II behandelten Tiere bei  $1,19 \times 10^{-11} \pm 3,89 \times 10^{-12}$  und das subendokardiale Gewebe bei  $8,68 \times 10^{-12} \pm 5,72 \times 10^{-12}$ . Insgesamt ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen. n=6 (**Abb. 27**).



**Abb. 27) Kv1.4 mRNA Epi/Endo bei 3,2 µg Ang II für 24 Stunden.** Angegeben ist das Verhältnis der mRNA-Menge von Kv1.4 bezogen auf die Gesamt-RNA einer Probe. Diese stammen aus epi-endokardnahen Schichten einer Kontrollgruppe und der Ang II-Gruppe (3,2 µg Ang II/Kg KG/min über 24 Stunden). Angabe der Mittelwerte und SEM. n=6

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Ang II auf die den  $I_{to}$  generierenden Kanaluntereinheiten des Myokards der Maus zu untersuchen. Aus Zellkulturversuchen weiß man, dass Ang II einen direkten, Hypertrophie-unabhängigen Einfluss auf Kv4.3, jedoch nicht auf Kv4.2 hat [Doronin et al. 2004; Zhou et al. 2006]. Da bisher nicht klar war, welchen Einfluss Ang II in vivo auf die Kanalbestandteile des  $I_{to}$  hat, lag dieser Arbeit die Annahme zu Grunde, dass Ang II auch in vivo vor allem Kv4.3 reduzieren würde. Das Hauptaugenmerk lag dabei in dieser Arbeit auf möglichen Veränderungen, die sich entweder aus einer kurzfristigen Ang II-Gabe oder aus einer längerfristigen Ang II-Gabe ergeben. Die Verteilung der in dieser Arbeit untersuchten  $I_{to}$ - und Hypertrophie-relevanten mRNA unter Ang II-Einfluss ist bei der Maus nicht beschrieben. Diese Arbeit zeigt, dass Ang II in der hier verwendeten Konzentration eine Hypertrophie des Mausherzens erzeugen kann und auf die Schlüsselkomponenten des  $I_{to}$  sowie auf kardiale Parameter einen starken Einfluss hat.

### 5.1. Effekte auf die Herzfrequenz und den Blutdruck

Die beiden hier verwandten Dosierungen von 1,6  $\mu\text{g}$  Ang II und 3,2  $\mu\text{g}/\text{Kg KG}/\text{min}$  über 14 Tage verursachten eine Steigerung der vier Parameter Herzfrequenz, MAD, systolischer und diastolischer Blutdruck. Um diese mit bisher publizierten Daten zu vergleichen, muss einleitend angemerkt werden, dass kaum Untersuchungen unter ähnlichen Bedingungen beschrieben sind. So sind viele der vorliegenden Arbeiten [Harada et al. 1998; Larkin et al. 2004; Arimoto et al. 2006; Oshita et al. 2006] mit jüngeren und leichteren Tieren (18-22 g vs. 27-42 g in dieser Arbeit) durchgeführt worden, oder das Gewicht der Tiere wurde nicht angegeben [Welch et al. 2006]. Auch die Dauer von 14 Tagen ist unter denselben Bedingungen nicht zu finden [Xu et al. 2008], außerdem werden unterschiedliche Dosierungen von Ang II verwandt. Dies könnte eine Erklärung für die zum Teil höheren MAD-Anstiege bei geringerer Ang II-Dosis sein [Larkin et al. 2004; Welch et al. 2006]. Des Weiteren ist in diesem Zusammenhang die hier eingesetzte relativ geringe Anzahl der Tiere mit Telemetriesender zu beachten, die im Vergleich zu Versuchsreihen mit größeren Stichproben, z. B. verwandten Harada et al. (1998) 10 Tiere, erst bei größeren Unterschieden der Werte signifikante Ergebnisse erbringen. Eine weitere Schwierigkeit in der Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist die jeweilige methodische Herangehensweise.

So wurde der Blutdruck in den zitierten Arbeiten unterschiedlich gemessen, z. B. mittels Schwanzplethysmographie [Rikitake et al. 2005; Arimoto et al. 2006, Larkin et al. 2006; Oshita et al. 2006; Kirchhoff et al. 2008], mit einem Carotiskatheter [Harada et al. 1998; Amann et al. 2006], oder wie hier mit einem Telemetriesystem [Welch et al. 2006].

In der vorliegenden Arbeit stieg der MAD bei 1,6  $\mu\text{g}$  Ang II um ca. 20 mmHg an, so wie es für diese Dosierung bereits beschrieben wurde [Amann et al. 2006]. Bei 3,2  $\mu\text{g}$  Ang II stieg der MAD sogar um hoch signifikante 33 mmHg, eine Steigerung, die Welch et al. (2006) schon mit einer Gabe von nur 1  $\mu\text{g}$  beschreiben. Das Erreichen der Maximalwerte des MAD nach zwei bis drei Tagen deckt sich mit publizierten Daten [Welch et al. 2006]. Die Arbeit von Amann et al. (2006) ermittelte mit den in dieser Arbeit verwandten Mäusen ähnlich schweren Tieren für 2  $\mu\text{g}$  Ang II einen MAD-Anstieg, der sich mit dem hier gemessenen deckt. Welch et al. (2006) konnten sogar mit 0,4  $\mu\text{g}$  Ang II eine signifikante Erhöhung des MAD ermitteln, genauso wie Harada et al. (1998) mit 0,1  $\mu\text{g}$  Ang II. Sowohl für den Blutdruck als auch für die Herzfrequenz wurden unterschiedliche Ausgangswerte bei Gabe der beiden Dosierungen gemessen. Die Differenz der Ausgangswerte der Telemetriemessung lag beim MAD bei 13 mmHg, beim systolischen und diastolischen Blutdruck bei 16,8 mmHg bzw. um 7,9 mmHg und für die Herzfrequenz bei 21 Schlägen pro Minute. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in einer noch nicht völligen Restitution des Herz-Kreislauf-Systems nach der ersten Versuchsreihe mit 1,6  $\mu\text{g}$  Ang II/Kg KG/min. Die Pause zwischen den beiden Messungen könnte mit 4 Wochen eventuell zu kurz gewesen sein. Dabei hatten Friddle et al. (2000) bereits nach 14 Tagen eine völlige Normalisierung der durch Ang II induzierten Hypertrophie feststellen können, wenn gleich unter einer niedrigeren Dosis Ang II. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass das Alter einen Einfluss auf die Parameter hat. Jedoch decken sich die unterschiedlichen Ausgangswerte des MAD mit Werten aus der Literatur. Diese differieren zum Teil erheblich, was ein Hinweis auf das oben bereits beschriebene unterschiedliche methodische Vorgehen sein könnte [Harada et al. 1998; Crowley et al. 2005; Arimoto et al. 2006; Welch et al. 2006]. Der Ausgangswert des MAD der ersten Messung stimmt mit Arimoto et al. (2006) überein, der der 2. Messreihe mit Crowley et al. (2005).

Der systolische Blutdruck stieg hier unter 3,2  $\mu\text{g}$  Ang II auf maximale 156,6 mmHg an, dies ist in etwa der Wert, den Larkin et al. (2004) auch beschreiben, jedoch hatten die Mäuse in dieser Arbeit einen Ausgangswert wie die für diese Arbeit verwendeten Tiere in der ersten Versuchsreihe. Kirchhoff et al. (2008) maßen mit 1,5  $\mu\text{g}$  Ang II einen dem

hier mit 1,6  $\mu\text{g}$  Ang II ermittelten ähnlichen, jedoch sehr signifikanten Anstieg des systolischen Blutdrucks. In einer Versuchreihe über vier Wochen erzeugten 2  $\mu\text{g}$  Ang II einen signifikanten Anstieg [Xu et al. 2008], hingegen schienen 0,4  $\mu\text{g}$  Ang II hierfür nicht ausreichend zu sein [Rikitake et al. 2005].

Veröffentlichungen zu dem Verhalten des diastolischen Blutdrucks unter Ang II konnten auch bei intensiver Literaturrecherche nicht gefunden werden. Der hier beschriebene Verlauf der diastolischen Druckkurve ähnelt sehr dem des systolischen Druckes. Dieses zeigt, dass Ang II ab einer gewissen Dosis sowohl auf den systolischen als auch auf den diastolischen Druck Einfluss hat.

Bei der Betrachtung der publizierten Herzfrequenzdaten fällt zunächst auf, dass diese im Ruhezustand mit angegebenen 321 bis 673/ min extrem schwanken [Harada et al. 1998; Arimoto et al. 2006]. Die Veränderung der Herzfrequenz unter Ang II war für die publizierten Dosierungen von 0,1 und 0,8  $\mu\text{g}$  nicht signifikant [Harada et al. 1998; Arimoto et al. 2006], lediglich bei weiblichen Mäusen wurde durch 0,8  $\mu\text{g}$  Ang II eine eindeutige Reduktion ermittelt [Xue et al. 2005]. Mit ca. 2  $\mu\text{g}$  Ang II erzielten Larkin et al. (2004) eine signifikante Reduktion der Herzfrequenz, die jedoch begleitet wurde von einer deutlicheren Steigerung des MAD, was eventuell auf die Aktivierung des Baroreflexes zurückzuführen ist. Die hier festgestellte Zunahme der Herzfrequenz um ca. 40 Schläge pro Minute bei einer Ang II-Dosierung von 1,6  $\mu\text{g}$  erzielten Rikitake et al. (2005) in etwa bei einer vierwöchigen Dosierung von 0,4  $\mu\text{g}$  Ang II. Die Unterschiede der Ergebnisse lassen sich wahrscheinlich auch in dem unterschiedlichen methodischen Vorgehen der Autoren, sowie dem Alter und Gewicht der Mäuse erklären.

## **5.2. Effekte auf das Herzgewicht**

Für die Beurteilung von möglichen Veränderungen des Herzgewichtes wurde zum einen das absolute linksventrikuläre Herzgewicht gemessen und daraus zusammen mit dem Körpergewicht das relative ventrikuläre Herzgewicht ermittelt. Dies sollte eine weiterer Index zur Messung von Veränderungen der Herzkammer- bzw. Körpermasse mit Anstieg im Falle einer Ventrikelhypertrophie sein. Durch die Ermittlung dieses Index war es möglich, eine Dosis von Ang II zu identifizieren, unter der es zu einer Hypertrophie der Ventrikel kam. Die Erzeugung einer Hypertrophie wurde in dieser Untersuchung angestrebt, um pathologische Zustände des Herzens wie bei der Herzinsuffizienz, zu imitieren und die für den  $I_{\text{to},f}$  relevanten molekularbiologischen Veränderungen zu ermitteln. Das Gewicht des gesamten Herzens zu messen, reichte

jedoch nicht aus, da sich die Kanäle des  $I_{to,f}$  hauptsächlich in den Ventrikeln befinden und eine Gewichtszunahme des Herzens auch von den Vorhöfen ausgehen könnte. Eine Schwierigkeit der Messung des ventrikulären Gewichtes liegt in der reproduzierbaren Abtrennung der Vorhöfe. Jedoch lässt der geringe Standardmessfehler hier die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen zu. Es konnte dargestellt werden, dass eine signifikante Zunahme des absoluten linksventrikulären Gewichtes nur durch die 14-tägige Zufuhr von  $3,2 \mu\text{g}$  Ang II, nicht jedoch durch die 24 stündige oder durch die geringere Dosierung von  $1,6 \mu\text{g}$  Ang II zu erzielen ist. Das relative ventrikuläre Herzgewicht hingegen ist sowohl nach 14-tägiger, als auch nach 24 stündiger Ang II-Gabe hoch signifikant erhöht. Die Zunahme ist jedoch vor allem nach 24 Stunden primär durch die signifikante Gewichtsabnahme der Mäuse unter Ang II zu erklären. In der Literatur ist die Veränderung des relativen Herzkammergewichtes unter Ang II nicht beschrieben. Es werden lediglich Angaben zu Gewichtszunahmen des ganzen Herzens gemacht. So beschreiben Harada et al. (1998) und Arimoto et al. (2006) einen signifikanten Anstieg des relativen Herzgewichtes bei  $0,1 \mu\text{g}$  Ang II, jedoch mit 18 bis 22 g schweren Mäusen. Auch Oshita et al. (2006) geben an, mit  $1 \mu\text{g}$  Ang II eine signifikante Steigerung des relativen Herzgewichtes ermittelt zu haben. Xu et al. (2008) konnten mit  $2 \mu\text{g}$  Ang II eine signifikante Steigerung des relativen Herzgewichtes nach vier Wochen ermitteln. Das hier erst bei einer höheren Ang II-Dosis eine signifikante Steigerung des relativen ventrikulären Herzgewichtes erzielt wurde als in den zitierten Arbeiten, könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen kommen auch hier wieder die Störgrößen, Alter und Gewicht der Mäuse, zum tragen, zum anderen ist nicht auszuschließen, dass die Herzvorhöfe schon auf geringere Ang II-Mengen mit einer Gewichtszunahme reagieren.

### **5.3. Effekte auf molekularer Ebene**

Da die Gabe von  $3,2 \mu\text{g}$  Ang II/Kg KG/min nach 14 Tagen zu einer Herzhypertrophie führte, wurden mit dieser Dosis die molekularbiologischen Untersuchungen durchgeführt.

Zunächst sollten mit  $\beta$ -Aktin und HGPRT zwei Gene untersucht werden, deren mRNA-Expression möglicherweise nicht durch die Ang II-Gabe beeinflusst wird und die sich deshalb als Kontrollgene für die Bestimmung der relativen quantitativen mRNA-Expression der Kanalgene eignen könnten.  $\beta$ -Aktin als ein Bestandteil des Zytoskeletts wird in der Molekularbiologie häufig als sogenanntes Haushaltsgen verwandt, da es relativ stabil exprimiert wird [Zhang et al. 2001, Martins et al. 2005]. Die hier ermittelte

signifikante Zunahme unter Ang II deckt sich mit publizierten Daten [Clement et al. 2001] und schließt  $\beta$ -Aktin als PCR-Vergleich für die zu untersuchenden Kanalbestandteile aus.

Das Enzym HGPRT agiert im Purinstoffwechsel und ist ebenfalls ein anerkanntes Haushaltsgen [Moniotte et al. 2001]. Jedoch konnte hier gezeigt werden, dass HGPRT durch Ang II in Kardiomyozyten der Maus signifikant überexprimiert wird und damit ebenfalls nicht als Vergleich der PCR-Daten dienen kann. Da HGPRT wahrscheinlich nicht durch (krankhafte) Veränderungen am Herzen reguliert wird [Moniotte et al. 2001], könnte es sich hier um eine spezifische Wirkung von Ang II handeln.

ANF ist ein Syntheseprodukt des Herzens mit unterschiedlichen Funktionen. Systemisch wirkt es diuretisch, natriuretisch, vasodilatatorisch und hemmend auf die Renin- und Aldosteronsekretion, lokal im Herzen agiert es antihypertroph und antifibrotisch [Nishikimi et al. 2006]. ANF wird im Falle einer Herzhypertrophie vermehrt sezerniert und stellt damit einen verlässlichen Parameter für das vergrößerte Herz dar [Sadoshima et al. 1992; Friddle et al. 2000]. Dieses spiegelt die vorliegende Arbeit wider. Die Konzentration an ANF mRNA im Herzgewebe stieg hier nur durch die 14tägige Zufuhr von 3,2  $\mu\text{g}$  Ang II, nicht jedoch durch die 24stündige Ang II-Gabe und deckt sich somit mit den Arbeiten von Sadoshima und Friddle. Über die Expressionsverteilung von ANF zwischen den subepikardialen und subendokardialen Myokard der Maus im Normalzustand, bei Hypertrophie oder nach Ang II-Gabe gibt es bisher keine Angaben in der Literatur. Die hier ermittelte Zunahme von ANF durch Ang II in beiden untersuchten Schichten des Herzens spiegelt die bisherige Datenlage wider. Harada et al. (1998) und Arimoto et al. (1998) registrieren unter 0,1  $\mu\text{g}$  Ang II eine eindeutige Zunahme von ANF im untersuchten Myokard, ebenso Rikitake et al. (2005) mit 0,4  $\mu\text{g}$  Ang II, Collins et al. (2004) mit 2,5  $\mu\text{g}$  Ang II und Xu et al. (2008) mit 2  $\mu\text{g}$  Ang II nach vier Wochen. Dass ANF in den subendokardialen Schnitten im hypertrophen Zustand hoch signifikant vermehrt exprimiert wird, wurde bereits in einer Arbeit mit menschlichen terminal insuffizienten Herzen gezeigt [Prestle et al. 1999].

Für die Haupt-Kanaluntereinheit des  $I_{\text{to},f}$  der Maus, Kv4.2, wurde ein hochsignifikanter Konzentrationsunterschied der mRNA zwischen dem Subepikardium und dem Subendokardium im Normalzustand gefunden, was mit dem bisherigen Kenntnisstand übereinstimmt [Goltz et al. 2007; Teutsch et al. 2007, Marionneau et al. 2008]. Sowohl die kurzfristige als auch die längerfristige Ang II-Zufuhr führten zu einer hochsignifikanten Abnahme an Kv4.2 in den subepikardialen Schichten. Dieser Befund passt zu den Angaben von Yu et al. (2000), wonach Ang II den  $I_{\text{to},f}$  aus epikardnahen



Myozyten in vitro dem von endokardnahen stark anpasst. Die Ang II-Gabe hatte hierbei jedoch keinen Einfluss auf den  $I_{to,f}$  aus den subendokardialen Myozyten [Yu et al. 2000], genau wie in dieser Arbeit auch keine Veränderung von Kv4.2 im Subendokardium durch Ang II festgestellt werden konnte. Allerdings wurde in der Arbeit von diesen Autoren keine Veränderung der mRNA oder Proteinmenge der  $\alpha$ -Untereinheiten in Zellen des Hundes festgestellt, sondern Veränderungen der Kanaleigenschaften. Tozakidou et al. (2009), in deren Publikation Inhalte dieser Doktorarbeit maßgeblich eingeflossen sind, konnten im Gegensatz zu der bisherigen Vorstellung jedoch keine Abnahme des  $I_{to,f}$  durch Ang II ermitteln. Dabei blieb bei deutlicher Reduktion der Kv4.2 mRNA die Protein-Expression aber unverändert. Die bereits nach 24 Stunden eingetretene Reduktion der Kv4.2 mRNA in dieser Dissertationsarbeit könnte durch eine direkte Wirkung von Ang II zu erklären sein, so wie es Doronin et al. (2004) für Kv4.3 beschreiben, auch wenn Zhou et al. (2004) darstellen, dass Ang II in kultivierten embryonalen Rattenmyozyten keine Wirkung auf Kv4.2 hat. Die Veränderungen nach 14 Tagen passen in das bisherige Bild einer Herzhypertrophie mit den dabei beschriebenen Phänomenen und könnten eine indirekte Folge der Herzhypertrophie sein. Die Abnahme von Kv4.2 in den subepikardialen Gewebe passt zu der schon häufig bei anderen Spezies beschriebenen Abnahme des  $I_{to,f}$  in dieser Muskelschicht des hypertrophierten Herzen [Näbauer et al. 1996; Bryant et al. 1999; Volk et al. 2001; Zicha et al. 2004], wobei Rose et al. (2004) sowie Goltz et al. (2007) die gleichzeitige Abnahme der Kv4.2 mRNA und des  $I_{to,f}$  feststellen konnten. Saygili et al. (2007) ermittelten eine Abnahme der Kv4.2 mRNA in Kombination mit einer  $I_{to,f}$  Reduktion durch mechanischen Stress. Dass diese Veränderungen zumindest zum Teil auf die Wirkung des Ang II zurückzuführen sein könnten, ergibt sich aus dem Wissen, dass mechanischer Stress die lokale Ang II-Produktion anregt sowie daraus, dass die Abnahme der Kv4.2 mRNA und des  $I_{to,f}$  in der Arbeit von Saygili et al. (2007) durch Losartan verhindert werden konnte. Dies alles zeigt, dass Ang II, ob nun direkt oder indirekt, in vivo einen massiven Einfluss auf die für den  $I_{to,f}$  wesentliche  $\alpha$ -Untereinheit Kv4.2 hat. Verbunden mit der Erkenntnis, dass die Ang II-Synthese im Herzen unter pathologischen Umständen wie der Herzhypertrophie oder der Herzinsuffizienz erhöht ist [Zhang et al. 1995; Danser et al. 1997; Wollert & Drexler 1999; Sernerl et al. 2001; van de Wal et al. 2006], lässt dies den Schluss zu, dass zumindest ein Teil der Veränderungen im insuffizienten Herzen (verlängerte APD, Abnahme des  $I_{to,f}$ , erhöhte Rate an Herzrhythmusstörungen) auf die Wirkung von Ang II zurückzuführen sind.

Für die mRNA von Kv4.3 im subepikardialen und im subendokardialen Myokard der Maus konnte hier kein eindeutiges Verteilungsmuster ermittelt werden, wie auch der Literatur nicht eindeutig die Konzentration entnommen werden kann Goltz et al. (2007) fanden einen Gradienten, andere Arbeitsgruppen hingegen nicht [Rosati et al. 2001; Guo et al. 2002; Teutsch et al. 2007]. Jedoch konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass Ang II nach 24 Stunden zu keiner Veränderung in der Konzentration der mRNA von Kv4.3 führt, während eine 14tägige Applikation eine hoch signifikante Abnahme im Subepikardium bewirkt. Die Ursache für die spätere Abnahme von Kv4.3 könnte darin begründet sein, dass es sich hierbei um eine sekundäre Folge der Hypertrophie oder anderer, durch Ang II oder die Hypertonie ausgelöste Faktoren handelt. Eine Reduktion von Kv4.3 im hypertrophen Herzen hatten Goltz et al. (2007) schon für Ratten gezeigt, während Marionneau et al. (2008) in ihrem Modell mit Herzhypertrophie durch thorakale Ligation der Gefäße keine Abnahme ermitteln konnten. Dass Ang II einen direkten Einfluss auf Kv4.3 haben kann, deuteten Doronin et al. (2004) an. Zhou et al. (2006) konnten nachweisen, dass die Reduktion von Kv4.3 durch Ang II, ebenso wie durch mechanische Dehnung, auf eine Destabilisierung der mRNA der Kanaluntereinheit nach AT1-Rezeptor-Aktivierung zurückzuführen ist. Bereits bei Myozyten des Hundes konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an mRNA von Kv4.3 durch Ang II-Behandlung innerhalb von 24 Stunden nicht verändert wird [Yu et al. 2000]. Jedoch war hier im Gegensatz zu den Ergebnissen von Tozakidou et al. (2009) eine deutliche Abnahme des  $I_{to,f}$  festzustellen, was eventuell durch Veränderungen auf Proteinebene zu erklären ist. Lebeche et al. (2006) konnten bei neonatalen Rattenmyozyten ebenfalls nach 24 Stunden keine Reduktion von Kv4.3 erkennen. Zhang et al. (2001) veröffentlichten hingegen Daten, in denen Ang II die Kv4.3 mRNA in kultivierten neonatalen Myozyten der Ratte innerhalb von 24 Stunden um 50 % reduzierte und dies, bevor eine Hypertrophie nachweisbar war. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die in vitro ermittelte Reduktion von Kv4.3 hier in vivo nicht auftrat, könnte dabei ein unterschiedliches Niveau an oxidativem Stress sein. Die Abnahme der Kv4.3 mRNA durch Ang II läuft über den rac-NADPH Oxidase-p38 Weg, für den Superoxide benötigt werden. Superoxide können durch die Superoxiddismutase katalysiert in Wasserstoffperoxid umgewandelt werden [Zhou et al. 2006]. Das Gen der Superoxiddismutase wird nach 24stündiger Ang II-Gabe vermehrt transkribiert [Larkin et al. 2004], so dass dies die Destabilisierung der Kv4.3 mRNA verhindern kann und eine mögliche Erklärung dafür sein könnte, dass die mRNA von Kv4.3 nach 24 Stunden in vivo nicht reduziert ist. Die eingangs aufgestellte These, dass

Ang II in vivo wie in vitro eine direkte Wirkung auf Kv4.3 hat, konnte damit in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Für KChIP2 konnte die relative Expression der mRNA in der Ventrikelwand der Maus unter Kontrollbedingungen ebenfalls nicht eindeutig ermittelt werden. In dem 14-tägigen Versuch ergab sich für die Kontrollgruppe ein signifikanter Gradient mit vermehrtem Vorkommen im Subepikardium, wie von Goltz et al. (2007) und Teutsch et al. (2007) bereits beschrieben. Dieser konnte in der zweiten Kontrollgruppe aus dem 24stündigen Versuch jedoch nicht bestätigt werden, was sich mit den Ergebnissen von Janzen et al. (2003) und Marionneau et al. (2008) deckt, die ebenfalls keinen Unterschied ermitteln konnten. Unter Ang II kam es sowohl kurz- als auch langfristig zu keiner Verteilungsveränderung von KChIP2. Die Ergebnisse von Tozakidou et al. (2009) mit einer deutlichen Reduktion von Kv4.2 und Kv4.3 mRNA unter Ang II ohne Einfluss auf KChIP2 bei weitestgehend unverändertem  $I_{to,f}$  deutet darauf hin, dass die funktionelle Expression des  $I_{to,f}$  im linken Ventrikel der Maus hauptsächlich von KChIP2 reguliert wird.

Die hier ermittelte ähnliche Expression der Kv1.4 mRNA in subepikardialen und subendokardialen Herzabschnitten unter Kontrollbedingungen wurde bereits von Dixon & McKinnon (1994) für das Rattenherz beschrieben. Unter Ang II-Applikation kommt es nach 14 Tagen zu einer signifikanten Zunahme von Kv1.4 in subepikardialen Schichten, während sich im subendokardialen Gewebe kein signifikanter Unterschied ergibt. Dieses Ergebnis deckt sich mit bereits beschriebenen Kv1.4 Zunahmen in pathologischen Situationen [Wickenden et al. 2000; Akar et al. 2005; Guo et al. 2005, Marionneau et al. 2008]. Die hier ermittelte stärkere Expression der Kv1.4 mRNA könnten eine Art der Kompensation darstellen. Guo et al. (2000) konnten diese These untermauern, in dem sie die Folgen einer gleichzeitigen Reduktion von  $I_{to,f}$  und  $I_{to,s}$  zeigten. Mäuse mit einem dominant negativen Kv4.2 und Kv1.4 hatten eine verlängerte APD mit verlängerter QT-Zeit, frühe Nachdepolarisationen, ventrikuläre Tachykardien und AV-Blöcke.

Für die weitere Untersuchung des Einflusses von Ang II auf Kardiomyozyten der Maus wäre ein Versuch wünschenswert, in dem die hier durchgeführte 14-tägige Ang II-Gabe mit einem den Blutdruck senkenden Medikament kombiniert wird, so wie es Kim et al. (1995) mit Ratten durchgeführt haben. So könnte man deutlicher den Einfluss der Hypertonie und eventuell der Hypertrophie auf die hier dargestellten Veränderungen auf molekularer Ebene beurteilen. Außerdem wäre es möglich, die von Kim et al. (1995)

und Domenighetti et al. (2005) veröffentlichte hypertrophierende Wirkung von Ang II bei normalem Blutdruck auch in vivo in nicht transgenen Mäusen zu bestätigen.

Das langfristige Ziel der Arbeiten auf dem Gebiet der molekularen Veränderungen im kranken Herzen ist, dass zukünftig eine Therapiemöglichkeit für Patienten mit pathologischer Herzhypertrophie oder Insuffizienz besteht. In zwei Arbeiten konnten zumindest die elektrophysiologischen Veränderungen der Einzelzelle durch Überexpression von Kv4.2 oder Kv4.3 aufgehoben werden [Zobel et al. 2002; Lebeche et al. 2006].

Die zu Beginn gestellten Fragen können somit wie folgt beantwortet werden:

- 1.) Ang II-Gabe induziert eine Abnahme der Konzentration der mRNA von Kv4.2 und Kv4.3 sowie eine Erhöhung von Kv1.4 im Subepikardium ohne Wirkung auf KChIP2.
- 2) Nach 24 Stunden ist lediglich die mRNA von Kv4.2 im Subepikardium reduziert. Nach 14 Tagen ist zusätzlich zu Kv4.2 auch die mRNA von Kv4.3 im Subepikardium verringert und die mRNA von Kv1.4 erhöht, KChIP2 bleibt unverändert.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ang II in einer Dosierung von 3,2 µg Ang II/Kg KG/min über 14 Tage sowohl den Blutdruck als auch die Herzfrequenz signifikant steigert. Dabei zeigten der systolische, diastolische und mittlere Blutdruck einen sehr ähnlichen Verlauf. Eine Infusion mit 3,2 µg Ang II über 14 Tage erhöhte das absolute und das relative ventrikuläre Herzgewicht. Die Menge an mRNA von β-Aktin und HGPRT wurde durch Ang II im epikardialen Myokard signifikant erhöht, so dass diese als Kontrollgene der PCR nicht in Frage kamen. Die Expression des molekularen Hypertrophiemarkers ANF wurde auf mRNA-Ebene durch die langfristige Ang II-Gabe in beiden Ventrikelschichten signifikant erhöht, nicht jedoch durch die kurzfristige. Nach 24 Stunden war lediglich die Kv4.2 mRNA-Expression verändert. Die hoch signifikante Abnahme im epikardialen Myokard könnte eine spezifische Reaktion auf Ang II sein. Die langfristige Ang II-Infusion führte ebenfalls zu einer hoch signifikanten Abnahme der Kv4.2 mRNA-Expression im epikardialen Myokard. Zusätzlich kam es zu einer hoch signifikanten Reduktion der Kv4.3 mRNA und zu einer signifikanten Steigerung der Kv1.4 mRNA-Expression in derselben Ventrikelschicht. Diese Veränderungen könnten sekundär durch die Herzhypertrophie zu erklären sein. Die mRNA Expression der β-Untereinheit KChIP2 wurde durch Ang II nicht verändert.

## 7. Literaturverzeichnis

**Akar FG, Yan GX, Antzelevitch C, Rosenbaum DS** (2002) Unique topographical distribution of M cells underlies reentrant mechanism of torsade de points in the long-QT syndrome. *Circulation* 105: 1247-1253

**Akar FG, Wu RC, Juang GJ, Tian Y, Burysek M, DiSilvestre D, Xiong W, Armoundas AA, Tomaselli GF** (2005) Molecular mechanisms underlying K<sup>+</sup> current downregulation in canine tachycardia-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: 2887-2896

**Amann K, Faulhaber J, Campean V, Balajew V, Dono R, Mall G, Ehmke H** (2006) Impaired myocardial capillarogenesis and increased adaptive capillary growth in FGF2-deficient mice. *Lab Invest* 86:45-53

**American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics-2005 Update.**

**Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U** (1996) Difference between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 491.1: 31-50

**An WF, Bolwby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendozza G, Hinson JW, Mattson KI, Stassle BW, Trimmer JS & Rhodes KJ** (2000) Modulation of A-Type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403:553-556

**Anumonwo JMB, Tallini YN, Vetter FJ, Jalife J** (2001) Action potential characteristics and arrhythmogenic properties of the cardiac conduction system of the murine heart. *Circ Res* 89: 329-335

**Arimoto T, Takeishi Y, Takahashi H, Shishido T, Niizeki T, Koyama Y, Shiga R, Nozaki N, Nakajima O, Nishimaru K, Abe J, Endoh M, Walsh RA, Goto K, Kubota I** (2006) Cardiac-specific overexpression of diacylglycerol kinase zeta prevents gq protein-coupled receptor agonist-induced cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Circulation* 113:60-6.

**Bader M, Peters J, Baltau O, Müller DN, Luft FC, Ganten D** (2001) Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 79: 76-102

**Bähring R, Dannenberg J, Perters HC, Leicher T, Pongs O, Isbrandt D** (2001) Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J Biol Chem* 276:23888-23894

**Barry DM, Xu H, Schuessler RB, Nerbonne JM** (1998) Functional knockout of the transient outward current, long-QT Syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4  $\alpha$  subunit. *Circ Res* 83: 560-567

**Bauriedel G, Skowasch D, Lüderitz B** (2005) Zertifizierte medizinische Fortbildung: Die chronische Herzinsuffizienz. *Dtsch Arztebl* 102: A-592

**Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E** (1993) Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 73: 379-385

**Boyden PA & Jeck CD** (1995) Ion channel function in disease. *Cardiovasc Res* 29: 312-318

**Bodi I, Muth JN, Hahn HS, Petrashevskaya NN, Rubio M, Koch SE, Varadi G, Schwartz A** (2003) Electrical remodeling in hearts from a calcium-dependent mouse model of hypertrophy and failure: complex nature of K<sup>+</sup> current changes and action potential duration. *J Am Coll Cardiol* 41:1611-22

**Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom W, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM** (2004) Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricles. *J Physiol* 559.1: 103-120

**Bryant SM, Shipsey SJ & Hart G** (1999) Normal regional distribution of membrane current density in rat left ventricle is altered in catecholamine-induced hypertrophy. *Cardiovasc Res* 42: 391-401

**Butler A, Wei A, Baker K, Salkoff L** (1989) A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science* 243: 943-947

**Butz GM & Davisson R** (2001) Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool. *Physiol Genomics* 5:89-97

**Caron KM, James LR, Kim Hs, Knowles J, Uhlir R, Mao L, Hagamann JR, Cascio W, Rockmann H, Smithies O** (2004) Cardiac hypertrophy and sudden death in mice with a genetically clamped renin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3106-3111

**Cerbai E, Crucitti A, Sartiani L, DE Paoli P, Pino R, Rodriguez ML, Gensini G, Mugelli A** (2000) Long-term treatment of spontaneously hypertensive rats with losartan and electrophysiological remodeling of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 45:388-396

**Chromczynski P & Sacchi N** (1986) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159

**Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P** (1997) Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res* 231:363:371

**Cingolani HE, Perez NG, Aiello EA, de Hurtado MC** (2005) Intracellular signaling following myocardial stretch: an autocrine/paracrine loop. *Regul Pept* 128:211-220

**Clément S, Chaponnier C, Gabbiani G, Pellicieux C, Pedrazzini T** (2001) Angiotensin II stimulates alpha-skeletal actin expression in cardiomyocytes in vitro and in vivo in the absence of hypertension. *Differentiation* 69:66-74

**Collins AR, Schnee J, Wang W, kim S, Fishbein MC, Bruemmer D, Law RE, Nicholas S, Ross RS, Hsueh WA** (2004) Osteopontin modulates ang II-induced fibrosis in the intact murine heart. *J Am Coll Cardiol* 43: 1698-1705

**CONSENSUS the trial study group** (1987) The effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. *N Engl J Med* 316: 1429-1435



**Crowley SD, Gurley SB, Olivero MI, Pazmino AK, Griffiths R, Flannery PJ, Spurney HJ, Kim HS, Smithies O, Le H, Coffman TM (2005)** Distinct roles for the kidneys and systemic tissues in blood pressure regulation by the rennin-angiotensin-system. *J Clin Invest* 115: 1092-1099

**Danser AHJ, van Kesteren CAM, Bax WA, Tavenier M, Derkx FHM, Saxena PR, Schalekamp MADH (1997)** Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme in normal and failing human heart. *Circulation* 96: 220-226

**Decher N, Barth AS, Gonzalez T, Steinmeyer K, Sanguinetti M (2004)** Novel KChIP2 isoforms increase functional diversity of transient outward potassium currents. *J Physiol* 557: 761-772

**Deschnes I, DiSilvestre D, Juang GJ, Wu RC, An WF, Tomaselli GF (2002)** Regulation of Kv4.3 current by KChIP2 splice variants. *Circulation* 106:423-429

**Deschenes I & Tomaselli GF (2002)** Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Letters* 528:183-188

**Dixon JE & McKinnon D (1994)** Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ Res* 75: 252-260

**Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, MacKinnon D (1996)** The role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 79: 659-668

**Domenighetti AA, Wang Q, Egger M, Richards SM, Pedrazzini T, Delbridge LMD (2005)** Angiotensin II-mediated phenotypic cardiomyocyte remodeling leads to age-dependent cardiac dysfunction and failure. *Hypertension* 46: 426-432

**Doronin SV, Potapova IA, Lu ZJ, Cohen IS (2004)** Angiotensin receptor type 1 forms a complex with the transient outward potassium channel Kv4.3 and regulates its gating properties and intracellular localization. *J Biol Chem* 279: 48231-48237

**Dostal DE** (2000) The cardiac renin–angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Regul Pept.* 91:1-11

**Drewe JA, Verma S, Frech G, Joho RH** (1992) Distinct spatial and temporal expression patterns of K<sup>+</sup> channel mRNAs from different subfamilies. *J Neurosci* 12:538-48.

**Dzau VJ, Re R** (1994) Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. *Circulation* 89:493-498

**Fogari R, Mugellini A, Destro M, Corradi I, Zoppi A, Fogari E, Rinaldi A** (2006) Losartan and prevention of atrial fibrillation recurrence in hypertensive patients. *J Cardiovasc Pharmacol* 47:46-50

**Fridde CJ, Koga T, Rubin EM, Bristow J** (2000) Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci.* 97:6745-50

**Gelband H & Bassett AL** (1973) Depressed transmembrane potentials during experimentally induced ventricular failure in cats. *Circ Res* 32:625-34.

**Goltz D, Schultz JH, Stucke C, Wagner M, Bassaláy P, Schwoerer AP, Ehmke H, Volk T** (2007) Diminished Kv4.2/3 but not KChIP2 levels reduce the cardiac transient outward K<sup>+</sup> current in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 74:85-95

**Gong N, Bodi I, Zobel C, Schwartz A, Molkentin JD, Backx PH** (2006) Calcineurin increases cardiac transient outward K<sup>+</sup> currents via transcriptional up-regulation of Kv4.2 channel subunits. *J Biol Chem* 281:38498-506

**Greenstein JL, Wu R, Po S, Tomaselli GF, Winslow RL** (2000) Role of the calcium-independent transient outward current It1 in shaping action potential morphology and duration. *Circ Res* 87: 1026-1033

**Guo W, Xu H, London B, Nerbonne JM** (1999) Molecular basis of transient outward K<sup>+</sup> current diversity in mouse ventricular myocytes J Physiol 521: 587-599

**Guo W, Li H, Nerbonne JM** (2000) Functional consequences of elimination of I<sub>to,f</sub> and I<sub>to,s</sub>: early afterdepolarizations, atrioventricular block and ventricular arrhythmias in mice lacking Kv1.4 and expressing a dominant-negative Kv4  $\alpha$  subunit. Circ Res 87:73-79

**Guo W, Li H, Aimond F, Johns DC, Rhodes KJ, Trimmer JS, Nerbonne JM** (2002) Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K<sup>+</sup> currents. Circ Res 90: 586-593

**Guo W, Jung WE, Marionneau C, Aimond F, Xu H, Yamada KA, Schwarz TL, Demolombe S, Nerbonne JM** (2005) Targeted deletion of Kv4.2 eliminates I<sub>(to,f)</sub> and results in electrical and molecular remodeling, with no evidence of ventricular hypertrophy or myocardial dysfunction. Circ Res 2005 97:1342-50

**Harada K, Komur I, Shiojima I, Hayashi D, Kudo S, Mizuno T, Kijima K, Matsubara H, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y** (1998) Pressure overload induces cardiac hypertrophy in Angiotensin II type 1A receptor knockout mouse. Circulation 97:1952-1959

**Hoppe UC, Marban E, Johns DC** (2000) Molecular dissection of cardiac repolarization by in vivo Kv4.3 gene transfer. J Clin Invest 105:1077-1084

**Janzen C** (2003) Entwicklung einer Einzelzell-Multiplex-PCR-Analyse an isolierten Kardiomyozyten der Ratte zur Identifikation der zellspezifischen Expression der Kaliumkanal- $\beta$ -Untereinheit KChIP2. Med. Dissertation. Universität Hamburg

**Kääh S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pah PH, Kass DA, Marban E, Tomaselli GF** (1996) Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. Circ Res 78: 262-273

**Kääh S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G,**

**MacKinnon D, Tomaselli GF** (1998) Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circ Res* 98:1383-1393

**Kaprelian R, Wickenden AD, Kassiri Z, Parker TG, Liu PP, Backx PH** (1999) Relationship between K<sup>+</sup> channel down-regulation and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 517:229-45

**Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Iwao H** (1995) Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats. *Hypertension* 25:1252-9

**Kirchhoff F, Krebs C, Abdulhag UN, Meyer-Schwesinger C, Maas R, Helmchen U, Hilgers KF, Wolf G, Stahl RA, Wenzel U** (2008) Rapid development of severe end-organ damage in C57BL/6 mice by combining DOCA salt and angiotensin II. *Kidney Int* 73:643-50

**Koch-Weser** (1964) Myocardial actions of angiotensin. *Circ Res* 14:337-344

**Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyễn-Trần VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR** (2001) A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I<sub>(to)</sub> and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 107:801-813

**Larkin JE, Frank BC, Gaspard RM, Duka I, Gavras H, Quakenbush J** (2004) Cardiac transcriptional response to acute and chronic angiotensin II treatments. *Physiol Genomics* 18: 152-166

**Lebeche D, Kaprielian R, Hajjar R** (2006) Modulation of action potential duration on myocyte hypertrophic pathways. *J Mol Cell Cardiol* 40:725-735

**Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P** (1998) Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest* 101:1326-1342

**Liss B, Franz O, Sewing S, Bruns R, Neuhoff H, Roeper J** (2001) Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *EMBO J.* 20:5715-5724

**Litovsky SH & Antzelevitch C** (1988) Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res* 62:116-126

**Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D** (2002) Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 106:3068-72

**MacKinnon R** (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350:232-235

**Martins AS, Crescenzi A, Stern JE, Bordin S, Michelini LC** (2005) Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. *Hypertension* 46:1004-1009

**Moniotte S, Vaermann JL, Kockx MM, Larrouy D, Langin D, Noirhomme P, Balligand JL** (2001) Real-time RT-PCR for the detection of beta-adrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies. *J Mol Cell Cardiol* 33:2121:2133

**Marionneau C, Brunet S, Flagg TP, Pilgram TK, Demolombe S, Nerbonne JM** (2008) Distinct cellular and molecular mechanisms underlie functional remodeling of repolarizing K<sup>+</sup> currents with left ventricular hypertrophy. *Circ Res* 102:1406-15

**Myazaki M & Takai S** (2006) Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting-enzyme and chymase. *J Pharmacol Sci* 100:391-397

**Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G** (1996) Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 93:168-177

**Nerbonne JM** (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *Journal of Physiology* 525.2:285-298

**Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D** (2001) Genetic manipulation of cardiac K<sup>+</sup> channel function in mice. *Circ Res* 89:944-956

**Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H** (2006) The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 69:318-28

**Niwa N, Wang W, Sha Q, Marionneau C, Nerbonne JM** (2008) Kv4.3 is not required for the generation of functional I<sub>to</sub>f channels in adult mouse ventricles. *J Moll Cell Cardiol* 44:95-104

**Oshita A, Iwai M, Chen R, Ide A, Okumura M, Fukunaga M, Fukunaga S, Yoshii T, Mogi M, Higaki J, Horiuchi M** (2006) Attenuation of inflammatory vascular remodeling by Angiotensin II type 1 receptor-associated protein. *Hypertens* 48:671-676

**Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S, Pocock S** (2003) Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: The CHARME-Overall programme. *Lancet* 362: 759-766

**Petkova-Kirova PS, Gursoy E, Mehdi H, McTiernan CF, London B, Salama G** (2006) Electrical remodeling of cardiac myocytes from mice with heart failure due to the overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:2098-107

**Potreau D, Gomez JP, Fares N** (1995) Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res* 30: 440-448

**Prestle J, Dieterich S, Preuss M, Bieligg U, Hasenfuss G** (1999) Heterogeneous transmural gene expression of calcium-handling proteins and natriuretic peptides in the failing human heart. *Cardiovasc Res* 43:323-31

**Radicke S, Cotella D, Graf EM, Ravens U, Wettwer E** (2005) Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative  $\beta$ -subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *J Physiol* 565.3:751-756

**Rikitake Y, Oyama N, Wang CYC, Noma K, Satoh M, Kim HH, Liao JK** (2005) Decreased perivascular fibrosis but not cardiac hypertrophy in ROCK1 +/- haploinsufficient Mice. *Circulation* 112:2959-2965

**Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, Mackinnon D** (2001) Regulation of KChIP2 potassium channel  $\beta$  subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 533.2:119-125

**Rosati B, Grau F, Rodriguez S, Li H, Nerbonne JM** (2003) Concordant expression of KChIP2 mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle. *J Physiol* 548.3: 815-822

**Rose J, Armoundas AA, Tian Y, DiSilvestre D, Burysek M, Halperin V, O'Rourke B, Kass DA, Marbán E, Tomaselli GF** (2005) Molecular correlates of altered expression of potassium currents in failing rabbit myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:2077-2087

**Rothermund L, Pinto YM, Vetter R, Herfort N, Kossmehl P, Neumayer HH, Paul M, Kreutz R** (2001) Effects of angiotensin II subtype receptor 1 blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmatic Ca<sup>2+</sup> handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene *J Hypertens* 19:1465-1472

**Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S** (1992) Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 267:10551-10560

**Sadoshima J, & Izumo S** (1997) The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 59:551-71

**Sawa H, Tokuchi F, Mochizuki N, Endo Y, Furuta Y, Shinohara T, Takada A, Kawaguchi H, Yasuda H, Nagashima K** (1992) Expression of the angiotensinogen Gene and Localization of its protein in the human heart. *Circulation* 86: 138-146

**Serteri GG, Boddi M, Cecioni I, Vanni S, Coppo M, Papa ML, Bandinelli B, Bertolozzi I, Polidori G, Toscano T, Maccerini M, Modesti PA** (2001) Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular dysfunction. *Circ Res.* 88: 961-968

**Shibata R, Misonou H, Campomanes CR, Anderson AE, Schrader LA, Doliveira LC, Carroll KI, Sweatt JD, Rhodes KJ & Trimmer JS** (2003) A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *The J Biol Chem* 278:36445-36454

**Shimoni Y & Liu XF** (2003) role of PKC in autocrine regulation of rat ventricular k<sup>+</sup> currents by angiotensin and endothelin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1168-H1181

**Stevenson WG, Stevenson LW, Middlekauf HR, Saxon LA** (1993) Sudden death prevention in patients with advanced ventricular dysfunction. *Circulation* 88:2953-2961

**Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T** (1995) The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95:651-657

**Swedberg K, Kjekshust J, Snappin S** (1999) Long-term survival in severe heart failure in patients treated with enalapril. *European Heart Journal* 20: 136-139

**Takimoto K, Li D, Hershman KM, Li P, Jackson EK, Levitan ES** (1997) Decreased expression of Kv4.2 and novel Kv4.3 K<sup>+</sup> channel subunit mRNAs in ventricles of renovascular hypertensive rats. *Circ Res* 81:533-9

**Teutsch C, Kondo RP, Dederko DA, Chrast J, Chien KR, Giles WR** (2007) Spatial distributions of Kv4 channels and KChip2 isoforms in the murine heart based on laser capture microdissection. *Cardiovasc Res.* 73:739-49



**Tozakidou M, Goltz D, Hagenström T, Budack MK, Vitzthum H, Szlachta K, Bähring R, Ehmke H** (2009) Molecular and functional remodeling of I(to) by angiotensin II in the mouse left ventricle. *J Mol Cell Cardiol.* 2009

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

**Tomita F, Basset AL, Myerburg RJ, Kimura S** (1994) Diminished transient outward currents in rat hypertrophied ventricular myocytes. *Circ Res* 75: 296-303

**Touyz RM & Berry C** (2002) Recent advances in angiotensin II signalling. *Braz J Med Biol Res* 35: 1001-1015

**Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, Kijima K, Murayama K, Mosaki H, Moriguchi Y, Shibasaki y, Kamihata H, Inada M, Iwasaka T** (1998) Angiotensin type 2 Receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac myocytes are the major cell type for its expression. *Circulation* 83: 1035-1046

**Unger T** (2002) The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 89:3-10

**Urata h, Nishimura H, Ganten D** (1996) Chymase-dependent ang II formation in human. *Am J Hypertens* 9:277-284

**Usui S, Yao A, Hatamo M, Kohmoto O, Takahashi T, Nagai R, Kinugawa K** (2006) Upregulated neurohumoral factors are associated with left ventricular remodeling and poor prognosis in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Circ J* 70: 1208-1215

**van der Heyden MA, Wijnhoven TJ, Opthof T** (2006) Molecular aspects of adrenergic modulation of the transient outward current. *Cardiovasc Res* 71:430-42

**Van de Wal RM, Plokker HW, Lok DJ, Boomsma F, van de Horst T, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Voors AA** (2006) Determinants of increased Ang II levels in severe chronic heart failure patients despite ACE inhibition. *Int J Cardiol* 106:367-372

**Van Kats JP, Danser AH, Van Meegen JR, Sassen LM, Verdouw PD, Schalekamp MA** (1998) Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. *Circulation* 98: 73-81

**Van Kesteren CA, Van Heugten HA, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA, Danser AH** (1997) Ang II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts. *J Moll Cell Cardiol* 29:2147-2157

**Volk T, Nguyen THD, Schultz JH, Faulhaber J, Ehmke H** (2001) Regional alterations of repolarizing K<sup>+</sup> currents among the left ventricular free wall of rats with ascending aortic stenosis. *J Physiol* 530.3: 443-445

**von Lutterotti N, Catanzaro DF, Sealey JE, Laragh JH** (1994) Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal tissues. *Circulation* 89:458-470

**Wakisaka Y, Niwano S, Niwano H, Saito J, Yoshida T, Hirasawa S, Kawada H, Izumi T** (2004) Structural and electrical ventricular remodeling in rat acute myocarditis and subsequent heart failure. *Cardiovasc Res* 63:689-99

**Wang Y, Cheng J, Chen G, Rob F, Naseem RH, Nguyen L, Johnstone JL, Hill JA** (2007) Remodeling of outward K<sup>+</sup> currents in pressure-overload heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18:869-75

**Welch WJ, Chabrashvili T, Solis G, Chen Y, Gill PS, Aslam S, Wang X, Ji H, Sandberg K, Jose P, Wilcox CS** (2006) Role of extracellular superoxid dismutase in the mouse angiotensin slow pressure response. *Hypertens* 48:934-941

**Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U** (1994) Transient Outward Current in Human Ventricular Myocytes of Subepicardial and Subendocardial Origin. *Circ Res* 75:473-482

**Wickenden AD, Lee P, Sah R, Huang Q, Fishman GI, Backx PH** (1999) Targeted expression of a dominant-negative Kv4.2 K<sup>+</sup> channel subunit in the mouse heart. *Circ Res* 85:1067-1076

**Wickenden AD, Kaprielian R, You XM, Backx PH** (2000) The thyroid hormone analog DITPA restores  $I_{to}$  in rats after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:1105-1116

**Winslow RL, Rice J, Jafri S** (1998) Modeling the cellular basis of altered excitation-contraction coupling in heart failure. *Prog Biophys Mol Biol* 69:497-514

**Xu H, Guo W, Nerbonne JM** (1999a) Four kinetically distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 113:661-677

**Xu H, Li H, Nerbonne JM** (1999b) Elimination of the transient outward potassium current and action potential prolongation in mouse atrial myocytes expressing a dominant negative Kv4  $\alpha$  subunit. *J Physiol* 519:11-21

**Xu Z, Okamoto H, Akino M, Onozuka H, Matsui Y, Tsutsui H** (2008) Pravastatin attenuates left ventricular remodeling and diastolic dysfunction in angiotensin II-induced hypertensive mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 51: 62-70

**Xue B, Pamidimukkala J, Hay M** (2005) Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2177-H2184

**Yamada H, Fabris B, Allen AM, Jackson B, Johnston CI, Mendelsohn FAO** (1991) Localization of angiotensin converting enzyme in rat heart. *Circ Res* 68: 141-149

**Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou H, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y** (1996) Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 271: 3221-3228

**Yu H, Gao J, Wang H, Wymore R, Steinberg S, MacKinnon D, Rosen MR, Cohen IS (2000)** Effects of the renin-angiotensin system on the current  $I_{to}$  in epicardial and endocardial ventricular myocytes from the canine heart. *Circ Res* 86: 1062-1068

**Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G (2000)** Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* 342: 145-153

**Zhang TT, Takimoto K, Stewart FR, Zhu C, Levitan ES (2001)** Independent regulation of cardiac Kv4.3 potassium channel expression by angiotensin II and phenylephrine. *Circ Res* 88: 476-482

**Zhang X, Dostal DE, Reiss K, Cheng W, Kajstura J, Li P, Huang H, Sonnenblick EH, Meggs LG, Baker KM, Anversa P (1995)** Identification and activation of autocrine renin-angiotensin system in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol* 269: 1791-1802

**Zhou C, Ziegler C, Birder LA, Stewart AF, Levitan ES (2006)** Angiotensin II and stretch activate NADPH oxidase to destabilize cardiac Kv4.3 channel mRNA. [Circ Res](#) 98:1040-1047

**Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S (2004)** Transmural expression of transient outward potassium current subunit in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol* 561.3: 735-748

**Zisman LS, Asonko K, Dutcher DL, Ferdensi A, Robertson AD, Jenkin M, Bush EW, Bohlmeier T, Perryman MB, Briston MR (1998)** Differential regulation of cardiac angiotensin-converting enzyme binding sites and AT1 receptor density in the failing human heart. *Circulation* 98: 1735-1748

**Zobel C, Kassiri Z, Nguyen TT, Meng Y, Backx PH (2002)** Prevention of hypertrophy by overexpression of Kv4.2 in cultured neonatal cardiomyocytes. *Circulation* 106: 2385-91

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
Ang II	Angiotensin II
APD	Aktionspotentialdauer
Bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
diast. D	Diastolischer Blutdruck
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
EDTA	Ethylendiamin Tetraessigsäure
EtSH	Mercaptoethanol
g	Gramm
GTC	Guanidin Thiocyanat
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phospho-Ribosyl-Transferase
H <sub>2</sub> O	Wasser
I <sub>to</sub>	Kalziumunabhängiger transienter Kaliumauswärtsstrom
I <sub>to,f</sub>	schnell inaktivierender Kalziumunabhängiger transienter Kaliumauswärtsstrom
I <sub>to,s</sub>	langsam inaktivierender Kalziumunabhängiger transienter Kaliumauswärtsstrom
KChIP2	Kalium Channel Interacting Protein 2
KG	Körpergewicht
Kg	Kilogramm
Kv	spannungsabhängiger Kaliumkanal
MAD	Mittlerer Arterieller Druck
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm

PCR	Polymerase Ketten Reaktion
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
SEM	Standardmessfehler
syst. D	systolischer Blutdruck
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
z. B.	zum Beispiel

## **9. Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Professor Ehmke für die Überlassung des Themas, die sehr hilfreiche Manuskriptkorrektur und die Unterstützung auch neben der Promotion sehr herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Goltz, die mich während meiner Zeit im Labor betreute und mich in das Thema einführte. Bei Frau Tozakidou möchte ich mich für das Durchsehen der Schrift und viele weiterführende Anmerkungen bedanken. Frau Kock und Frau Vitzthum führten mich in die Arbeitstechniken der Molekularbiologie ein, vielen Dank dafür.

Frau Budack und Frau Kilp lernten mich in der Technik der Telemetriesender an.

Frau Kollien möchte ich dafür danken, dass Sie immer ein offenes Ohr und gute Ratschläge für mich hatte.

Bedanken möchte ich mich auch beim Zentrum für Molekulare Neurobiologie für die unkomplizierte Nutzung der Geräte.

Der größte Dank gilt aber meiner Frau, die mich in allen Phasen dieser Arbeit immer unterstützt und motiviert hat.

## 10. Lebenslauf

**Geburtsdatum:** 17.05.1979

**Geburtsort:** Hamburg

**Familienstand:** verheiratet mit Frau Dr. med. Enke Grabhorn, drei Kinder

**Staatsangehörigk.:** deutsch

**Schulbildung:** 08/1985 - 06/1989 Grundschule Sanderstraße  
08/1989 - 06/1998 Gesamtschule Bergedorf  
06/1998 Abitur, Note: 2,1

**Zivildienst:** 08/1998 - 09/1999 Bergedorfer Impuls (Integrationseinrichtung für psychisch erkrankte Menschen)

**Ausbildung:** 10/1999 - 09/2002 Berufsfachschule für Physiotherapie am UKE  
09/2002 Staatliche Prüfung für Physiotherapeuten, Note: 1,66

**Studium:** 02/2003 - 03/2003 Pflegepraktikum im AK St. Georg, Hamburg  
04/2003 - 03/2005 Medizinstudium an der Universität Gießen  
03/2005 Physikum, Note: 1,33  
04/2005 Wechsel an die Universität Hamburg  
04/2005 Beginn der Doktorarbeit  
04/2005 Famulatur in der Orthopädie-Praxis Dr. Manigold  
05/2005 Famulatur Innere Medizin im Klinikum Bremen-Nord  
08/2007 Famulatur in der orthopädischen Wirbelsäulenchirurgie des UKE  
05/2008 Famulatur in der Kinderklinik des UKE  
08/2008 - 12/2008 PJ-Tertial „Innere Medizin“ Israelitisches Krankenhaus  
12/2008 - 03/2009 PJ-Tertial „Orthopädie“ Schön Klinikum Eilbek  
03/2009 - 07/2009 PJ-Tertial „Chirurgie“ Asklepios Klinik Barmbek  
10/2009 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (ehemals 3. Staatsexamen), Note: 2,0

**Beruf. Tätigkeit:** seit 01/2010 Abteilung für Orthopädie/Unfallchirurgie im Albertinen Krankenhaus Hamburg



**Publikationen:** Die Dissertation ist Teil einer Arbeit, die beim *Journal of Molecular and Cell Cardiology* publiziert worden ist:

Tozakidou M, Goltz D, Hagenström T, Budack M, Vitzthum H, Szlachta K, Bähring R, Ehmke H (2010)  
*Molecular and functional remodeling of  $I_{to}$  by angiotensin II in the left mouse ventricle*. *Journal of Molecular and Cell Cardiology* 48: 140-151

**Ausland:** 11/2003 - 02/2003      Reiseaufenthalt in Neuseeland, kombiniert mit einem  
zweiwöchigen Praktikum im Christchurch Hospital

Hamburg, 01.04.2010

## 11. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....