

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. Neumann



Beeinflussung kardialer Gap Junctions durch Angiotensin II

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Berit Marianne Noack, geb. Ebelt
geboren am 28.09.1977 in Hohenmölsen

Betreuer: Prof. Dr. med. Stefan Dhein, Klinik für Herzchirurgie, Universität Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Stefan Dhein
2. Univ.-Prof. Dr. J. Neumann

Verteidigung am 23.06.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014289

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014289>]

Referat

Interzelluläre Kommunikation stellt die Basis für eine intakte Funktion von Geweben und Organen dar. Gap Junctions sind polymere Strukturen aus 12 Connexinen, jeweils 6 Connexine bilden einen Hemikanal. Ein funktionsfähiger Kanal entsteht durch das Andocken zweier Hemikanäle benachbarter Zellen. Gap Junctions sind maßgeblich an der direkten Zell-zu-Zell Kopplung beteiligt.

Im Rahmen kardialer Erkrankungen kommt es häufig zum Auftreten von Arrhythmien, diese sind durch die Alteration von Gap Junctions zumindest teilweise mitbedingt. Die hier vorgestellte Arbeit untersucht den Einfluss von Angiotensin II auf kardiale Gap Junctions an neonatalen Rattenkardiomyozyten.

Nach 24 stündiger Inkubation mit Angiotensin II kommt es zum signifikanten Anstieg der Expression von Connexin 43, Connexin 40 wird nicht durch Stimulation mit Angiotensin II beeinflusst. Des Weiteren findet sich ein erhöhter Phosphorylierungsgrad von Connexin 43. Die genannten Effekte sind durch Losartan, einen AT₁-Rezeptor-Antagonisten blockierbar. Die Endothelin-Rezeptorblockade bleibt ohne Auswirkungen, das bedeutet, eine durch Angiotensin II ausgelöste gesteigerte Endothelin-Produktion ist nicht für die vermehrte Expression und Phosphorylierung von Connexin 43 verantwortlich. Die intrazelluläre Signaltransduktion beinhaltet MAP-Kinasen als second messenger. Sowohl die Inhibierung der MEK, als auch der p 38 Proteinkinase führt zum Rückgang der Angiotensin II vermittelten Wirkungen. Die funktionelle Relevanz zeigt sich in den Untersuchungen des Double Cell Patch Clamp Verfahrens. Nach 24 stündiger Inkubation der Zellen mit Angiotensin II kann ein signifikant erhöhter Gap Junction Leitwert gemessen werden, was einer erhöhten Leitfähigkeit und damit Kopplung der Zellen entspricht. Die Aussagen lassen sich durch immunfluoreszenzmikroskopische Bilder morphologisch untermauern.

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	1
2	Zielstellung	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Verwendete Geräte und Chemikalien	10
3.2	Verwendete Antikörper	12
3.3	Zellkultur	12
3.4	Zelllysis	16
3.5	Proteinbestimmung	17
3.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	18
3.7	Western-Blot	20
3.8	Detektion	21
3.9	Immunhistologie	23
3.10	Statistik	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Expression der Connexine 40, 43 und 45 an neonatalen Rattenkardiomyozyten	25
4.2	Einfluss von Angiotensin II auf die Expression der Connexin 40 und 43 sowie auf die Phosphorylierung	26
4.3	Signaltransduktion	32
4.4	Zusammenfassung – Ergebnisse	37
5	Diskussion	38
6	Zusammenfassung	47
7	Literaturverzeichnis	50
8	Thesen	63

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzym
CTGF	connective tissue growth factor
Cx37	Connexin 37
Cx40	Connexin 40
Cx43	Connexin 43
Cx45	Connexin 45
Cx46	Connexin 46
Cx-NP	nicht-phosphorylierte Connexin-Isoform
Cx-P	phosphorylierte Connexin-Isoform
ICAM -1	interzelluläres Adhäsionsmolekül Typ 1
IP3	Inositoltriphosphat
JAK	Janus Kinase
MAP – Kinasen	mitogen – activated protein kinases
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5 Bisphosphat
PTHrP	Parathyroid – Hormon verwandtes Protein
RAAS	Renin–Angiotensin–Aldosteron–System
TGF β	transforming growth factor β
VCAM-1	vaskuläres Adhäsionsmolekül Typ 1

1 Einleitung

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) mit seinem Effektorpeptid Angiotensin II repräsentiert eines der phylogenetisch ältesten Hormonsysteme. Seit der Entdeckung von Renin durch Tigerstedt und Bergman vor mehr als 100 Jahren ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System Ziel intensiver Forschung. Viele Entdeckungen trugen seither zum besseren Verständnis des RAAS bei.

Ausgangspunkt der enzymatisch gesteuerten Kaskade ist das α 2-Globulin Angiotensinogen, welches überwiegend in der Leber synthetisiert und in den Blutkreislauf abgegeben wird. Renin, eine Protease, die in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet wird, wandelt Angiotensinogen in das biologisch noch inaktive Angiotensin I um. Im Plasma und in den verschiedenen Geweben wird schließlich Angiotensin I durch das angiotensin converting enzym (ACE) zu dem biologisch aktiven Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt.

Angiotensin II ist einer der wichtigsten Mediatoren des Körpers für Blutdruckregulation, Aldosteronausschüttung und Natriumreabsorption. Neben diesen „klassischen“ Angiotensin II vermittelten Effekten rücken Erkenntnisse über die Bedeutung des RAAS im Hinblick auf die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen immer mehr in den Blickpunkt und ändern die traditionelle Sicht auf die Rolle des Angiotensin II. Mittlerweile ist generell akzeptiert, dass Angiotensin II an der Regulierung der Expression unter anderem von Wachstumsfaktoren [Huckle und Earp 1994; Rosendorff 1996], Zytokinen [Jesmin et al. 2003] und Chemokinen [Sadoshima 2000] von Zellen beteiligt ist und somit Vorgänge wie Wachstum und Apoptose [Matsubara 1998; Izumiya et al. 2003], Fibrose und Inflammation [Kataoka et al. 2002] mit steuert [Hsueh et al. 1995; Booz und Baker 1996; Ruiz-Ortega et al. 2003].

Studien der vergangenen Jahre belegen, dass Angiotensin II ein potenter proinflammatorischer Wirkstoff ist [Ruiz-Ortega et al. 2001]. Angiotensin II moduliert die Antworten von Immun- und Entzündungszellen wie Chemotaxis, Proliferation und die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen [Ruiz-Ortega et al. 2001]. Die Präsenz einer inflammatorischen Reaktion in arteriellen Gefäßwänden wird in Zusammenhang mit Gefäßerkrankungen einschließlich Atherosklerose und arterieller Hypertonie beschrieben [Ross 1999]. Angiotensin II ist an dieser inflammatorischen Antwort durch die Freisetzung verschiedener proinflammatorisch wirksamer

Mediatoren wie Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Zytokinen beteiligt. Angiotensin II induziert die Adhäsion von Monozyten und neutrophilen Granulozyten am Endothel [Ruiz-Ortega et al. 2001] durch die Produktion von P-Selectin, Interzellulären Adhäsionsmolekül Typ 1 (ICAM-1) und Vaskulären Adhäsionsmolekül Typ 1 (VCAM-1) in Gefäßendothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur in vivo und in vitro [Tayeh und Scicli 1998; Pastore et al. 1999; Tummala et al. 1999; Piqueras et al. 2000]. Hypertensive Patienten präsentieren erhöhte Serum Level von Adhäsionsmolekülen [Ruiz-Ortega et al. 2001]. Endotheliale Dysfunktion ist charakterisiert durch vermehrte Adhäsion von zirkulierenden Monozyten. Es wird die Expression der gleichen Adhäsionsmoleküle beobachtet wie nach Stimulation mit Angiotensin II. Im Tierversuch verursacht Angiotensin II endotheliale Dysfunktion, messbar durch verschlechterte Vasodilatation nach Behandlung mit Acetylcholin [Rajagopalan et al. 1996]. ACE- Hemmer verringern die endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung [Mancini et al. 1996]. Es ist daher anzunehmen, dass Angiotensin II über den Mechanismus der endothelialen Dysfunktion die Entstehung von Atherosklerose fördert.

Der vorteilhafte Effekt von ACE-Hemmern und AT₁- Rezeptor Blockern bei Herzinsuffizienz und nach Myokardinfarkt ist zumindest teilweise unabhängig von der Blutdrucksenkung zu sehen. Es entstand die These, dass Angiotensin II nicht nur in der Zirkulation, sondern auch lokal im Herzgewebe gebildet wird. Es folgten Studien, die die kardiale Angiotensin II- Bildung untersuchten. Diese nutzten Infusionen von radioaktiv markiertem Angiotensin II, um aus dem Plasma aufgenommenes von lokal synthetisiertem Angiotensin II differenzieren zu können. Es zeigte sich, dass Angiotensin II im Herz tatsächlich zu großen Teilen lokal generiert wird, sowohl unter physiologischen, als auch unter pathophysiologischen Bedingungen [van Kats et al. 2000; Jan Danser und Saris 2002].

Frühere Untersuchungen demonstrierten bereits, dass Angiotensin II ein Wachstumsfaktor ist, welcher Hyperplasie oder Hypertrophie in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Balance der verschiedenen Wachstumsfaktoren induziert [Egido 1996]. In Endothelzellen induziert Angiotensin II Apoptose. Dies könnte Einfluss auf die Anlagerung von Thrombozyten und Entzündungszellen haben und somit einen weiteren potentiellen Mechanismus für die Entstehung von Atherosklerose darstellen [Dimmeler et al. 1997]. In vivo bewirkten Infusionen von Angiotensin II Zellproliferation,

Apoptose oder die gesteigerte Bildung von Extrazellulärsubstanz [Kim und Iwao 2000]. Es wurde beobachtet, dass Parathyroid- Hormon verwandtes Protein (PTHrP), ein mitogener und vasodilatatorisch wirksamer Mediator, vermehrt in mit Angiotensin II infundierten Ratten in der Aorta und den Nieren gebildet wird, was in Zusammenhang mit Zellproliferation und Fibrose steht [Lorenzo et al. 2002]. Angiotensin II moduliert die Synthese sowie den Abbau von Extrazellulärmatrix [Mezzano et al. 2001]. Die durch Angiotensin II vermittelte Produktion von Extrazellulärsubstanz wird hauptsächlich über transforming growth factor β (TGF β) induziert [Mezzano et al. 2001]. Ebenso wurden andere Mediatoren der Angiotensin II induzierten Fibrose beschrieben. So auch der connective tissue growth factor (CTGF), ein profibrinogen wirksames Zytokin, welches bei der TGF β vermittelten Fibrose eine Rolle spielt [Gupta et al. 2000]. CTGF wird in atherosklerotischen Plaques beim Menschen überexprimiert [Oemar et al. 1997]. Es wurde beobachtet, dass bei Angiotensin II induzierter Hypertonie die CTGF Produktion in der Aorta erhöht ist. Zusammengenommen scheint CTGF ein Mediator fibrinogener Effekte von Angiotensin II zu sein [Ruiz-Ortega et al. 2001].

Die Akkumulation von Extrazellulärsubstanz ist erklärbar durch eine gesteigerte Synthese sowie durch einen verminderten Abbau. Ein Prozess, der durch Proteasen-Inhibitoren verursacht wird. Metalloproteinasen können eine Vielzahl von Proteinen der extrazellulären Matrix abbauen. Angiotensin II erhöht die Produktion von Metalloproteinasen [Kim und Iwao 2000]. Dieser Weg, also der vermehrte Abbau von Extrazellulärmatrix durch Metalloproteinasen, ist ein kritisches Ereignis, welches zur Schwächung der Gefäßwand führt. Das Renin-Angiotensin-System ist außerdem verbunden mit der Aktivität von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1. Dadurch fördert es sowohl Thrombose als auch Fibrose [Ruiz-Ortega et al. 2001].

Das Oktapeptid Angiotensin II entfaltet seine beschriebenen vielfältigen Wirkungen über verschiedenen Rezeptor-Subtypen. Zwei Hauptrezeptoren wurden bisher charakterisiert, der Angiotensin-Typ1(AT₁)- und der Angiotensin-Typ2(AT₂)- Rezeptor. Diese sind sehr heterogen in peripheren Geweben sowie im Gehirn verteilt [Obermüller et al. 1991; Tsutsumi und Saavedra 1991; Timmermans et al. 1992; Matsubara et al. 1998]. Der AT₁- Rezeptor spielt im kardiovaskulären System die Hauptrolle, über ihn werden die weithin bekannten Angiotensin II- Wirkungen wie Vasokonstriktion [Carey et al. 2000], Produktion von Wachstumsfaktoren, Hypertrophie der glatten Muskulatur

und der Kardiomyozyten sowie Proliferationsreize vermittelt [Nakamura et al. 1999]. Der AT_2 -Rezeptor hingegen scheint eine große Bedeutung während der fetalen Entwicklung zu besitzen, wobei er möglicherweise entscheidend an Gewebedifferenzierungen beteiligt ist. Unter pathophysiologischen Bedingungen wie Herzinsuffizienz, Gefäßverletzungen sowie nach Herzinfarkten sind modulierende Wirkungen beschrieben bis hin zur Auslösung von Apoptose [Ishida und Fukamizu 1999], dabei wird ein enges Zusammenwirken mit dem AT_1 -Rezeptor vermutet, jedoch ist diese Frage noch nicht abschließend geklärt [Nakamura et al. 1999].

In Nagetieren, jedoch nicht beim Menschen, existiert der AT_1 -Rezeptor in 2 Isoformen, dem AT_{1a} - und dem AT_{1b} -Rezeptor [Kakar et al. 1992; Sandberg et al. 1992]. Im kardiovaskulären System ist der AT_{1a} -Rezeptor hauptsächlich an der Regulierung des Blutdrucks sowie als potenter Wachstumsstimulator beteiligt, wohingegen der AT_{1b} -Rezeptor den Gefäßtonus in Abwesenheit des AT_{1a} -Rezeptors beeinflusst [De Mello und Danser 2000].

Die Angiotensin-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen [Unger et al. 1996; Davie et al. 2001], dessen ungeachtet gibt es sehr verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege.

Die Bindung von Angiotensin II am AT_1 -Rezeptor führt zur Aktivierung einer „klassischen“ G-Protein-Kaskade mit $G_{q/11}$ -Stimulation und nachfolgend Phospholipase C-, PLD- und PLA2-Stimulation [Sim und Lim 1998; Touyz und Schiffrin 2000; De Gasparo 2002]. Die Aktivierung der Phospholipase C führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5 Biphosphat (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol [Adams und Brown 2001]. IP₃ ruft eine Erhöhung des intrazellulären Calciums hervor, was seinerseits zu einer erhöhten Aktivität der Proteinkinase C führt [Balla et al. 1998]. Die durch PLD und PLA2 initiierte Kaskade endet in der Bildung von Fettsäuren, welche die Vorstufen zur Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen darstellen [Lucius et al. 1999]. Im Weiteren zeigen frühere Nachforschungen zusätzliche Signaltransduktionswege, welche zum einen ras/raf vermittelt zur Aktivierung von MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases) führen, zum anderen konnten die Janus Kinase (JAK) und die c-Jun N-terminale Kinase-Familie als Mediatoren identifiziert werden [Marrero et al. 1996]. Im Gegensatz zum AT_1 -Rezeptor induziert die Signaltransduktionskaskade des AT_2 -Rezeptors keinen Anstieg von Inositoltriphosphat und Diacylglycerol mit Calcium-Mobilisation. Die

Aktivierung des AT₂-Rezeptors stimuliert intrazelluläre Mechanismen mit Involvierung verschiedener Tyrosin und Serin/Threonin Phosphatasen, cyclischem Guanosinmonophosphat und Phospholipase A2 [De Gasparo 2002].

Interzelluläre Kommunikation stellt die Basis für die intakte Funktion von Geweben und Organen dar. Neben der zellulären Kommunikation, die durch Freisetzung von chemischen Transmittern, Hormonen und Mediatoren realisiert wird, spielt die direkte elektrische und chemische Kopplung von Zellen via Gap Junctions eine wichtige Rolle für die Organisation von Geweben und die Formung eines elektrischen Synzythiums [Dhein 1998].

Die direkte Zell-zu-Zell Kopplung durch Gap Junctions ist entscheidend für die Funktion vieler Gewebe, beispielsweise der Interaktionen zwischen Glia und Neuronen [Dermietzel et al. 1989], der Ernährung der Augenlinienszellen [Kistler et al. 1990], der Kommunikation von Leberzellen [Fujikura et al. 1993] und der elektrischen Kopplung von Kardiomyozyten [Dhein 1998]. Bei kardialen Erkrankungen geht die Alteration von Gap Junctions mit der Entstehung von Arrhythmien einher [Sepp et al. 1996; De Mello 1999; Dhein und Hammerath 2001].

Die intensive Erforschung der Gap Junction Kanäle u. a. durch Elektronenmikroskopie und molekularbiologische Verfahren führte zu einem heute weitgehend akzeptierten Modell der Kanäle. In Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen sieht man Gap junctions als polymere Strukturen, welche aus 12 Proteinen bestehen, die Connexine genannt werden. Die Bezeichnung der Connexine korrespondiert mit deren Molekulargewicht, beispielsweise Connexin 40 (Cx40) mit einem Molekulargewicht von 40 kDa, Connexin 43 mit einem Molekulargewicht von 43 kDa usw.. Die Connexin-Familie umfasst mindestens 15 verschiedene Isoformen, von denen die Isoformen Connexin 37 (Cx37), Connexin 40 (Cx40), Connexin 43 (Cx43), Connexin 45 (Cx45) und Connexin 46 (Cx46), Connexin 31,9 (Cx31,9), Connexin 50 (Cx50) sowie Connexin 57 (Cx 57) [Dhein 2004; Sohl und Willecke 2004] im Herzkreislaufsystem von Säugetieren exprimiert werden [Dhein 1998; Jongasma und Wilders 2000; van Veen et al. 2001]. Jedes Connexin hat vier transmembranäre Domänen, einen extrazellulären Loop und zwei intrazelluläre Loops. Auf zytoplasmatischer Seite sind sowohl eine Carboxyl-als auch eine Aminogruppe lokalisiert [Dhein 1998]. Sechs Connexin-Moleküle bilden einen Hemikanal, auch Connexon genannt. Nach Translation der mRNA erfolgt die Synthese der Connexine im

Endoplasmatischen Retikulum. Zur Oligomerisierung zu Connexonen findet nachfolgend der Transport zum Golgi-Apparat statt, erst danach erfolgt die Integration in die Zellmembran. Durch Andocken zweier Hemikanäle benachbarter Zellen entsteht ein funktioneller Kanal. [Musil und Goodenough 1990]. Der gebildete Kanal ist 100-150 Å lang, der innere Porendurchmesser beträgt 12,5 Å, Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von ca. 1000 Da können den Kanal passieren [Beyer et al. 1995]. Der Abbau der Connexine kann sowohl über Lysosomen als auch durch Proteasome erfolgen [Laing und Beyer 1995].

Bemerkenswerterweise sind die Halbwertszeiten der Connexine sehr kurz. Der rapide Umsatz von Connexin 43 in kardialen Gewebe wurde von Beardslee gezeigt, indem Langendorff-perfundierten Ratten-Herzen radioaktiv markiertes Methionin zugesetzt wurde. Dabei zeigte sich eine Halbwertszeit von Connexin 43 von nur 1,3 Stunden [Beardslee et al. 1998]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass an jeder Grenzfläche zwischen Kardiomyozyten die die Gap Junction formenden Proteine mehrfach täglich komplett ausgewechselt werden. Der rapide Umsatz der Gap Junction Proteine begründet die Annahme, dass der Umbau von interzellulären Kommunikationswegen innerhalb kürzester Zeit stattfindet, also vermutlich hochgradig reguliert ist.

In humanem Myokard sind insbesondere Connexin 43, Connexin 40 und Connexin 45 nachweisbar [Davis et al. 1995; Gros und Jongasma 1996], dabei zeigen sie ein unterschiedliches Verteilungsmuster. Während im Arbeitsmyokard des Ventrikels hauptsächlich Connexin 43 und in frühen Entwicklungsstadien Connexin 45 gefunden wurde, war Connexin 40 nur in wesentlich geringerem Umfang nachweisbar. Vorhofmyokard und Erregungsleitungssystem enthalten alle drei genannten Connexine nebeneinander, das Reizleitungssystem jedoch in deutlich höheren Konzentrationen [Davis et al. 1995; Polontchouk et al. 2001]. Im Sinusknoten wurde überwiegend Connexin 45 gefunden, ebenfalls ein geringer Gehalt an Connexin 40, Connexin 43 war nicht nachweisbar [Boyett et al. 2000]. In den langsamer leitenden Regionen des Atrioventrikularknotens wurden, in Übereinstimmung mit der Funktion, insgesamt nur wenige Gap Junction Plaques detektiert [Beyer et al. 1995; Davis et al. 1995]. Interessant ist, dass die genannte Verteilung kardialer Gap Junction-Proteine nicht in allen Säugetieren gleich ist. Im Tiermodell konnte ein abweichendes Verteilungsmuster beobachtet werden. So konnte im Ventrikelmyokard der Maus zwar auch Connexin 43 als das vorherrschende Connexin identifiziert werden, Connexin 40 war jedoch gar nicht nachweisbar, Connexin 45 nur in Spuren [Darrow et al. 1995]. Connexin 40 wurde

vorwiegend im Vorhofmyokard und im Erregungsleitungssystem gefunden [Gros et al. 1994; Delorme et al. 1995], Connexin 45 ebenfalls im Reizleitungssystem [Coppen et al. 1998].

Neben dieser unterschiedlichen Lokalisation im Herzen selber haben die Connexine auch eine speziell geordnete Lokalisation innerhalb der Herzmuskelzelle [Peters et al. 1994; Peters und Wit 1998]. Im adulten Herz befinden sich Gap Junctions überwiegend an den distalen Enden der Myofibrillen im Bereich der Glanzstreifen. Diese Orientierung entwickelt sich erst im Laufe des Lebens, bei neugeborenen Säugetieren ist sie noch nicht vorhanden [Gourdie et al. 1992; Peters et al. 1994; Angst et al. 1997]. Die Umverteilung der Gap Junctions ist mit einer Abnahme der Seit-zu-Seit-Verbindungen mit zunehmendem Alter assoziiert. Durch die genannte Verteilung kardialer Gap Junctions mit Konzentration der Plaques im Bereich der Glanzstreifen ist eine drei- bis zehnfach höhere Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit in longitudinaler Richtung im Vergleich zur transversalen Richtung bedingt [Saffitz et al. 1994; Saffitz et al. 1995; Spach et al. 2000].

Die Erregungseigenschaften des normalen Vorhof- und Kammermyokards werden durch Anzahl, Größe und Verteilung der interzellulären Gap Junctions bestimmt. Eine Vielzahl von Faktoren wie beispielsweise Gewebedilatation, erhöhte Katecholaminspiegel oder Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration können zu einer veränderten Funktion der Gap Junctions führen, und damit zur Beeinträchtigung der Herzfunktion und zum Entstehen von Arrhythmien beitragen. Nach 24stündiger Inkubation neonataler Kardiomyozyten mit cAMP, einem potenten Mediator kardialer Hypertrophie, konnte eine Zunahme des Gesamtgehaltes von Connexin 43 verifiziert werden. Der erhöhte Connexin 43 Gehalt ging mit einer ebenfalls gesteigerten Impulsleitungsgeschwindigkeit einher [Darrow et al. 1996; Salameh und Dhein 2005].

Im Rahmen kardialer Erkrankungen, insbesondere bei ischämischen und dilatativen Kardiomyopathien unterliegt der linke Ventrikel einem chronischen Umbauprozess, welcher durch Kammerdilatation, myokardialer Hypertrophie sowie Veränderungen der Extrazellulärmatrix gekennzeichnet ist; Dem ventrikulären Remodeling [Cohn 1995; Dietz et al. 1999; Burlew und Weber 2000]. Diese strukturellen Veränderungen des Myokards gehen mit Anormalitäten der Erregungsleitung einher [Severs 1994]. Bei

chronischer Herzinsuffizienz wurden signifikante Veränderungen der Expression und Verteilung der Gap Junctions beobachtet. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Gap Junction-Größe im pathologisch veränderten Gewebe [Kostin et al. 2003] sowie eine generelle Reduktion der Gap Junction-Fläche in Bezug auf die Zelloberfläche von bis zu 40% [Peters 1995; Kaprielian et al. 1998]. Im Gegensatz dazu steigt der Gehalt an Connexin 43 im Rahmen kompensierter myokardialer Hypertrophie an [Peters 1996; Kostin et al. 2004; Salameh et al. 2006]. Auch das Verhältnis von Connexin 43 zu Connexin 40 sowie die räumliche Verteilung der Gap Junctions innerhalb einer Zelle verändert sich unter pathophysiologischen Bedingungen. Beeinflusst wird das Expressionsmuster durch Veränderungen der Konzentration zirkulierender Mediatoren wie Wachstumshormonen, darunter Angiotensin II. Insbesondere im Hinblick auf das ventrikuläre Remodeling spielt Angiotensin II eine entscheidende Rolle [Sonnenblick und LeJemtel 1989; Beckwith und Munger 1993; Brilla et al. 1993; Brilla 1994; Blaufarb und Sonnenblick 1996; Aartsen et al. 2002].

Bereits frühere Arbeiten zeigten einen Anstieg von Connexin 43 in neonatalen Rattenkardiomyozyten unter Einfluss von Angiotensin II. Nach 24stündiger Exposition konnte dabei ein zweifacher Anstieg von Connexin 43 registriert werden. Die Inkubation führte weiterhin zu einer erhöhten Anzahl und Größe von Gap Junctions [Dodge et al. 1998].

Neben einer veränderten Expression der verschiedenen Connexine konnte eine Umverteilung kardialer Gap Junctions unter pathophysiologischen Bedingungen beobachtet werden. Beispielsweise wurde eine Lateralisierung der Gap Junction bei Vorhofflimmern beobachtet [Polontchouk et al. 2001]. Es kommt insbesondere bei Ischämie zur Umverteilung der im gesunden Myokard transversal im Bereich der Glanzstreifen angeordneten Gap Junctions hin zur Verteilung über die gesamte Zelloberfläche [Peters 1995; Peters et al. 1997]. Dieses Gap Junction Remodeling führt zu einer Diskontinuität der Erregungsausbreitung mit der Gefahr der Entstehung von Arrhythmien. Insbesondere Patienten nach Myokardinfarkt sind vom Auftreten zum Teil lebensbedrohlicher ventrikulärer Arrhythmien bedroht. Die Umverteilung kardialer Gap Junctions in der Randzone von Infarkten scheint dabei einen bedeutenden Faktor in der Genese der Arrhythmien darzustellen [Smith et al. 1991; Peters et al. 1995; Gutstein et al. 2001].

2 Zielstellung

Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich in diesem Zusammenhang mit folgender Fragestellung:

1. Ist die Expression der kardialen Connexine 40, 43 und 45 in einem Zellkulturmodell neonataler Rattenkardiomyozyten beeinflussbar?
2. Spielt Angiotensin II eine Rolle in der Beeinflussung der Expression kardialer Connexine?
3. Werden die Connexine 40, 43 und 45 durch Angiotensin II gleichsinnig beeinflusst oder differentiell?
4. Welches ist der Signaltransduktionsweg?

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

<u>Chemikalie/ Medikament</u>	<u>Hersteller</u>
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	(BioRad, Richmond, USA)
Ammoniumpersulfat (APS)	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
BQ123	(Alexis, USA)
BQ788	(Alexis, USA)
Bromphenolblau	(Sigma, St.Louis, USA)
CaCl ₂	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Collagenase Type II	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Seromed # C11-22 Lot No K008	(Biochrome AG, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blue	(Bio Rad, Richmond, USA)
CuSO ₄	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Endothelin-1	(Alexis, USA)
Essigsäure	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
fetales Kälberserum (FKS)	(Gibco Life Technologies, USA)
Folin-Reagenz	(Sigma, Steinheim, Deutschland)
Gelatine	(Sigma, Steinheim, Deutschland)
Glucose	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Glycerol	(Sigma, St.Louis, USA)
Glycin	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
HCl	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
HEPES	(Sigma, Steinheim, Deutschland)
KCl	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
KH ₂ PO ₄	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kalium Na Tartrat Tetrahydrat	(Fluka, Steinheim, Deutschland)
L-Glutamin	(Sigma, St.Louis, USA)
M 199 (mit Hanks' salts und HEPES)	(Sigma, St.Louis, USA)
MAP kinase inhibitor set beehaltend	(Calbiochem, USA)
PD 98059	
SB 202190	
SB 203580	
und SB 202474	

Methanol	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
MgCl ₂	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
MgSO ₄	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Molekulargewichtsstandart	(BioRad, Richmond, USA)
Na ₂ CO ₃	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
NaCl	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
n-Propyl-Gallat, P-3130	(Sigma, St.Louis, USA)
Penicillin	(Sigma, St.Louis, USA)
Pferdeserum	(Sigma, St.Louis, USA)
PMSF	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Ponceau-Färbelösung	(Sigma, St.Louis, USA)
Rinderserum Albumin (BSA)	(Sigma, St.Louis, USA)
Roti Block Reagenz	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
SDS	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Streptomycin	(Sigma, St.Louis, USA)
Supersignal Reagenz	(Pierce, USA)
TCA	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
TEMED	(Serva, Heidelberg, Deutschland)
Tris	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	(Sigma, St.Louis, USA)
Tween	(Sigma, Steinheim, Deutschland)

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Biofuge	(Kendro, Deutschland)
Deckgläschen	(Schütt, Deutschland)
Einmalküvetten	(Brand, Deutschland)
Filterpapier GB004	(Schleicher und Schuell, Deutschland)
Gefriertruhe	(Forma, Frankfurt, Deutschland)
Inkubator	(Nuaire, Plymouth, USA)
Nitrocellulose ECL-Membran	(Amersham Pharmacia, USA)
Petrischalen	(Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
pH-Meter	(WTW, Weihenheim, Deutschland)

Pipettenspitzen	(Roth, Deutschland)
Pipetten	(Eppendorff, Deutschland)
Power Pack P25	(Biometa, Göttingen, Deutschland)
Scanner	(Twain, CA, USA)
Schüttler	(Schütt, Deutschland)
Spectrometer	(Beckman, Deutschland)
Tank-Blotting-System	(BioRad, Richmond, USA)
Vortex	(Scientific industries, Bohemia, USA)
Waage	(Mettler GmbH, Giessen, Deutschland)
Wasserbad	(Julabo, Seelbach, Deutschland)
X-ray-films	(Kodak, Deutschland)

3.2 Verwendete Antikörper

Monoklonale Antikörper gegen die Aminosäuren 250-272 von Ratten Cx43 (Chemicon, USA).

Polyklonale Antikörper gegen die Aminosäuren 231-330 von Ratten- Cx40 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J-A. Haefliger; Department of Internal Medicine B, Laboratory of Molecular Biology, DMIB 19-135S, CHUV Lausanne, CH-1011 Lausanne, Switzerland) [Haefliger et al., 1999; Polontchouk und Eppenberger, 1999].

Monoklonale Antikörper gegen Ratten Cx45 (Chemicon, USA).

Peroxidase-gekoppelter sek. Antikörper, Goat anti-mouse IgG (Pierce, USA, Produkt Nr. 31430, Lot Nr. 97071420).

Peroxidase-gekoppelter sek. Antikörper, Goat anti-rabbit IgG (Chemicon, USA).

3.3 Zellkultur

Zur Vorbereitung der Zellkultur wurden folgende Medien und Lösungen unter sterilen Bedingungen hergestellt:

Phosphat-Puffer (PBS)	137 mmol/l, 8 g/l NaCl
2,7 mmol/l, 0,2 g/l KCl	

8,3 mmol/l, 1,5 g/l Na₂HPO₄

1,5 mmol/l, 0,2 g/l KH₂PO

PBS/Glucose-Lösung

Phosphat-Puffer (PBS)

20 mmol/l, 4g/l Glucose

pH auf 7,4 einstellen

Lagerung bei 4°C

Disaggregationslösung

50 ml Phosphat-Puffer (PBS)

200 mg Glucose

500 mg Rinderserum Albumin (BSA)

50 mg Collagenase Typ II

kurz vor Gebrauch herstellen

Medium zur Resuspension des Überstandes 44,5 ml M 199

50µl, 100 µg/ml Penicillin

50µl, 100 µg/ml Streptomycin

5 ml, 10%iges Fetales Kälberserum (FKS)

300 mg, 25 mmol/l HEPES

500 µl, 2 mmol/l L-Glutamin

Lagerung bei 4°C

Kultur-Medium für den ersten Tag 84 ml M 199

1ml, 2 mmol/l L-Glutamin

5 ml, 5%iges FKS

100µl, 100µl/ml Penicillin

100 µl, 100 µl/ml Streptomycin

10 ml, 10 %iges Pferdeserum

Lagerung bei 4°C

Kultur-Medium für nach dem ersten Tag 175,5 ml M 199

2 ml, 2mmol/l L-Glutamin

2ml, 1 %iges FKS

200 µl, 100 µg/ml Penicillin

200 μ l, 100 μ l/ml Streptomycin

20 ml, 10 %iges Pferdeserum

Lagerung bei 4°C

Dulbecco`s Wasch-Lösung für den 2. Tag 137 mmol/l, 8g NaCl

2,68 mmol/l, 200 mg/l KCl

6,48 mmol/l, 1,2 g/l Na₂HPO₄·2H₂O

1,47 mmol/l, 1,2 g/l KH₂PO₄

0,49 mmol/l, 100 mg/l MgCl₂·6H₂O

0,81 mmol/l, 200 mg/l MgSO₄·7H₂O

0,9 mmol/l, 132 mg/l CaCl₂

pH auf 7,2 einstellen

Lagerung bei 4°C

Für die Zellkultur wurden neonatale Kardiomyozyten gewählt, da dieses Modell als gut vergleichbarer Literaturstandard gilt. Vor der Inkubation über 24 Stunden mit Angiotensin II und den verschiedenen Pharmaka wurden die Herzmuskelzellen unter Verwendung Ca²⁺ armer Disaggregationslösung isoliert und über 7 Tage in M199 kultiviert. Dies sei im Folgenden näher beschrieben.

Maximal 1 Tag alte Wistarratten wurden zunächst decapitiert, danach wurde thoracotomiert. Nach Eröffnen des Pericards wurde das Herz herausgelöst und sofort in kalte PBS/Glucose-Lösung überführt, um das Blut vollständig abzuspielen. Danach wurden die Vorhöfe mittels Skalpell abgetrennt und die Ventrikel in eine zweite Schale mit PBS/Glucose-Lösung transferiert. Dort wurden die Ventrikel nun soweit wie möglich mit Hilfe des Skalpells oder einer Schere zerkleinert. Man mischte die Ventrikelstücke mit 7 ml Disaggregationslösung, in einem Röhrchen wurde alles in 37°C warmen Wasser für 5 Minuten manuell geschüttelt. Durch in der Disaggregationslösung befindliche Collagenase wird der Abbau interzellulärer Verbindungen durch Andauen beschleunigt, so dass die Zellen isoliert wurden. Nach Sedimentation des Zellmaterials wurde der Überstand in ein nächstes Röhrchen pipettiert, das das Gewebe enthaltende Sediment im ersten Röhrchen wurde erneut mit 7 ml Disaggregationslösung versetzt und es wurde wie oben beschrieben verfahren. Diesen Vorgang wiederholte man insgesamt 7 mal. Der abpipettierte Überstand wurde

nach jedem Durchgang 1:1 mit dem „Medium zur Resuspension des Überstandes“ vermischt.

Im nächsten Schritt wurde diese Zellsuspension 5 Minuten lang bei 700 rpm zentrifugiert, danach der Überstand abgesaugt und das Pellet im „Medium für den ersten Tag“ resuspendiert. Die so entstandene Zelllösung wurde in Plastikflaschen gefüllt und für 45 Minuten bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% CO²-Sättigung inkubiert. Während dieser Zeit setzten sich die nicht muskulären Zellen ab, die Kardiomyocyten verbleiben in der Lösung.

Bereits im Vorfeld wurden Petrischalen mit einem Durchmesser von 60 mm vorbereitet. Um den Zellen das Anhaften zu ermöglichen, wurden die Schalen mit 0,1%iger Gelatine beschichtet und für eine Stunde bei 37°C vorinkubiert. Sollten immunhistologische Untersuchungen angeschlossen werden, legte man je 2 halbe Deckgläschen in die Petrischalen.

Bevor man den Überstand ausplattierte, wurden die Petrischalen mit M199 ohne weitere Zusätze gespült. 24 Stunden später war der Vorgang der Zellanheftung abgeschlossen. Mehr als 95% der angehefteten Zellen hatten die typische stabförmige Struktur intakter Kardiomyocyten. Nicht angeheftete Zellen hatten sich in dieser Zeit abgerundet. In den Petrischalen lagen die Herzmuskelzellen einzeln und in wahlloser Orientierung. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte der Medienwechsel. Dazu wurden die Kulturschalen mit „Dulbecco`s Wasch Lösung“ gespült und im Anschluss mit dem „Medium für nach dem ersten Tag“ bedeckt.

Weitere 6 Tage wurden die Zellen in diesem Medium inkubiert. Nach dieser Zeit waren Zellkontraktionen deutlich sichtbar festzustellen, die Zellen waren konfluent. Nun wurde die 24 stündige Inkubation mit Angiotensin II und den verschiedenen Pharmaka begonnen.

Neben einer Kulturschale ohne Angiotensin II wurden durch Verdünnung mit dem „Medium für nach dem ersten Tag“ Angiotensin II-Konzentrationen von 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM und 1 µM hergestellt und die Zellen damit wie bereits beschrieben behandelt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Kardiomyocyten neben den aufgeführten Angiotensin-Konzentrationen mit dem AT 1 Rezeptorblocker Losartan in einer Konzentration von 100 nM inkubiert.

Da Angiotensin II auch Endothelin freisetzen kann, wurde, um Endothelin 1 vermittelte Effekte beurteilen zu können, eine Versuchsgruppe mit Angiotensin II (100 nM) und

dem ET_A-Rezeptorantagonist BQ 123, ebenfalls in einer Konzentration von 100nM, behandelt.

Desweiteren wurden die Zellen einer Behandlung mit MAP-Kinase-Inhibitoren unterzogen. Neben einer Kontrolle, der nur Angiotensin II in einer Konzentration von 100 nM zugesetzt wurde, wurden die Zellen mit den MAP-Kinase Blockern SB 202190 (Konzentration 1µM), PD 98059 (Konzentration 25 µM) und SB 202474 (Konzentration 25 µM) sowie Angiotensin II (Konzentration 100 nM) inkubiert.

Die gleichen Konzentrationen der MAP-Kinase-Inhibitoren wurden auch ohne Zusatz von Angiotensin II in einer letzten Versuchsreihe angewendet.

Für jede Versuchsreihe wurden 3 verschiedene Präparationen von Kardiomyocyten verwendet. Die Verdünnungen wurden alle mit dem „Medium für nach dem ersten Tag“ hergestellt. Die Inkubation dauerte jeweils 24 Stunden.

3.4 Zelllysis

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen zweimal 5 Min. mit kaltem PBS gewaschen, dadurch konnten abgestorbene Zellen und das Medium entfernt werden. Anschließend pipettierte man in jede Petrischale 100 µl Laemmli-Puffer. 1 Minute später konnte die nun lysierte Zellsuspension mit Hilfe eines Plastikzellschabers abgekratzt werden. Nachdem die Zelllysate in ein gekühltes Eppendorfröhrchen transferiert worden waren, zentrifugierte man die Röhrchen in einer ebenfalls gekühlten Biofuge. Direkt im Anschluss wurden die Zellen im 4°C kalten Ultraschallbad behandelt, bis keine Zellklumpen mehr sichtbar waren. An diesem Punkt konnten die Proben entweder sofort zur Proteinbestimmung und Elektrophorese weiterverwendet werden, oder tiefgefroren bei -80°C für einen späteren Zeitpunkt aufbewahrt werden.

Der für die Zelllysis verwendete Extraktionspuffer (Laemmli-Puffer) setzt sich wie folgt zusammen:

62,5 mM Tris-HCl, pH 7,5

5% Glycerol

2% SDS

5% β-Mercaptoethanol

0,005% Bromphenolblau

1 mM PMSF

Der Laemmli-Puffer kann bei Raumtemperatur gelagert werden. PMSF ist ein Protease-Inhibitor. Es wurde hinzugefügt, da bei der Zerkleinerung der Zellen und unter Einwirkung verschiedener Detergenzien Proteasen freigesetzt werden, die Proteine partiell spalten und am Ende das Versuchsergebnis verfälschen können. Da PMSF in wässriger Lösung extrem instabil ist, sollte dieses erst kurz vor Versuchsbeginn hinzugefügt werden. Um eine Oxidation von Thiolgruppen der zu untersuchenden Proteine durch den Kontakt mit Luftsauerstoff zu vermeiden, wurde β -Mercaptoethanol hinzugefügt.

3.5 Proteinbestimmung

Im Vorfeld wurde eine Eichgerade erstellt. Am Spectrometer bei OD 750 wurden die Extinktionen einer Reihe definierter Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) gemessen. Die Konzentrationen betragen 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; und 20 $\mu\text{g/ml}$, alle Messungen wurden dreifach durchgeführt, aus den Mittelwerten wurde die Eichgerade erstellt.

Für die Proteinbestimmung der Zellsuspensionen nach Lowry [Lowry et al., 1951] wurden folgende Lösungen benötigt:

Lösung A: 2% Na_2CO_3 in 0,1 M NaOH

Lösung B1: 1% CuSO_4 (dunkel lagern)

Lösung B2: 2% Kalium-Natrium-Tartrat

Für Reagenz 1 mischte man 100 ml der Lösung A mit 1ml der Lösung B1 und 1 ml der Lösung B2.

Reagenz 2 wurde hergestellt, indem man Folin Reagenz 1:1 mit H_2O dest. verdünnt.

Auch bei der Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden alle Messungen dreifach durchgeführt.

In einem Eppendorf-Röhrchen wurden jeweils 500 μl 10% TCA mit 3 μl der zu bestimmenden Probe gemischt und für eine Stunde auf Eis gestellt. Nach dieser Zeit wurden die Röhrchen 15 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 13 000 bpm und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert.

Im Anschluß daran wurde der Überstand aus den Probenröhrchen dekantiert und die noch verbliebene Flüssigkeit mit Hilfe von schmalen Filterpapierstreifen aufgesaugt.

Im nächsten Schritt versetzte man das Pellet mit je 1ml Reagenz 1, vermischte es gut auf dem Vortex und inkubierte es 10 Minuten bei Raumtemperatur. Danach pipettierte man 100 µl Reagenz 2 hinzu, mischte alles erneut auf dem Vortex und stellte die Proben für 10 Minuten in ein 60°C temperiertes Wasserbad.

Nach Beendigung der Reaktionszeit im Wasserbad lagerte man die Reagenzröhrchen auf Eis und bestimmte deren Extinktion am Photometer. Gemessen wurde bei OD 750. Nach Bestimmung des Mittelwertes der Meßprobe wurde dieser durch 3, entsprechend dem Ausgangsvolumen, dividiert, man erhielt so die Konzentration des Proteins in 1 µl Probenlösung.

3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Eine Auftrennung von Proteinen ausschließlich nach Größe ist nach Behandlung mit dem anionischen Deterganz Natriumdodecylsulfat (SDS) möglich. Dabei werden die Proteine vollkommen entfaltet (denaturiert). Es kommt durch hydrophobe Wechselwirkungen zu einer gleichmäßigen Beladung der Polypeptidketten mit dem negativ geladenen SDS, wobei die Eigenladungen der Proteine überdeckt werden, es entsteht ein konstantes Ladungs/Masseverhältnis, die stark negative Ladung der Proteine ist also proportional ihrem Molekulargewicht.

Es wurde das diskontinuierliche System nach Laemmli [Laemmli, 1970] verwendet. Die Diskontinuität bezieht sich dabei auf die Gelstruktur (ein großporiges Sammelgel ist einem engporigen Trenngel aufgelagert), den pH-Wert und die Art und Konzentration der Ionen in den verschiedenen Puffern.

Durch verschiedene elektrochemische Reaktionen und Vorgänge wird eine Konzentration der SDS-Proteinkomplexe im Sammelgel erreicht, so dass diese in einer schmalen Zone auf das Trenngel gelangen.

Die Lösungen für die Gele wurden nach folgendem Schema hergestellt:

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8: 27,23 g Tris, ad 150 ml ddH₂O; Lagerung bei 4°C

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8: 6 g Tris, ad 100 ml ddH₂O; Lagerung bei 4°C

<u>10 % Trenngel</u>	<u>10ml</u>
ddH ₂ O	4,1 ml
Acrylamid/	

Bisacrylamid	3,3 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml
20 % SDS	0,05 ml
5 Minuten im Ultraschallbad, um Luftblasen zu beseitigen	
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl
<u>4 % Sammelgel</u>	<u>5 ml</u>
ddH ₂ O	3,07 ml
Acrylamid/	
Bisacrylamid	0,62 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
20 % SDS	0,0025 ml
5 Minuten im Ultraschallbad, um Luftblasen zu beseitigen	
10 % APS	25 µl
TEMED	5 µl

Durch Wechselwirkungen von APS und TEMED entstehen freie Radikale, welche die Polymerisationsreaktion in Gang setzen, weshalb nach deren Zusatz zügig gearbeitet werden musste.

Vorbereitend wurden die Glasplatten mit Ethanol entfettet und in der Elektrophoreseapparatur befestigt.

Zuerst wurde das Trenngel, wie oben beschrieben zusammenpipettiert, und mittels einer 5 ml Pipette vorsichtig in den Plattenzwischenraum eingefüllt. Der Abstand zwischen Plattenoberrand und Trenngel sollte die Tiefe der Probenaschen + 1 cm betragen. Um die Polymerisation unter Luftabschluß und die Bildung einer glatten Randzone zu gewährleisten, wurde ein dünner Film ddH₂O aufgetragen. Der Abschluss der Polymerisation des Trenngels war an einer deutlich sichtbaren Trennlinie zwischen Trenngel und Wasserfilm erkennbar.

Nach Entfernung des Wasserfilms konnte nun das zuvor vorbereitete Sammelgel aufgebracht werden und der Slotkamm in den Plattenzwischenraum geschoben werden. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Elektrophoreseapparatur vorbereitet. Dazu wurde zunächst der Elektrophoresepuffer hergestellt:

3 g Tris
14,4 g Glycin
1 g SDS
ad 1 l dd H²O

Der pH-Wert von 8,9 musste vor Zugabe von SDS bestimmt und eingestellt werden. Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels wurde der Probenkamm entfernt und das Gel-Glas-Sandwich an der Elektrophoreseapparatur so befestigt, dass die eingekerbte Platte nach innen zur oberen Pufferkammer zu liegen kam.

Beide Pufferkammern wurden vollständig mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt, eventuell vorhandene Luftblasen an der Unterseite des Gels wurden mit Hilfe einer umgebogenen Kanüle entfernt, die Probenaschen wurden ausgespült.

Als nächstes konnten die Proben aufgebracht werden. Dabei wurden die Proben mit einer Mikroliterpipette mit feiner, ausgezogener Spitze tief in die Probenaschen eingebracht. Aufgrund der höheren Dichte des Probenpuffers verblieben diese am Boden der Taschen. Pro Slot wurden jeweils 20 µg der aufgetauten Proben aufgetragen. Neben den eigenen Proben ließ man eine Molekulargewichtsmarker mitlaufen, um eine spätere Identifikation sowie die Bestimmung der Proteingrößen zu ermöglichen.

Man schloss nun die Elektrophoresekammer an ein Powerpack an und wählte anfangs eine Stromstärke von 25 mA. Wenn die Proben das Trenngel erreicht hatten, konnte die Stromstärke auf 50 mA erhöht werden. Nach ca. 2 Stunden war der Elektrophoresevorgang abgeschlossen - erkennbar daran, dass die Bromphenolblaufront die Gelunterkante erreicht hatte.

3.7 Western-Blot

Ziel dieser Methodik war es, die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Gel möglichst vollständig auf eine synthetische Membran zu übertragen, so dass ein genaues Abbild des Elektrophoresemusters entstand. Die auf der Membrantextur gebundenen Moleküle sind dann einem immunologischen Nachweis leichter zugänglich.

Der Western-Blot wurde mittels Tank-Blot-Methode durchgeführt. Der hierfür benötigte Transferpuffer hatte folgende Zusammensetzung:

25 mM Tris	3,03 g
192 mM Glycin	14,4 g
20% Methanol	200ml
dd H ² O	ad 1l

pH 8,3; vor Zugabe des Methanols messen

Nachdem das Acrylamidgel aus den Glasplatten herausgelöst worden war, entfernte man mittels Skalpell das Sammelgel. Die Orientierung des Gels markierte man. Zur Reduktion des freien SDS wurde das Gel in eine Schale mit Transferpuffer überführt. Nachdem eine Nitrocellulose ECL-Membran und 6 Filterpapiere auf die Abmessungen des Gels zugeschnitten waren, wurden auch diese in Transferpuffer überführt. Über einen auf die Anodenseite des Blotgerätes platzierten Schaumstoffschwamm wurden 3 Filterpapiere geschichtet, darauf die Membran, gefolgt von dem Acrylamidgel. Zu beachten war insbesondere, dass sobald das Gel Kontakt mit der Membran hatte, dieses nicht bewegt werden durfte. Das Acrylamidgel überschichtete man mit weiteren 3 Lagen Filterpapier und einen zweiten Schaumstoffschwamm. Luftblasen, die den Transfer behindert hätten, wurden mit einer Glaspipette herausgerollt. Die Transferkassette wurde nun in der Blotanlage befestigt und diese mit Transferpuffer gefüllt. Bei einer Stromstärke von 190 mA und einer Spannung von 100 Volt dauerte der Transfer bei 2 Gelen 2 Stunden. Durchgeführt wurde der Blotvorgang im Kühlraum. Zur besseren Wärmeableitung wurde der Puffer durch ein Magnetrührstäbchen in Bewegung gehalten.

3.8 Detektion

Der immunologische Nachweis wurde indirekt und in 2 Stufen durchgeführt.

Die Membran wurde nach erfolgtem Transfer aus dem Sandwich genommen und in eine flache Schale überführt. Um den Transfer zu überprüfen, färbte man die Membran mit Ponceau-S-Färbelösung. Später konnte die Membran mit PBS wieder entfärbt werden.

Um unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden, wurden vor Durchführung der Immunreaktion unspezifische Bindungsstellen mit Roti-Block viermal 30 Minuten blockiert.

Der Primärantikörper wurde mit Blockierlösung verdünnt und die Membran damit bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper abgesaugt und die Nitrocellulosemembran einem erneuten Waschvorgang unterzogen. Dies diente der möglichst vollständigen Entfernung ungebundenen und unspezifisch gebundenen Antikörpers. Gewaschen wurde zunächst 15 Minuten mit Roti-Block und anschließend dreimal 15 Minuten mit TBS-Tween (0,005 %).

TBS hatte folgende Zusammensetzung:

20 mM Tris 2,24 g

130 mM NaCl 8 g

ddH²O ad 1l

pH auf 7,6 einstellen

Im nächsten Arbeitsschritt wurde der Sekundärantikörper auf die Membran aufgebracht und unter sanftem Schütteln für 1 Stunde inkubiert. Es erfolgten erneute Waschvorgänge, dreimal 15 Minuten mit TBS-Tween und anschließend zweimal 15 Minuten mit TBS. Bei den letzten Waschvorgängen wurde auf Tween verzichtet, da dieses einen negativen Effekt auf die chemische Entwicklungsreaktion haben kann.

Die Detektion erfolgte durch den Nachweis von Peroxidase mit Hilfe von Chemilumineszenz. Das Prinzip einer solchen Reaktion besteht darin, dass im Zuge einer enzymatischen Reaktion eine luminogene Substanz in ein energiereiches, instabiles Zwischenprodukt umgewandelt wird. Dieses zerfällt in einem stark exergonischen Prozess, wodurch eines der Produkte in einen angeregten Zustand überführt wird. Diese Anregungsenergie wird bei der Rückkehr in den Grundzustand des Moleküls in Form eines charakteristischen Chemilumineszenzlichtes abgestrahlt.

Die gut abgetropfte Membran wurde mit der proteinbeladenen Seite nach oben auf glattgestrichene Haushaltsfolie gelegt. Man mischte die Detektionslösung aus den Reagenzien 1 und 2 zu gleichen Teilen und verteilte diese nun gleichmäßig auf der Membran. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten wurde überschüssige Detektionslösung entfernt und die feuchte Membran faltenfrei in Haushaltsfolie eingewickelt. In einer Röntgenkassette wurde alles wiederum der Proteinseite nach oben mit Klebestreifen befestigt. Die Entwicklungsdauer in der Rotlichtkammer wurde auf 10 Sekunden festgesetzt. Die Entwicklung wurde in der Klinik für Urologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

3.9 Immunhistologie

Für die Immunhistologie wurden die Deckgläschen mit den darauf befindlichen Zellen nach abgeschlossener Inkubation mit einer Pinzette vorsichtig aus den Petrischalen genommen und im kalten Methanolbad bei -20 °C fixiert. Das Fixativ wurde nach 30-60 Sekunden weitgehend mit einem Papiertaschentuch entfernt, ohne die Zellen zu beschädigen. Anschließend wurden 70 µl Triton X100 (1% in PBS) zur Permeabilisierung auf die Reaktionskammer pipettiert. In diese Kammer wurden die Deckgläschen mit der Gewebeseite nach unten gelegt, so dass die Zellen vollständig bedeckt waren. Man ließ die Zellen 30 Minuten inkubieren, tupfte das Triton ab und inkubierte sie anschließend für 20 Minuten mit 70 µl PBS-BSA (0,1 %). Das PBS wurde entfernt, es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C (monoklonale Antikörper gegen die Aminosäuren 250-272 von Ratten-Cx43 [Chemicon, USA], Verdünnung 1:100 in PBS; bzw. polyklonale Antikörper gegen die Aminosäuren 231-330 von Ratten -Cx40 [freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J.-A. Haefliger], Verdünnung 1:200 bzw monoklonale Antikörper gegen Ratten 45 [Chemicon, USA], in einer Verdünnung von 1: 500). Der Antikörper wurde jeweils mit 5 ml PBS-BSA abgespült und erneut für 20 Minuten mit 70 µl PBS-BSA inkubiert. Nachfolgend wurde unter Lichtausschluß gearbeitet. Nach Entfernen des PBS-BSA folgte die Inkubation mit 70 µl des Sekundärantikörpers (goat-anti-mouse-IgG [Pierce, USA], in einer Verdünnung von 1: 500, bzw. goat-anti-rabbit IgG [Chemicon, USA], in einer Verdünnung von 1: 100) für 1-2 Stunden. Die Deckgläschen wurden mit PBS-BSA gespült und weitere 20 Minuten mit 70µl PBS inkubiert. Nachfolgend konnte das PBS abgetupft werden, die Zellen in Galat-Glycerol eingebettet und nach 10 Minuten mit Acryllack versiegelt werden.

Galat-Glycerol wurde mit folgender Zusammensetzung vorbereitet:

Glycerol 7 ml

Tris-HCL 0,1 M 3 ml

Galat

pH 9,5 einstellen

Es wurden bei 400-und 1000-facher Vergrößerung Aufnahmen von 20 Sekunden mit einem 100 ASA Film gemacht, diese digitalisiert und mit Hilfe eines Image-Analysis-System (Sigma Scan, Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland) ausgewertet. Gemessen wurde die Fluoreszenz je Zellfläche an 50 Zellen je Versuchsbedingung.

3.10 Statistik

Jede Versuchsbedingung (d.h. jede Konzentration bzw. Kombination von Konzentrationen) wurde an $n=3$ Kulturen getestet. An jeder dieser Kulturen wurden $n=3$, bzw. in der Immunhistologie $n=50$ Zellen, Messungen durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler (MW \pm SEM) angegeben. Nach einer Varianzanalyse wurde ein t-Test (mit Bonferroni-Korrektur für multiple Messungen) auf dem Signifikanzniveau $p=0,05$ durchgeführt (InStat; Prism). Die Konzentrationswirkungskurven wurden mit einer nichtlinearen Regressionsanalyse als sigmoidale Kurven gefittet (Graph Pad Prism, Graph Pad Software, San Diego, Californien, USA). Es wurden die EC_{50} , E_{max} und Steilheit der Konzentrationswirkungskurven bestimmt. Für die Auswertung der Blots wurde die TINA-Software (Isotopenmessgeräte GmbH, Deutschland) benutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Expression der Connexine 40, 43 und 45 an neonatalen Rattenkardiomyozyten

Die Expression der Connexine 40, 43, und 45 wurde an neonatalen Rattenkardiomyozyten untersucht. Dazu wurden die Zellen nach 7 tägiger Kultivierung für 24 Stunden mit Medium 199 inkubiert. Anschließend wurde die quantitative Proteinbestimmung mittels Westernblot-Analysen durchgeführt sowie immunhistochemische Untersuchungen angeschlossen, um Anzahl und Verteilung der Gap Junctions beurteilen zu können.

Connexin 40 erschien in den Analysen der Westernblots als einzelne Bande bei 38 kDa im Vergleich zum Standard-Molekulargewichtsmarker der Firma BioRad. Eine phosphorylierte Isoform, welche als 2. Bande mit geringfügig höherem Molekulargewicht im Vergleich zum Marker imponieren würde, konnte nicht nachgewiesen werden.

Connexin 43 war ebenfalls als Einzelbande nachweisbar, sie erschien bei ca. 42 kDa. Auch hier war eine Phosphorylierung an nicht stimulierten Zellen nicht detektierbar. Abbildung 1 zeigt repräsentative Immunoblots des Nachweises der Connexine 40 und 43.

Im Gegensatz dazu gelang der Nachweis von Connexin 45 mittels Westernblot-Analysen nicht, es waren allenfalls Spuren nachweisbar.

Immunhistochemische Präparate bestätigten die im Western-Blot erhobenen Ergebnisse. Connexin 40 war bedingt durch den Sekundärantikörper als rote punktförmige Fluoreszenz im Bereich der Zellmembranen sichtbar. Äquivalent dazu erschien durch Verwendung eines differenten Sekundärantikörpers Connexin 43 als grün fluoreszierendes Signal, ebenfalls im Bereich der Zellmembranen.

In den Präparaten der Immunfluoreszenzmikroskopie für Connexin 45 fanden sich sehr vereinzelt fluoreszierende Signale im Bereich der Zellmembranen, jedoch machten diese weniger als 1% der Membranlänge aus. Aus diesem Grund konzentrierten sich alle weiteren Untersuchungen auf die Connexine 40 und 43, Connexin 45 fand keine weitere Berücksichtigung.

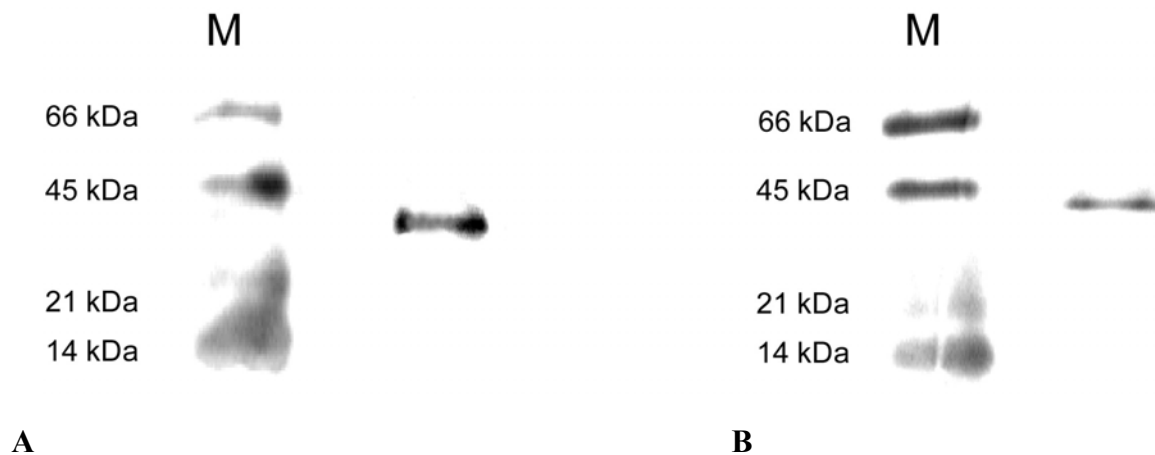


Abbildung 1A und B: Connexin-Expression in ventrikulären Rattenkardiomyozyten (Western-Blot). Primärkulturen ventrikulärer Rattenkardiomyozyten wurden für 24 Stunden mit Medium 199 inkubiert, anschließend wurde in den Zelllysaten das Auftreten von Connexin 40 (A) und Connexin 43 (B) durch Immunoblotting und Antikörperfärbung analysiert. M: Marker

4.2 Einfluss von Angiotensin II auf die Expression der Connexin 40 und 43 sowie auf die Phosphorylierung

Um den Einfluss von Angiotensin II auf die Synthese der kardialen Gap junctions zu untersuchen, wurden die eine Woche kultivierten neonatalen Rattenkardiomyocyten mit Angiotensin II in Konzentrationen von 10, 50, 100, 500 und 1000 nM für 24 Stunden inkubiert.

Nach Aufarbeitung der Zelllysate zeigten die Immunoblotauswertungen einen dosisabhängigen Anstieg der Expression von Connexin 43 nach Stimulation mit Angiotensin II. Quantitative Bestimmungen wiesen einen Anstieg der Menge an Connexin 43 auf mehr als das dreifache im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits nach Inkubation mit 100 nM Angiotensin II nach.

Im Gegensatz dazu wurde die Expression von Connexin 40 durch Stimulation mit Angiotensin II nicht beeinflusst. Auch nach Inkubation der Zellkulturen mit 1000 nM Angiotensin II konnte in den Analysen kein signifikanter Anstieg der Konzentration von Connexin 40 nachgewiesen werden.

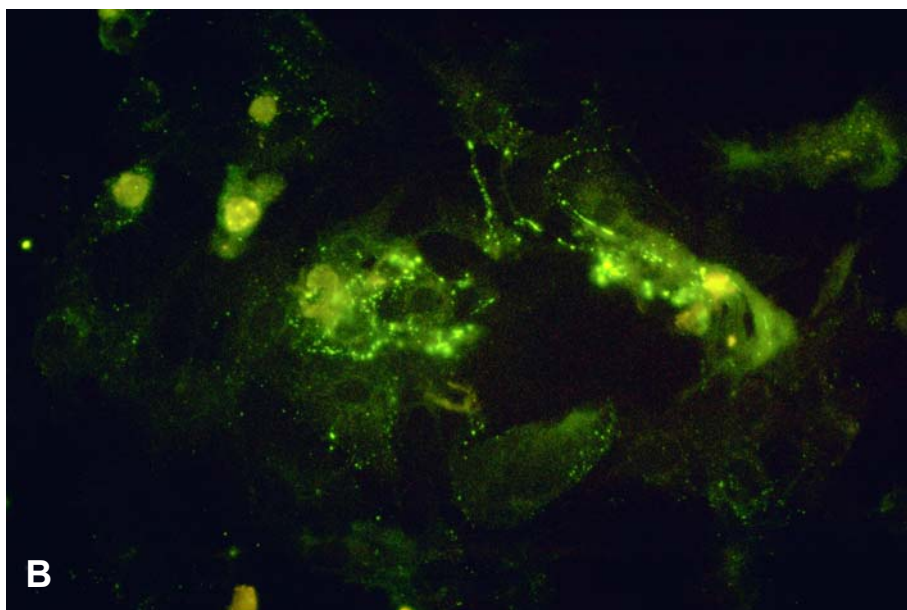
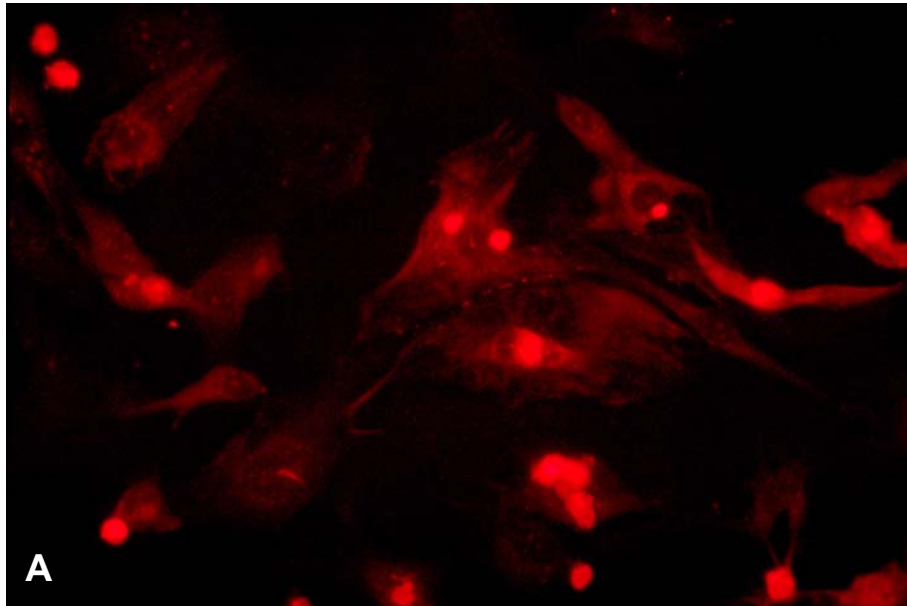


Abbildung 2A und B: Immunhistochemischer Nachweis der Connexin-Expression in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten. A: Connexin 40. B: Connexin 43.

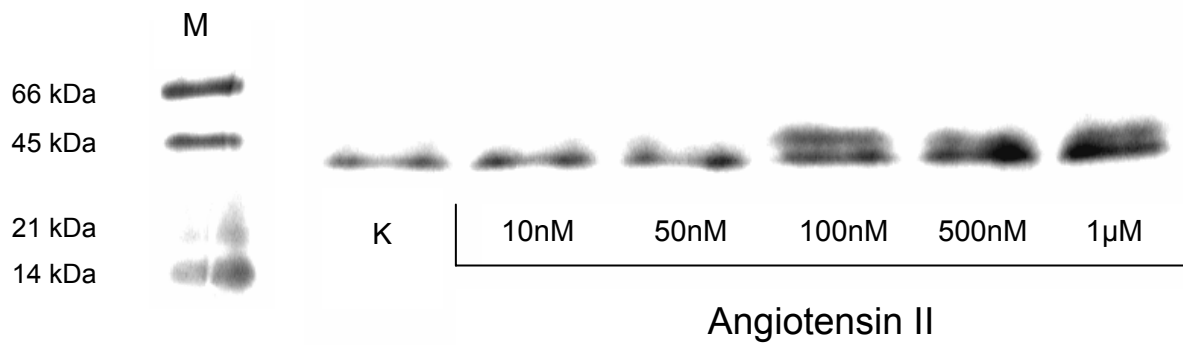


Abbildung 3: Connexin-Expresssion in ventrikulären Rattenkardiomyozyten (Western-Blot). Primärkulturen ventrikulärer Rattenkardiomyozyten wurden 24 h in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Angiotensin II inkubiert, anschliessend wurde in den Zelllysaten das Auftreten von Connexin 43 durch Immunoblotting und Antikörpermarkierung analysiert. M: Marker; K: Kontrolle.

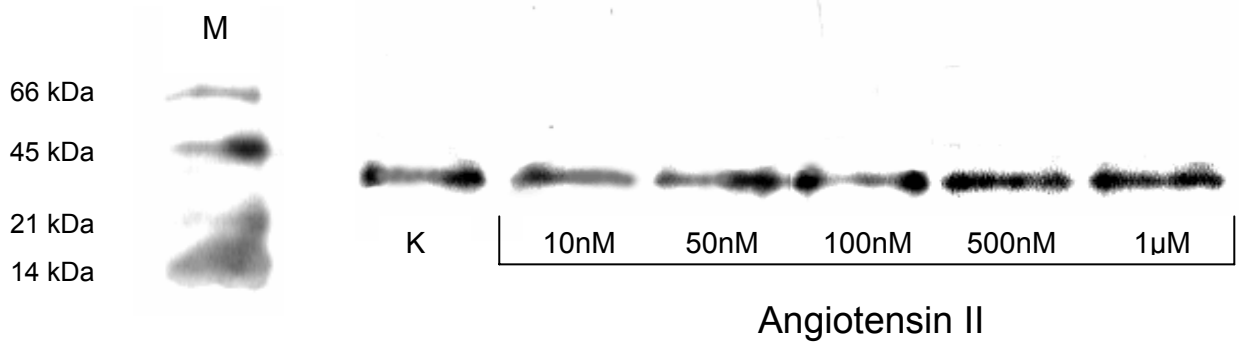


Abbildung 4: Connexin-Expresssion in ventrikulären Rattenkardiomyozyten (Western-Blot). Primärkulturen ventrikulärer Rattenkardiomyozyten wurden 24 h in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Angiotensin II inkubiert, anschliessend wurde in den Zelllysaten das Auftreten von Connexin 40 durch Immunoblotting und Antikörpermarkierung analysiert. M: Marker; K: Kontrolle.

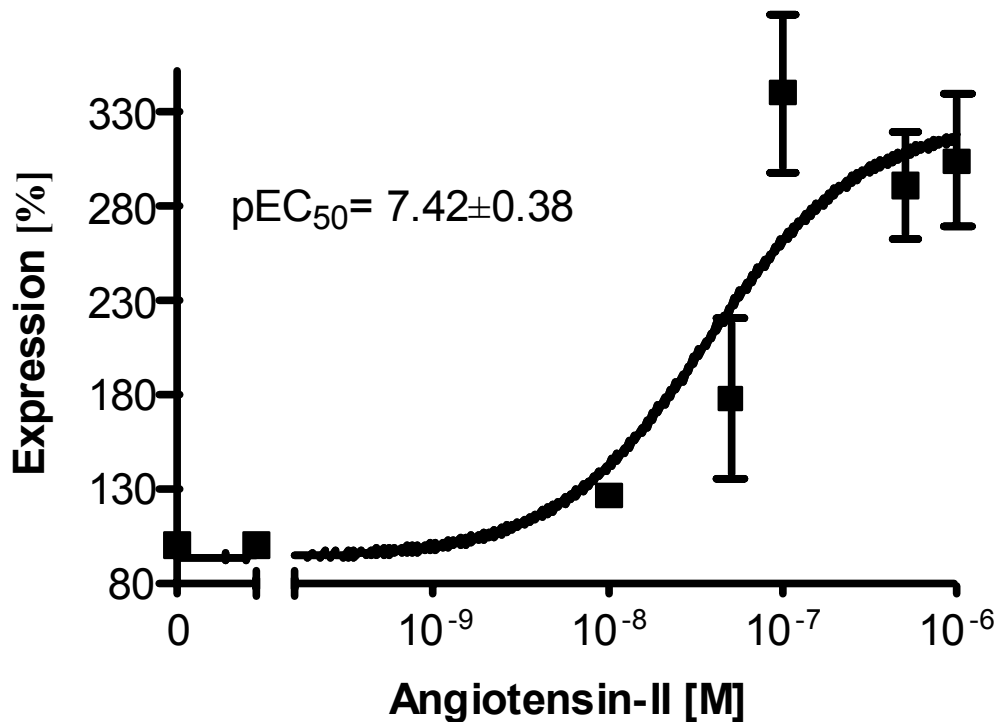


Abbildung 5: Konzentrations-Wirkungs-Kurve; Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von Connexin 43 in Primärkulturen ventrikulärer Rattenkardiomyozyten. Ordinate: Connexin 43-Expression in % im Vergleich zur Kontrollkultur; Abszisse: molare Konzentration von Angiotensin II; pEC 50 = $7,42 \pm 0,38$

Die immunhistochemischen Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse der Western-Blot -Analysen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Connexin 43-Gehaltes der neonatalen Rattenkardiomyocyten im Vergleich zur Kontrollgruppe, sichtbar sowohl als deutliche Vermehrung der Fluoreszenz in den Präparaten der Immunfluoreszenzmikroskopie insbesondere wiederum im Bereich der Zellmembranen, als auch in der Abbildung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach densitometrischer Auswertung. Die pEC gibt dabei den negativen Logarithmus der Konzentration von Angiotensin II an, welche 50% des maximal erzielbaren Effektes hervorruft. Sie beträgt $7,42 \pm 0,38$.

Für die fehlende Stimulierbarkeit der Expression des Connexin 40 sprechen ebenfalls die Untersuchungsergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Präparate, welche im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikant gesteigerte Fluoreszenz aufwiesen, so dass sich die Auswertungen der Western-Blots bestätigen ließen.

Bereits in den oben gezeigten Abbildungen der Western-Blots imponieren die Connexine als Doppelbanden. Tatsächlich entsprechen die Banden einer phosphorylierten sowie einer nicht-phosphorylierten Isoform [Polontchouk et al. 2002]. Bedingt durch das höhere Molekulargewicht wandert die phosphorylierte Isoform während der elektrophoretischen Auftrennung langsamer, wodurch sich die Doppelbanden erklären. Fraglich ist, inwiefern Angiotensin II die Phosphorylierung von Connexinen reguliert. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Angiotensin II keine signifikanten Auswirkungen auf die Synthese von Connexin 40 hat, wird im Folgenden die Beeinflussung der Phosphorylierung von Connexin 43 betrachtet.

Dazu wurde das Verhältnis der phosphorylierten Isoform (Cx-P) zur nicht-phosphorylierten Isoform (Cx-NP) bestimmt.

Die unten abgebildete Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigt einen deutlichen Anstieg der phosphorylierten Isoform von Connexin 43 in Bezug auf die nicht-phosphorylierte Isoform, der Effekt tritt konzentrationsabhängig auf.

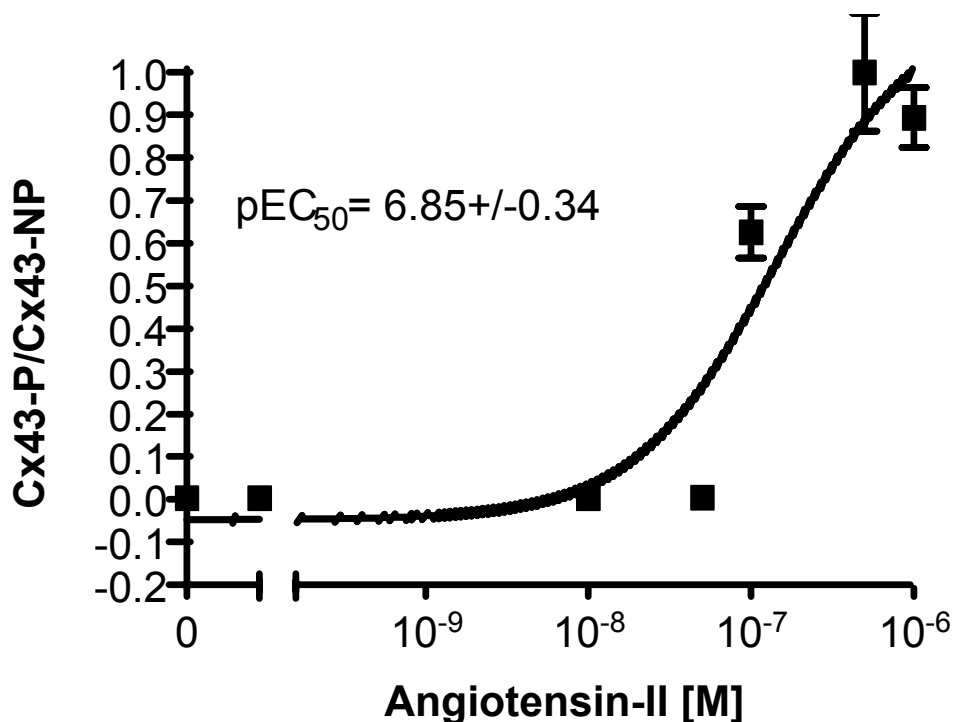


Abb. 6: Konzentrations-Wirkungs-Kurve: Einfluss von Angiotensin II auf die Phosphorylierung von Connexin 43 in Primärkulturen ventrikulärer Rattenkardiomyozyten.

Ordinate: Verhältnis der phosphorylierten Isoform zu der nicht-phosphorylierten Isoform von Connexin 43; Abszisse: molare Konzentration von Angiotensin II ; $pEC_{50} = 6,85 \pm 0,34$

Um der Frage nachzugehen, ob die gesteigerte Proteinsynthese auch funktionelle Relevanz hat, wurde mit Hilfe des Double Cell Patch Clamp Verfahrens (durchgeführt von Frau Dr. Polontchouk) die Gap Junction Leitfähigkeit gemessen, sowohl unter Kontrollbedingungen, das heißt an kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten, als auch nach 24 stündiger Inkubation mit 500 nM Angiotensin II. Damit wurde die interzelluläre Kommunikation untersucht.

Unter Kontrollbedingungen war ein Gap Junction Leitwert von 28 ± 4 nS messbar. Nach Stimulation der Zellen mit Angiotensin in der oben angegebenen Dauer und Konzentration erhöhte sich der Wert signifikant auf 53 ± 3 nS, was einer erhöhten Leitfähigkeit und damit Kopplung der Zellen entspricht.

4.3 Signaltransduktion

Im nächsten Teil der Experimente wurde die Signaltransduktion untersucht, welche zu der beschriebenen erhöhten Expression von Connexin 43 in neonatalen Rattenkardiomyocyten unter dem Einfluss von Angiotensin II führte. Es sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit der AT₁-Rezeptor bei der Signaltransduktion eine Rolle spielt. Die Zellkulturen wurden dazu mit Angiotensin II in den beschriebenen Konzentrationen inkubiert, zusätzlich wurde Losartan, ein AT₁ Rezeptor-Antagonist zugegeben. Es zeigte sich, dass durch Zusatz von 100 nM Losartan die Angiotensin II vermittelten Effekte blockierbar waren. Der Anstieg des Gehaltes an Connexin 43 blieb weitgehend aus, so dass eine Signaltransduktion via Angiotensin 1 Rezeptor anzunehmen ist.

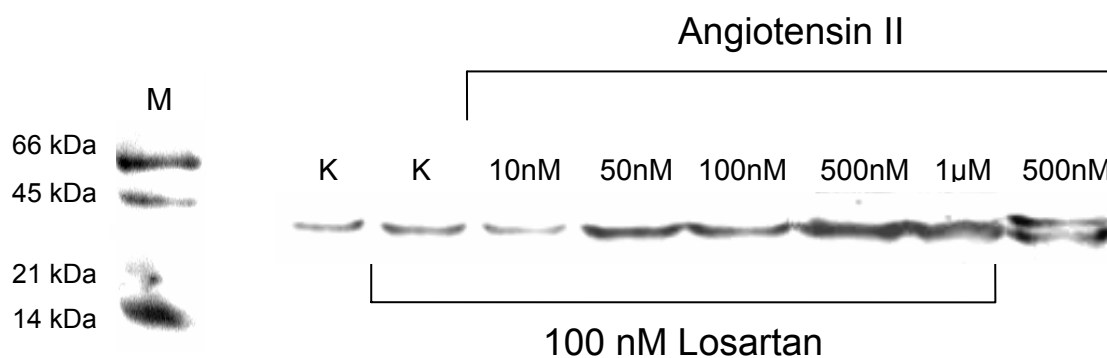


Abbildung 7: Connexin 43-Expression und Phosphorylierung unter dem Einfluss von Angiotensin II und Losartan (Western-Blot). Primärkulturen ventrikulärer Rattenkardiomyozyten wurden 24 h in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Angiotensin II in Anwesenheit von 100 nM Losartan inkubiert, anschließend wurde in den Zelllysaten das Auftreten von Connexin 43 durch Immunoblotting und Antikörpermarkierung analysiert. M: Marker; K: Kontrolle.

Um der Frage nachzugehen, ob eine durch Angiotensin induzierte vermehrte Endothelinproduktion der Zellen die beschriebenen Veränderungen der Connexin 43-Expression hervorruft, wurden die kultivierten Kardiomyozyten zusätzlich zu den verschiedenen Angiotensin II-Konzentrationen mit dem Endothelin A Rezeptorantagonisten BQ 123 inkubiert.

Die Analysen der Western-Blots ließen erkennen, dass durch Inhibierung des Endothelin A-Rezeptors kein Einfluss auf die Synthese von Connexin 43 nachweisbar ist. Eine Stimulierung durch Angiotensin II führte auch unter diesen Bedingungen zu einer dosisabhängig vermehrten Expression des kardialen Gap Junctions-Proteins. Es handelt sich demnach um direkt durch Angiotensin II vermittelte Wirkungen, da auch unter Blockade eventueller Endothelin-Wirkungen ein ausgeprägter Anstieg der Connexin 43 Expression durch Stimulierung mit Angiotensin II nachweisbar war.

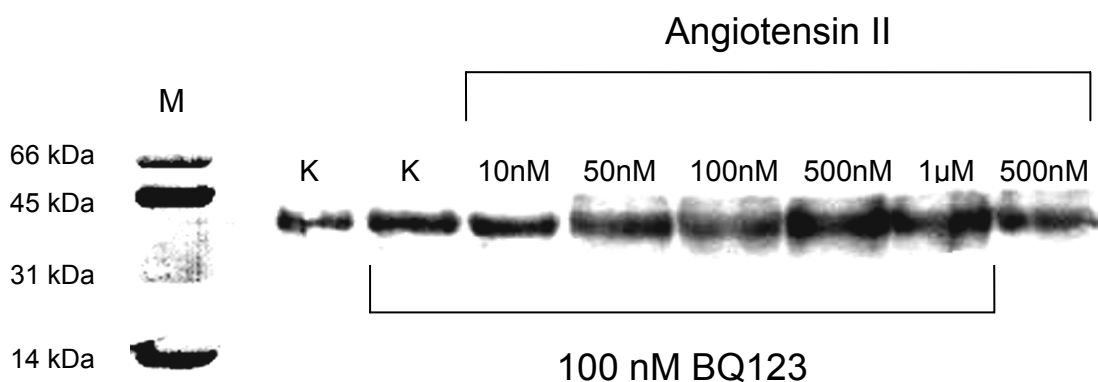


Abbildung 8: Connexin 43-Expression und Phosphorylierung unter dem Einfluss von Angiotensin II und BQ123 (Westernblot-Analysen) Primärkulturen ventrikulärer Rattenkardiomyozyten wurden 24 Stunden mit Angiotensin II in verschiedenen Konzentrationen in Gegenwart von 100nM BQ123 inkubiert. Anschließend wurde in den Zellysaten das Auftreten von Connexin 43 sowie dessen Phosphorylierung mittels Immunoblotting und Antikörpermarkierung analysiert. M: Marker; K: Kontrolle

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve (siehe Abb.10) veranschaulicht die erläuterten Fakten.

Es sollte außerdem überprüft werden, inwieweit die Phosphorylierung von Connexin 43 durch Zusatz der Rezeptorantagonisten beeinflussbar ist. Dazu wurde erneut das Verhältnis der phosphorylierten Isoform (Cx-P) zu der nicht-phosphorylierten Isoform (Cx-NP) bestimmt. Nachweisbar war die Hemmung der Phosphorylierung durch 100 nM Losartan, wohingegen der Endothelin A-Rezeptorantagonist BQ123 ohne signifikanten Effekt auf die Phosphorylierung von Connexin 43 blieb. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigt einen nahezu identischen Kurvenverlauf für die Beeinflussung der Phosphorylierung durch Angiotensin II in den angegebenen Konzentrationen sowie nach zusätzlicher Inkubation mit BQ123, wohingegen 100 nM

Losartan als Zusatz zu einem fast vollständigen Rückgang der phosphorylierten Isoform auf das Basislevel führt.

Nachdem der AT₁-Rezeptor als Teil der Signalkaskade identifiziert werden konnte und indirekte Beeinflussung über Endothelin-1 ausgeschlossen wurde, erfolgte die Betrachtung der intrazellulären Signaltransduktion. Dabei wurde die Rolle von MAP-Kinasen in der Regulation von Connexin 43 untersucht. Kultivierte neonatale Rattenkardiomyozyten wurden 24 Stunden mit 100 nM Angiotensin II und zusätzlich entweder 1) ohne Map-Kinase-Inhibitor als Kontrolle; 2) mit 25 µM MEK-Inhibitor PD 98059; 3) mit 2 µM p38-Inhibitor SB 202190 und 4) mit 25 µM einer Negativkontrolle für MAP-Kinase-Inhibitoren, SB 202474, inkubiert. Um die Auswirkungen der Map-Kinase-Inhibitoren auf das basale Level der Connexin 43 Expression in den Kardiomyozytenkulturen zu überprüfen, wurden zusätzlich Kulturen angelegt und mit den verschiedenen oben erwähnten Blockern behandelt, ohne eine Stimulation durch Angiotensin II vorzunehmen.

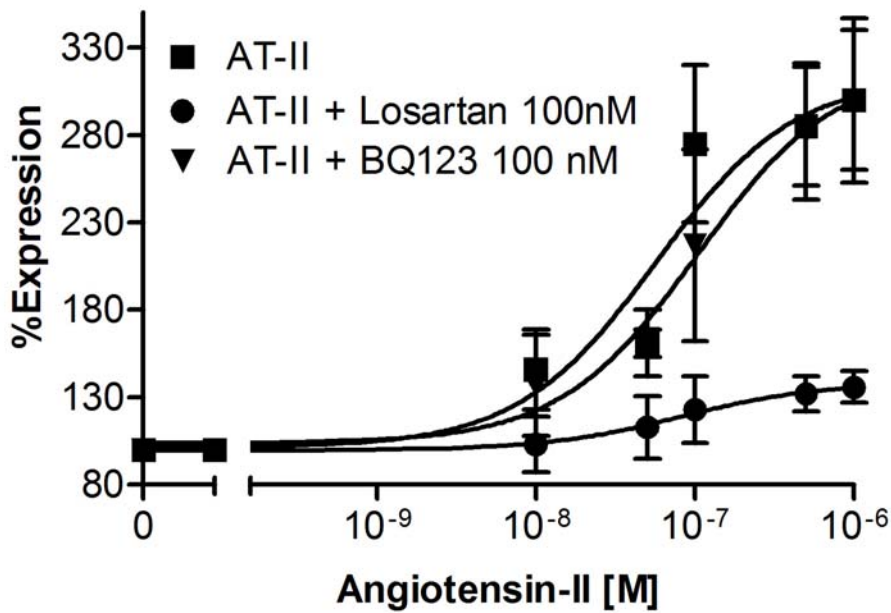


Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungs-Kurve; Einfluss von Angiotensin II; Angiotensin II + Losartan und Angiotensin II + Endothelin A-Rezeptorantagonist BQ123 auf die Connexin 43-Expression in neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten.
Ordinate: Connexin 43 in % im Vergleich zu der Kontrollkultur; Abszisse: molare Angiotensin II-Konzentration.

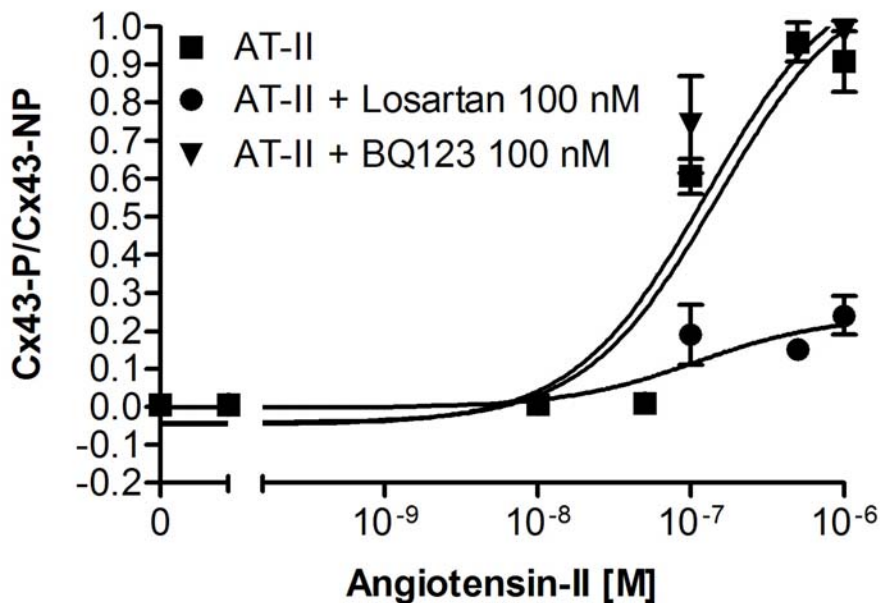


Abbildung 10: Konzentrations-Wirkungs-Kurve; Einfluss von Angiotensin II; Angiotensin II + Losartan und Angiotensin II + Endothelin A-Rezeptorantagonist BQ123 auf die Connexin 43-Phosphorylierung in neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten.
Ordinate: Verhältnis der phosphorylierten und der nicht-phosphorylierten Isoform von Connexin 43; Abszisse: molare Angiotensin II-Konzentration.

Die Analysen der Western-Blots zeigten, dass unter Kontrollbedingungen alle MAP-Kinase-Inhibitoren ineffektiv sind und das basale Level der Connexin 43-Expression nicht beeinflussen. In den mit Angiotensin II behandelten Zellen war ein Rückgang der vermehrten Connexin 43-Expression und Phosphorylierung zu den Ausgangswerten nachweisbar durch die Inhibierung beider untersuchter MAP-Kinasen, MEK und p 38.

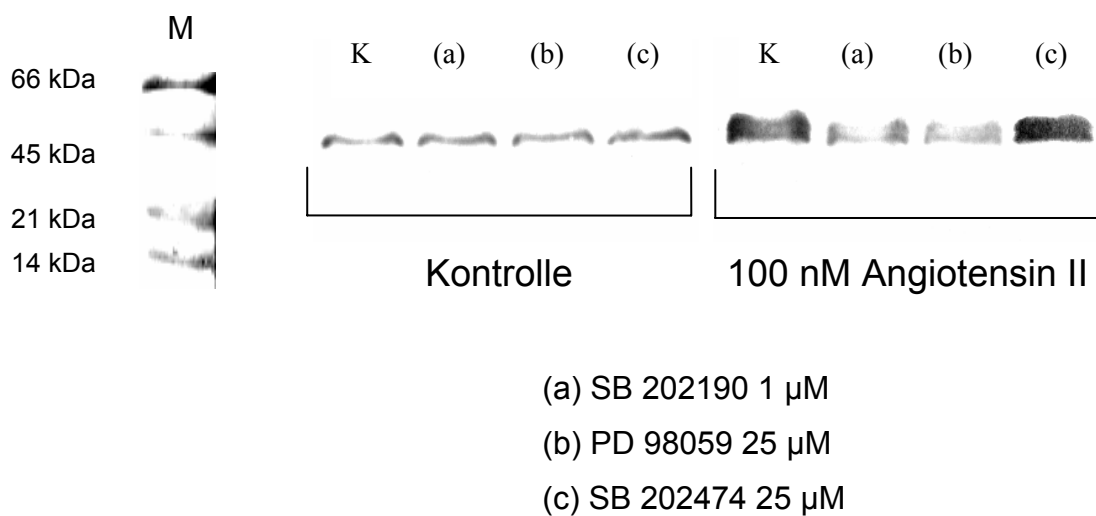


Abbildung 11: Connexin 43-Expression und Phosphorylierung unter dem Einfluss von Angiotensin II und verschiedenen MAP-Kinase-Inhibitoren (Westernblot-Analysen). Primärkulturen ventrikulärer Rattenkardiomyozyten wurden mit 500nM Angiotensin II und zusätzlich mit dem MEK-Inhibitor PD 98059, dem p38-Inhibitor SB202190 sowie einer Negativkontrolle für MAP-Kinase-Inhibitoren für 24 Stunden in den oben angegebenen Konzentrationen inkubiert. Negativkontrollen wurden mit dem gleichen MAP-Kinase-Inhibitor-Set behandelt; M: Marker; K: Kontrolle.

4.4 Zusammenfassung - Ergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten die Connexine 40 und 43 in relevanten Mengen nachweisbar sind. Connexin 45 war nur in Spuren detektierbar. Die Synthese des kardialen Connexin 43 ist regulierbar. Die Stimulation mit Angiotensin II führte zu einer vermehrten Expression. Die Synthese von Connexin 40 war durch Angiotensin II nicht zu beeinflussen. Nachweisbar war ebenfalls ein Effekt auf die Phosphorylierung. Neben der erhöhten Proteinexpression durch Angiotensin II war eine Zunahme der phosphorylierten Isoform ersichtlich. Die genannten Effekte waren durch den AT₁-Antagonisten Losartan blockierbar, die Endothelin 1-Rezeptorblockade blieb ohne Auswirkungen, das heißt, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen tatsächlich um Angiotensin II vermittelte Wirkungen handelte, welche über den Angiotensin 1-Rezeptor ablaufen. Die intrazelluläre Signaltransduktion beinhaltet MAP-Kinasen als second messenger. Sowohl die Inhibierung von MEK als auch der p 38 Proteinkinase durch die entsprechenden Blocker führte zum Rückgang der AT₁-Rezeptor stimulierten Effekte, nämlich Erhöhung des Gehaltes und der Phosphorylierung von kardialem Connexin 43. Das bedeutet, beide Wege sind an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt.

5 Diskussion

In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Einflüsse des vasoaktiven Peptids Angiotensin II auf die Synthese kardialer Gap Junctions untersucht. Zur Durchführung der Experimente wurden neonatale ventrikuläre Rattenkardiomyozyten als Zellkulturmodell gewählt, wobei die Zellen aus 24-48 Stunden alten Tieren gewonnen wurden. Neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten sind in der Erforschung von Einflüssen verschiedener Mediatoren auf die Expression und Regulation kardialer Gene ein allgemein anerkanntes Zellkulturmodell [Engelmann et al. 1993; Dodge et al. 1998]. Kultivierte neonatale ventrikuläre Rattenkardiomyozyten behalten die typischen Gegebenheiten im Vergleich zu nativen Zellen bei, insbesondere im Hinblick auf die Verteilung und Funktion kardialer Gap Junctions, sie sind daher ein gut geeignetes Modell für Untersuchungen bezüglich der Expression und Funktion von Gap Junction Kanälen [Kwak et al. 1999].

Nach Isolation der Zellen wurden diese über 7 Tage kultiviert. Bereits am ersten Tag kontrahieren die Kardiomyozyten spontan, aber irregulär. Nach 7 Tagen in Kultur kontrahieren die konfluenten Zellen synchron. Ebenfalls bereits am ersten Tag wird Connexin 43 m-RNA exprimiert, diese Expression hält über mindestens 7 Tage an, ebenso ist bekannt, dass der Gehalt an Connexin 43 sowie das Verhältnis der phosphorylierten zur nicht phosphorylierten Isoform über den genannten Zeitraum zunimmt [Oyamada et al. 1994].

Im Gegensatz dazu beantworten adulte ventrikuläre Kardiomyozyten Wachstumsstimuli mit Hypertrophie, nicht jedoch mit Proliferation [Schluter und Piper 1999]. Des Weiteren regulieren kultivierte adulte Kardiomyozyten Connexine hinunter, über ca. 3-5 Tage, um dann in einen embryonalen Phänotyp überzugehen und die Connexine über das Ausgangsniveau hochzuregulieren. Somit sind adulte Kardiomyozyten für Connexin-Expressionsuntersuchungen eher ungeeignet [Polontchouk et al. 2002].

Der Nachweis der Connexine 40 und 43 erfolgte mittels Western-Blot-Analysen und immunhistochemischen Untersuchungen. Die Immunodetektion mittels Western-Blot ist als indirekte immunologische Nachweismethode in erster Linie von der Spezifität und Qualität der Primärantikörper abhängig. Es fanden monoklonale Antikörper der Firma Chemicon zum Nachweis der Connexine 43 und 45 Verwendung. Die Detektion von Connexin 40 erfolgte mittels eines polyklonalen Antikörpers, freundlicherweise bereitgestellt von Dr.Haeffliger, Lausanne. Die Gefahr polyklonaler Antiseren besteht in

unspezifischen Reaktionen mit fremden Proteinen, da neben dem spezifischen Antikörper unspezifische Immunglobuline enthalten sind. Der von uns verwendete Antikörper richtet sich gegen die Aminosäuren 231-330 von Connexin 40 und weist in Western-Blots Connexin 40 spezifisch nach, wobei sich eine Bande bei 40 kDa zeigt.[Haefliger et al. 2001]. An transfizierten HeLa-Zellen (HeLa-Cx43, HeLa-Cx40) wurde eine Kreuzreaktion ausgeschlossen.

In den durchgeführten Experimenten sind die Connexine 40 und 43 mittels der genannten Antikörper im Western-Blot der kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten deutlich nachweisbar. Ebenso zeigten sich in den Präparaten der Immunfluoreszenzmikroskopie den Connexinen entsprechende Fluoreszenzen im Bereich der Zellmembranen. Connexin 45 war mit beiden Nachweismethoden nur in Spuren detektierbar. Immunhistochemisch zeigten sich vereinzelt punktförmige Fluoreszenzen, ebenfalls im Bereich der Zellmembranen, die jedoch weniger als 1 % der Membranlänge ausmachten. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit Studien der letzten Jahre, in denen Connexin 45 mittels Western-Blots nicht oder nur sehr schwach detektierbar war [Coppen et al. 1998; Alcolea et al. 1999]. Im Kontrast dazu stehen die Auswertungen älterer Untersuchungen, in denen Connexin 45 in ausreichend quantifizierbarer Menge in ventrikulären Kardiomyozyten nachweisbar war [Kanter et al. 1992; Darrow et al. 1995; Darrow et al. 1996]. Diese sehr unterschiedlichen Aussagen beruhen möglicherweise auf der Verwendung unspezifischer Primärantikörper gegen Connexin 45 in früheren Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass Kreuzreaktionen der Connexin 45-Antikörper mit Epitopen von Connexin 43 stattfanden, was zu einem fälschlichen Nachweis von Connexin 45 führte[Coppen et al. 1998]. Der Einsatz neuerer Antikörper gegen Connexin 45 mit hoher Spezifität führte zu den genannten Aussagen der Studien der letzten Jahre. Aufgrund der fehlenden Quantifizierbarkeit von Connexin 45 in den Ergebnissen der hier vorgestellten Arbeit wurde in den weiteren Experimenten Connexin 45 nicht weiter berücksichtigt und Untersuchungen ausschließlich mit Antikörpern gegen Connexin 40 und 43 durchgeführt.

Für die Dauer der Inkubation mit Angiotensin II wurde sich für eine Zeitspanne von 24 Stunden entschieden. Bereits in früheren Arbeiten [Darrow et al. 1996] zeigte sich diese Dauer als gut geeignet, Einflüsse von Proliferationsstimuli zu beurteilen. Kürzere Inkubationszeiten führten zu einem statistisch nicht signifikanten Anstieg der Connexin

43-Expression [Dodge et al. 1998]. Die Halbwertszeit von Connexin 43 in der Zellmembran beträgt 1-2 Stunden. Ein kompletter Austausch der Connexine innerhalb von 24 Stunden ist daher annehmbar [Laird et al. 1991], und die Effekte der Inkubation gut beurteilbar.

Die Experimente wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Angiotensin II durchgeführt. Diese wurden so gewählt, um den Bedingungen in vivo möglichst nahe zu kommen. Angiotensin-Konzentrationen zwischen 10 nM und 100 nM sind vergleichbar mit denen in kardialem Gewebe unter pathophysiologischen Bedingungen [Polontchouk et al. 2002]. Außerdem entsprechen die von uns verwendeten Konzentrationen den Werten, welche in früheren Studien angewandt wurden [Neyses et al. 1993].

Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war die Beurteilung des Einflusses von Angiotensin II auf die Synthese kardialer Gap Junctions.

Nach Inkubation der über 7 Tage kultivierten neonatalen Rattenkardiomyocyten mit Angiotensin II in Konzentrationen zwischen 10 nM und 1000 nM zeigt sich eine konzentrationsabhängige deutliche Steigerung der Connexin 43 Expression. Bereits 24-stündige Inkubation mit 100 nM Angiotensin II führt zu einer Verdreifachung des Gehaltes an Connexin 43 im Vergleich zu Kontrollzellkulturen. Die pEC 50 liegt bei $7,42 \pm 0,38$, was bedeutet, dass diese Effekte im in-vivo relevanten Konzentrationsbereich auftreten. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Studien, in denen die Rolle von Angiotensin II im Hinblick auf Gap Junction Proteine untersucht wurde [Dodge et al. 1998; Shyu et al. 2001]. Um der Frage nachzugehen, inwieweit die Expression von Connexin 40 durch Angiotensin II regulierbar ist, wurden die mit Angiotensin II in den verschiedenen Konzentrationen inkubierten ventrikulären Kardiomyozyten hinsichtlich ihres Gehaltes an Connexin 40 untersucht. Dabei zeigte sich, dass im Gegensatz zu Connexin 43 Connexin 40 durch Angiotensin II nicht beeinflussbar ist. Die Regulierung der Gap Junction Proteine Connexin 40 und Connexin 43 erfolgt also differentiell. Die differentielle Regulierung verschiedener Gap Junction Proteine wurde bereits früher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass chronisches Vorhofflimmern zu einem deutlichen Anstieg der Expression von Connexin 40 im Vorhofmyokard führt, wohingegen eine Beeinflussung von Connexin 43 nicht nachgewiesen werden konnte [Polontchouk et al. 2001].

Connexin 43 kommt in 3 verschiedenen Isoformen vor, welche einer nicht phosphorylierten Isoform, einer einfach phosphorylierten Isoform und einer mehrfach phosphorylierten Isoform entsprechen [Laird et al. 1991; Kwak et al. 1995]. Die verschiedenen Phosphorylierungsgrade weisen ein Molekulargewicht zwischen 41 und 46 kDa auf. Funktion und Lebensdauer der Connexine einschließlich Transport innerhalb der Zelle, Ein- und Ausbau in der Membran, Abbau und Kontrolle der Kanalöffnung sind zumindest teilweise von der Phosphorylierung abhängig [Musil und Goodenough 1991; Lampe und Lau 2000; Salameh et al. 2006]. In den Analysen der im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit durchgeführten Western-Blots präsentiert sich Connexin 43 als Doppelbande mit Molekulargewichten im Vergleich zum Standard-Proteinmarker zwischen 41 und 46 kDa. Es zeigt sich neben der bereits beschriebenen Stimulation der Expression von Connexin 43 eine ebenfalls dosisabhängige Steigerung der Phosphorylierung von Connexin 43 durch Angiotensin II.

Bereits in früheren Arbeiten [Dodge et al. 1998] konnte eine Inhibierung von Angiotensin II-vermittelten Effekten durch den AT₁-Rezeptor-Antagonisten Losartan gezeigt werden.

Losartan war der erste synthetisierte AT₁-Rezeptorantagonist, welcher chemisch auf einem Imidazolring aufgebaut ist, es war außerdem der Erste, welcher in der klinischen Praxis eingesetzt wurde [Wong et al. 1991]. Die Selektivität für den AT₁-Rezeptor ist 3000 mal höher als für den AT₂-Rezeptor. Losartan gilt in der Literatur als Standard Rezeptor-Antagonist bei Untersuchungen des AT₁-Rezeptors, wobei er als reiner kompetitiver Antagonist agiert. [Chung und Unger 1998; Guo et al. 1998]

Um zu klären, ob die dargestellten Veränderungen unserer Untersuchungen ebenfalls über den AT₁-Rezeptor vermittelt werden, wurden den Kulturen zusätzlich zu den verschiedenen Angiotensin II Konzentrationen 100 nM Losartan zugesetzt, zur Kontrolle wurden Zellen mit 500 nM Angiotensin II ohne Zusatz des Rezeptorblockers inkubiert. Es zeigte sich ein Rückgang der erhöhten Connexin 43 Expression auf basale Level bei zusätzlicher Inkubation mit Losartan, so dass eine Signaltransduktion via Angiotensin 1-Rezeptor annehmbar ist.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass andere G_{q/11} gekoppelte Rezeptoren ebenfalls zu einer erhöhten Expression von Connexin 43 bei gleich bleibender Expression von Connexin 40 führen. Insbesondere α - und β - adrenerge Stimulation

sowie die Aktivierung des ET_A-Rezeptors führen ebenfalls zu den genannten Veränderungen [Polontchouk et al. 2002; Salameh et al. 2006]. Möglicherweise handelt es sich hierbei also um ein generelles Prinzip G_{q/11} gekoppelter Rezeptoren. Allerdings müssten weitere Studien durchgeführt werden, um diese These zu untermauern.

Nach Aktivierung durch Angiotensin II kommt es in verschiedenen Zellen, darunter auch Kardiomyozyten und Fibroblasten, zu einer Hochregulierung der Endothelin 1-Expression [Pönicke et al. 1997]. Es ist ebenfalls nachgewiesen, dass Endothelin 1 die Synthese kardialer Gap Junction beeinflusst und an einer vermehrten Expression von Connexin 43 in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten beteiligt ist. Dabei zeigte sich, dass die Erhöhung des Gehaltes an Connexin 43 über den Endothelin-A-Rezeptor vermittelt wird und durch den Rezeptorantagonisten BQ 123 inhibierbar ist [Dissertation M. Jackels 2003]. Es besteht die Möglichkeit, dass die beobachteten Effekte im Sinne einer vermehrten Expression und Phosphorylierung von Connexin 43 bei fehlender Beeinflussbarkeit von Connexin 40 keine Angiotensin II vermittelten Effekte im engeren Sinn sind, sondern sekundär über Endothelin 1 durch vermehrte Produktion dieses Mediators ausgelöst werden. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein Versuchsaufbau gewählt, bei welchem die neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten zusätzlich zu den verschiedenen Konzentrationen von Angiotensin II mit dem Endothelin-A-Rezeptorantagonisten BQ123 inkubiert wurden, dabei wurde die als wirksam erwiesene Konzentration früherer Untersuchungen beibehalten (Dissertation M. Jackels 2003) [Polontchouk et al. 2002].

Es zeigte sich, dass Expression und Phosphorylierung des Connexin 43 mit steigender Angiotensin II Konzentration zunehmen, auch wenn der Endothelin-A-Rezeptorantagonist BQ123 in wirksamer Konzentration zugesetzt wurde. Damit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die demonstrierten Effekte einer Angiotensin II Inkubation bei kultivierten neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten nicht auf einer sekundär gesteigerten Endothelinproduktion beruhen, sondern als tatsächlich und direkt Angiotensin II-vermittelt angesehen werden müssen.

Die Mitglieder der mitogen-activated-protein (MAP)-Kinase Familie sind ubiquitär verbreitete Proteinkinasen, welche in verschiedensten Geweben exprimiert werden und

deren Aktivierung die Antwort auf eine große Anzahl von extrazellulären Stimuli darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass MAP-Kinasen an der Regulierung von Wachstum und Differenzierung, an Zellhypertrophie und Apoptose beteiligt sind [Huckle und Earp 1994; Takahashi und Berk 1998; Adams und Brown 2001]. Als bekannte second messenger überführen MAP-Kinasen extrazelluläre Signale in den Zellkern. Bereits in früheren Untersuchungen konnte eine Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen durch Angiotensin II gezeigt werden [Huang et al. 1996; Kubo et al. 2000; Kubo et al. 2001] Die Rolle der MAP-Kinase-Aktivierung im Hinblick auf die Expression kardialer Gap Junction Proteine ist bislang weitgehend unklar. Um diesen Signaltransduktionsweg weiter zu differenzieren, wurden Experimente durchgeführt, um zu überprüfen, inwieweit die durch Angiotensin II vermittelte Steigerung der Expression und Phosphorylierung von Connexin 43 in kultivierten ventrikulären neonatalen Rattenkardiomyozyten die Aktivierung von MAP-Kinasen beinhaltet. Dabei wurden spezifische Inhibitoren für MAP-Kinasen verwendet. PD 98059 blockiert spezifisch die MEK MAP-Kinase in einer Dosierung von 25 μ M, SB 202190 inhibiert die p38 MAP-Kinase. Die Untersuchungen wurden sowohl an mit Angiotensin II inkubierten Zellen als auch an unbehandelten Kardiomyozyten durchgeführt, um zusätzlich den Effekt der MAP-Kinase-Inhibitoren auf das basale Level von Connexin 43 zu überprüfen. Durch Auswertung der Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass alle Map-Kinase-Inhibitoren bei den Kontrollkulturen ineffektiv waren, wohingegen die gesteigerte Expression und Phosphorylierung von Connexin 43 in den mit Angiotensin II inkubierten neonatalen Kardiomyozyten durch beide MAP-Kinase-Blocker verhindert werden konnte. Diese Ergebnisse deuten auf die Involvierung mehrerer Signaltransduktionswege hin, die die Aktivierung beider MAP-Kinasen, MEK und p38 beeinhaltet.

Neben der vermehrten Expression und Phosphorylierung des Gap Junction Proteins Connexin 43 durch Angiotensin II wurde im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit auch die funktionelle Relevanz der dargestellten Ergebnisse untersucht. Fraglich ist dabei, ob der vermehrte Connexin 43-Gehalt und die gesteigerte Phosphorylierung der Proteine auch zur Ausbildung einer erhöhten Anzahl funktionsfähiger Gap Junction Kanäle führt. Die Gap Junction Leitfähigkeit wurde bereits früher unter verschiedenen Bedingungen gemessen [Dhein et al. 2002]. Mittels der Double Cell Patch Clamp Experimente wurde

elektrische Kopplung an Zellpaaren gemessen, wobei sich an mit Angiotensin II inkubierten Zellen eine Verdopplung der elektrischen Kopplung demonstrieren ließ [Polontchouk et al. 2002].

Damit scheint die vermehrte Expression und Phosphorylierung des Gap Junction Proteins Connexin 43 auch eine vermehrte Ausbildung von funktionstüchtigen Gap Junction Kanälen zu Folge zu haben.

Viele Herzmuskelerkrankungen führen zu Arrhythmien. Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich unter pathophysiologischen Bedingungen die Connexinexpression sowie die Verteilung der Gap Junctions im Myokard verändert [Saffitz 1997; Kostin et al. 2003]. Eine häufige Beobachtung ist die Umverteilung der Gap Junctions von den Glanzstreifen (End-zu-End- Verbindungen zum lateralen Zellrandrand [Smith et al. 1991], in Randzonen von Myokardinfarkten wurden weniger Gap Junctions gefunden als im gesunden Myokard [Severs 1994], bei Herzmuskelhypertrophie zeigte sich die oben beschriebene Umverteilung der Gap Junctions sowie eine Zunahme des Gehaltes an Connexin 43 [Emdad et al. 2001], Umverteilungen der Gap Junctions konnten ebenso bei hypertropher Kardiomyopathie nachgewiesen werden [Sepp et al. 1996]. Die Veränderungen der Gap Junctions in Anzahl und Verteilung werden als anatomisches Substrat von Arrhythmien gesehen [Kirchhoff et al. 1998; Severs 2001; Severs et al. 2004].

Analog zu den hier vorgestellten Ergebnissen wurde auch in anderen Experimenten eine Erhöhung des Expressionslevels von Connexin 43 in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten durch Stimulation mit Angiotensin II nachgewiesen. Dabei zeigte sich, wie in dieser Arbeit auch, eine deutliche Zunahme der Gap Junctions in der Immunfluoreszenzmikroskopie [Dodge et al. 1998]. Veränderungen der Konzentration von Wachstumshormonen und second-messenger, wie sie im Rahmen von Kardiomyopathien verschiedenster Genesen unter anderem für Angiotensin II bekannt sind, haben offensichtlich einen Einfluss auf die Synthese und Verteilung von Gap Junctions [Shyu et al. 2001].

Es konnte in den Untersuchungen des Double Cell Patch Clamp eine verdoppelte elektrische Kopplung der mit Angiotensin II inkubierten Kardiomyozyten demonstriert werden, so dass auch eine funktionelle Beeinflussung im Sinne einer veränderten

metabolischen und elektrischen Kopplung via Gap Junction-Kanäle unter (patho-)physiologischen Bedingungen anzunehmen ist [van Rijen et al. 2000; Yao et al. 2003]. In scheinbarem Gegensatz zu den genannten Beobachtungen stehen Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass die vermehrte Phosphorylierung von Connexin 43 zu einer verminderten Einzelkanalleitfähigkeit der Gap Junctions führt [Warn-Cramer et al. 1998; Cottrell et al. 2003]. Diese ist wahrscheinlich davon abhängig, welche Aminosäure des C-Terminus phosphoryliert wurde [Salameh und Dhein 2005]. Die Involvierung von MAP-Kinasen wurde bei diesen Experimenten als second messenger mit nachfolgend vermehrter Phosphorylierung nachgewiesen. Entscheidend ist, dass durch Angiotensin II die Expression und Phosphorylierung von Connexin 43 steigt und damit die Anzahl der Kanäle zunimmt, die MAP-Kinase vermittelte (Über-)phosphorylierung jedoch zu einer verminderten Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle führt [Cottrell et al. 2003]. Der dadurch entstehende funktionelle Antagonismus erscheint regeltechnisch sinnvoll, da auf diesem Wege eine sensible und genaue Gleichgewichtseinstellung möglich wäre. Vor dem Hintergrund der arrhythmogenen Wirkung einer zu starken Kopplung scheint diese gegenläufige Regulierbarkeit vorteilhaft [Rohr et al. 1997].

Die grundsätzlich mögliche differentielle Regulierung der Connexine ist denkbar, da die Stimulation durch Angiotensin II selektiv für die Expression und Phosphorylierung von Connexin 43 ist, Connexin 40 bleibt unbeeinflusst. Somit ist dieser Vorgang dynamisch und nicht statisch. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass interzelluläre Kommunikation via Gap Junction verschiedenen Anforderungen angepasst werden kann.

Vorhofflimmern ist die häufigste kardiale Arrhythmie, über 1 % der Bevölkerung ist daran erkrankt. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter, außerdem wird das Auftreten durch Risikofaktoren wie rheumatische oder ischämische Herzerkrankung, Hypertonie oder Herzinsuffizienz verschiedener Genese begünstigt. In vielen Fällen kann jedoch keine spezielle Ursache gefunden werden. Vorhofflimmern jedweder Genese führt zu Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften mit einer reduzierten effektiven Refraktärzeit, Aktionspotentialdauer und Leitungsgeschwindigkeit, was zur Stabilisierung und zur Fortdauer von Re-entrant-Kreisen führt [Jalife et al. 1999; Wetzel et al. 2005]. Damit verbunden sind strukturelle Änderungen auf Vorhofebene wie exzessive interstitielle Fibrose, Vorhofvergrößerung und Hypertrophie [Shi et al. 2002]. Veränderungen der Verteilung von Gap Junctions

und der Connexin-Expression sind die Basis für die elektrophysiologischen Umbauvorgänge, wie sie bei chronischem Vorhofflimmern auftreten [Polontchouk et al. 2001; Wetzel et al. 2005]. Es konnte gezeigt werden, dass Vorhofflimmern zu einer vermehrten Expression sowohl von Connexin 40, als auch von Connexin 43 im menschlichen linken Vorhof führt [Wetzel et al. 2005]. Die Expression von Connexin 40 ist unter diesen Bedingungen auch im rechten Vorhof erhöht. Auch die Verteilung der Gap Junctions auf Vorhofebene ändert sich dramatisch [Polontchouk et al. 2001]. Auf die Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems in der Pathophysiologie des ventrikulären Remodeling wurde bereits eingegangen. Es konnte jedoch ebenfalls gezeigt werden, dass der ACE-Hemmer Enalapril atriale Fibrose und atriales Remodeling, welches im Rahmen von experimentell erzeugtem Vorhofflimmern auftrat, signifikant verringert [Shi et al. 2002]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Renin-Angiotensin-System möglicherweise durch Beeinflussung von Gap Junctions im Bereich der Herzvorhöfe zum Auftreten und zur Fortdauer von Vorhofflimmern beiträgt.

Eine endgültige pathophysiologische Interpretation der beschriebenen Ergebnisse ist an dieser Stelle noch nicht möglich, da in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz neben Angiotensin II auch andere Mediatoren wie Katecholamine, Endothelin, Tumornekrosefaktor alpha und weitere wirksam werden. Eine gegenseitige positive wie negative Beeinflussung ist denkbar [Golfman et al. 1993; Adams und Brown 2001]. Alle Mediatoren wirken in vivo weit länger als 24 Stunden auf das Gewebe ein, d.h. Langzeitwirkungen nach Exposition über Monate oder Jahre sind im Rahmen dieser Arbeit nicht abschätzbar.

6 Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System repräsentiert eines der phylogenetisch ältesten Hormonsysteme. Angiotensin II ist einer der wichtigsten Mediatoren im Körper für Blutdruckregulation, Aldosteronausschüttung und Natriumreabsorption. Erkenntnisse über die Bedeutung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems im Hinblick auf die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen rücken jedoch immer mehr in den Focus und ändern die traditionelle Sicht auf die Rolle des Angiotensin II. Mittlerweile ist generell akzeptiert, dass Angiotensin II an der Regulierung der Expression unter anderem von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen von Zellen beteiligt ist und somit Vorgänge wie Wachstum und Apoptose, Fibrose und Inflammation mit steuert.

Im Rahmen kardialer Erkrankungen, insbesondere bei ischämischen und dilatativen Kardiomyopathien unterliegt der linke Ventrikel einem chronischen Umbauprozess, welcher durch Kammerdilatation, myokardialer Hypertrophie sowie Veränderungen der Extrazellulärmatrix gekennzeichnet ist – dem ventrikulären Remodeling. Hierbei spielt Angiotensin II eine entscheidende Rolle. Viele Studien der vergangenen Jahre belegen eindrucksvoll den Nutzen des Einsatzes von ACE-Hemmern in der Therapie der Herzinsuffizienz.

Die beschriebenen strukturellen Veränderungen des Myokards gehen mit Anormalitäten der Erregungsleitung einher. Basis für die Kommunikation benachbarter Zellen und die Formung eines Synzythiums sind, neben der Freisetzung von chemischen Transmittern und Mediatoren, Gap Junctions. Durch sie wird eine direkte chemische und elektrische Kopplung realisiert. Diese direkte Kopplung ist entscheidend für die Funktion vieler Gewebe und Organe, insbesondere bei der Erregungsübertragung im Herz spielen sie eine wichtige Rolle.

Gap Junctions sind polymere Strukturen, welche aus 12 Proteinen bestehen, die Connexine genannt werden. Die Bezeichnung der Connexine korrespondiert mit deren Molekulargewicht. Die Connexin-Familie umfasst mindestens 15 Isoformen, von denen die Isoformen Connexin 37 (Cx37), Connexin 40 (Cx40), Connexin 43 (Cx43), Connexin 45 (Cx45) und Connexin 46 (Cx46) im Herzkreislaufsystem von Säugetieren exprimiert werden. Sechs Connexin-Moleküle bilden einen Hemikanal, auch Connexon genannt. Durch Andocken zweier Hemikanäle benachbarter Zellen entsteht ein funktioneller Kanal.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Beeinflussung kardialer Gap Junctions durch Angiotensin II untersucht. Dabei wurde mit Zellkulturen neonataler Rattenkardiomyozyten gearbeitet. Es konnte gezeigt werden, dass die Connexine 40 und 43 in relevanten Mengen in den kultivierten Kardiomyozyten exprimiert werden. Connexin 45 ließ sich nur in Spuren detektieren. Stimulation der Zellen mit Angiotensin II über 24 Stunden führte zu einem signifikanten Anstieg der Expression von Connexin 43, Connexin 40 blieb durch die Stimulation mit Angiotensin II unbeeinflusst. Ebenfalls nachweisbar war ein Effekt auf die Phosphorylierung, neben der erhöhten Proteinexpression durch Angiotensin II war eine Zunahme der phosphorylierten Isoform von Connexin 43 ersichtlich. Funktion und Lebensdauer der Connexine einschließlich Transport innerhalb der Zelle, Ein- und Ausbau in der Membran, Abbau und Kontrolle der Kanalöffnung sind zumindest teilweise von der Phosphorylierung abhängig.

Angiotensin II vermittelt seine Wirkungen über zwei Hauptrezeptoren, den AT₁-Rezeptor und den AT₂-Rezeptor. Im kardiovaskulären System spielt der AT₁-Rezeptor die Hauptrolle, über ihn werden die weithin bekannten Angiotensin II Wirkungen wie Vasokonstriktion, Proliferationsreize oder Hypertrophie der glatten Muskulatur und der Kardiomyozyten vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Expression und Phosphorylierung von Connexin 43 ebenfalls AT₁-Rezeptor vermittelt sind. Zugabe des Rezeptor-Antagonisten Losartan blockiert die beschriebenen Effekte. Die Endothelin-Rezeptorblockade blieb ohne Auswirkungen, das bedeutet, eine durch Angiotensin II induzierte Endothelin-Produktion ist nicht für die vermehrte Expression und Phosphorylierung von Connexin 43 verantwortlich.

Die intrazelluläre Signaltransduktion beinhaltet MAP-Kinasen als second messenger. Sowohl die Inhibierung der MEK als auch der p38 Proteinkinase durch die entsprechenden Blocker führt zum Rückgang der AT₁-Rezeptor vermittelten Wirkungen. Das bedeutet, beide Wege sind an der Signaltransduktion beteiligt. Fluoreszenzmikroskopische Bilder untermauern die anhand von Western-Blots gemachten Erkenntnisse. Zur Beurteilung der funktionellen Relevanz wurden mit Hilfe des Double Cell Patch Clamp Verfahrens Messungen durchgeführt, welche eine erhöhte Gap Junction Leitfähigkeit und damit eine erhöhte Kopplung der Zellen nach Stimulation mit Angiotensin II bestätigten.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit deuten also auf eine Beeinflussung kardialer Gap Junctions durch Angiotensin II hin, was möglicherweise große klinische Relevanz im Hinblick auf die Entstehung von Herzrhythmusstörungen hat. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um eine abschließende pathophysiologische Interpretation zu ermöglichen. In vivo wirken eine Vielzahl von Mediatoren wie Katecholamine, Tumornekrosefaktor alpha oder Endothelin neben Angiotensin II auf die Kardiomyozyten ein, außerdem dauert die Stimulation weitaus länger als 24 Stunden. Trotz dieser Einschränkungen ermöglicht die weiterführende Erforschung von Gap Junctions möglicherweise zukünftig eine Pharmakotherapie, mit der durch gezielte Öffnung oder Schließung von Kanälen, vermehrter oder reduzierter Expression von Connexinen, eine wirksame Behandlung potentiell lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen erreicht wird.

7 Literaturverzeichnis

1. Aartsen WM, Schuijt MP, Danser AH, Daemen MJ, Smits JF: The role of locally expressed angiotensin converting enzyme in cardiac remodeling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* 56 (2002) 205-213
2. Adams JW, Brown JH: G-proteins in growth and apoptosis: lessons from the heart. *Oncogene* 20 (2001) 1626-1634
3. Alcolea S, Theveniau-Ruissy M, Jarry-Guichard T, Marics I, Tzouanacou E, Chauvin JP, Briand JP, Moorman AF, Lamers WH, Gros DB: Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ Res* 84 (1999) 1365-1379
4. Angst BD, Khan LU, Severs NJ, Whitely K, Rothery S, Thompson RP, Magee AI, Gourdie RG: Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ Res* 80 (1997) 88-94
5. Balla T, Varnai P, Tian Y, Smith RD: Signaling events activated by angiotensin II receptors: what goes before and after the calcium signals. *Endocr Res* 24 (1998) 335-344
6. Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE: Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res* 83 (1998) 629-635
7. Beckwith C, Munger MA: Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on ventricular remodeling and survival following myocardial infarction. *Ann Pharmacother* 27 (1993) 755-766
8. Beyer EC, Davis LM, Saffitz JE, Veenstra RD: Cardiac intercellular communication: consequences of connexin distribution and diversity. *Braz J Med Biol Res* 28 (1995) 415-425
9. Blaufarb IS, Sonnenblick EH: The renin-angiotensin system in left ventricular remodeling. *Am J Cardiol* 77 (1996) 8C-16C
10. Booz GW, Baker KM: The role of the renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiac remodeling. *Blood Press Suppl* 2 (1996) 10-18

11. Boyett MR, Honjo H, Kodama I: The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res* 47 (2000) 658-687
12. Brilla CG: The cardiac structure-function relationship and the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertension and heart failure. *Curr Opin Cardiol* 9 Suppl 1 (1994) S2-10; discussion S10-11
13. Brilla CG, Maisch B, Weber KT: Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease: in vivo and in vitro studies on collagen matrix regulation. *Clin Investig* 71 (1993) S35-41
14. Burlew BS, Weber KT: Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms. *Cardiol Clin* 18 (2000) 435-442
15. Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM: Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 35 (2000) 155-163
16. Chung O, Unger T: Pharmacology of angiotensin receptors and AT1 receptor blockers. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 2 (1998) 15-23
17. Cohn JN: Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. *Circulation* 91 (1995) 2504-2507
18. Coppen SR, Dupont E, Rothery S, Severs NJ: Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ Res* 82 (1998) 232-243
19. Cottrell GT, Lin R, Warn-Cramer BJ, Lau AF, Burt JM: Mechanism of v-Src- and mitogen-activated protein kinase-induced reduction of gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 284 (2003) C511-520
20. Darrow BJ, Fast VG, Kleber AG, Beyer EC, Saffitz JE: Functional and structural assessment of intercellular communication. Increased conduction velocity and enhanced connexin expression in dibutyryl cAMP-treated cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 79 (1996) 174-183
21. Darrow BJ, Laing JG, Lampe PD, Saffitz JE, Beyer EC: Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 76 (1995) 381-387

22. Davie L, Lehtonen JY, Hayashida W, Dzau VJ, Horiuchi M: Intracellular third loops in AT1 and AT2 receptors determine subtype specificity. *Life Sci* 69 (2001) 509-516
23. Davis LM, Rodefeld ME, Green K, Beyer EC, Saffitz JE: Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. *J Cardiovasc Electrophysiol* 6 (1995) 813-822
24. De Gasparo M: [AT(1) and AT(2) angiotensin II receptors: key features]. *Drugs* 62 Spec No 1 (2002) 1-10
25. De Mello WC: Cell coupling and impulse propagation in the failing heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10 (1999) 1409-1420
26. De Mello WC, Danser AH: Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension* 35 (2000) 1183-1188
27. Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, Marics I, Briand JP, Willecke K, Gros D, Theveniau-Ruissy M: Developmental regulation of connexin 40 gene expression in mouse heart correlates with the differentiation of the conduction system. *Dev Dyn* 204 (1995) 358-371
28. Dermietzel R, Traub O, Hwang TK, Beyer E, Bennett MV, Spray DC, Willecke K: Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 10148-10152
29. Dhein S: [Gap junction channels and cellular communication. Recent discoveries of importance in medicine]. *Dtsch Med Wochenschr* 123 (1998) 912-917
30. Dhein S: Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. *Trends Pharmacol Sci* 19 (1998) 229-241
31. Dhein S: Pharmacology of gap junctions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 62 (2004) 287-298
32. Dhein S, Hammerath SB: Aspects of the intercellular communication in aged hearts: effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364 (2001) 397-408
33. Dhein S, Polontchouk L, Salameh A, Haefliger JA: Pharmacological modulation and differential regulation of the cardiac gap junction proteins connexin 43 and connexin 40. *Biol Cell* 94 (2002) 409-422

34. Dietz R, Osterziel KJ, Willenbrock R, Gulba DC, von Harsdorf R: Ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 82 Suppl 1 (1999) 73-75
35. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM: Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 81 (1997) 970-976
36. Dodge SM, Beardslee MA, Darrow BJ, Green KG, Beyer EC, Saffitz JE: Effects of angiotensin II on expression of the gap junction channel protein connexin43 in neonatal rat ventricular myocytes. *J Am Coll Cardiol* 32 (1998) 800-807
37. Egidio J: Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney Int* 49 (1996) 578-597
38. Emdad L, Uzzaman M, Takagishi Y, Honjo H, Uchida T, Severs NJ, Kodama I, Murata Y: Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: prevention by angiotensin II type 1 receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 33 (2001) 219-231
39. Engelmann GL, Birchenall-Roberts MC, Ruscetti FW, Samarel AM: Formation of fetal rat cardiac cell clones by retroviral transformation: retention of select myocyte characteristics. *J Mol Cell Cardiol* 25 (1993) 197-213
40. Fujikura Y, Ohta H, Hirai T, Fukumoto T: Immunohistochemical analysis of rat liver using a monoclonal antibody (HAM8) against gap junction. *Anat Rec* 235 (1993) 335-341
41. Golfman LS, Hata T, Beamish RE, Dhalla NS: Role of endothelin in heart function in health and disease. *Can J Cardiol* 9 (1993) 635-653
42. Gourdie RG, Green CR, Severs NJ, Thompson RP: Immunolabelling patterns of gap junction connexins in the developing and mature rat heart. *Anat Embryol (Berl)* 185 (1992) 363-378
43. Gros D, Jarry-Guichard T, Ten Velde I, de Maziere A, van Kempen MJ, Davoust J, Briand JP, Moorman AF, Jongsma HJ: Restricted distribution of connexin40, a gap junctional protein, in mammalian heart. *Circ Res* 74 (1994) 839-851
44. Gros DB, Jongsma HJ: Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18 (1996) 719-730

45. Guo W, Kamiya K, Kada K, Kodama I, Toyama J: Regulation of cardiac Kv1.5 K⁺ channel expression by cardiac fibroblasts and mechanical load in cultured newborn rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30 (1998) 157-166
46. Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR: Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 58 (2000) 1389-1399
47. Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI: Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res* 88 (2001) 333-339
48. Haefliger JA, Demotz S, Braissant O, Suter E, Waeber B, Nicod P, Meda P: Connexins 40 and 43 are differentially regulated within the kidneys of rats with renovascular hypertension. *Kidney Int* 60 (2001) 190-201
49. Hsueh WA, Do YS, Anderson PW, Law RE: Angiotensin II in cell growth and matrix production. *Adv Exp Med Biol* 377 (1995) 217-223
50. Huang XC, Richards EM, Summers C: Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J Biol Chem* 271 (1996) 15635-15641
51. Huckle WR, Earp HS: Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II. *Prog Growth Factor Res* 5 (1994) 177-194
52. Ishida J, Fukamizu A: [Angiotensin II and apoptosis]. *Nippon Rinsho* 57 (1999) 1117-1123
53. Izumiya Y, Kim S, Izumi Y, Yoshida K, Yoshiyama M, Matsuzawa A, Ichijo H, Iwao H: Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. *Circ Res* 93 (2003) 874-883
54. Jalife J, Morley GE, Vaidya D: Connexins and impulse propagation in the mouse heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10 (1999) 1649-1663
55. Jan Danser AH, Saris JJ: Prorenin uptake in the heart: a prerequisite for local angiotensin generation? *J Mol Cell Cardiol* 34 (2002) 1463-1472

56. Jesmin S, Sakuma I, Hattori Y, Kitabatake A: Role of Angiotensin II in Altered Expression of Molecules Responsible for Coronary Matrix Remodeling in Insulin-Resistant Diabetic Rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2003)
57. Jongsma HJ, Wilders R: Gap junctions in cardiovascular disease. *Circ Res* 86 (2000) 1193-1197
58. Kakar SS, Riel KK, Neill JD: Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (AT-1A and AT-1B) in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 185 (1992) 688-692
59. Kanter HL, Saffitz JE, Beyer EC: Cardiac myocytes express multiple gap junction proteins. *Circ Res* 70 (1992) 438-444
60. Kaprielian RR, Gunning M, Dupont E, Sheppard MN, Rothery SM, Underwood R, Pennell DJ, Fox K, Pepper J, Poole-Wilson PA, Severs NJ: Downregulation of immunodetectable connexin43 and decreased gap junction size in the pathogenesis of chronic hibernation in the human left ventricle. *Circulation* 97 (1998) 651-660
61. Kataoka C, Egashira K, Inoue S, Takemoto M, Ni W, Koyanagi M, Kitamoto S, Usui M, Kaibuchi K, Shimokawa H, Takeshita A: Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension* 39 (2002) 245-250
62. Kim S, Iwao H: Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52 (2000) 11-34
63. Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A, Kruger O, Traub O, Willecke K: Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol* 8 (1998) 299-302
64. Kistler J, Berriman J, Evans CW, Gruijters WT, Christie D, Corin A, Bullivant S: Molecular portrait of lens gap junction protein MP70. *J Struct Biol* 103 (1990) 204-211
65. Kostin S, Dammer S, Hein S, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J: Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovasc Res* 62 (2004) 426-436

66. Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J: Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem* 242 (2003) 135-144
67. Kubo T, Hosokawa H, Kambe T, Fukumori R: Angiotensin II mediates pressure loading-induced mitogen-activated protein kinase activation in isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol* 391 (2000) 281-287
68. Kubo T, Ibusuki T, Chiba S, Kambe T, Fukumori R: Mitogen-activated protein kinase activity regulation role of angiotensin and endothelin systems in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 411 (2001) 27-34
69. Kwak BR, Saez JC, Wilders R, Chanson M, Fishman GI, Hertzberg EL, Spray DC, Jongsma HJ: Effects of cGMP-dependent phosphorylation on rat and human connexin43 gap junction channels. *Pflugers Arch* 430 (1995) 770-778
70. Kwak BR, van Kempen MJ, Theveniau-Ruissy M, Gros DB, Jongsma HJ: Connexin expression in cultured neonatal rat myocytes reflects the pattern of the intact ventricle. *Cardiovasc Res* 44 (1999) 370-380
71. Laing JG, Beyer EC: The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* 270 (1995) 26399-26403
72. Laird DW, Puranam KL, Revel JP: Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J* 273(Pt 1) (1991) 67-72
73. Lampe PD, Lau AF: Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384 (2000) 205-215
74. Lorenzo O, Ruiz-Ortega M, Esbrit P, Ruperez M, Ortega A, Santos S, Blanco J, Ortega L, Egido J: Angiotensin II increases parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and the type 1 PTH/PTHrP receptor in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 13 (2002) 1595-1607
75. Lucius R, Gallinat S, Busche S, Rosenstiel P, Unger T: Beyond blood pressure: new roles for angiotensin II. *Cell Mol Life Sci* 56 (1999) 1008-1019
76. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Luscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard AC, Pepine CJ, Pitt B: Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril

- improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation* 94 (1996) 258-265
77. Marrero MB, Paxton WG, Schieffer B, Ling BN, Bernstein KE: Angiotensin II signalling events mediated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal* 8 (1996) 21-26
 78. Matsubara H: Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res* 83 (1998) 1182-1191
 79. Matsubara H, Mori Y, Masaki H, Inada M: [Pathophysiological function of angiotensin II AT1 and AT2 receptors and clinical application of AT1 antagonists]. *Nippon Rinsho* 56 (1998) 1912-1918
 80. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J: Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38 (2001) 635-638
 81. Musil LS, Goodenough DA: Gap junctional intercellular communication and the regulation of connexin expression and function. *Curr Opin Cell Biol* 2 (1990) 875-880
 82. Musil LS, Goodenough DA: Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 115 (1991) 1357-1374
 83. Nakamura Y, Makino H, Morishita R: [Distribution and function of angiotensin receptor subtypes in cardiovascular system]. *Nippon Rinsho* 57 (1999) 1032-1035
 84. Neyses L, Nouskas J, Luyken J, Fronhoffs S, Oberdorf S, Pfeifer U, Williams RS, Sukhatme VP, Vetter H: Induction of immediate-early genes by angiotensin II and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes. *J Hypertens* 11 (1993) 927-934
 85. Obermuller N, Unger T, Culman J, Gohlke P, de Gasparo M, Bottari SP: Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat brain nuclei. *Neurosci Lett* 132 (1991) 11-15
 86. Oemar BS, Werner A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauck M, Marz W, Rupp J, Pech M, Luscher TF: Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation* 95 (1997) 831-839

87. Oyamada M, Kimura H, Oyamada Y, Miyamoto A, Ohshika H, Mori M: The expression, phosphorylation, and localization of connexin 43 and gap-junctional intercellular communication during the establishment of a synchronized contraction of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Exp Cell Res* 212 (1994) 351-358
88. Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, Toniato E, Alesse E, Bravi MC, Ferri C, Desideri G, Gulino A, Santucci A: Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation* 100 (1999) 1646-1652
89. Peters NS: Myocardial gap junction organization in ischemia and infarction. *Microsc Res Tech* 31 (1995) 375-386
90. Peters NS: New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischaemic and hypertrophied human hearts. *Clin Sci (Lond)* 90 (1996) 447-452
91. Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL: Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation* 95 (1997) 988-996
92. Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ: Cardiac arrhythmogenesis and the gap junction. *J Mol Cell Cardiol* 27 (1995) 37-44
93. Peters NS, Severs NJ, Rothery SM, Lincoln C, Yacoub MH, Green CR: Spatiotemporal relation between gap junctions and fascia adherens junctions during postnatal development of human ventricular myocardium. *Circulation* 90 (1994) 713-725
94. Peters NS, Wit AL: Myocardial architecture and ventricular arrhythmogenesis. *Circulation* 97 (1998) 1746-1754
95. Piqueras L, Kubes P, Alvarez A, O'Connor E, Issekutz AC, Esplugues JV, Sanz MJ: Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation* 102 (2000) 2118-2123

96. Polontchouk L, Ebelt B, Jackels M, Dhein S: Chronic effects of endothelin 1 and angiotensin II on gap junctions and intercellular communication in cardiac cells. *Faseb J* 16 (2002) 87-89
97. Polontchouk L, Haefliger JA, Ebelt B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U, Kuhn-Regnier F, De Vivie ER, Dhein S: Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol* 38 (2001) 883-891
98. Polontchouk LO, Valiunas V, Haefliger JA, Eppenberger HM, Weingart R: Expression and regulation of connexins in cultured ventricular myocytes isolated from adult rat hearts. *Pflugers Arch* 443 (2002) 676-689
99. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97 (1996) 1916-1923
100. Rohr S, Kucera JP, Fast VG, Kleber AG: Paradoxical improvement of impulse conduction in cardiac tissue by partial cellular uncoupling. *Science* 275 (1997) 841-844
101. Rosendorff C: The renin-angiotensin system and vascular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 28 (1996) 803-812
102. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340 (1999) 115-126
103. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J: Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension* 38 (2001) 1382-1387
104. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J: Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10 (2001) 321-329
105. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Egido J: Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep* 5 (2003) 73-79
106. Sadoshima J: Cytokine actions of angiotensin II. *Circ Res* 86 (2000) 1187-1189
107. Saffitz JE: Gap junctions: functional effects of molecular structure and tissue distribution. *Adv Exp Med Biol* 430 (1997) 291-301

108. Saffitz JE, Davis LM, Darrow BJ, Kanter HL, Laing JG, Beyer EC: The molecular basis of anisotropy: role of gap junctions. *J Cardiovasc Electrophysiol* 6 (1995) 498-510
109. Saffitz JE, Kanter HL, Green KG, Tolley TK, Beyer EC: Tissue-specific determinants of anisotropic conduction velocity in canine atrial and ventricular myocardium. *Circ Res* 74 (1994) 1065-1070
110. Salameh A, Dhein S: Pharmacology of gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer? *Biochim Biophys Acta* 1719 (2005) 36-58
111. Salameh A, Frenzel C, Boldt A, Rassler B, Glawe I, Schulte J, Muhlberg K, Zimmer HG, Pfeiffer D, Dhein S: Subchronic alpha- and beta-adrenergic regulation of cardiac gap junction protein expression. *Faseb J* 20 (2006) 365-367
112. Sandberg K, Ji H, Clark AJ, Shapira H, Catt KJ: Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *J Biol Chem* 267 (1992) 9455-9458
113. Schluter KD, Piper HM: Regulation of growth in the adult cardiomyocytes. *Faseb J* 13 Suppl (1999) S17-22
114. Sepp R, Severs NJ, Gourdie RG: Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 76 (1996) 412-417
115. Severs NJ: Pathophysiology of gap junctions in heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 5 (1994) 462-475
116. Severs NJ: Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence? *J Cell Mol Med* 5 (2001) 355-366
117. Severs NJ, Dupont E, Coppin SR, Halliday D, Inett E, Baylis D, Rothery S: Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 1662 (2004) 138-148
118. Shi Y, Li D, Tardif JC, Nattel S: Enalapril effects on atrial remodeling and atrial fibrillation in experimental congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 54 (2002) 456-461
119. Shyu KG, Chen CC, Wang BW, Kuan P: Angiotensin II receptor antagonist blocks the expression of connexin43 induced by cyclical mechanical stretch in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33 (2001) 691-698

120. Sim MK, Lim SL: Angiotensin AT1 receptor subtypes in the rabbit pulmonary artery. A ligand binding study. *Receptors Channels* 5 (1998) 323-329
121. Smith JH, Green CR, Peters NS, Rothery S, Severs NJ: Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease. An immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy. *Am J Pathol* 139 (1991) 801-821
122. Sohl G, Willecke K: Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62 (2004) 228-232
123. Sonnenblick EH, LeJemtel TH: Pathophysiology of congestive heart failure. Role of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am J Med* 87 (1989) 88S-91S
124. Spach MS, Heidlage JF, Dolber PC, Barr RC: Electrophysiological effects of remodeling cardiac gap junctions and cell size: experimental and model studies of normal cardiac growth. *Circ Res* 86 (2000) 302-311
125. Takahashi E, Berk BC: MAP kinases and vascular smooth muscle function. *Acta Physiol Scand* 164 (1998) 611-621
126. Tayeh MA, Scicli AG: Angiotensin II and bradykinin regulate the expression of P-selectin on the surface of endothelial cells in culture. *Proc Assoc Am Physicians* 110 (1998) 412-421
127. Timmermans PB, Chiu AT, Herblin WF, Wong PC, Smith RD: Angiotensin II receptor subtypes. *Am J Hypertens* 5 (1992) 406-410
128. Touyz RM, Schiffrin EL: Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52 (2000) 639-672
129. Tsutsumi K, Saavedra JM: Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am J Physiol* 261 (1991) R209-216
130. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM: Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 100 (1999) 1223-1229

131. Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ: Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl* 14 (1996) S95-103
132. van Kats JP, Duncker DJ, Haitzma DB, Schuijt MP, Niebuur R, Stubenitsky R, Boomsma F, Schalekamp MA, Verdouw PD, Danser AH: Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade prevent cardiac remodeling in pigs after myocardial infarction: role of tissue angiotensin II. *Circulation* 102 (2000) 1556-1563
133. van Rijen HV, van Veen TA, Hermans MM, Jongasma HJ: Human connexin40 gap junction channels are modulated by cAMP. *Cardiovasc Res* 45 (2000) 941-951
134. van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T: Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res* 51 (2001) 217-229
135. Warn-Cramer BJ, Cottrell GT, Burt JM, Lau AF: Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273 (1998) 9188-9196
136. Wetzel U, Boldt A, Lauschke J, Weigl J, Schirdewahn P, Dorszewski A, Doll N, Hindricks G, Dhein S, Kottkamp H: Expression of connexins 40 and 43 in human left atrium in atrial fibrillation of different aetiologies. *Heart* 91 (2005) 166-170
137. Wong PC, Hart SD, Duncia JV, Timmermans PB: Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Studies with DuP 753 and EXP3174 in dogs. *Eur J Pharmacol* 202 (1991) 323-330
138. Yao JA, Hussain W, Patel P, Peters NS, Boyden PA, Wit AL: Remodeling of gap junctional channel function in epicardial border zone of healing canine infarcts. *Circ Res* 92 (2003) 437-443

8 Thesen

1. Interzelluläre Kommunikation stellt die Basis für die intakte Funktion von Geweben und Organen. Neben der zellulären Kommunikation, die durch Freisetzung von chemischen Transmittern, Hormonen und Mediatoren realisiert wird, spielt die direkte elektrische und chemische Kopplung von Zellen via Gap Junctions eine wichtige Rolle für die Organisation von Geweben und die Formung eines elektrischen Synzythiums.
2. Gap Junctions sind polymere Strukturen, welche aus 12 Proteinen bestehen, die Connexine genannt werden. Die Bezeichnung der Connexine korrespondiert mit deren Molekulargewicht. Sechs Connexinmoleküle bilden einen Hemikanal, auch Connexon genannt. Durch Andocken zweier Hemikanäle benachbarter Zellen entsteht ein funktioneller Kanal.
3. Patienten mit kardialen Erkrankungen, insbesondere nach Myokardinfarkt, sind von Arrhythmien bedroht. Die Alteration von Gap Junctions geht mit der Entstehung von Arrhythmien einher.
4. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System mit seinem Effektor-Peptid Angiotensin II repräsentiert eines der phylogenetisch ältesten Hormonsysteme. Angiotensin II ist einer der wichtigsten Mediatoren des Körpers für Blutdruckregulation, Aldosteronausschüttung und Natriumreabsorption. Jedoch spielt Angiotensin II auch im Hinblick auf die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen eine entscheidende Rolle.
5. In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Beeinflussung kardialer Gap Junctions durch Angiotensin II untersucht. Dabei wurde der Frage nachgegangen, in wie weit die kardialen Connexine 40, 43 und 45 in einem Zellkulturmodell neonataler Rattenkardiomyozyten beeinflussbar sind, ob und welche Rolle Angiotensin II dabei einnimmt. Weiterhin wurde die Signaltransduktionskaskade untersucht.
6. Für die Experimente wurden wurden Zellkulturen aus neonatalen Rattenkardiomyozyten gewählt, da dieses Modell als gut vergleichbarer Literaturstandard gilt. Vor der Inkubation über 24 Stunden mit Angiotensin II und

den verschiedenen Pharmaka wurden die Herzmuskelzellen über 7 Tage kultiviert. Nach Zelllysis und Gesamtproteinbestimmung wurden die Proteine elektrophoretisch mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western-Blots dem immunologischen Nachweis der einzelnen Connexine zugänglich gemacht. Zusätzlich wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder angefertigt. Die funktionellen Aspekte der durchgeführten Experimente wurden mit Hilfe des Double Cell Patch Clamp Verfahrens beurteilt.

7. Es konnte gezeigt werden, dass in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten die Connexine 40 und 43 in relevanten Mengen exprimiert werden. Connexin 45 wurde nur in Spuren nachgewiesen.
8. Nach Inkubation mit Angiotensin II zeigte sich eine signifikante Steigerung des Gehaltes an Connexin 43, Connexin 40 war nicht durch Angiotensin II beeinflussbar. Ebenfalls ersichtlich war ein Effekt auf die Phosphorylierung: Neben der erhöhten Proteinexpression durch Angiotensin II war eine Zunahme der phosphorylierten Isoform von Connexin 43 ersichtlich.
9. Die beschriebenen Effekte sind AT_1 -Rezeptor vermittelt. Alle durch Angiotensin II ausgelösten Veränderungen waren durch den AT_1 -Rezeptor-Antagonisten Losartan blockierbar. Die Endothelin-Rezeptorblockade blieb ohne Auswirkungen, das bedeutet, eine durch Angiotensin II induzierte Endothelinproduktion ist nicht für die vermehrte Expression und Phosphorylierung von Connexin 43 verantwortlich.
10. Die intrazelluläre Signaltransduktion beinhaltet MAP-Kinasen als second messenger. Sowohl die Inhibierung von MEK als auch der p38 Proteinkinase durch die entsprechenden Blocker führte zum Rückgang der Angiotensin II vermittelten Effekte. Somit sind beide Wege an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt.
11. Die funktionelle Relevanz zeigte sich im Double Cell Patch Clamp Verfahren. Nach 24-stündiger Stimulation der Zellen mit Angiotensin II konnte ein

signifikant erhöhter Gap Junction Leitwert gemessen werden, was einer erhöhten Leitfähigkeit und damit Kopplung der Zellen entspricht.

12. Da in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und bei der Entstehung kardialer Arrhythmien neben Angiotensin II auch andere Mediatoren wie Katecholamine, Endothelin, Tumornekrosefaktor alpha und andere wirksam werden, und alle Mediatoren in vivo weit länger als 24 Stunden auf das Gewebe einwirken, sind weitere Studien notwendig, um positive wie negative Beeinflussungen der Mediatoren gegenseitig sowie Langzeitwirkungen abzuschätzen.
13. Obwohl eine endgültige pathophysiologische Interpretation der Ergebnisse der vorgelegten Arbeit noch nicht möglich ist, öffnet die Erforschung und die Möglichkeit der pharmakologischen Beeinflussung von Gap Junctions doch neue Perspektiven im Hinblick auf die Behandlung verschiedenster Erkrankungen, insbesondere auch kardialer Arrhythmien. Der positive Einfluss von ACE-Hemmern auf Mortalität und kardiales Remodeling im Rahmen der Herzinsuffizienz ist bekannt. Weiterführende Erforschung kardialer Gap Junctions stellt möglicherweise in Zukunft die Mittel bereit, über eine gezielte pharmakologische Beeinflussung der Öffnung oder Schließung der Kanäle eine wirksame Behandlung von Herzrhythmusstörungen durchzuführen.

Lebenslauf

- 28.09.1977 in Hohenmölsen geboren
- 01.09.1984 Einschulung in die 3. Polytechnische Oberschule „Paul Wegmann“
in Zeitz
- 01.09.1990 - Besuch des Gymnasiums „Geschwister Scholl“ in Zeitz
- 21.06.1996
- 21.06.1996 Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife (Note 1,5)
- 01.09.1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg
- 07.09.1998 Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung („befriedigend“)
- 01.09.1998 Aufnahme der Arbeit an der Promotion
- 31.08.1999 Bestehen des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung („gut“)
- 04.09.2001 Bestehen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung („gut“)
- 27.11.2002 Bestehen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
(„befriedigend“)
- Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung „gut“
- 01.01.2003 Aufnahme der Tätigkeit als „Ärztin im Praktikum“ der
Medizinischen Klinik des Städtischen Krankenhaus Dresden-
Neustadt
- 19.06.2004 Eheschließung mit Silvio Noack, seither Führung des gemeinsamen
Familiennamens Noack
- 01.07.2004 Erteilung der Approbation als Ärztin
- 02.03.2006 Geburt der Tochter Louise

Selbstständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Hinweis auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit

Ergebnisse dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

Polontchouk L, Ebelt B, Jackels M, Dhein S: Chronic effects of endothelin 1 and angiotensin II on gap junctions and intercellular communication in cardiac cells. *Faseb J* 16 (2002) 87-89

Polontchouk L, Haefliger JA, Ebelt B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U, Kuhn-Regnier F, De Vivie ER, Dhein S: Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol* 38 (2001) 883-891

Danksagung

Ich möchte all denen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stefan Dhein für die Übertragung des Promotionsthemas, zahllose Gespräche und Ratschläge und nicht zuletzt für die freundlich-familiäre Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dhein, insbesondere Frau Dr. Lioudmila Polontchouk, möchte ich für die entgegengebrachte Unterstützung danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Geduld und Unterstützung bedanken, dabei insbesondere bei meinem Bruder, Dr. med. Henning Ebelt.