

Diplomarbeit

**Apoptose in Herzmuskelzellen mit einer Ryanodin-
Rezeptor-Mutation**
**Apoptosis in cardiac myocytes with a
ryanodine receptor mutation**

eingereicht von

Georg Arnstein

Mat. Nr.: 0533653

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Abteilung für Kardiologie

unter der Anleitung von

Prof. Dr. Jens Kockskämper

Ort, Datum: Graz, 27.09.2011

(Unterschrift)



Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 27.09.2011

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a stylized, somewhat abstract shape.

Unterschrift

Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bedanken bei:

Meinen Eltern,

denen ich alles verdanke und ohne die weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wären...

Prof. Dr. Jens Kockskämper

für die Erstkorrektur, die guten Ratschläge vor der Präsentation meiner Ergebnisse und die Möglichkeit, meine Abschlussarbeit in einem faszinierenden Teilgebiet der Medizin zu schreiben.

PD. Dr. Simon Sedej

für die Zweitkorrektur, die wirklich ausgezeichnete Betreuung, die Hilfe bei der Präsentation meiner Daten und die Geduld, die er mit mir hatte.

Zusammenfassung

Mutationen des Ryanodin-Rezeptors (RyR2) führen zu einem spontanen Ca^{2+} -Leck aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), welches in ähnlicher Form auch bei einer erworbenen Herzinsuffizienz beobachtet wird.

Diese Arbeit befasste sich mit der Möglichkeit einer beschleunigten Herzinsuffizienz-Entwicklung durch Apoptose vor dem Hintergrund spontaner Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR durch mutierte RyR2.

Aus Mausherzen mit einer humanen RyR2-Mutation ($\text{RyR2}^{\text{R4496C}+/}$) wurden nach einer durch Druckbelastung induzierten Hypertrophie (transverse Aortenkonstriktion, TAC), bzw. nach einer Schein-Operation (Sham) mittels eines Kryotoms Herzschnitte hergestellt. Diese Gefrierschnitte wurden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt. Die Kern-DNA der Herzmuskelzellen wurde mit DAPI gefärbt, während DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche als Indiz für Apoptose mit einem vom Rhodamin abgeleiteten Fluoreszenzfarbstoff (Tetra-Methyl-Rhodamin) markiert wurden (engl. terminal deoxynucleotidyl transferase-(TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL Assay). Anschließend wurden von jedem Herzschnitt zwölf Bereiche des linksventrikulären Myokards analysiert.

Mit einem Laserkonfokalmikroskop wurden beide Färbungen kenntlich gemacht und als digitale Bilder gespeichert. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte entsprechend eigens festgelegter Analysekriterien sowohl optisch als auch mit dem Bildanalyseprogramm ImageJ.

Einschlusskriterien für die Zählung Rhodamin-positiver Kerne waren eine Mindestgröße von $11 \mu\text{m}^2$, ein Rundheitsgrad der zu untersuchenden Objekte von mind. 0,4 (wobei 1 ein perfekter Kreis sei), eine Signalintensität von mindestens 50 von 256 (8 bit-Aufnahmen) und eine absolute Signalkongruenz der DAPI- und Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoffe. Nach Auszählung der Häufigkeiten Rhodamin-positiver Kerne in den jeweiligen Versuchsgruppen (Wildtyp- und heterozygote $\text{RyR2}^{\text{R4496C}+/}$ -Mäuse) mit und ohne TAC wurden die Mittelwerte statistisch ausgewertet.

Die Unterschiede der Mittelwerte der einzelnen Gruppen waren nicht statistisch signifikant. Somit kann die Vermutung, dass eine durch ein SR- Ca^{2+} -Leck bedingte Apoptose sechs Wochen nach Induktion einer Druckbelastung die Progression einer Herzinsuffizienz beschleunigt, nicht gestützt werden. Die Apoptose spielt also in den späten Formen der Herzinsuffizienz keine tragende Rolle, so dass andere Prozesse wie die Nekrose oder Autophagie im Vordergrund stehen können. Inwieweit die Apoptose das

Fortschreiten der frühen Formen einer Herzinsuffizienz bedingt, bleibt zu diesem Zeitpunkt Gegenstand weiterer Forschung.

Abstract

Cardiac ryanodine receptor (RyR2) dysfunction due to mutations in the RyR2 causes spontaneous Ca^{2+} leak from the sarcoplasmic reticulum (SR), similar to the SR- Ca^{2+} leak observed in heart failure.

The aim of this work was to elucidate whether increased spontaneous SR- Ca^{2+} leak through mutated RyR2 due to pressure-induced overload induces apoptosis and thus, accelerates the progression of heart failure.

Murine hearts harbouring a human RyR2 mutation (RyR2^{R4496C+/-}) were processed to slices after Sham-operation or after the induction of hypertrophy through transverse aortic constriction (TAC). The frozen slices were stained using fluorescent dyes. The DNA was stained with DAPI, while the DNA strand breaks (apoptotic markers) with tetra-methyl-rhodamine by means of TUNEL Assay. Twelve regions of interest from the left ventricular myocardium were randomly selected and analyzed in each slice.

The stained slices were visualized by a laser confocal microscope, analyzed using custom-made algorithm as part of the ImageJ program and evaluated by eye.

Rhodamine-positive nuclei were considered apoptotic when the following criteria were matched:

- Object size of at least $11 \mu\text{m}^2$
- Roundness of the object of at least 0.4 (1 is a perfect circle)
- Signal intensity at least 50 of 256 (8 bit-images)
- Signal congruence of DAPI and rhodamine

The statistical analysis showed no significant differences between the groups. The differences between the groups were not large enough to exclude the possibility of a random allocation of the rhodamine-positive nuclei.

The hypothesis that SR- Ca^{2+} leak-induced apoptosis accelerates the progression of late stage heart failure cannot be supported by this work. Other mechanisms such as necrosis or autophagy might be involved. However, whether apoptosis is involved in the progression of early stage heart failure remains the matter of further investigation.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract	vi
Inhaltsverzeichnis	vii
Glossar und Abkürzungen	ix
Abbildungsverzeichnis	xii
Tabellenverzeichnis	xv
1. Einleitung	1
1.1 Physiologie der Herzmuskelzelle	1
1.1.1 Kardiomyozyten und Kalzium	1
1.1.2 Zelluläre Kalziumkanäle	1
1.1.3 Ryanodin-Rezeptoren (RyR)	2
1.1.4 Elektromechanische Kopplung	4
1.2 Pathophysiologie der Herzmuskelzelle	5
1.2.1 Hypertrophie und Druckbelastung	5
1.2.2 Herzinsuffizienz	6
1.2.3 Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie (CPVT)	9
1.3 Zelltod	11
1.3.1 Apoptose	12
1.3.2 Nekrose	19
1.3.3 Autophagie	20
1.3.4 Andere Formen des Zelltodes	21
1.3.5 Herzinsuffizienz und Zelltod	22
1.4 Arbeitsgrundlage	23
1.4.1 RyR2 ^{R4496C +/-} -knock-in-Mausmodell	23
1.4.2 Transverse Aortenkonstriktion (TAC) in RyR2 ^{R4496C +/-} -Mäusen	24
1.5 Hypothese	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Geräte, Materialien und Reagenzien	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Transverse Aortenkonstriktion (TAC) und Sham-Operation	27
2.2.2 Schnittvorbereitung	28
2.2.3 TUNEL-Färbung und DAPI	28
2.2.4 Detektion und Analyse	31
2.2.5 Statistische Methoden	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Gravimetrie	35
3.1.1 Normierung von Herz und Lungengewicht	36
3.1.2 Einfluss des Eingriffs auf die Gewichts- und Längenvariablen	37
3.1.3 Einfluss des Genotyps auf die Gewichts- und Längenvariablen	39
3.2 Häufigkeit von DNA-Strangbrüchen in den Gruppen	40
3.2.1 Konfokale Aufnahmen	40
3.2.2 Statistische Auswertung der Häufigkeit von DNA-Strangbrüchen	42
4. Diskussion	44
4.1 Gravimetrie	44
4.2 Apoptoserate	45
4.3 Potentielle Einflussfaktoren auf die Resultate	45
4.3.1 Beurteilung des TUNEL-Verfahrens	46
4.3.2 Beurteilung des Versuchsaufbaus	47
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick	49

5.	Literaturverzeichnis.....	51
6.	Anhang	59
7.	Lebenslauf.....	63

Glossar und Abkürzungen

AIF	Apoptosis Inducing Factor
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
ARC	Apoptosis repressor with caspase recruitment domain
ASIC	Acid-sensing ion channel
AT	Adenin-Thymin
ATP	Adenosintriphosphat
AVK	Arterielle Verschlusserkrankung
BAD	Bcl-2-antagonist of cell death protein
BAX	Bcl-2-associated X protein
BECN1	Beclin-1
Bid	BH3-interacting domain death agonist protein
$[Ca^{2+}]_e$	Extrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration
CaMKII	Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CHOP	C/EBP homologous protein
CICR	Calcium-induced calcium release
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
CPVT	Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie
DAD	Delayed afterdepolarization
DAPI	4, '6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
df	degrees of freedom
Diablo	Direct IAP binding protein with low pI
DNA	Desoxyribonucleic acid
DR	Death receptor
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
EAD	Early afterdepolarization
EndoG	Endonuclease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FADD	Fas-associated death domain
Fas	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6

GADD	Growth arrest DNA damage protein
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HMV	Herzminutenvolumen
HSP	Heat shock protein
HtrA2	High temperature requirement protein A2
IP3R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
$[K^+]_i$	Intrazelluläre K^+ -Ionenkonzentration
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
LTCC	L-type calcium channel
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
mCU	Mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter
mNCX	Mitochondrial sodium-calcium exchanger
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
MPT	Mitochondrial permeability transition
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
NCX	Na^+/Ca^{2+} -Austauscher
NGF-R	Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor
NYHA	New York Heart Association
PARP	Poly ADP-ribose Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PLN	Phospholamban
PMCA	Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonucleic acid
ROI	Region of interest
ROS	Reactive oxygen species
RyR2	Ryanodin-Rezeptor Typ2
SD	Standard deviation

SE	Standard error
SERCA	Sarko-/Endoplasmatisches Retikulum-Ca ²⁺ -ATPase
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SOICR	Store overload-induced calcium release
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAC	Transverse Aortenkonstriktion
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TTCC	T-type calcium channel
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP nick end labeling
UPR	Unfolded protein response
VDCC	Voltage-dependent calcium channel
WT	Wildtyp
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Aufbau und Regulation der Aktivität des RyR2. Der aus vier Untereinheiten bestehende Rezeptor wird nach Ca^{2+} -Einstrom durch LTCC aktiviert und durch Junctin, Triadin und weitere Proteine in seiner Funktionalität reguliert. PMCA, NCX, SERCA und die Mitochondrien tragen zum Erhalt der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase bei. Abgeändert nach Vorlage von (Kushnir, Betzenhauser & Marks 2010).....3
- Abbildung 2: Molekulare Vorgänge bei der Membrandepolarisation. Im Rahmen einer Membrandepolarisation strömt Ca^{2+} durch LTCC in die Zelle (Aktionspotential, AP). Sarkoplasmatische RyR2 werden aktiviert, was zu einer Entleerung der SR- Ca^{2+} -Speicher ins Zytosol führt (CICR) und die Kontraktion der Myozyten ermöglicht. Anschließend senken NCX, PMCA und SERCA die $[\text{Ca}^{2+}]_i$, während die Na^+/K^+ -ATPase den Ausstrom von Na^+ aus dem Zytosol vermittelt und die intrazelluläre K^+ -Ionenkonzentration $[\text{K}^+]_i$ erhöht. Abgeändert nach Vorlage von (Bers 2002).5
- Abbildung 3: Mögliche Ursache von DAD: Durch die, durch ein Ca^{2+} -Leck im SR bedingte, erhöhte NCX-Aktivität wird vermehrt Na^+ in die Zelle transportiert, was zu Depolarisationen der Zellmembran und zu Arrhythmien führen kann. Abgeändert nach Vorlage von (Kockskämper & Heinzel n.d.).....9
- Abbildung 4: Beispiele für Mutationen, die Auswirkung auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR haben können und deren Lokalisationen. Abgeändert nach Vorlage von (Kushnir, Betzenhauser & Marks 2010).10
- Abbildung 5: Die klassischen Formen des Zelltodes, in Abhängigkeit von der Art der Zellschädigung: Apoptose (links), Nekrose (rechts) und der Autophagie-assoziierte Zelltod (Mitte). Abgeändert nach Vorlage von (Hotchkiss et al. 2009).....11
- Abbildung 6: Schematische Darstellung der Apoptosekaskade und der möglichen Aktivierungsformen. Extrinsischer Aktivierungsweg über Ligandenbindung am Todesrezeptor. Intrinsischer Aktivierungsweg über „BH3-only Proteine“ oder SR-bedingte Ca^{2+} -Ausschüttung. Abgeändert nach Vorlage von (Lee & Gustafsson 2009).14
- Abbildung 7: Die Rolle von Ca^{2+} in der Aktivierung der Apoptosekaskade: Die Entleerung von SR- Ca^{2+} -Speichern führt über einen regionalen Ca^{2+} -Anstieg zum einen zu einer μ -Kalpain-Aktivierung und zum anderen zu einer Überladung der Mitochondrien mit Kalzium. Beides bewirkt eine Freisetzung von Zytochrom C aus dem

Membranzwischenraum der Mitochondrien. Die SR-Speicherentleerung kann durch eine Ca^{2+} -Überladung oder durch ein Ca^{2+} -Leck, beispielsweise durch den RyR2, verursacht werden. Abgeändert nach Vorlage von (Chen et al. 2005).	17
Abbildung 8: Darstellung der Aorta (Latexinjektion) nach TAC- (links) und Sham-Operation (rechts). Nach dem Entfernen der Ligatur kann deutlich die Konstriktion der Aorta zwischen dem Truncus brachiocephalicus und der linken Arteria carotis communis gesehen werden (Pfeilspitze). Abgeändert nach Vorlage von (Hu et al. 2003).....	28
Abbildung 9: Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen. Zur Datensicherung wurden stets die Originalaufnahme (links) mit dem dazugehörigen Abbild der Kernumrisse (Mitte) gespeichert. Die Kernumrisse wurden inklusive ihrer Fläche und ihres Rundheitsgrads (rechts) archiviert.	33
Abbildung 10: Auswahl der TUNEL-positiven Kerne. Markierungen einzelner Kerne erleichtern die vergleichende Analyse der Aufnahmen einer Region. Die linke Rhodamin-Fluoreszenz (in den Aufnahmen rot umrahmt) wurde aufgrund von mangelnder Signalkongruenz ausgeschlossen (fehlendes DAPI-Signal in der linken Aufnahme). Der rechte Kern konnte aufgrund der absoluten Deckungsgleichheit der DAPI- und Rhodamin-Signale als TUNEL-positiv gewertet werden (vergrößerte Darstellung im rechten Bild). Durch Setzen einer unteren Analyseschwelle (Wegschneiden von Signalintensitäten unterhalb eines bestimmten Grenzwertes) wurden Artefakte exkludiert und nicht in die Auswertung einbezogen (schwach fluoreszierende Kerne in der mittleren Aufnahme).	34
Abbildung 11: Mittelwerte mit Standardfehlern (links) und Häufigkeitsverteilung (rechts) der Variablen Herzgewicht/Tibialänge (oben) sowie Lungengewicht/Tibialänge (unten) der jeweiligen Gruppen. Die jeweils linke Abbildung zeigt die Mittelwerte mit Standardfehlern (+/- SE) der einzelnen Gruppen. Rechts sind die Häufigkeitsverteilungen in Form einer Box-Plot-Analyse dargestellt. Der Strich in der jeweiligen Box stellt den Median, die Box-Grenzen das 25–75%-Perzentil und die Querbalken oben und unten die Extremwerte der Gruppen dar.	38
Abbildung 12: Konfokale Aufnahmen der Kern-DNA der verschiedenen Gruppen und der jeweiligen DNA-Brüche: DAPI-Färbung der Kern-DNA (links), Rhodamin-Färbungen von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Mitte) und die Überlagerung beider Aufnahmen zur Prüfung der Signalkongruenz (rechts). Während in den WT-	

Gruppen selten Rhodamin-positive Kerne gefunden werden, imponieren vor allem in der Gruppe RyR2^{R4496C+/-}-TAC vermehrte Rhodamin-Signale.41

Abbildung 13: Mittelwerte mit Standardfehlern (links) und Häufigkeitsverteilung der Rhodamin-positiven Kerne pro 100.000 DAPI-positiver Kerne (rechts), differenziert nach Genotyp und Eingriff: Der Anstieg der Mittelwerte der Rhodamin-positiven Kerne in den RyR2^{R4496C+/-}-Gruppen (links) wird durch die hohen Standardfehler der Mittelwerte (+/- SE) (links) und in der Darstellung der Häufigkeitsverteilungen (rechts) durch einige hochabweichende Werte in den heterozygoten Gruppen erklärt.43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einstellungen im LSM 510 Meta 3.2: Die nachfolgend aufgelisteten Einstellungen wurden für alle Aufnahmen beibehalten.	32
Tabelle 2: Körpergewicht, Herzgewicht, Lungengewicht, Lebergewicht und Tibialänge der WT- und RyR2 ^{R4496C+/-} -Mäuse nach TAC- oder Sham-Operation. Deskriptive Statistik (Mittelwert, Standardabweichung, und Standardfehler des Mittelwerts) sowie Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung ($P < 0,05$). Mit einem $P > 0,05$ (rot) ist von einer Normalverteilung der Daten in der jeweiligen Gruppe auszugehen.	35
Tabelle 3: Verschiedene Gewichts- und Längenverhältnisse der WT- und RyR2 ^{R4496C+/-} -Mäuse nach TAC- oder Sham-Operation. Deskriptive Statistik (Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts) sowie Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung ($P < 0,05$). Mit einem $P > 0,05$ (rot) ist von einer Normalverteilung der Daten der jeweiligen Variable auszugehen.	36
Tabelle 4: Einfluss der Art des Eingriffs (TAC oder Sham) auf die Organgewichte sowie die Gewichts- und Längenvariablen innerhalb der WT- und RyR2 ^{R4496C+/-} -Mäuse. Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der durch die Gruppenvariable Eingriff bedingten, Unterschiede ($P < 0,05$). Mit einem Testergebnis von $P < 0,05$ ist in Abhängigkeit vom Eingriff von signifikanten Unterschieden zwischen den Variablen auszugehen.	37
Tabelle 5: Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen den Organgewichten in Abhängigkeit von der Gruppenvariable Genotyp ($P < 0,05$): Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen WT und RyR2 ^{R4496C+/-} nachgewiesen werden.	39
Tabelle 6: Deskriptive Statistik und Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung des Anteils an Rhodamin-positiven Kernen. Mit $P < 0,05$ in allen Gruppen ist von einer fehlenden Normalverteilung der Daten auszugehen.	42
Tabelle 7: Kruskal-Wallis-H-Test (ANOVA on ranks): Mit einem $P = 0,984$ liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen WT-Sham, WT-TAC, RyR2 ^{R4496C+/-} -Sham und RyR2 ^{R4496C+/-} -TAC vor.	43
Tabelle 8: Einflussfaktoren und deren potentiell verfälschende Auswirkung auf die Messergebnisse. Abgeändert nach Vorlage von (Krause 2007).	46
Tabelle 9: Deskriptive Statistik der Gruppenvariable Genotyp. Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts sowie Minimum, Maximum und die Perzentile der Daten.	59

Tabelle 10: Mittlerer Rang und Rangsummen der Gruppenvariable Genotyp.....	59
Tabelle 11: Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen der Gruppenvariable Genotyp ($P < 0,05$): Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen WT und RyR2 ^{R4496C+/-} nachgewiesen werden.	60
Tabelle 12: Deskriptive Statistik der Gruppenvariable Eingriff. Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts sowie Minimum, Maximum und die Perzentile der Daten.	60
Tabelle 13: Mittlerer Rang und Rangsumme der Variable Eingriff.	61
Tabelle 14: Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der Unterschiede zwischen der Gruppenvariable Eingriff ($P < 0,05$). Bei einem Testergebnis von $P < 0,05$ ist von signifikanten Unterschieden (rot) zwischen den Variablen in Abhängigkeit vom vorgenommenen Eingriff (TAC oder Sham) auszugehen.	62
Tabelle 15: Kruskal-Wallis-H-Test: Unterschiede zwischen den 4 Gruppen. Die Normierung von Herz- und Lungengewicht auf das Körpergewicht zeigt mit $P = 0,082$, bzw. $P = 0,088$ eine Tendenz zur Signifikanz ($P < 0,1$).	62

1. Einleitung

In den nachfolgenden Kapiteln werden die Besonderheiten der Kalzium-Homöostase von Herzmuskelzellen und der mögliche Einfluss einer Dysregulation auf vermehrt auftretenden Zelltod im versagenden Herzen beschrieben.

1.1 Physiologie der Herzmuskelzelle

1.1.1 Kardiomyozyten und Kalzium

Die zelluläre Kalziumkonzentration ist für viele physiologische Prozesse und somit für das Überleben und die Funktionsfähigkeit einer Zelle von großer Bedeutung. Bei Muskelzellen hat sie unter anderem maßgeblichen Einfluss auf die kontraktile Eigenschaften. Als „second messenger“ nimmt Ca^{2+} Einfluss auf die Synthese von Proteinen und kann über Leben und Tod einer Zelle entscheiden (Hajnoczky et al. 2000). Weiter ist Ca^{2+} an der Membrandepolarisation im Rahmen eines Aktionspotentials in Kardiomyozyten beteiligt. Dies hat zur Folge, dass die Regulation des Ca^{2+} -Haushalts sowohl für die einzelnen Zellen als auch für die Funktionsfähigkeit des gesamten Organs (rhythmischer Herzschlag) unerlässlich ist. Die extrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ist mit $\sim 1,2$ mM ca. 10.000-mal höher als die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Zytosol einer ruhenden Zelle (zirka 100 nM). Die luminaire Konzentration des Ca^{2+} im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) erreicht 0,5–1 mM, während der Ca^{2+} -Gehalt in den Mitochondrien und dem Zellkern weitgehend dem des Zytosols gleicht (Roy & Hajnoczky 2008). Bei Depolarisation der Zellmembran steigt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zirka um den Faktor 10 an.

1.1.2 Zelluläre Kalziumkanäle

Als Kalziumkanäle werden Ionenkanäle bezeichnet, die mehr oder weniger permeabel für Ca^{2+} sind. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen spannungsabhängigen (engl. voltage-dependent calcium channel, VDCC) und Ligand-regulierten Kanälen. Ein wesentlicher Anteil des Kalziumeinstroms in die Zelle erfolgt über spannungsabhängige Kalziumkanäle (engl. L-type calcium channel, LTCC und T-type calcium channel, TTCC) (Fatt & Ginsborg 1958).

Die Öffnung der SR-ständigen Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren (IP3R) und Ryanodin-Rezeptoren (RyR) führt zu einer Entleerung der Ca^{2+} -Speicher des SR und so zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Der Ausstrom aus dem Zytosol erfolgt hauptsächlich durch die Plasmamembran- Ca^{2+} -Pumpen (engl. plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, PMCA), den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (engl. sodium-calcium exchanger, NCX) und die sarko-/endoplasmatische Retikulum- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) (Hajnoczky, Davies & Madesh 2003).

Da sich die vorliegende Arbeit mit der Apoptose als einer möglichen Folge einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase durch mutierte RyR2 beschäftigt, wird die physiologische Bedeutung und Funktionsweise dieser Rezeptoren im Folgenden weiter ausgeführt.

1.1.3 Ryanodin-Rezeptoren (RyR)

RyR setzen als intrazelluläre Kalziumkanäle Ca^{2+} aus dem SR frei. Generell wird zwischen drei Typen unterschieden. Diese, in ihrer Struktur zu 65% identischen, Proteine (RyR1, RyR2 und RyR3) kommen in der glatten Muskulatur von Gefäßen vor. RyR1 und RyR2 werden hauptsächlich in Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert. RyR1 ist darüber hinaus in Leukozyten und in Purkinje-Zellen des Zerebellums zu finden, RyR2 in den Langerhans'schen Zellen des Pankreas und in Zellen des Gyrus dentatus des Hippocampus. Den RyR3 findet man in geringen Mengen in der Skelettmuskulatur, in Leukozyten und ebenfalls in bestimmten hippocampalen Zellen (Kushnir, Betzenhauser & Marks 2010).

Alle drei RyR bestehen aus jeweils vier Untereinheiten zu je ~565 kDa (siehe Abbildung 1). Als Transmembranprotein ragen 4/5 des Rezeptors in das Zytosol und 1/5 in das SR-Lumen. Die Rezeptoren sind in Gruppen von bis zu 100 Stück auf einer Fläche von ca. 200 nm^2 SR-Membran angeordnet. Diese Gruppen liegen in enger Beziehung zu sarkolemmalen LTCC (10–25 Stück auf 100 RyR2) und bilden zusammen mit diesen eine komplexe Funktionseinheit, die als Couplon bezeichnet wird (Bers 2002).

Aktiviert werden RyR2 hauptsächlich durch Ca^{2+} , wobei ab bestimmten, erhöhten Konzentrationen ein inhibitorischer Effekt auftritt. Sowohl ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als auch ein erhöhter SR- Ca^{2+} -Gehalt erhöhen die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2. Die Ca^{2+} -Konzentration im SR kann durch einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom, einen erniedrigten Ca^{2+} -Ausstrom oder eine vermehrte SR-Aufnahme, wie beispielsweise nach β_1 -adrenerger Stimulation (siehe Kapitel 1.2.2 Herzinsuffizienz), positiv beeinflusst werden (Bers 2002). Junctin, Triadin und Calsequestrin bilden einen Komplex mit dem C-terminalen Ende der luminalen Seite des RyR2. Hierbei reguliert Calsequestrin die luminalen Ca^{2+} -Konzentration

in direkter Umgebung des RyR2. Triadin koordiniert das Zusammenspiel der RyR2 mit den LTCC, Junctin hingegen stabilisiert den RyR2 und kann regulatorischen Einfluss auf Calsequestrin nehmen (Kushnir, Betzenhauser & Marks 2010). Die Proteinkinase A (PKA) und die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) bewirken über eine Phosphorylierung der RyR2 eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der Rezeptoren und damit einen erhöhten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR in das Zytosol (Zalk, Lehnart & Marks 2007).

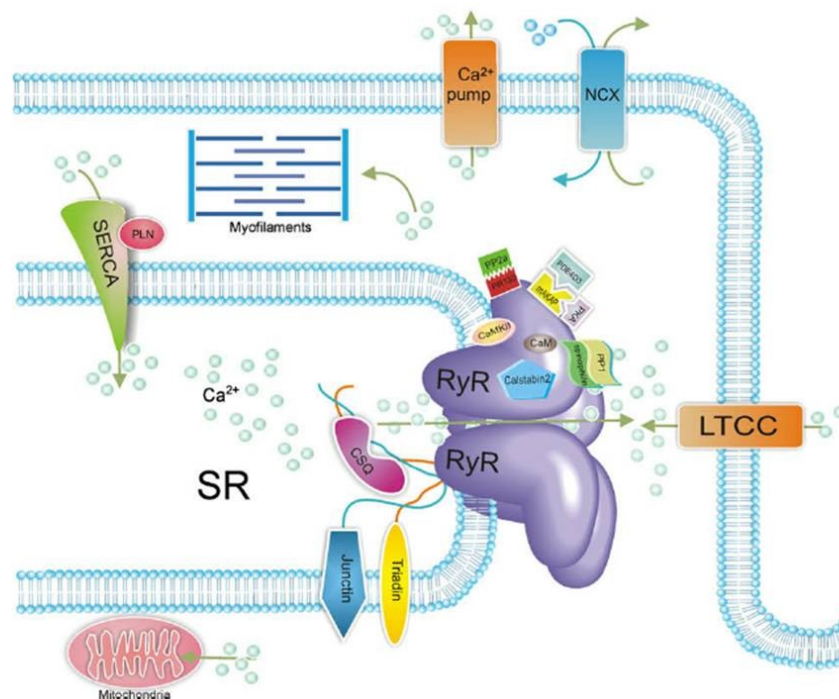


Abbildung 1: Aufbau und Regulation der Aktivität des RyR2. Der aus vier Untereinheiten bestehende Rezeptor wird nach Ca^{2+} -Einstrom durch LTCC aktiviert und durch Junctin, Triadin und weitere Proteine in seiner Funktionalität reguliert. PMCA, NCX, SERCA und die Mitochondrien tragen zum Erhalt der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase bei. Abgeändert nach Vorlage von (Kushnir, Betzenhauser & Marks 2010).

Die Inaktivierung der RyR2 erfolgt über das Herabsetzen der Öffnungswahrscheinlichkeit durch die Bindung von Ca^{2+} an die Rezeptoren bei Erreichen einer bestimmten Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol. Magnesium und Calmodulin inaktivieren die RyR2.

1.1.4 Elektromechanische Kopplung

Die Theorie der elektromechanischen Kopplung erklärt die zellulären Abläufe in einer Herzmuskelzelle vom Eintreffen eines Aktionspotentials über die Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung bis hin zur Zellkontraktion.

Aktionspotential

Die elektrische Erregung von Kardiomyozyten unterscheidet sich von der Membrandepolarisation anderer elektrisch erregbarer Zellen im Wesentlichen durch die Ca^{2+} -bedingte Plateauphase.

Während der Diastole wird das Membranpotential des Arbeitsmyokards (~ -80 mV) durch eine hohe K^+ -Leitfähigkeit aufrecht erhalten. Eine durch Nachbarzellen weitergeleitete Depolarisation führt zur Öffnung von membranständigen, spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen. Der Einstrom von Na^+ -Ionen hat eine Depolarisation der Zellmembran auf bis zu $+30$ mV zur Folge. Diese Spannungsänderung bewirkt die Öffnung von LTCC (Plateauphase).

Beim Erreichen einer bestimmten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration werden die LTCC geschlossen. Durch die Depolarisation werden „delayed rectifier“ K^+ -Kanäle geöffnet, welche die Repolarisation einleiten.

Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung (CICR)

Die Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem SR kann durch die Theorie der Kalzium-induzierten Kalziumfreisetzung (engl. calcium-induced calcium release, CICR) erklärt werden (Fabiato 1983).

Auf ein Aktionspotential hin öffnen sich membranständige VDCC. Diese LTCC sind zusammen mit benachbarten RyR2 zu einem Couplon zusammengelagert. Nach Öffnung der LTCC und dem Einstrom von Ca^{2+} in das Zytosol binden Ca^{2+} -Ionen an einen RyR2, erhöhen so dessen Öffnungswahrscheinlichkeit und initiieren einen lokalen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR (siehe Abbildung 2). Dieser führt durch die enge räumliche Lage zur Aktivierung des gesamten Couplons (Bers 2002).

Der weitere Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Gehalts bewirkt zum einen eine Inaktivierung der LTCC und zum anderen eine Bindung von Ca^{2+} an Troponin C, was in weiterer Folge die Zellkontraktion ermöglicht (Bers 2002).

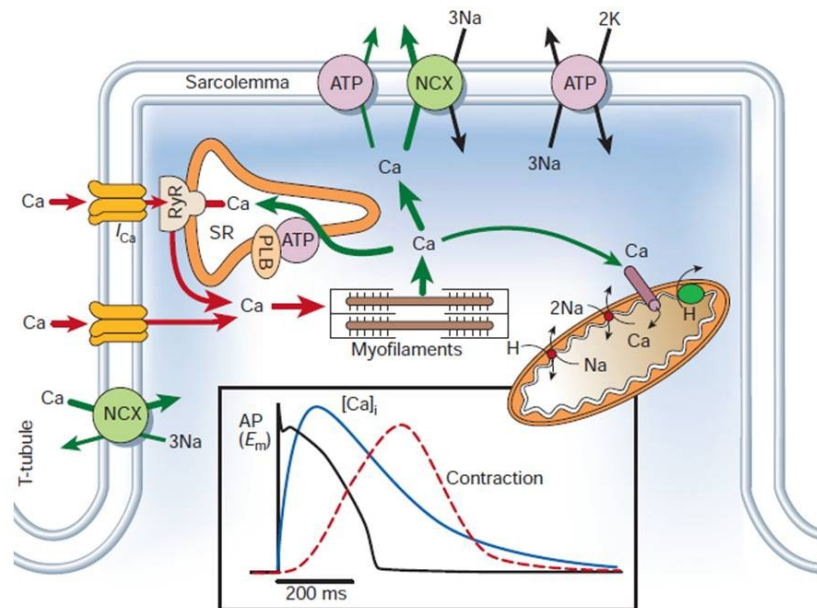


Abbildung 2: Molekulare Vorgänge bei der Membrandepolarisation. Im Rahmen einer Membrandepolarisation strömt Ca^{2+} durch LTCC in die Zelle (Aktionspotential, AP). Sarkoplasmatische RyR2 werden aktiviert, was zu einer Entleerung der SR- Ca^{2+} -Speicher ins Zytosol führt (CICR) und die Kontraktion der Myozyten ermöglicht. Anschließend senken NCX, PMCA und SERCA die $[\text{Ca}^{2+}]_i$, während die Na^+/K^+ -ATPase den Ausstrom von Na^+ aus dem Zytosol vermittelt und die intrazelluläre K^+ -Ionenkonzentration $[\text{K}^+]_i$ erhöht. Abgeändert nach Vorlage von (Bers 2002).

1.2 Pathophysiologie der Herzmuskelzelle

Vor dem Hintergrund der vorgestellten physiologischen Abläufe in den Zellen des Herzens werden nachfolgend die Auswirkungen bestimmter Dysregulationen dieser Prozesse vorgestellt. Eine häufige kardiale Erkrankung, die mit kontraktile und zellulärer Dysfunktion sowie mit ventrikulärer Dilatation einhergehen kann, ist die Herzinsuffizienz (Wencker et al. 2003). Die grundlegenden pathophysiologischen Mechanismen werden beschrieben, die auf zellulärer und subzellulärer Ebene diese Dysfunktionen verursachen und daher möglicherweise auch für eine erhöhte Apoptoserate der Zellen des Herzgewebes mit verantwortlich sind.

1.2.1 Hypertrophie und Druckbelastung

Die chronische Druckbelastung des Herzens, die mit einer transversen Aortenkonstriktion simuliert werden kann, führt im Sinne des Frank-Starling-Mechanismus zu einer Erhöhung der Nachlast und zu einer Zunahme der systolischen und diastolischen Wandspannung. Dies hat nach dem derzeit gültigen Paradigma von Meerson (1962) längerfristig eine

linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) und im weiteren Verlauf die Entwicklung einer exzentrischen Herzinsuffizienz zur Folge.

Es ist davon auszugehen, dass bei 70% der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz eine Druckbelastung (arterielle Hypertonie) vorliegt oder in der Vorgeschichte bestand (Eriksson et al. 1989). Über welche Mechanismen diese häufige Ursache einer Herzinsuffizienz zur Hypertrophie des Herzens führt, ist im Detail noch Gegenstand der aktuellen Forschung. In diesem Zusammenhang werden ein Wachstum der Herzmuskelzellen, Veränderungen in der interzellulären Matrix (Fibrose), im Bereich der intramyokardialen Koronararterien sowie auf neurohumoraler Ebene beobachtet (Drazner 2011). Ebenso nicht im Detail geklärt sind die pathophysiologischen Mechanismen, welche den Umbau von einer konzentrischen in eine exzentrische Hypertrophie bedingen, und ob die Apoptose bei diesem Prozess eine signifikante Rolle spielt.

1.2.2 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist eine Erkrankung mit weltweit hoher Prävalenz, Morbidität und Mortalität. Sie bezeichnet definitionsgemäß das Unvermögen des Herzens ein adäquates Herzminutenvolumen (HMV), entsprechend den Anforderungen des Organismus zu fördern. Kennzeichen der Herzinsuffizienz sind kontraktile Dysfunktion, elektrophysiologische und strukturelle Umbauprozesse („remodelling“) und ein vermehrtes Auftreten des plötzlichen Herztods. Grundsätzlich wird zwischen einer systolischen und einer diastolischen Herzinsuffizienz unterschieden. Während unter Ersterem eine verminderte Pumpfähigkeit des Herzens verstanden wird, beruht die diastolische Herzinsuffizienz auf einer gestörten Füllung des Herzens, wie sie beispielsweise bei einer LVH oder bei einer gestörten diastolischen Relaxation des Herzmuskels auftritt.

Unabhängig von den mannigfaltigen Ursachen wie z.B. arterieller Hypertonie, koronarer Herzkrankheit (KHK), Insult, übermäßigem Alkoholkonsum, Myokarditis, Vitien etc., stellt die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ein gängiges Endstadium dieser Erkrankung dar. Die zu Grunde liegenden und die Progression bedingenden Mechanismen der DCM sind nach wie vor unzureichend beschrieben (Wencker et al. 2003). Klinisch präsentieren sich die Patienten mit einer verminderten Belastbarkeit, Dyspnoe, Ödemen sowie feuchten Rasselgeräuschen über der Lunge. Klassifiziert wird die Herzinsuffizienz nach einem Vorschlag der New York Heart Association entsprechend der Schwere der Symptomatik (NYHA I-IV), da sich aus dieser unmittelbar eine therapeutische Konsequenz ableitet (Chacko 1995).

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz wird für die erwachsene Bevölkerung Zentraleuropas und den USA mit 1–2% angegeben. Sie steigt mit dem Durchschnittsalter und erreicht 6–10% bei der Bevölkerungsgruppe der über 65-jährigen. Das Lebenszeitrisiko, an einer Herzinsuffizienz zu erkranken, beträgt bei über 40-jährigen zirka 20%. Etwa 60–70% der erkrankten Personen versterben innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung an einem Pumpversagen des Herzens oder an ventrikulären Arrhythmien. 30–40% der Betroffenen versterben sogar innerhalb des ersten Jahres (McMurray & Pfeffer 2005).

Unabhängig von den Ursachen der Herzinsuffizienz ist die Folge eine Schädigung und daraus resultierende Funktionsbeeinträchtigung des Arbeitsmyokards. Der Myokardverlust wird vom Organismus initial durch verschiedene neurohumorale Regelmechanismen kompensiert, so dass der Patient vorerst im Rahmen einer sogenannten kompensierten Herzinsuffizienz asymptomatisch bleibt (NYHA I). Einen wesentlichen Beitrag hierzu leisten das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und das sympathoadrenerge System. Welche Faktoren die kardialen Umbauprozesse und letztendlich die Dekompensation hin zu einer manifesten Herzinsuffizienz bedingen (NYHA III-IV), ist noch nicht endgültig geklärt, doch scheinen die für die zeitweise Kompensation verantwortlichen neurohumoralen Komponenten einen maßgeblichen Einfluss zu haben (Kilter & Bohm 2004).

Kalziumleck und Pumpversagen

Katecholamine bewirken, über die Bindung an G-Protein gekoppelten β_1 -Rezeptoren auf Herzmuskelzellen, eine Aktivierung der PKA. Diese phosphoryliert bestimmte Proteine, wie LTCC, Phospholamban (PLN) und RyR2, was eine schnellere Ca^{2+} -Freisetzung (Chronotropie) und eine erhöhte Kontraktilität (Inotropie) zur Folge hat. Durch die PLN-Phosphorylierung wird der inhibitorische Effekt von PLN auf SERCA reduziert, was zu einem schnelleren Wiederauffüllen der SR- Ca^{2+} -Speicher führt. Die RyR2-Phosphorylierung bewirkt durch eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit einen vermehrten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR in das Zytosol. Durch eine $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -abhängige CaMKII-Aktivierung kann es ebenfalls zu einer Phosphorylierung der RyR2 und somit zu einer höheren Öffnungswahrscheinlichkeit kommen (Zalk, Lehnart & Marks 2007).

Bei chronisch erhöhten Katecholaminwerten, wie sie für eine Herzinsuffizienz nahezu pathognomonisch sind, führt eine Hyperphosphorylierung der PKA und die Erschöpfung von Kalstabin 2-Pools zu einer Fehlfunktion der RyR2 (Marx et al. 2000). Das Geschehen mündet schließlich in einem diastolisch erhöhten SR- Ca^{2+} -Leck, einer Erschöpfung der

SR- Ca^{2+} -Speicher, einer verminderten SERCA-Aktivität und Expression (Hasenfuss 1998) und letztendlich in einer herabgesetzten Kontraktilität des Arbeitsmyokards (Kushnir, Betzenhauser & Marks 2010). Auf Grund der verminderten SERCA-Aktivität übernimmt vermehrt der NCX den Abtransport von Ca^{2+} aus dem Zytosol. Auf diese Weise sinkt der gesamte Ca^{2+} -Gehalt der Zelle, was zusätzlich die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten senkt.

Dieser Effekt wird durch eine Dichteabnahme der β_1 -Rezeptoren auf den Herzmuskelzellen weiter verstärkt (Prinzip des negativen Feedbacks). Hieraus ergibt sich in der Summe eine progrediente Verschlechterung der Herzfunktion, welcher der Körper durch weitere Katecholamin- und Zytokinausschüttung (u. a. Tumornekrosefaktor- α) entgegenzuwirken versucht. Die Folge ist ein „circulus vitiosus“ mit einer gestörten Stoffwechselfunktion, einem vermehrten Zelltod und einer Umorganisation der Herzarchitektur. Ununterbrochen führt dieser Kreislauf zur Dilatation und zu einer kontraktile Dysfunktion, was sich als zunehmende Pumpschwäche oder sogar Pumpversagen des Herzens äußern kann (Kilter & Bohm 2004).

Kalziumleck und Arrhythmien

Abhängig von der Ursache der Herzinsuffizienz können auf dem Boden einer Myokardschädigung verschiedene bradykarde und tachykarde Rhythmusstörungen entstehen (Stevenson et al. 1993).

Die im Fokus dieser Arbeit stehenden tachykarden Rhythmusstörungen können grundsätzlich auf Störungen der Erregungsbildung oder der Erregungsausbreitung beruhen. Ersteres kann entweder durch abnorme oder durch „getriggerte“ Aktivitäten bedingt sein, wohingegen Störungen der Erregungsausbreitung zumeist auf pathologischen „reentry-Mechanismen“, wie beispielsweise beim Wolff-Parkinson-White-Syndrom, beruhen. Unter abnormer Aktivität werden „de novo“ Depolarisationen zusammengefasst, die entweder auf einer gesteigerten Aktivität bestimmter Bereiche des Erregungsbildungssystems beruhen, oder durch Verluste der Stabilität des Ruhepotentials in Bereichen des Arbeitsmyokards verursacht werden. Als getriggerte Aktivitäten werden Depolarisationen bezeichnet, welche durch ein Aktionspotential ausgelöst werden, diesem also folgen. Hierbei sind „early afterdepolarizations“ (EAD) und „delayed afterdepolarizations“ (DAD) zu unterscheiden. Während EAD hauptsächlich auf dem Boden einer verlängerten Aktionspotentialdauer entstehen (im EKG als verlängertes QT-Intervall zu beobachten),

werden DAD vor allem bei Überladung der Zelle mit Kalzium beobachtet (Roskamm et al. 2004).

Das erhöhte zytosolische Kalzium wird auf Grund der verminderten SERCA-Aktivität vermehrt über den NCX aus der Zelle transportiert (Hasenfuss 1998). Da im Gegenzug für jedes Ca^{2+} -Ion drei Na^{+} -Ionen in das Zytosol befördert werden, kann dieser Mechanismus zu Membrandepolarisationen führen, welche in der Lage sind Aktionspotentiale im Sinne der eben beschriebenen DAD auszulösen (siehe Abbildung 3). Eine mögliche Folge sind ventrikuläre Arrhythmien, welche hauptverantwortlich für eine der häufigsten Todesursachen bei Herzinsuffizienz, den plötzlichen Herztod, sind (Lehnart et al. 2006).

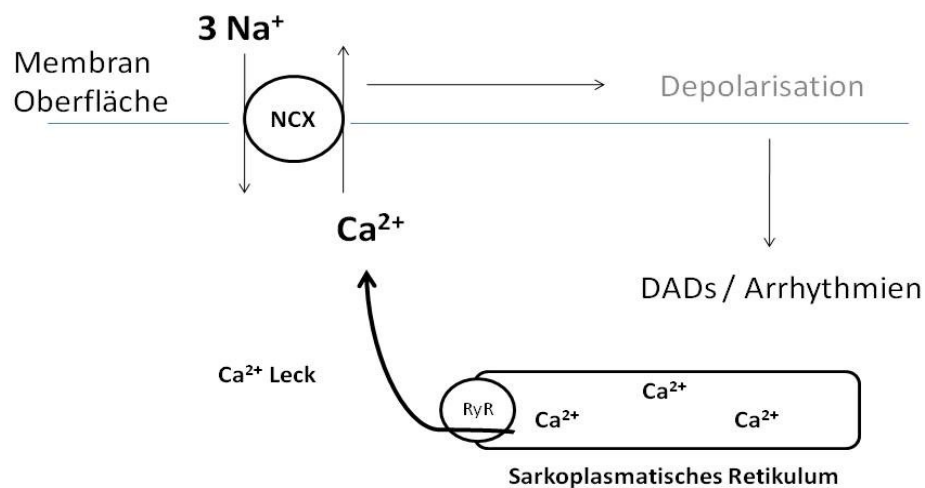


Abbildung 3: Mögliche Ursache von DAD: Durch die, durch ein Ca^{2+} -Leck im SR bedingte, erhöhte NCX-Aktivität wird vermehrt Na^{+} in die Zelle transportiert, was zu Depolarisationen der Zellmembran und zu Arrhythmien führen kann. Abgeändert nach Vorlage von (Kockskämper & Heinzel n.d.).

1.2.3 Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie (CPVT)

Die CPVT ist eine autosomal dominant vererbare arrhythmogene Erkrankung des morphologisch unauffälligen Herzens. Die Mortalität liegt bis zum 35. Lebensjahr bei ca. 35% (Lehnart et al. 2004). Bei β_1 -adrenerger Stimulation durch körperliche oder emotionale Belastung können im Rahmen der CPVT lebensgefährliche Herzrhythmusstörungen und bidirektionale oder polymorphe Kammertachykardien auftreten (Leenhardt et al. 1995). Ähnlich wie bei dem erworbenen diastolischen SR- Ca^{2+} -Leck im Rahmen der Herzinsuffizienz, findet sich bei dieser Erkrankung eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2, die mit einem erhöhten diastolischen Ca^{2+} -Leck

einhergeht. Nach der Entdeckung der ersten pathognomonischen R4496C Mutation der RyR2 (Priori et al. 2001) wurden bis dato über 150 weitere Mutationen der RyR2, aber auch einige Calsequestrin-Genmutationen (siehe Abbildung 4) ausfindig gemacht, die für diese Erkrankung verantwortlich sein können (Priori & Chen 2011).

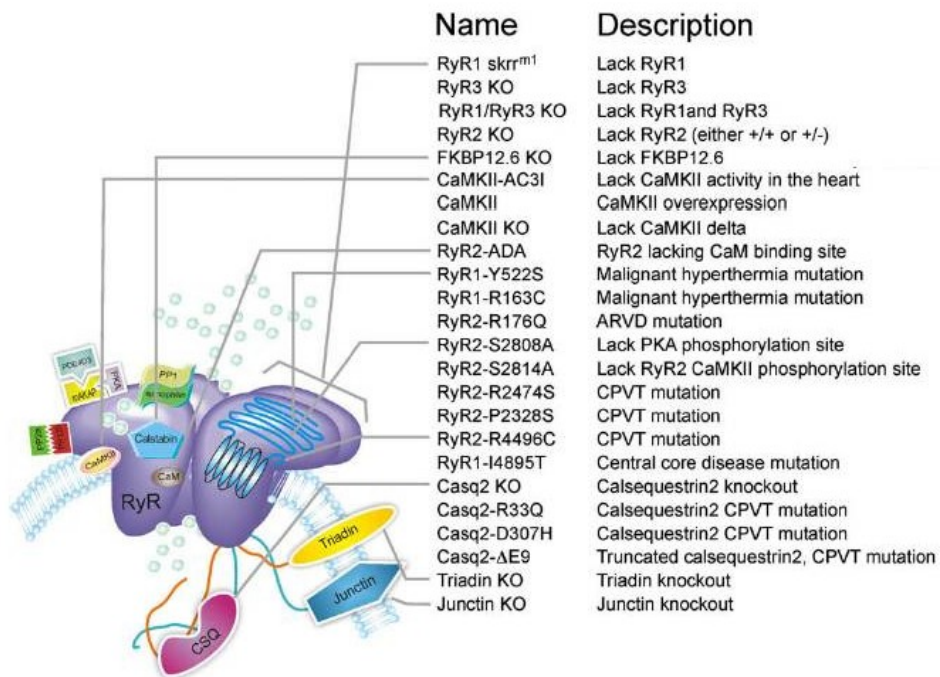


Abbildung 4: Beispiele für Mutationen, die Auswirkung auf die Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR haben können und deren Lokalisationen. Abgeändert nach Vorlage von (Kushnir, Betzenhauser & Marks 2010).

Die Entwicklung eines R4496C knock-in-Mausmodells (Cerrone et al. 2005) erlaubt eine intensive Erforschung der pathophysiologischen Abläufe der CPVT und damit indirekt auch der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz.

Bekanntermaßen spielt bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz der Zelltod eine wesentliche Rolle. Dabei ist es naheliegend, dass abhängig von den verschiedenen Ursachen der Myokardschädigung unterschiedliche Formen des Zelltodes an der Progredienz der Herzinsuffizienz beteiligt sind. Mit dem R4496C-Modell besteht erstmals die Möglichkeit zu erforschen, in wieweit ein diastolisches Ca²⁺-Leck im SR den Untergang von Zellen verursacht und die Progression einer Herzinsuffizienz beschleunigt.

1.3 Zelltod

Eine Zelle verfügt im Rahmen ihres Zellzyklus über verschiedene Optionen: Neben einem Verbleib in der Ruhephase kann sie sich teilen (Mitose), sich spezialisieren (Differenzierung) oder sterben (Zelltod). Für die Funktion eines Organismus ist eine koordinierte Auswahl dieser Optionen in jeder einzelnen Zelle wichtig. Fiele beispielsweise der programmierte Zelltod aus, würden sich im menschlichen Organismus im Laufe seines Lebens bis zum 80. Lebensjahr durch Zellteilungen zirka zwei Tonnen Knochenmark und Lymphknoten, sowie 16 Kilometer Darm ansammeln (Melino 2001).

Der Zelltod wird klassisch in drei Formen unterteilt (siehe Abbildung 5):

- Apoptose = programmierter Zelltod
- Nekrose = ungeplanter, versehentlicher Zelltod
- Autophagie-assoziiertes Zelltod = Tod beim Ausbleiben einer adäquaten Energieversorgung.

Der Ablauf dieser drei Prozesse unterscheidet sich auf morphologischer, biochemischer und molekularer Ebene (Kroemer et al. 2009). Diese Unterschiede werden nachfolgend dargestellt und diskutiert.

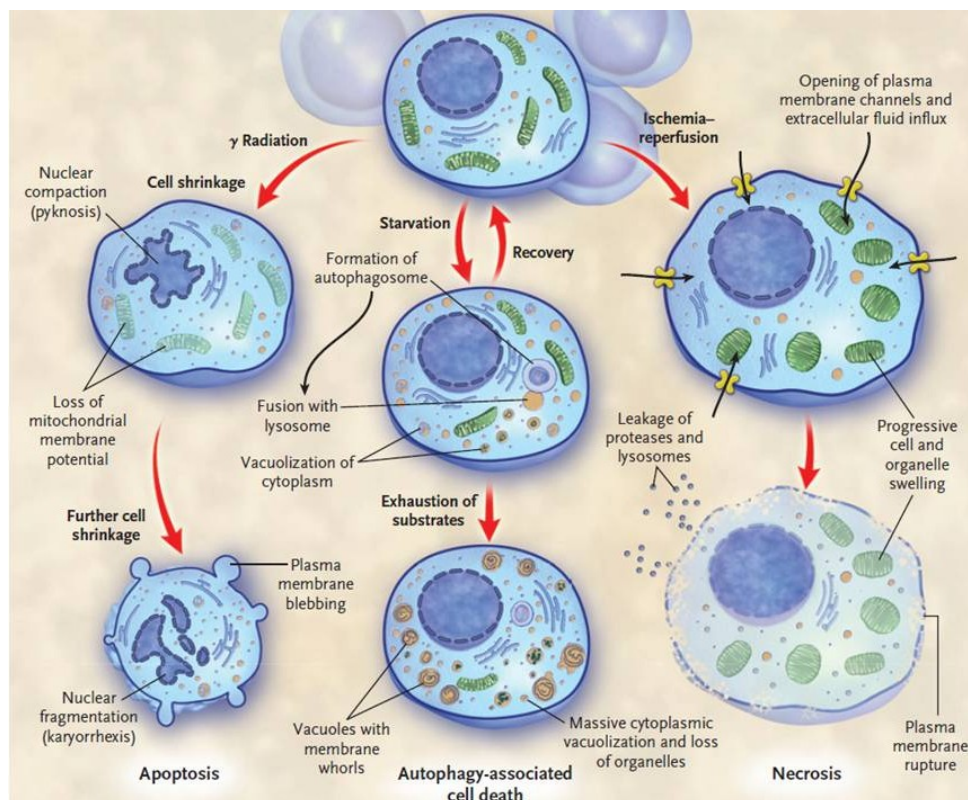


Abbildung 5: Die klassischen Formen des Zelltodes, in Abhängigkeit von der Art der Zellschädigung: Apoptose (links), Nekrose (rechts) und der Autophagie-assoziierte Zelltod (Mitte). Abgeändert nach Vorlage von (Hotchkiss et al. 2009).

Einer neueren Definition nach wird von einem programmierten Zelltod gesprochen, wenn dieser geordnet nach genetischen Vorgaben abläuft. Somit stellen sowohl die Apoptose als auch die Autophagie eine Form des programmierten Zelltodes dar (Klionsky 2007). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass auch die Nekrose in bestimmten Stadien durch zelluläre Kontrollmechanismen modifiziert werden kann (Zong & Thompson 2006). Der Ausdruck des programmierten Zelltodes sollte daher nicht als Synonym für Apoptose genutzt werden. Des Weiteren besteht Uneinigkeit darüber, welche Kriterien den Zelltod definieren. Das Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) schlägt vor, dass erst vom Zelltod gesprochen werden sollte, wenn zumindest eines der folgenden drei Kriterien beobachtet werden kann (Kroemer et al. 2009):

- Integritätsverlust der Zellmembran
- vollständige Zell- und Zellkernfragmentierung
- Phagozytose durch eine benachbarte Zelle

1.3.1 Apoptose

Der aus dem Griechischen stammende Begriff „Apoptose“, der übersetzt „abtropfen“ oder „abfallen“ bedeutet, wurde für eine Form des Zelltodes etabliert (Kerr, Wyllie & Currie 1972), bei dem beschädigte Zellen unter Energieaufwand aus dem Verband gelöst und abgebaut werden, ohne dass eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird (Lee & Gustafsson 2009). Dieser Prozess läuft zirka 20-mal schneller ab als die Mitose und ist daher experimentell relativ schwer zu erfassen (Melino 2001).

Die zur Definition der Apoptose herangezogen Kriterien beschrieben ursprünglich die morphologisch sichtbaren Veränderungen der Zellen bei diesem Prozess. Nach dem durch Kerr et al. erstellten Kriterienkatalog wird von Apoptose gesprochen, wenn folgende Spezifika beobachtet werden (Kerr, Wyllie & Currie 1972):

- Abrundung der Zelle
- Retraktion der Pseudopodien (falls vorhanden)
- Reduktion des Volumens der Zelle und des Zellkerns (Pyknose)
- Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhesis)
- geringe Veränderungen der zytoplasmatischen Organellen (im Sinne eines Integritätserhalts bis in das finale Prozessstadium)
- Vesikulierung der Plasmamembran (bei, bis in die finale Prozessstufe, erhaltener Integrität)
- In vivo-Phagozytose durch Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS).

Darüber hinaus wird noch die Kondensation von Chromatin und die Bildung von „apoptotic bodies“ (Majno & Joris 1995) sowie die Fragmentierung zytoplasmatischer Proteine durch Aspartat-spezifische Proteasen (Cysteinyl-Aspartat spezifische Proteasen = Caspasen) beschrieben (Adams, Cory 2007). Als hochgeordneter Prozess ist die Apoptose stark vom intrazellulären ATP-Gehalt abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass der zelluläre ATP-Gehalt ausschlaggebend für die Art des Zelltodes ist und dass eine apoptotische Zelle bei Reduktion des ATP-Gehalts nekrotisch wird. Umgekehrt geht der Prozentsatz an nekrotischen Zellen unter ansonsten konstanten Bedingungen bei ATP-Zufuhr zurück (Eguchi, Shimizu & Tsujimoto 1997).

Sowohl extrinsische als auch intrinsische Faktoren können die Apoptose einer Zelle auslösen. Man spricht daher von einem extrinsischen und einem intrinsischen Aktivierungsweg der Apoptose.

Extrinsischer Aktivierungsweg

Von einem extrinsischen Aktivierungsweg oder „death-receptor pathway“ wird gesprochen, wenn die Apoptose durch Aktivierung von „Todesrezeptoren“ eingeleitet wird. Diese Todesrezeptoren gehören zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor-(TNF-R)-/Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor-(NGF-R)-Superfamilie. Es handelt sich um Transmembranproteine mit einer extrazellulären Bindungsdomäne und einer intrazellulären Todesdomäne. Beispielhaft seien hier Fas (CD 95), TNF-R1 oder die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 genannt (Thorburn 2004). CD-95-Liganden können beispielsweise TNF- α , Fas-Liganden oder andere zur TNF- α -Familie gehörende Zytokine sein.

Die Bindung eines Liganden führt zur Oligomerisation und Aktivierung des Rezeptors, was im Intrazellulärbereich die Rekrutierung der „Fas-associated death domain“ (FADD) zur Folge hat. Der Fas/FADD-Komplex bindet die inaktive Pro-Caspase-8, bildet den „death inducible signaling complex“ (DISC) und überführt die inaktive Pro-Caspase-8 durch Spaltung in ihre aktive Form (Dorn 2009). Im menschlichen Organismus aktiviert der Komplex darüber hinaus auch die Caspase-10 (Adams & Cory 2007). Der aktivierte DISC überträgt das Signal zum einen auf die nachgeschaltete Caspase-3, was eine gezielte Proteolyse zur Folge hat, und bewirkt über die Spaltung des BH3-interacting domain death agonist protein (Bid) zu tBid (truncated Bid) eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, was zu einer Freisetzung von Zytochrom C in das Zytosol führt (Lee & Gustafsson 2009).

Intrinsischer Aktivierungsweg

Die Aktivierung der Apoptose durch intrazelluläre Stimuli kann über zwei verschiedene Signalwege induziert werden:

- Mitochondriale Aktivierung
- ER-abhängige Aktivierung

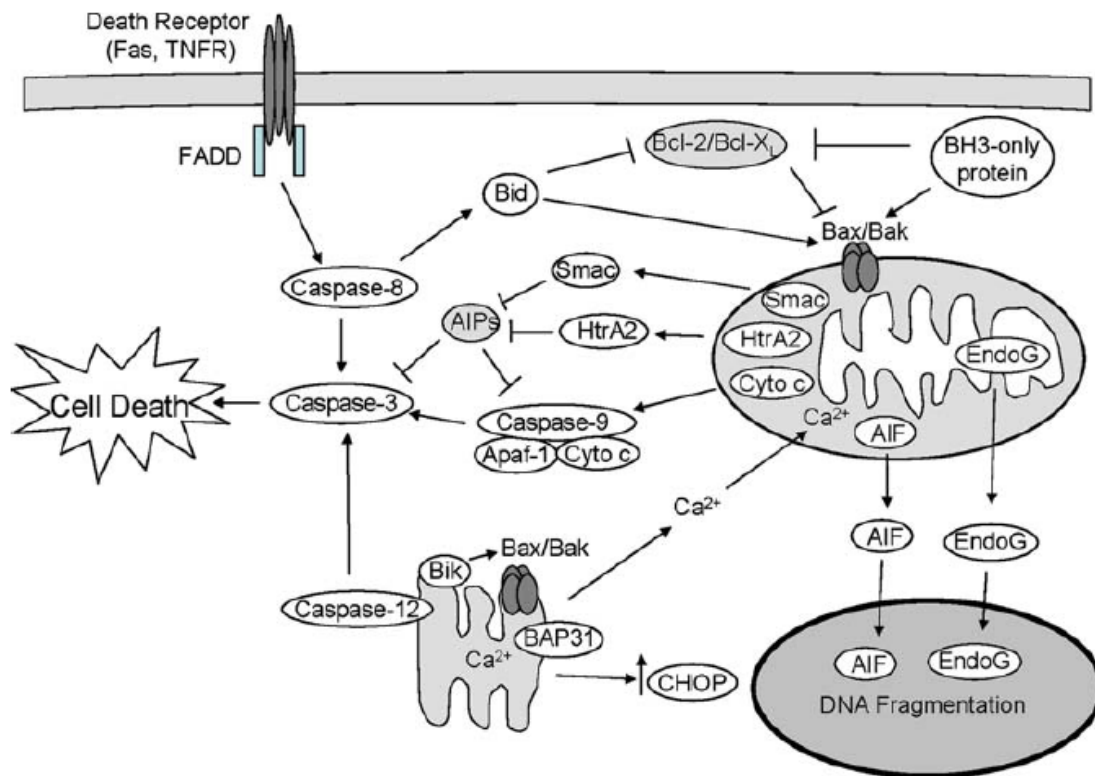


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Apoptosekaskade und der möglichen Aktivierungsformen. Extrinsischer Aktivierungsweg über Ligandenbindung am Todesrezeptor. Intrinsischer Aktivierungsweg über „BH3-only Proteine“ oder SR-bedingte Ca^{2+} -Ausschüttung. Abgeändert nach Vorlage von (Lee & Gustafsson 2009).

Mitochondrial-induzierte Apoptose

Die primäre Funktion der Mitochondrien einer Zelle ist die Bereitstellung von Energie in Form von ATP durch oxydative Phosphorylierung. In Kardiomyozyten nehmen die Mitochondrien bis zu 30% des Zellvolumens ein. Die Organellen sind zum einen im Bereich des Sarkolemms und zum anderen im Intermyo-fibrillärbereich konzentriert, was eine effektive und kontinuierliche Energieversorgung sicherstellt.

Die mitochondrial-induzierte Apoptose wird durch pro- und anti-apoptotische Bcl-2-Proteine reguliert. Anti-apoptotische Bcl-2-Proteine, wie Bcl-2 oder Bcl- X_L , haben vier gemeinsame Bcl-2-homology-(BH)-Domänen (BH1-4) und inhibieren verschiedene

Schritte der Apoptose. Bcl-2 verhindert beispielsweise die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran durch Inhibition der pro-apoptotischen Proteine Bax/Bak (Gustafsson & Gottlieb 2007). Darüber hinaus konnten auch weitere protektive Aktivitäten von Bcl-2 nachgewiesen werden. Im Hinblick auf den Kalziumhaushalt senkt Bcl-2 die NCX-Aktivität und die Empfindlichkeit der mitochondrialen „permeability transition pore“ gegenüber Ca^{2+} und reduziert die Wahrscheinlichkeit eines Zytochrom C-Verlustes (Zhu et al. 2001).

Pro-apoptotische Bcl-2-Proteine hingegen haben entweder eine oder drei gemeinsame BH-Domänen und werden entsprechend in BH1-3-Proteine unterteilt. In diese Gruppe gehören Proteine, wie Bax und Bak, und BH3-only-Proteine, wie Bimp3, Nix/Bimp3L, Bad, Bid, Noxa und Puma (Danial & Korsmeyer 2004). Ihre Aktivierung führt zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und somit zur Freisetzung verschiedener pro-apoptotischer Proteine aus dem Intermembranraum. BH3-only-Proteine fungieren als Sensoren für zellulären Stress. Durch oxidativen Stress oder durch einen fehlregulierten Ca^{2+} -Haushalt aktivierte BH3-only-Proteine aktivieren ihrerseits Bax/Bak. Dies geschieht entweder direkt durch Wechselwirkung mit den Proteinen selbst oder indirekt über die Bindung von Bcl-2/Bcl-X_L (Gustafsson & Gottlieb 2007). Bax und/oder Bak oligomerisieren und lagern sich zu einer Pore innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran zusammen, welche die Freisetzung der verschiedenen pro-apoptotischen Faktoren wie Zytochrom C, „apoptosis inducing factor“ (AIF), Omi/HtrA2, Smac/Diablo oder EndoG aus dem Intermembranraum ermöglicht (Gustafsson & Gottlieb 2007).

In gesunden Zellen befördert Zytochrom C Elektronen vom Komplex III zum Komplex IV der Atmungskette. Während der Apoptose lagert es sich im Zytosol mit dem „apoptotic protease-activating factor“ (Apaf-1) und Desoxyadenosintriphosphat (dATP) zu einem sogenannten Apoptosom zusammen. Das dATP des Apoptosoms verursacht eine Konformationsänderung im Apaf-1 was nachfolgend zur Aktivierung der Caspase-9 führt. Die Caspase-9 spaltet die inaktive Pro-Caspase-3 in die aktive Caspase-3. Diese wiederum beginnt dann mit der Spaltung ausgewählter Zellproteine (Li et al. 1997).

Des Weiteren transloziert die aktivierte Caspase-3 in den Zellkern, wo sie die „DNA-repairing-enzyme“-Poly-(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) durch Spaltung inaktiviert und bestimmte Endonukleasen aktiviert, was zur irreversiblen DNA-Fragmentierung und zum apoptotischen Zelltod führt (Li et al. 1997).

AIF, ein im Intermembranraum der Mitochondrien angesiedeltes und an die Innenmembran gebundenes Flavoprotein, wird sowohl für den Aufbau und die Stabilisierung des Komplexes I der Atmungskette als auch für die oxidative Phosphorylierung benötigt (Vahsen et al. 2004). Nach Freisetzung in das Zytosol transloziert AIF in den Zellkern, wo es die Kondensation von Chromatin und die DNA-Spaltung vermittelt (Daugas et al. 2000). Ein erhöhter Ca^{2+} -Gehalt in den Mitochondrien verursacht eine Freisetzung des AIF von der Innenmembran in den Intermembranraum und erleichtert den Ausstrom des AIF bei permeabilisierter Außenmembran (Norberg et al. 2008).

Smac/Diablo und Omi/HtrA2 sind indirekt an der Aktivierung der Caspasenkaskade beteiligt. Freigesetzt hemmen sie die „apoptosis inhibitor proteins“ (AIP), die normalerweise ihrerseits die Aktivität der Caspasen-3 und -9 inhibieren (Deveraux et al. 1997).

Die Endonuklease G, die in der Innenmembran der Mitochondrien lokalisiert ist, trägt unter normalen Bedingungen zur Beseitigung defekter mitochondrialer-DNA bei. In das Zytosol entlassen transloziert sie ebenso wie AIF in den Zellkern und führt dort zur Fragmentierung der Kern-DNA (Ikeda & Ozaki 1997).

SR-induzierte Apoptose

Das SR fungiert als Ca^{2+} -Speicher der Zelle und ist für die Synthese und Faltung bestimmter Proteine zuständig (Gaut & Hendershot 1993). In gesunden Zellen herrscht im SR ein Gleichgewicht zwischen dem Import von zu faltenden und dem Export fertig gefalteter Proteine. Bei Störungen dieses Gleichgewichtes im Sinne einer Anhäufung ungefalteter Proteine im SR-Lumen oder Störungen des Ca^{2+} -Haushaltes (Stress), aktiviert das SR ein Programm, das als „unfolded protein response“ (UPR) bezeichnet wird. Im Rahmen der UPR werden bestimmte Transkriptionsfaktoren, die die Proteinfaltkapazität des SR erhöhen, aktiviert (Schroder & Kaufman 2005). Bei prolongiertem oder starkem Stress aktiviert die UPR zwei, von den Mitochondrien unabhängige Apoptosewege. Zum einen wird durch die Aktivierung der Caspase-12 die Caspase-3 aktiviert (Szegezdi et al. 2006) und zum anderen werden durch die vermehrte Expression der Transkriptionsfaktoren CHOP/GADD153 bestimmte Programme, die zur Apoptose führen, initiiert. So aktiviert CHOP die Transkription pro-apoptotischer Proteine, wie beispielsweise die des BH3-only-Proteins „p53 upregulated modulator of apoptosis“ (PUMA) (Breckenridge et al. 2003).

Derzeit ist noch umstritten, ob Ca^{2+} lediglich einen zusätzlichen Faktor oder den ausschlaggebenden Faktor bei der Apoptoseaktivierung darstellt. Da in der Literatur ein starker Zusammenhang zwischen einer gestörten Ca^{2+} -Regulation, mitochondrialer Dysfunktion und Apoptose postuliert wird, werden nachfolgend die potentiellen Zusammenhänge skizziert (Chen et al. 2005).

Ca^{2+} und Apoptose

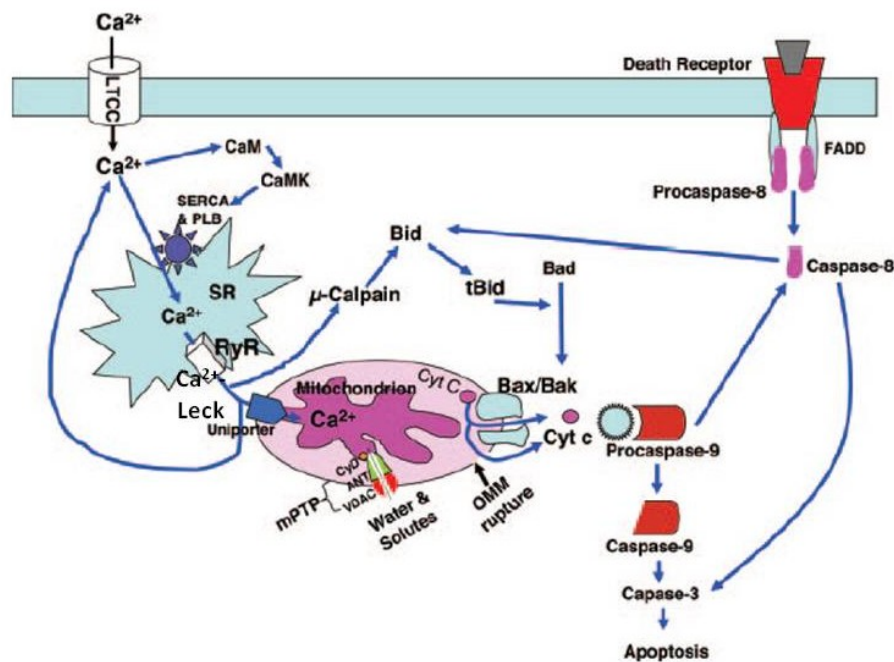


Abbildung 7: Die Rolle von Ca^{2+} in der Aktivierung der Apoptosekaskade: Die Entleerung von SR- Ca^{2+} -Speichern führt über einen regionalen Ca^{2+} -Anstieg zu einer μ -Calpain-Aktivierung und zum anderen zu einer Überladung der Mitochondrien mit Kalzium. Beides bewirkt eine Freisetzung von Zytocrom C aus dem Membranzwischenraum der Mitochondrien. Die SR-Speicherentleerung kann durch eine Ca^{2+} -Überladung oder durch ein Ca^{2+} -Leck, beispielsweise durch den RyR2, verursacht werden. Abgeändert nach Vorlage von (Chen et al. 2005).

Die Sensitivität der Zelle gegenüber apoptotischen Signalen hängt vom Ca^{2+} -Gehalt im SR und der Fähigkeit des Systems, Kalzium vom SR in die Mitochondrien zu transferieren, ab. So kann ein herabgesetzter Ca^{2+} -Gehalt im SR die Zelle vor Apoptose schützen (Demaurex & Distelhorst 2003), eine Entleerung oder eine Überfüllung der SR- Ca^{2+} -Speicher kann hingegen die Apoptose auslösen (Chen et al. 2005). Bei erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen wird die CaMKII aktiviert. Diese phosphoryliert PLN und erhöht somit die SERCA-Aktivität (Davis et al. 1983), was zu einer vermehrten Füllung der Ca^{2+} -Speicher im SR führt. Entlässt nun aufgrund einer Speicherüberladung das SR über RyR2

oder IP3R Ca^{2+} , kommt es zum einen zu einer Ca^{2+} -Aufnahme durch benachbarte Mitochondrien über den Ca^{2+} -Uniporter und zum anderen zu einer Aktivierung von μ -Kalpain (Suzuki & Sorimachi 1998), welche über eine Bid-Spaltung und BAD-Dephosphorylierung die Oligomerisation von Bax und Bak bewirkt (Chen et al. 2005, Demaurex & Distelhorst 2003). Die Mitochondrien können durch die enge räumliche Beziehung zum SR Einfluss auf die lokale Ca^{2+} -Konzentration nehmen. So können sie Kalzium über den Ca^{2+} -Uniporter aufnehmen oder bei drohender Speicherentleerung Ca^{2+} via mitochondrialem NCX in das SR zurückführen.

Eine Ca^{2+} -Überladung im SR führt über diesen Mechanismus konsekutiv zu einer Überfüllung der mitochondrialen Ca^{2+} -Speicher, was eine Öffnung der „mitochondrial permeability transition pores“ (mPTP) und eine Zytochrom C-Freisetzung zur Folge hat. Bedingt durch die mPTP-Öffnung dringt Zytosol in die Mitochondrien ein, was eine Schwellung, möglicherweise aber auch eine Membranruptur der Mitochondrien bewirken und so letztendlich die Apoptose einleiten kann (Crow et al. 2004).

Ein erhöhtes Ca^{2+} -Leck schützt das SR zwar vor einer Ca^{2+} -Überladung, führt aber über denselben Mechanismus durch einen konstanten regionalen Konzentrationsanstieg zu einer Überladung der Mitochondrien mit Ca^{2+} und zu einer Aktivierung von μ -Kalpain.

Unterbrechung der Apoptosekaskade

Die Aktivierung der apoptotischen Signalkaskade muss nicht zwingend eine Apoptose zur Folge haben. Auf dieser Erkenntnis basiert ein Modell, das in der Literatur als Herzinsuffizienz ohne Zellverlust diskutiert wird. Voraussetzung für dieses Modell ist, dass nachgeschaltete Signalwege unterbrochen werden können, bevor sie zu einer DNA-Fragmentierung und Proteinolyse führen (Narula et al. 2001).

Die vermehrte Expression endogener Caspaseinhibitoren, wie des „X-linked inhibitor of apoptosis protein“ (XIAP) und der „apoptosis repressor with caspase recruitment domain“ (ARC) werden hier als maßgebliche Faktoren benannt (Haider, Narula & Narula 2002).

In den betroffenen Zellen können Zytochrom C- und Caspase-3-Spaltprodukte bei intakter DNA und Proteinstruktur nachgewiesen werden. Der Verlust von Zytochrom C aus den Mitochondrien hat eine gestörte Atmungskette und somit eine Beeinträchtigung der Funktionalität der Zelle zur Folge. Diesem Umstand wird durch die Bezeichnung „zombie myocytes“ Rechnung getragen (Narula et al. 2001).

In wie weit die Zellen in diesem Zustand verweilen oder in eine AIF- und EndoG-vermittelte „Caspasen-unabhängige Apoptose“ übergehen, bleibt fraglich (Abraham &

Shaham 2004). Auch bleibt unklar, wie lange Zellen in einem solchen Zustand der gestörten Energiebereitstellung verbleiben können. Sobald sich der zelluläre ATP-Vorrat erschöpft, entleeren sich die SR- Ca^{2+} -Speicher, was, wie beschrieben, eine Öffnung der mPTP bewirkt. Aufgrund des ATP-Mangels kommt es nicht zur Apoptose. Für den anschließenden Prozess wird die Bezeichnung „programmierte Nekrose“ diskutiert (Leist et al. 1997).

1.3.2 Nekrose

Die Nekrose wurde lange Zeit als ungeplanter, durch irreversible Schädigung bedingter Zelltod angesehen. Sie ist im Wesentlichen durch Zell- und Organellschwellung, eine Zunahme der Membranpermeabilität und Membranrupturen, gefolgt vom Zytosolerguss in den Interstitialraum mit Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes gekennzeichnet (Zong & Thompson 2006). Als Hauptursache für diese Art des Zelltodes wird die Erschöpfung intrazellulärer ATP-Speicher angesehen. Dies führt über eine Störung der intrazellulären Na^+ -Homöostase, aber auch durch eine Öffnung von sogenannten „death channels“ zur Zellschwellung und Membranruptur (Nishimura & Lemasters 2001).

Gesunde Zellen verfügen mit der oxidativen Phosphorylierung und der Glykolyse über zwei mögliche ATP-Synthesewege. Da sich die Kapazität der intrazellulären ATP-Speicher im millimolaren Bereich bewegt, machen kurzfristige Dysregulationen des Haushalts eine Nekrose als Reaktion unwahrscheinlich (Pfeiffer, Schuster & Bonhoeffer 2001). Nachhaltige Störungen des ATP-Haushaltes können hingegen durchaus eine Nekrose auslösen.

Bei mangelnder Organperfusion (arterielle Verschlusserkrankung (AVK), KHK, etc.) ist die Versorgung der Herzmuskelzellen mit Sauerstoff und Glukose limitiert, was die Zelle zur anaeroben Glykolyse und somit in eine azidotische Stoffwechsellage zwingt. Bei Reperfusion des ischämischen Gewebes steigt aufgrund des plötzlichen Sauerstoffanstiegs und der darauf folgenden Aktivierung von Enzymen, wie der Xanthin-Oxidase und der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) massiv an, was in Kombination mit Hypoglykämie, Azidose und Hypoxie den nekrotischen Tod der Zelle besiegelt (Zweier, Flaherty & Weisfeldt 1987).

Studien der letzten Jahre zeigen, dass die Nekrose durch das Zusammenspiel vieler Faktoren bedingt sein und in ihrem Ablauf durchaus geregelten Bahnen folgen kann (Zong & Thompson 2006). Darüber hinaus konnte in bestimmten Situationen eine genetische

Regulierung der Nekrose nachgewiesen werden (Nakagawa et al. 2005), was den Terminus der „programmierten Nekrose“ zumindest in manchen Fällen rechtfertigt.

Programmierte Nekrose

Die Ca^{2+} -vermittelte Nekrose ist eine der am ausführlichsten beschriebenen programmierten Nekrosen in der Literatur (Zong & Thompson 2006). Bei einer Ca^{2+} -Überladung der Mitochondrien kommt es zur Öffnung der mPTP und somit zur Permeabilisierung der inneren Mitochondrienmembran, was eine Schwellung der Mitochondrienmatrix zur Folge hat. Die ATP-Produktion sinkt und die Mitochondrien werden bei dem Versuch, die eigene Homöostase aufrecht zu erhalten, von einem ATP-Produzenten zu einem ATP-Verbraucher. Die folgende ATP-Depletion führt die Zelle in diese als programmierte Nekrose beschriebene Form des Zelltodes (Dorn 2009). Sowohl die erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration als auch die Öffnung der mPTP werden als Ursachen der Apoptose angesehen. Welche Form des Todes eine Zelle letztendlich erleidet, hängt u. a. von der Höhe der Ca^{2+} -Konzentration ab. Ebenso führt eine kurzfristige mPTP-Öffnung eher zur Apoptose, eine permanente Öffnung jedoch eher zur Nekrose (Zong & Thompson 2006). Auch Calpain, ein Ca^{2+} -abhängiger Initiator der Apoptose, spielt eine Rolle in der Aktivierung der Nekrose (Wang 2000). In Neuronen kann Calpain über die Spaltung des sarkolemmalen NCX eine starke Ca^{2+} -Überladung der Zelle herbeiführen und die lysosomale Membran permeabilisieren (Zong & Thompson 2006). Auch in Kardiomyozyten deuten Untersuchungen auf einen Zusammenhang zwischen Calpain und Nekrose hin (Inserate et al. 2005).

Über den biologischen Sinn einer „gewollten“ Gewebsentzündung, also einer programmierten Nekrose und ihrer Rolle im Zellverband Herz, kann beim jetzigen Wissensstand nur gemutmaßt werden. Aufgrund der massiven Aktivierung des Immunsystems kann diese Form des Zelltodes möglicherweise jedoch als Frühwarnsystem zur Selbstverteidigung des Organismus verstanden werden (Zong & Thompson 2006).

1.3.3 Autophagie

Autophagie ist ein wichtiger zellulärer Prozess zum Recycling alter, beschädigter oder redundanter Proteine und Zellorganellen sowie zur Energiebereitstellung bei mangelnder Energiezufuhr. Er wird als Antwort auf subletale Stimuli wie Energiemangel, aber auch als wichtiger Prozess bei der Verhinderung von Tumorwachstum, der Elimination

intrazellulärer Mikroorganismen und der Antigenpräsentation verstanden (Kroemer & Jaattela 2005).

In Abhängigkeit vom Transport des zum Abbau bestimmten Materials zu den Lysosomen werden drei verschiedene Formen der Autophagie definiert: Die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie.

Bei der Makroautophagie werden die zu lysierenden Zellbestandteile durch eine Doppelmembran (Autophagosom) umhüllt, welche mit dem Lysosom fusioniert. Im Rahmen der Mikroautophagie wird das zu lysierende Protein durch Invagination der Lysosomenmembran internalisiert. Dagegen sind bei der Chaperon-vermittelten Autophagie mit Heat-shock-Proteinen verwandte Proteine für den Transport zu den Lysosomen zuständig (Klionsky 2007). Die Struktur des Autophagosoms wird durch bestimmte, Autophagie-assoziierte Proteine, wie PI3K oder Beclin 1, einem BH3-only-Protein der Bcl-2-Familie, reguliert. Nach Verschmelzung mit den Lysosomen werden die Proteine durch saure Hydrolasen in ihre Bestandteile zerlegt (Hotchkiss et al. 2009).

Über die Bedeutung der Autophagie für den Zelltod wird in der Literatur nach wie vor kontrovers diskutiert (Levine & Yuan 2005). Strittig ist, ob dieser Prozess eine Zelle in einen Caspasen-unabhängigen Zelltod, dem die Charakteristika einer Apoptose fehlen, führen kann. Die in manchen sterbenden Zellen auftretende, erhöhte Anzahl an Apoptosomen kann als Ursache des Zelltodes betrachtet werden. Alternativ ist dies möglicherweise lediglich ein Zeichen für einen gescheiterten Versuch das Überleben durch Opferung von Zellorganellen zu sichern. Vor diesem Hintergrund sollte daher eher von einem Autophagie-assoziierten, als von einem Autophagie-induzierten Zelltod gesprochen werden (Kroemer et al. 2009).

1.3.4 Andere Formen des Zelltodes

Neben der Apoptose, der Nekrose und dem Autophagie-assoziierten Zelltod gibt es weitere, z. T. sehr spezielle Formen des Zelltodes, die aufgrund von morphologischen oder molekularen Gegebenheiten nicht zur Gänze mit den klassischen, vorangehend beschriebenen Formen übereinstimmen. Diese Formen werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Einen Überblick gibt die Arbeit von Kroemer et al. (2009).

1.3.5 Herzinsuffizienz und Zelltod

Die Beteiligung des Zelluntergangs am Umbauprozess und der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie ist in der Fachliteratur unstrittig. Die Meinungen divergieren allerdings bei der Frage nach den zugrunde liegenden pathophysiologischen Prozessen und der Art des Zelltodes, die eine Insuffizienz hervorrufen sollen. Abhängig von der Grunderkrankung können die Abläufe, die zu den Umbauprozessen führen, sehr unterschiedlich sein (Hasenfuss 1998). Dementsprechend werden in der Literatur verschiedene Formen des Zelltodes beschrieben, die an der Entwicklung einer Herzinsuffizienz beteiligt sein können.

Beispielsweise können chronisch erhöhte Katecholaminwerte einen progredienten Zelltod im Rahmen der Entwicklung einer Herzinsuffizienz hervorrufen.

Eine Verbindung zwischen β_1 -adrenerger Überstimulation und der Apoptose wurde nachgewiesen (Asai et al. 1999). Nach Adrenalingabe konnte aber auch eine erhöhte Nekroserate im Herzgewebe beschrieben werden (Goldspink, Burniston & Tan 2003). Erwähnenswert ist hierbei die zeitliche Diskrepanz zwischen diesen beiden Prozessen. Nach Katecholamingabe lässt sich nach 3 bis 6 Stunden ein Apoptosemaximum nachweisen, während eine vermehrte Nekrose erst ca. 18 Stunden später auftritt. Beide Formen des Zelltodes finden sich im Subendokard rund 10-mal häufiger als im Subepikard (Goldspink, Burniston & Tan 2003). Diese Beobachtung könnte auf den erhöhten Sauerstoffverbrauch und die schlechte koronare Versorgung in diesem Bereich zurückzuführen sein. Die mit den erhöhten Katecholaminwerten einhergehenden erhöhten Zytokinwerte (wie z.B. von TNF- α) können zu einer erhöhten Apoptoserate beitragen. Dabei bewirkt TNF- α nicht ausschließlich eine Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden, sondern kann diese bei Bindung an bestimmte Rezeptoren auch verhindern (Hehlgans & Pfeffer 2005). Die alternative Bindung von TNF- α an andere Rezeptoren führt dagegen zur Nekrose der Zelle (Vandenabeele et al. 2010).

Eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase, wie sie im Rahmen einer CPVT oder einer Herzinsuffizienz auftritt, stellt eine weitere Form der Dysbalance dar, an der Kardiomyozyten zugrunde gehen können. Hierbei kann abhängig von der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und dem Ca^{2+} -Gehalt im SR sowohl die Apoptose als auch die Nekrose initiiert werden (siehe Kapitel 1.3.2 Nekrose).

Bei erniedrigten SR- Ca^{2+} -Speichern und einer erhöhten zytosolischen diastolischen Ca^{2+} -Konzentration kann jedoch von einem durch Apoptose bedingten Prozess ausgegangen werden (siehe Kapitel 1.3.1 Apoptose).

Bei chronischer Druckbelastung muss ebenfalls mit einer vermehrten Apoptose gerechnet werden, da hier die Bax-Expression erhöht und die Bcl-2-Expression erniedrigt ist (Condorelli et al. 1999). Ebenso konnte gezeigt werden, dass verstärkt BH3-only-Proteine Nix und Bnip3 expremiert werden (Galvez et al. 2006), was in der Summe die Vulnerabilität der Zelle gegenüber apoptotischen Stimuli erhöht.

Nach dem heutigen Erkenntnisstand spielt die Apoptose, anders als während der kardialen Entwicklung, keine physiologische Rolle in Kardiomyozyten des normalen, erwachsenen Herzens (Fisher, Langille & Srivastava 2000). Das Verhältnis apoptotischer Zellen zu normalen Zellen wird im erwachsenen, gesunden Herzen in der Literatur mit ca. 1 zu 10.000 angegeben (Dorn 2009). Auch bei mit der Apoptose assoziierten, kardialen Erkrankungen wie der ischämischen und dilatativen Kardiomyopathie bleibt das Verhältnis in der Regel unter einem Prozent (Kang, Izumo 2000). Wencker et al. (2003) gehen sogar von noch niedrigeren Werten aus, da sie im Mausmodell zeigten, dass ein Verhältnis von ca. 2 zu 10000 bereits ausreicht, um ein Herz in eine tödliche dilatative Kardiomyopathie zu führen. Sie definieren das Verhältnis 1 zu 100.000 als physiologische Apoptoserate im gesunden Herzen der Maus.

1.4 Arbeitsgrundlage

Das RyR2^{R4496C^{+/-}}-knock-in-Mausmodell zeigt analog zur erworbenen Herzinsuffizienz einen erhöhten Ca²⁺-Transport aus dem SR über den RyR2 und bietet sich daher als Modell für die Erforschung der pathophysiologischen Mechanismen dieser Erkrankung an. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob das SR-Ca²⁺-Leck lediglich ein Epiphänomen ist, oder ob es einen unabhängigen, kausalen Faktor bei der Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz darstellt.

1.4.1 RyR2^{R4496C^{+/-}}-knock-in-Mausmodell

Das RyR2^{R4496C^{+/-}}-knock-in stellt ein Modell dar, bei welchem eine humane, genetisch determinierte Fehlfunktion der RyR2 (R4496C^{+/-}), die beim Menschen eine CPVT verursacht, in Mäuse eingebaut wurde. Dieses CPVT-Modell ist daher phänotypisch der Klinik von RyR2^{R4496C^{+/-}}-positiven Patienten sehr ähnlich. Es finden sich vermehrt Arrhythmien, insbesondere bidirektionale und polymorphe ventrikuläre Tachykardien, und DAD bei verschiedenen Belastungsprotokollen (Liu et al. 2006). Die R4496C-Mutation befindet sich am C-terminalen Ende des Rezeptors, das in das Zytosol ragt. Sie liegt nahe

der Bindungsdomäne für die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der RyR2, was die Sensibilität gegenüber Kalziumionen erhöht. Dieses Mausmodell weist auch Katecholamin-unabhängig eine signifikant erhöhte Aktivität des RyR2 in Anwesenheit eines erhöhten SR- Ca^{2+} -Gehalts auf (Sedej et al. 2010), welche jedoch unter β_1 -adrenerger Stimulation weiter erhöht werden kann (Fernandez-Velasco et al. 2009). Anders als bei anderen RyR2-Mutationen (Lehnart et al. 2006) kommt es unter Adrenalingabe nicht zu einer pathologischen Kalstabin2-Dissoziation vom RyR2 (Liu et al. 2006). Es muss daher die gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit unter β_1 -adrenerger Stimulation auf anderen molekularen Mechanismen beruhen. Eine mögliche Erklärung ist die PKA-bedingte Phosphorylierung von PLN und damit eine erhöhte SERCA-Aktivität, die zu einer Ca^{2+} -Überladung im SR und somit zu einem „store overload-induced calcium release“ (SOICR) führt. Die Erklärung für einen nachweislich herabgesetzten SR- Ca^{2+} -Gehalt der knock-in-Mäuse liegt möglicherweise in der konstitutiv erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 (Fernandez-Velasco et al. 2009). Der Vollständigkeit halber sei angemerkt, dass andere Autoren keine Unterschiede bei der basalen Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2^{R4496C+/-} finden oder keine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2^{R4496C+/-}, verglichen mit dem Wildtyp (WT), nachweisen können (Kashimura et al. 2010). Es wird jedoch über eine erhöhte Aktivität bei einer SR- Ca^{2+} -Überladung berichtet (George, Higgs & Lai 2003).

1.4.2 Transverse Aortenkonstriktion (TAC) in RyR2^{R4496C+/-}-Mäusen

Die TAC dient der Induktion einer linksventrikulären Druckbelastung des Herzens und simuliert eine Aortenstenose. Die Folge ist eine druckinduzierte, linksventrikuläre Hypertrophie. Die Nachlasterrhöhung führt zur Induktion von Stressereignissen im ER, was die Apoptoserate im Herzen während des Übergangs von einer Hypertrophie zu einer Insuffizienz deutlich erhöhen kann (Okada et al. 2004).

In einer vorangegangenen Studie wurden drei Wochen nach einem TAC-Eingriff, bzw. nach einer Sham-Operation bei RyR2^{R4496C+/-}- und WT-Mäusen das Körper-, Herz- und Lungengewicht sowie die Länge der linken Tibia erfasst. Darüber hinaus wurde der Anteil an fibrotischem Herzgewebe bestimmt.

Die Ergebnisse deuteten auf verstärkte Umbauprozesse und auf eine beschleunigte Entwicklung und Progression einer Herzinsuffizienz der heterozygoten Herzen unter Druckbelastung hin. Zwischen den genotypisch unterschiedlichen Sham-Gruppen konnten

keine Unterschiede in der Herzmasse, dem Lungengewicht oder der Fibroserate festgestellt werden (Sedej, Walther & Schmidt unpub.).

Folglich führt das diastolisch erhöhte SR-Ca²⁺-Leck, bedingt durch die RyR2^{R4496C+/-}-Mutation, zum gegebenen Zeitpunkt und bei Vorhandensein des zusätzlichen Faktors Druck, im Sinne einer linksventrikulären Druckbelastung zu einer Progression der Herzinsuffizienz.

1.5 Hypothese

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob das RyR2^{R4496C+/-}-bedingte SR-Ca²⁺-Leck bei Druckbelastung des Herzens die Apoptoserate im Herzgewebe erhöht und dadurch zur beschleunigten Entwicklung der Herzinsuffizienz führt.

Hierzu wurden WT- und heterozygote RyR2^{R4496C+/-}-Mäuse einer TAC- oder Sham-Operation unterzogen. Nach sechs Wochen wurden die Herzen explantiert, in 5 µm Gefrierschnitte prozessiert und mittels konfokaler Mikroskopie auf „Terminal deoxynucleotidyl transferase-(TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling“-(TUNEL)-positive Zellkerne untersucht.

2. Material und Methoden

Für die vorliegende Untersuchung wurden Mäuse der Linie C57B6 verwendet (Körpergewicht: Weibchen = 21 +/- 1 g; Männchen = 24 +/- 1 g). Sowohl Kardiomyozyten von WT- (RyR2^{R4496C^{-/-}}) als auch von heterozygoten R4496C-knock-in-Mäusen (RyR2^{R4496C^{+/-}}) wurden in die Untersuchung einbezogen.

Beide Gruppen wurden in zwei Subgruppen unterteilt, wovon je eine Subgruppe einer TAC- und die andere Subgruppe jeweils als Kontrollgruppe einer Schein-Operation (Sham) unterzogen wurde.

Sechs Wochen nach diesen Eingriffen wurden die Herzen explantiert. Es wurde das Feuchtgewicht der Herzen erfasst. Die Aorta wurde retrograd mit 25 mM KCl-Normaltyrode perfundiert und anschließend wurden die Herzen für 30 Sekunden in 2-methylbutan eingelegt. Die Vorhöfe sowie der Apex cordis wurden abgesetzt und die weitere Aufbewahrung erfolgte in Stickstoffgefrierbehältern bei -196 Grad Celsius. Neben dem Herzgewicht wurden auch das Lungengewicht, das Lebergewicht und die Länge der linken Tibia erfasst.

Es wurden insgesamt 13 Herzen untersucht. Pro Herz wurden fünf Gefrierschnitte angefertigt. Pro Schnitt wurden nach entsprechenden Färbungen 12 „regions of interest“ (ROI) mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. Durchschnittlich konnten je ROI 92 Kerne erfasst werden, so dass insgesamt 72.652 Kerne beurteilt wurden.

2.1 Geräte, Materialien und Reagenzien

Durchlichtmikroskop, Olympus BX41	Olympus (J)
Konfokales Mikroskop, LSM 510	Carl Zeiss (D)
Kryotom, Microm HM 560	Microm (D)
Kryotom Messer, Accu-Edge: Low profile Baldes	Sakura (USA)
Kryotom Compound, Tissue-Tek: OTC Compound	Sakura (USA)
DAPI, ProLong Gold antifade reagent	Invitrogen (USA)
DNase I	Roche (D)
TUNEL, In Situ Cell Death detection Kit, TMR red	Roche (D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma (D)
Formaldehyd	Sigma (D)

Natriumcitrat	Sigma (D)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma (D)
Triton X-100	Sigma (D)
HCl 25%	Merck (D)
KCl	Merck (D)
NaOH	Merck (D)
Excel	Microsoft (USA)
ImageJ	National Institutes of Health (USA)
LSM 510 Meta 3.2 Software	Carl Zeiss (D)
LSM 510 Viewer	Carl Zeiss (D)

2.2 Methoden

2.2.1 Transverse Aortenkonstriktion (TAC) und Sham-Operation

Bei dem hier zur Anwendung gekommenen Verfahren wurde unter Isofluran-Narkose nach Eröffnung des Brustkorbs die Aorta transversa zwischen dem Truncus brachiocephalicus und der linken Arteria carotis communis nach Vorlage einer 27-Gauge-Nadel mit einem nichtresorbierbaren 5-0 Seidenfaden ligiert. So durchgeführt, führte die TAC zu einer 65-70-prozentigen Stenose der Aorta im Bereich des Arcus aortae (Rockman et al. 1991).

Durch diesen Eingriff bei WT-Mäusen und bei heterozygoten RyR2^{R4496C/+}-knock-in-Mäusen konnte die Bedeutung der Faktoren Druckbelastung und diastolisches SR-Ca²⁺-Leck sowohl alleine als auch in Kombination im Hinblick auf die Progression einer Herzinsuffizienz untersucht werden.

Bei der Sham-Operation wurde der Brustraum eröffnet und anschließend wieder verschlossen, ohne dass die Konstriktion der Aorta vorgenommen wurde. Dieser Eingriff wurde durchgeführt, um die Mäuse einem vergleichbaren Stressfaktor auszusetzen, ohne die nachhaltige Druckbelastung zu induzieren und so eine besser vergleichbare Kontrollgruppe zu schaffen.



Abbildung 8: Darstellung der Aorta (Latexinjektion) nach TAC- (links) und Sham-Operation (rechts). Nach dem Entfernen der Ligatur kann deutlich die Konstriktion der Aorta zwischen dem Truncus brachiocephalicus und der linken Arteria carotis communis gesehen werden (Pfeilspitze). Abgeändert nach Vorlage von (Hu et al. 2003).

2.2.2 Schnittvorbereitung

Die tiefgefrorenen Mauserherzen wurden mit dem Kryotom (Microm HM 560, D) auf eine Schichtdicke von fünf Mikrometern prozessiert. Die Messertemperatur betrug hierbei gleichbleibend -18 Grad Celsius, während die Objekttemperatur bei -20 Grad Celsius lag. Es wurden pro Herz fünf Schnitte aus der Papillarmuskel-Ebene des linksventrikulären Myokards angefertigt und in bis zu drei Schnitten auf je einen Objektträger aufgetragen. Nach einer Kontrolle der Präparate auf Unversehrtheit via Durchlichtmikroskopie (Olympus BX 41, J) erfolgte eine luftdichte Aufbewahrung der Schnitte bis zur Weiterprozessierung bei -20 Grad Celsius (max. 24 h).

2.2.3 TUNEL-Färbung und DAPI

Zur Detektion potenziell apoptotischer Zellen wurde eine Färbung der Gefrierschnitte mit dem „In Situ Cell Death detection Kit, TMR red.“ (TUNEL Assay; Roche, D) durchgeführt. Die Visualisierung von DNA und somit von Zellkernen erfolgte mittels DAPI, ProLong Gold Antifade (Invitrogen, USA).

TUNEL-Färbung

Grundlagen

Der 'Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labelling'-Assay (TUNEL Assay oder TUNEL-Färbung) basiert auf der Markierung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA und wird als Kit zur Detektion und Quantifikation von Apoptoseereignissen vertrieben. Die Apoptose führt über verschiedene Mechanismen zur Fragmentierung von Kern-DNA (Kapitel 1.3.1). Das Enzym TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) katalysiert die Bindung des Rhodamin-markierten Deoxyribonucleotids dUTP (Desoxy-Uridintriphosphat) an die bei den Strangbrüchen entstehenden 3'OH-Enden der DNA (Gavrieli, Sherman & Ben-Sasson 1992). Diese Reaktion ermöglicht indirekt die Visualisierung von DNA-Brüchen durch die Detektion emittierten Lichtes einer Wellenlänge von 580 nm nach gezielter Anregung des Rhodamins mit einer Wellenlänge von 540 nm.

Färbeprotokoll

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden pro Gruppe drei Herzen, also 15 Schnitte und eine Positivkontrolle zusammen mit zwei Negativkontrollen (Ansatz ohne TdT) prozessiert. Die Positivkontrolle diente dem Nachweis der Wirksamkeit der TUNEL-Färbung. Hierfür wurden in einem Schnitt mittels DNase I künstlich DNA-Brüche herbeigeführt, bevor der Schnitt entsprechend des Protokolls weiterbehandelt wurde. Daneben wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, um Artefakte, die möglicherweise bei der Behandlung entstehen, zu detektieren.

Falls die Gefrierschnitte zwischengelagert wurden, wurden diese vor Beginn der Bearbeitung langsam über 20 Minuten in einem leicht humiden Klima wieder auf Raumtemperatur gebracht.

Die nachfolgende Fixierung des Gewebes erfolgte 20 min lang in 4% Formaldehyd, welches vorab mit HCl oder NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 titriert wurde. Anschließend wurden die Schnitte 30 min auf einem Wippschüttler in PBS gewaschen.

Während dieser Zeit wurde die Lösung zur Permeabilisierung der Zellen vorbereitet. Es wurden 0,1 g Triton X-100 (100 µl) in 100 ml 0,1% Na-Citrat gelöst und im Kühlraum auf eine Temperatur von 4 Grad Celsius gekühlt. In dieser Lösung wurden die Schnitte zwei Minuten lang zur Permeabilisierung auf einem Wippschüttler geschwenkt. Nach der

Permeabilisierung wurden die Schnitte zweimal in PBS gewaschen und 10 min bei Raumtemperatur abgedeckt getrocknet.

Zur Herstellung der Positivkontrolle wurde 1 ml 50 mM Tris-HCl-Lösung mit 1,5 mg DNase I zu einer DNase I-Lösung vermengt. Von dieser Lösung wurden 10 µl mit 990 µl (= 1:100) der 50 mM Tris-HCl-Lösung und 1 mg BSA vermischt. Dies entsprach einer Lösung mit einer DNase I-Aktivität von 30 U/ml. 50 µl der DNase I-Lösung wurden auf den dafür vorgesehenen Schnitt aufgetragen und als Positivkontrolle 10 min bei Raumtemperatur zur Inkubation belassen.

Die nachfolgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt, um ein Bleichen des Farbstoffes und somit eine Beeinträchtigung der späteren Resultate zu vermeiden.

Es wurden zunächst zweimal 50 µl der im TUNEL Assay-Kit enthaltenen „Label Solution“ (ohne „Enzyme Solution“) auf zwei Schnitte eines Objektträgers aufgetragen, welche als Negativkontrolle ebenfalls 10 min inkubiert wurden.

Die restlichen 450 µl der Label Solution wurden mit 50 µl der Enzyme Solution vermischt. Davon wurden anschließend je 30 µl pro Schnitt auftragen. Dabei wurden die Negativkontrollen ausgespart, der als Positivkontrolle vorbehandelte Schnitt wurde jedoch mitprozessiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass vorab die DNase I-Lösung durch Pipettieren entfernt wurde. Nachfolgend wurden alle Schnitte abgedeckt und für 60 min bei 37 Grad Celsius in einem Brutschrank belassen. Nach dieser Zeit (die Objektträger sollten noch leicht feucht sein) wurden die Schnitte abschließend dreimal in PBS gewaschen.

Dieses Protokoll orientierte sich an den Vorgaben des Herstellers (Roche Applied Science 2006). Anstatt der vorgeschlagenen 50 µl pro Schnitt wurden 30 µl der Label/Enzyme-Solution-Mischung aufgetragen. Diese Menge reicht für suffiziente Färbungen völlig aus und erlaubt die Färbung von 16 anstatt von 10 Schnitten mit einer „TUNEL reaction mixture“.

DAPI-Färbung

Grundlagen

DAPI bindet vorzugsweise an AT-Basenpaare von Doppelstrang-DNA (Kubista, Akerman & Norden 1987). Die entstehenden Komplexe ermöglichen nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 385 nm (Maximum) die Darstellung von Zellkernen bei einer Fluoreszenzemission bei 461 nm (Molecular Probes 2006). Neben der DNA-Komplexierung vermag DAPI auch an RNA zu binden (Tanious et al. 1992). Hier liegt das

Emissionsmaximum jedoch im Bereich einer Wellenlänge von zirka ~500 nm (Kapuscinski 1990).

Färbeprotokoll

Die Färbung mit DAPI erfolgt direkt im Anschluss an die TUNEL-Färbung. Nach einem Waschschrift in PBS wurde die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgetupft und pro Objektträger wurden 40 µl der vorab langsam auf Raumtemperatur gebrachten Reagenzlösung aufgetragen. Danach wurden die Deckgläser unter Vermeidung einer Luftblasenbildung auf die Objektträger platziert und die Schnitte wurden für 24 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen. Nach dieser Zeitspanne wurden die Deckgläser mit Aceton luftdicht verschlossen.

Die fertig prozessierten und versiegelten Präparate können für einige Monate im Dunkeln bei +4 oder bei -20 Grad Celsius gelagert werden (Molecular Probes 2009).

2.2.4 Detektion und Analyse

Konfokale Mikroskopie

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten mit einem LSM 510 Meta-Konfokalmikroskop (Carl Zeiss, D). Die konfokale Mikroskopie erlaubt, das zu betrachtende Gewebe optisch in verschiedenen Tiefen zu schneiden. Dadurch wird eine genaue Evaluierung der Signalkongruenz von Rhodamin und DAPI möglich. Signalüberlagerungen durch Fluoreszenz aus tieferen Gewebeschichten können vermieden werden.

Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe wurde für DAPI eine Diode mit einer Wellenlänge von 405 nm und für Rhodamin ein Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 543 nm genutzt. Die Aufnahme des emittierten Lichtes der Wellenlängen 580 nm (Rhodamin) und 461 nm (DAPI) erfolgte mit einem 40 x Plan-Neo/1.3 NA Öl-Immersionsobjektiv. Die Aperturblende wurde auf 1 „Airy Unit“ eingestellt. Für alle Aufnahmen wurden folgende Einstellungen verwendet:

Tabelle 1: Einstellungen im LSM 510 Meta 3.2: Die nachfolgend aufgelisteten Einstellungen wurden für alle Aufnahmen beibehalten.

	DAPI	Rhodamin
Aperturblende (=1)	< 0,7 μm	< 1,0 μm
Laserstärke	6 %	6 %
Filter	LP 420	LP 560
Bildgröße (Pixel)	1024 x 1024	1024 x 1024
Averaging	4	4

Vor den jeweiligen Aufnahmen wurden die annähernd kreisförmigen Schnitte durch Markierungen in zwölf etwa gleich große Abschnitte unterteilt.

Entsprechend dieser Markierungen wurden pro Schnitt zwölf Regionen (ROI) aufgenommen. Jede Region umfasste eine Fläche von 230 μm x 230 μm und beinhaltete durchschnittlich 92 Kerne. Es wurden von jeder Region zwei Aufnahmen mit einer Farbtiefe von 8 bit angefertigt. Eine Aufnahme erfolgte nach der Anregung von DAPI und eine nach der Anregung von Rhodamin. Die Regionen wurden zufällig ausgewählt, waren jedoch auf das linksventrikuläre Myokard beschränkt.

Die Auswertung der erstellten Aufnahmen erfolgte sowohl optisch (qualitativ) als auch quantitativ mit dem Bildanalyseprogramm ImageJ (National Institutes of Health, USA). Alle Aufnahmen wurden entsprechend identischer, nachfolgend beschriebener Kriterien analysiert.

ImageJ

Die Auswertung der konfokalen Fluoreszenzaufnahmen mit ImageJ v1.42 erfolgte mit vorab festgelegten Kriterien, nach welchen das Programm die zu zählenden Objekte (die fluoreszierenden Kerne) katalogisierte und auf bestimmte morphologische Kriterien untersuchte. Die vorgenommenen Programmeinstellungen im Sinne von Einschlusskriterien beinhalteten eine minimale Objektfläche von mind. 50 Pixel (11,2 μm^2), eine „Rundheit“ der Kerne von mind. 0,4 (wobei 1 ein perfekter Kreis sei) und eine Mindestintensität der Fluoreszenz. Bei einer Farbtiefe der 8 bit-Aufnahmen von 256 wurden nur Objekte mit einer Intensität von mehr als 50 berücksichtigt. Von jeder Region wurden nach Prozessierung die Originalbilder, die Umrisszeichnungen mit entsprechender Kernnummerierung sowie die zu den Nummern gehörenden Flächen und Rundheitsgrade

(„Circularity“) gespeichert, um positiv gewertete Kerne klar zuordnen zu können (siehe Abbildung 9).

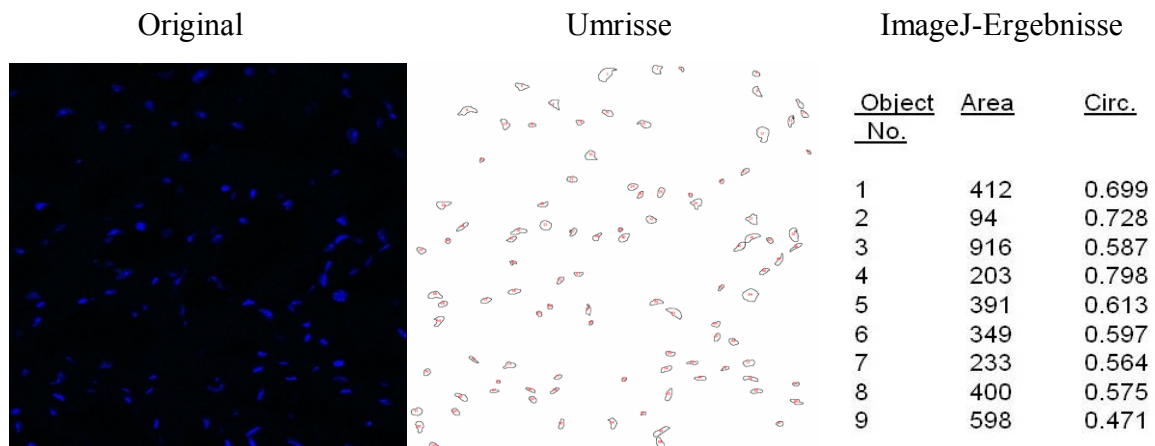


Abbildung 9: Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen. Zur Datensicherung wurden stets die Originalaufnahme (links) mit dem dazugehörigen Abbild der Kernumrisse (Mitte) gespeichert. Die Kernumrisse wurden inklusive ihrer Fläche und ihres Rundheitsgrads (rechts) archiviert.

Optische Analyse

In der optischen Analyse wurde die Signalkongruenz der Aufnahmen jeder Region überprüft. Waren Rhodamin- und DAPI-Signal eines Kernes völlig deckungsgleich, galt der Kern als TUNEL-positiv und wurde in die Wertung aufgenommen. Ebenso wurden Kerne als TUNEL-positiv gewertet, deren Rhodamin-Signal auf die Fläche der DAPI-Fluoreszenz beschränkt war, diese jedoch nicht völlig bedeckte, sich aber mindestens über 30% der Fläche erstreckte (im Sinne einer beginnenden Apoptose). Ausgenommen wurden Rhodamin-Signale, die nicht mit der DAPI-Fluoreszenz korrelierten oder deckungsgleich waren, da ein positiver DNA-Nachweis zwingende Voraussetzung für die Akzeptanz eines Signals ist, das einem DNA-Strangbruch entsprechen soll. Die Auswahl erfolgte durch Analyse der jeweiligen Einzelaufnahmen und der dazugehörigen „Overlay“-Aufnahme einer Region (siehe Abbildung 10).

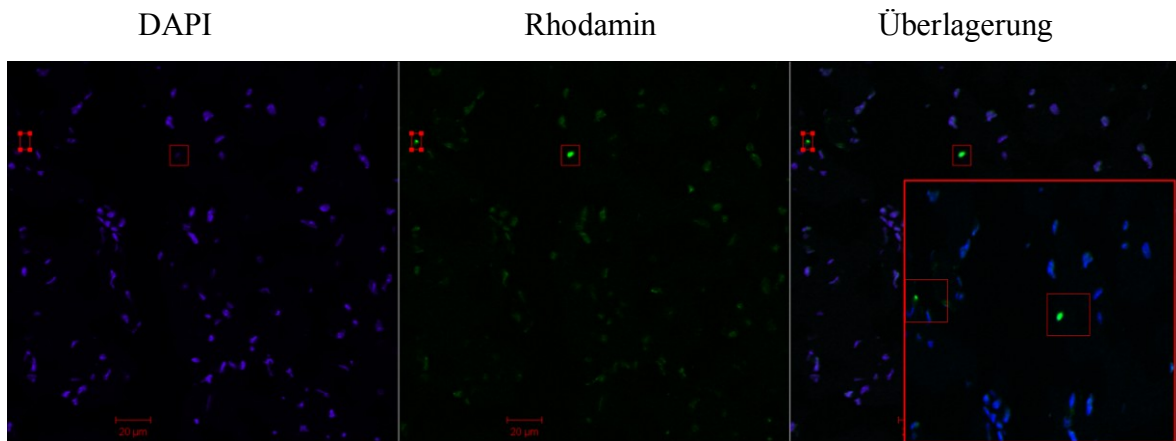


Abbildung 10: Auswahl der TUNEL-positiven Kerne. Markierungen einzelner Kerne erleichtern die vergleichende Analyse der Aufnahmen einer Region. Die linke Rhodamin-Fluoreszenz (in den Aufnahmen rot umrahmt) wurde aufgrund von mangelnder Signalkongruenz ausgeschlossen (fehlendes DAPI-Signal in der linken Aufnahme). Der rechte Kern konnte aufgrund der absoluten Deckungsgleichheit der DAPI- und Rhodamin-Signale als TUNEL-positiv gewertet werden (vergrößerte Darstellung im rechten Bild). Durch Setzen einer unteren Analyseschwelle (Wegschneiden von Signalintensitäten unterhalb eines bestimmten Grenzwertes) wurden Artefakte exkludiert und nicht in die Auswertung einbezogen (schwach fluoreszierende Kerne in der mittleren Aufnahme).

2.2.5 Statistische Methoden

Den statistischen Berechnungen lag eine Einteilung in die Gruppen WT-Sham, WT-TAC, RyR2^{R4496C+/-}-Sham und RyR2^{R4496C+/-}-TAC zugrunde.

Für die Auswertung der Rhodamin-positiven Kerne wurden die Herzen der jeweiligen Gruppen zusammengefasst (pooling).

Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test ($P < 0,05$), der für Stichproben mit einem Umfang von $N < 50$ dem gängigeren Kolmogorov-Smirnov-Test überlegen ist.

Die Verteilung der Daten wurde mittels deskriptiver Statistik ausgedrückt: Mittelwert (MW), Standardfehler des Mittelwerts (engl. standard error, SE), Standardabweichung (engl. standard deviation, SD). Die Mittelwerte, die Standardfehler der Mittelwerte sowie die Häufigkeitsverteilungen wurden mit einem Fehlerbalkendiagramm bzw. mit einer „Box-Plot-Analyse“ dargestellt.

Zur Bestimmung der Signifikanz von Mittelwertunterschieden wurde für normalverteilte Daten der Mann-Whitney-U-Test ($P < 0,05$) und für nicht-normalverteilte Daten der Kruskal-Wallis-H-Test (ANOVA on ranks) durchgeführt ($P < 0,05$).

Auf einen Paarvergleich wurde im Rahmen der Analyse der gravimetrischen Daten aufgrund der fehlenden statistischen Aussagekraft bei Stichproben mit $N < 5$ verzichtet (Bortz 2005).

3. Ergebnisse

3.1 Gravimetrie

Die WT- und RyR2^{R4496C+/-}-Mäuse wurden alternativ einer TAC- oder Sham-Operation unterzogen (siehe Kapitel 2.2.1 Transverse Aortenkonstriktion (TAC) und Sham-Operation). 42 Tage nach der Operation wurden das Körpergewicht, das Herz-, Leber- und Lungengewicht sowie die Länge der linken Tibia bestimmt. Tabelle 2 zeigt die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Tabelle 2: Körpergewicht, Herzgewicht, Lungengewicht, Lebergewicht und Tibialänge der WT- und RyR2^{R4496C+/-}-Mäuse nach TAC- oder Sham-Operation. Deskriptive Statistik (Mittelwert, Standardabweichung, und Standardfehler des Mittelwerts) sowie Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung ($P < 0,05$). Mit einem $P > 0,05$ (rot) ist von einer Normalverteilung der Daten in der jeweiligen Gruppe auszugehen.

	Genotyp und Eingriff	N	MW	SD	SE	Shapiro-Wilk-Test		
						Statistik	df	Signifikanz
Körpergewicht (g)	WT-Sham	4	25,6	3,2	1,6	,815	4	,132
	WT-TAC	10	24,4	1,7	,5	,931	10	,459
	RyR2 ^{R4496C+/-} -Sham	3	24,5	1,0	,6	,899	3	,382
	RyR2 ^{R4496C+/-} -TAC	11	23,7	2,2	,7	,919	11	,308
Herzgewicht, feucht (mg)	WT-Sham	4	162,5	48,1	24,1	,727	4	,023
	WT-TAC	10	261,1	96,0	30,4	,942	10	,572
	RyR2 ^{R4496C+/-} -Sham	3	213,3	62,8	36,2	,913	3	,430
	RyR2 ^{R4496C+/-} -TAC	11	268,5	99,2	29,9	,883	11	,114
Lungengewicht, trocken (mg)	WT-Sham	4	45,8	5,9	3,0	,915	4	,507
	WT-TAC	10	76,0	47,4	15,0	,849	10	,056
	RyR2 ^{R4496C+/-} -Sham	3	50,7	11,7	6,8	,881	3	,328
	RyR2 ^{R4496C+/-} -TAC	11	81,8	42,8	12,9	,763	11	,003
Lebergewicht, feucht (mg)	WT-Sham	4	1049,3	215,8	107,9	,947	4	,698
	WT-TAC	10	1061,0	221,1	69,9	,943	10	,588
	RyR2 ^{R4496C+/-} -Sham	3	1210,0	177,0	102,2	1,000	3	,981
	RyR2 ^{R4496C+/-} -TAC	11	1052,5	162,6	49,0	,958	11	,744
Tibialänge (mm)	WT-Sham	4	17,3	,4	,2	,871	4	,304
	WT-TAC	10	17,4	,3	,1	,940	10	,548
	RyR2 ^{R4496C+/-} -Sham	3	17,4	,4	,2	,980	3	,726
	RyR2 ^{R4496C+/-} -TAC	11	17,4	,2	,1	,957	11	,736

Mit einem Testergebnis von $P > 0,05$ ist von einer Normalverteilung der Daten in der jeweiligen Gruppe auszugehen. Somit sind die Daten fast aller hier untersuchten Gruppen (mit Ausnahme des Lungengewichts der RyR2^{R4496C+/-}-Mäuse nach TAC) normalverteilt.

3.1.1 Normierung von Herz und Lungengewicht

Weiter wurden die auf das Körpergewicht oder die Tibialänge normierten Herz- und Lungengewichte der untersuchten Tiere bestimmt und mittels deskriptiver Statistik beschrieben (siehe Tabelle 3). Alle Verhältnisse bis auf das Verhältnis von Lungengewicht zu Körpergewicht der RyR2^{R4496C+/-}-TAC-Gruppe und das Lungengewicht zu Tibialänge der RyR2^{R4496C+/-}-TAC-Gruppe zeigten eine Normalverteilung.

Tabelle 3: Verschiedene Gewichts- und Längenverhältnisse der WT- und RyR2^{R4496C+/-}-Mäuse nach TAC- oder Sham-Operation. Deskriptive Statistik (Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts) sowie Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung ($P < 0,05$). Mit einem $P > 0,05$ (rot) ist von einer Normalverteilung der Daten der jeweiligen Variable auszugehen.

Genotyp und Eingriff		N	MW	SD	SE	Shapiro-Wilk-Test		
						Statistik	df	Signifikanz
Herz- gewicht/ Körper- gewicht (mg/g)	WT-Sham	4	6,3	1,5	,7	,987	4	,943
	WT-TAC	10	10,7	3,9	1,2	,924	10	,393
	RyR2 ^{R4496C+/-} -Sham	3	8,7	2,2	1,3	,951	3	,573
	RyR2 ^{R4496C+/-} -TAC	11	11,5	4,6	1,4	,890	11	,137
Herz- gewicht/ Tibia- länge (mg/mm)	WT-Sham	4	9,5	3,1	1,5	,733	4	,027
	WT-TAC	10	15,0	5,6	1,8	,945	10	,610
	RyR2 ^{R4496C+/-} -Sham	3	12,3	3,6	2,1	,872	3	,302
	RyR2 ^{R4496C+/-} -TAC	11	15,5	5,7	1,7	,877	11	,094
Lungen- gewicht/ Körperge- wicht (mg/g)	WT-Sham	4	1,8	,2	,1	,968	4	,832
	WT-TAC	10	3,2	2,1	,7	,840	10	,044
	RyR2 ^{R4496C+/-} -Sham	3	2,1	,4	,2	,888	3	,347
	RyR2 ^{R4496C+/-} -TAC	11	3,5	2,1	,6	,743	11	,002
Lungen- gewicht/ Tibia- länge (mg/mm)	WT-Sham	4	2,6	,3	,2	,948	4	,705
	WT-TAC	10	4,4	2,8	,9	,838	10	,042
	RyR2 ^{R4496C+/-} -Sham	3	2,9	,7	,4	,929	3	,486
	RyR2 ^{R4496C+/-} -TAC	11	4,7	2,5	,7	,765	11	,003

3.1.2 Einfluss des Eingriffs auf die Gewichts- und Längenvariablen

Im Folgenden wurde untersucht, ob die TAC- im Vergleich zur Sham-Operation einen Einfluss auf die Organgewichte und die jeweiligen Verhältnisse zum Körpergewicht oder der Tibialänge hat (siehe Tabelle 4). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen Sham und TAC sprechen für eine hämodynamische Auswirkung des Eingriffs und somit für eine erfolgreich durchgeführte TAC.

Tabelle 4: Einfluss der Art des Eingriffs (TAC oder Sham) auf die Organgewichte sowie die Gewichts- und Längenvariablen innerhalb der WT- und RyR2^{R4496C+/−}-Mäuse. Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der durch die Gruppenvariable Eingriff bedingten, Unterschiede ($P < 0,05$). Mit einem Testergebnis von $P < 0,05$ ist in Abhängigkeit vom Eingriff von signifikanten Unterschieden zwischen den Variablen auszugehen.

	Mann-Whitney-U	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Körpergewicht (g)	56,000	,353
Herzgewicht, feucht (mg)	31,500	,026
Lungengewicht, trocken (mg)	33,500	,034
Lebergewicht, feucht (mg)	55,000	,326
Tibialänge (mm)	67,500	,748
Herzgewicht/Körpergewicht (mg/g)	30,000	,021
Herzgewicht/Tibialänge (mg/mm)	34,000	,036
Lungengewicht/Körpergewicht (mg/g)	29,000	,018
Lungengewicht/Tibialänge (mg/mm)	36,500	,050

Die Art des Eingriffs zeigte signifikante Auswirkungen auf die Variablen Herzgewicht, Lungengewicht sowie deren Normierung auf das Körpergewicht und die Länge der linken Tibia ($P < 0,05$). Das Körpergewicht selbst, die Tibialänge und das Lebergewicht wurden nicht durch die Art des Eingriffs beeinflusst.

Die Abbildung 11 zeigt graphisch die in Tabelle 3 berechneten Unterschiede zwischen den Datenverteilungen der jeweiligen Gruppen.

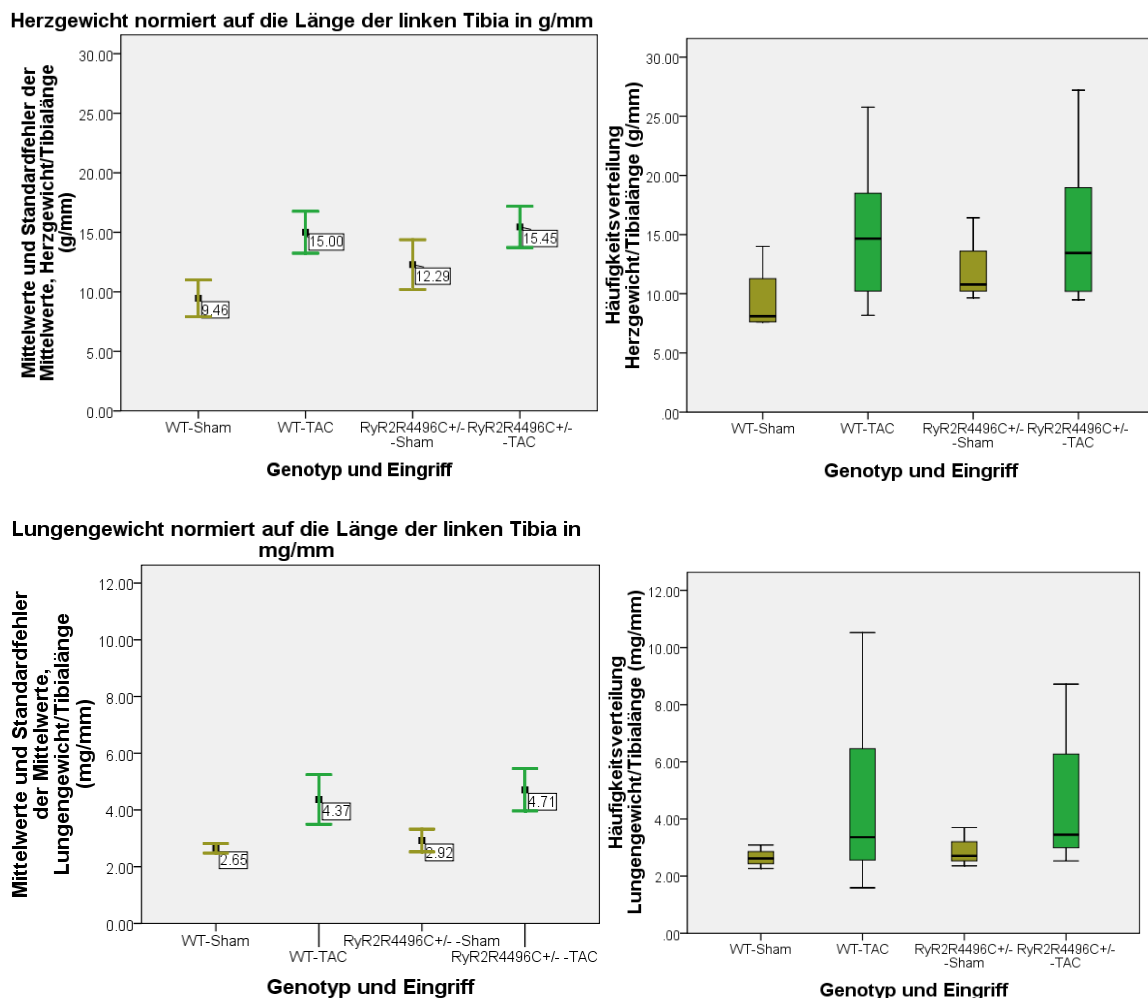


Abbildung 11: Mittelwerte mit Standardfehlern (links) und Häufigkeitsverteilung (rechts) der Variablen Herzgewicht/Tibiallänge (oben) sowie Lungengewicht/Tibiallänge (unten) der jeweiligen Gruppen. Die jeweils linke Abbildung zeigt die Mittelwerte mit Standardfehlern (+/- SE) der einzelnen Gruppen. Rechts sind die Häufigkeitsverteilungen in Form einer Box-Plot-Analyse dargestellt. Der Strich in der jeweiligen Box stellt den Median, die Box-Grenzen das 25–75%-Perzentil und die Querbalken oben und unten die Extremwerte der Gruppen dar.

Während in den WT-Gruppen eine relativ homogene Verteilung der Daten auffällt, sind die TAC-Gruppen durch höhere Mittelwerte aber auch durch eine höhere Streuung der Daten gekennzeichnet. Wie aus der Abbildung 11 und der Tabelle 4 hervorgeht, finden sich signifikante Unterschiede zwischen Herz- und Lungengewicht sowie zwischen den entsprechenden Normierungen in Abhängigkeit von dem jeweilig durchgeführten Eingriff (Herzgewicht durch Länge der linken Tibia ($P = 0,036$), Lungengewicht durch Länge der linken Tibia ($P = 0,050$)).

3.1.3 Einfluss des Genotyps auf die Gewichts- und Längenvariablen

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss des Genotyps (WT oder RyR2^{R4496C+/-}) der Mäuse auf die Organgewichte und deren Normierung untersucht (siehe Tabelle 5). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen würden für einen unabhängigen Einfluss des Genotyps auf die Organgewichte sprechen.

Tabelle 5: Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen den Organgewichten in Abhängigkeit von der Gruppenvariable Genotyp ($P < 0,05$): Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen WT und RyR2^{R4496C+/-} nachgewiesen werden.

	Mann-Whitney-U	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Körpergewicht (g)	79,000	,383
Herzgewicht (mg)	79,500	,395
Lungengewicht, trocken (mg)	74,000	,270
Lebergewicht (mg)	93,000	,818
Tibiallänge (mm)	91,500	,763
Herzgewicht/Körpergewicht (mg/g)	76,000	,312
Herzgewicht/Tibiallänge (mg/mm)	78,000	,358
Lungengewicht/Körpergewicht (mg/g)	72,500	,241
Lungengewicht/Tibiallänge (mg/mm)	73,000	,250

Ein Vergleich der von der Gruppenvariable Genotyp abhängigen Variablen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Der Genotyp der Mäuse hatte also keine Auswirkung auf die Organgewichte und die entsprechenden Normierungen.

Die Statistik hierzu kann im Rahmen der im Anhang vollständig dargelegten Auswertungen nachvollzogen werden.

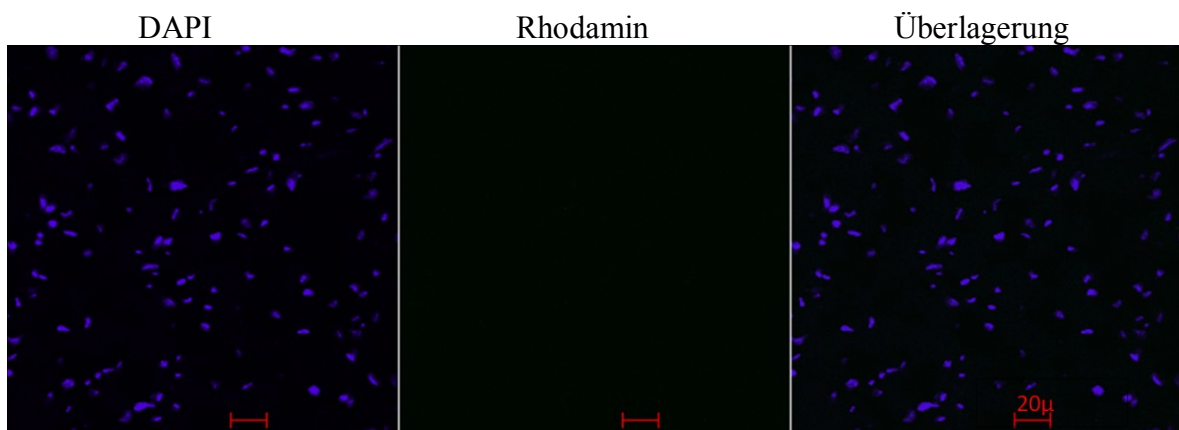
Wie vorangehend beschrieben (siehe Kapitel 2.2.5 Statistische Methoden), wurde auf einen Paarvergleich der einzelnen Gruppen verzichtet, da der Stichprobenumfang der Gruppen WT-Sham (N = 4) und RyR2^{R4496C+/-}-Sham (N = 3) mit $N < 5$ zu klein war, als dass statistisch eine Aussage zu diesen Gruppen getroffen werden könnte oder die Gruppen einzeln mit anderen Gruppen verglichen werden könnten.

3.2 Häufigkeit von DNA-Strangbrüchen in den Gruppen

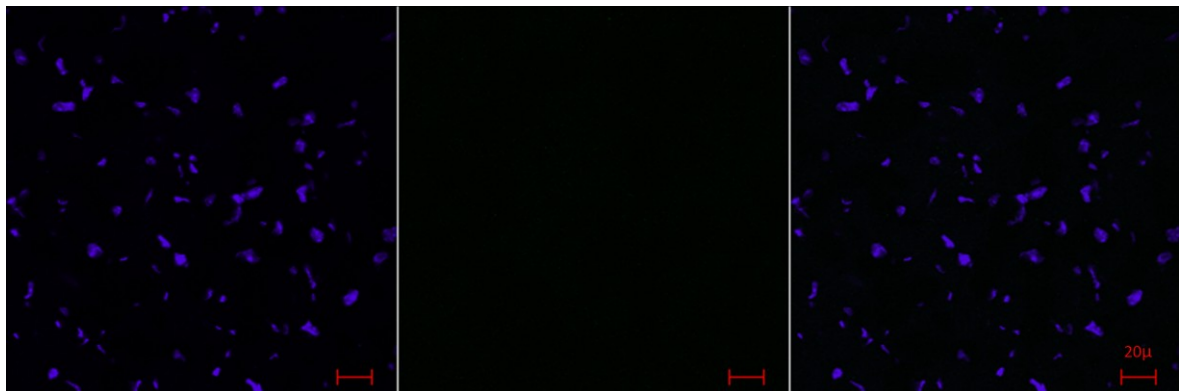
3.2.1 Konfokale Aufnahmen

Die Gefrierschnitte der jeweiligen Gruppen (WT-Sham, WT-TAC, RyR2^{R4496C+/-}-Sham und RyR2^{R4496C+/-}-TAC) wurden mit einer TUNEL- und einer DAPI-Fluoreszenzfärbung angefärbt, um die DNA sowie die DNA-Strangbrüche in den Herzmuskelzellen zu markieren (siehe Kapitel 2.2.3 TUNEL-Färbung und DAPI). Die Färbungen wurden mittels verschiedener Laser und konfokaler Mikroskopie sichtbar gemacht und als digitale Bilder archiviert (siehe Kapitel 2.2.4 Detektion und Analyse). Die Abbildung 12 zeigt beispielhaft Aufnahmen zufällig ausgewählter Regionen aus dem Bereich des linksventrikulären Herzmuskels der verschiedenen Gruppen. Die DAPI-Färbung ist hier links zu sehen. In der Mitte angeordnet sind die Aufnahmen der Rhodamin-Färbungen für DNA-Strangbrüche, während rechts die Überlagerung beider Aufnahmen zur Überprüfung der Signalkongruenz zu finden ist.

WT-Sham



WT-TAC



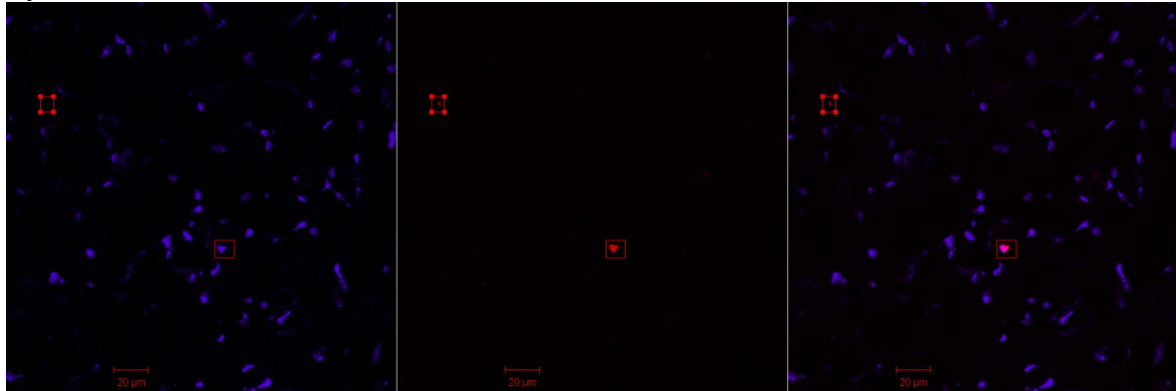
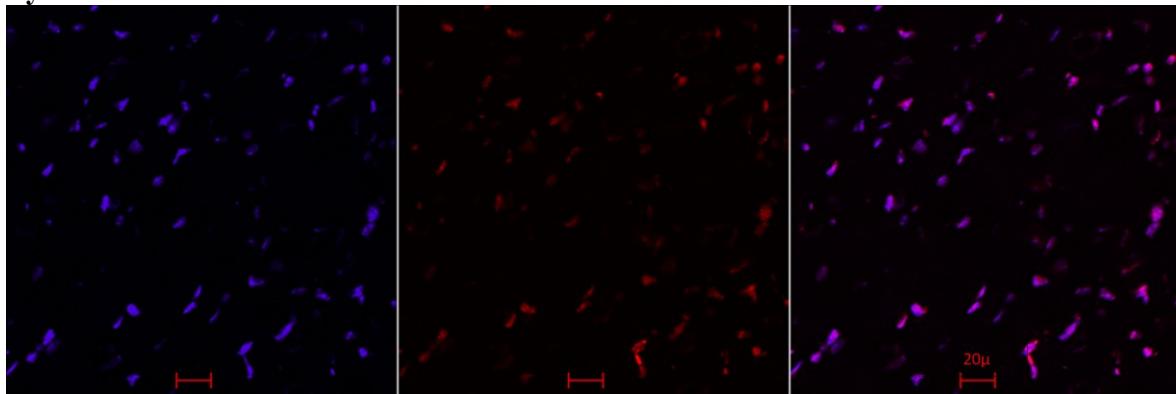
RyR2^{R4496C+/-}-Sham**RyR2^{R4496C+/-}-TAC**

Abbildung 12: Konfokale Aufnahmen der Kern-DNA der verschiedenen Gruppen und der jeweiligen DNA-Brüche: DAPI-Färbung der Kern-DNA (links), Rhodamin-Färbungen von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Mitte) und die Überlagerung beider Aufnahmen zur Prüfung der Signalkongruenz (rechts). Während in den WT-Gruppen selten Rhodamin-positive Kerne gefunden werden, imponieren vor allem in der Gruppe RyR2^{R4496C+/-}-TAC vermehrte Rhodamin-Signale.

Die DAPI-Aufnahmen zeigen über alle Gruppen hinweg eine starke Färbung der Kern-DNA. Die Kerne sind scharf begrenzt und die Bilder weisen nahezu keine Hintergrundfluoreszenz auf. Auf den hier abgebildeten Aufnahmen sind in den Gruppen WT-Sham und WT-TAC keine Rhodamin-Signale und somit keine DNA-Strangbrüche zu sehen. Aus diesem Grund sind auf den zusammengesetzten Bildern rechts nur DAPI-Fluoreszenzen sichtbar. In den RyR2^{R4496C+/-}-Sham Aufnahmen imponieren zwei Rhodamin-Signale. Das linke, mit verstärkten Ecken markierte, Rhodamin-Signal weist in der DAPI-Aufnahme keine dazugehörige Fluoreszenz auf, so dass von einem Artefakt und nicht von einem DNA-Bruch auszugehen ist. Das rechte Rhodamin-Signal hingegen weist ein entsprechendes DAPI-Signal auf und ist in der überlappenden Aufnahme strikt auf dessen Fläche begrenzt. Dieses Signal wird als DNA-Bruch interpretiert und in die Analyse einbezogen. Die hier abgebildete Rhodamin-Aufnahme der Gruppe RyR2^{R4496C+/-}-TAC zeigt multiple, über das Bild verteilte Fluoreszenzsignale. Da hier die Analyse der Deckungsgleichheit der Signale in der überlappenden Aufnahme erschwert ist, wurden nur

Fluoreszenzen mit einer bestimmten Signalstärke und entsprechender Deckungsgleichheit in die Auswertung aufgenommen (siehe Kapitel 2.2.4 Detektion und Analyse).

3.2.2 Statistische Auswertung der Häufigkeit von DNA-Strangbrüchen

Die Rhodamin-positiven Kerne wurden rechnerisch in Beziehung zu den DAPI-Fluoreszenzen gesetzt (Rhodamin-positive Kerne pro 100.000 DAPI-Kerne), um die relative Häufigkeit der DNA-Strangbrüche pro Gruppe (WT-Sham, WT-TAC, RyR2^{R4496C+/-}-Sham und RyR2^{R4496C+/-}-TAC) zu bestimmen. Die ermittelten Werte wurden mittels deskriptiver Statistik beschrieben und mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung der Daten überprüft ($P < 0,05$) (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Deskriptive Statistik und Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung des Anteils an Rhodamin-positiven Kernen. Mit $P < 0,05$ in allen Gruppen ist von einer fehlenden Normalverteilung der Daten auszugehen.

Genotyp und Eingriff	N	MW	SD	SE	Shapiro-Wilk-Test		
					Statistik	df	Signifikanz
WT-Sham	15	,000375	,000594	,000153	,681	15	,000
WT-TAC	15	,000451	,000621	,000160	,732	15	,001
RyR2 ^{R4496C+/-} -Sham	15	,001139	,003061	,000790	,408	15	,000
RyR2 ^{R4496C+/-} -TAC	15	,001729	,004034	,001042	,508	15	,000

Bei dieser Analyse fiel auf, dass die Mittelwerte aber auch die Standardabweichungen der heterozygoten Gruppen höher waren als in den WT-Gruppen. Die Datensätze sind also im Vergleich zu den WT-Gruppen ungleichmäßiger verteilt. Dem entsprechend lag mit $P < 0,05$ in keiner der vier Gruppe eine Normalverteilung vor.

Abbildung 13 zeigt die Mittelwerte der einzelnen Gruppen als Fehlerbalkendiagramm und die Häufigkeitsverteilung der Daten als Box-Plot-Analyse.

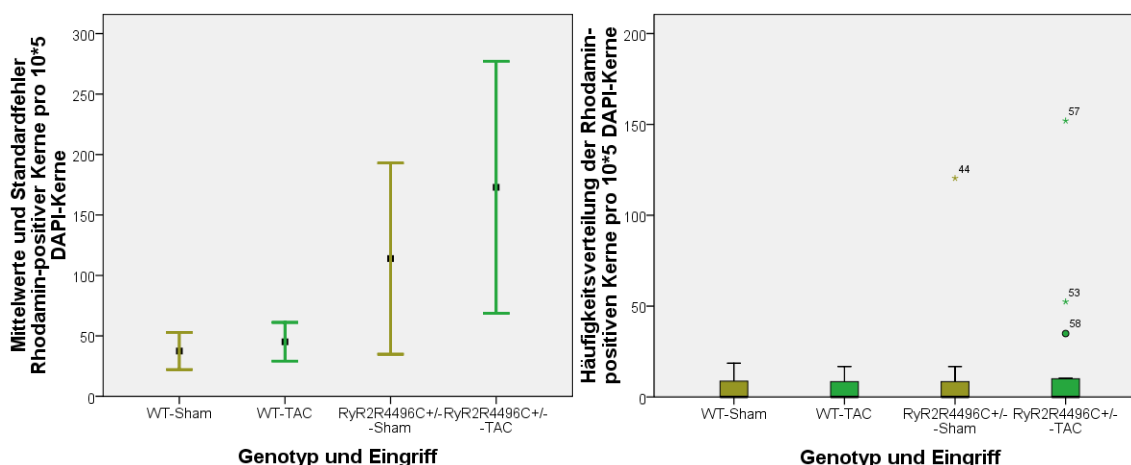


Abbildung 13: Mittelwerte mit Standardfehlern (links) und Häufigkeitsverteilung der Rhodamin-positiven Kerne pro 100.000 DAPI-positiven Kerne (rechts), differenziert nach Genotyp und Eingriff: Der Anstieg der Mittelwerte der Rhodamin-positiven Kerne in den RyR2^{R4496C+/-}-Gruppen (links) wird durch die hohen Standardfehler der Mittelwerte (+/- SE) (links) und in der Darstellung der Häufigkeitsverteilungen (rechts) durch einige hochabweichende Werte in den heterozygoten Gruppen erklärt.

Die im Fehlerbalkendiagramm der Abbildung 13 (links) augenscheinlich erhöhten Mittelwerte der RyR2^{R4496C+/-}-Gruppen wurden zum einen durch die hohen Standardfehler und zum anderen in der Box-Plot-Analyse (rechts) durch einige hochabweichende Werte erklärt. Im Hinblick auf die 25%- und 75%-Perzentile (Boxgrenzen) waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen (WT-Sham, WT-TAC, RyR2^{R4496C+/-}-Sham und RyR2^{R4496C+/-}-TAC) erkennbar.

Aufgrund einer fehlenden Normalverteilung der Rhodamin-positiven Kerne in allen vier Gruppen ($P < 0,05$) wurde zur Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Kruskal-Wallis-H-Test durchgeführt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Kruskal-Wallis-H-Test (ANOVA on ranks): Mit einem $P = 0,984$ liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen WT-Sham, WT-TAC, RyR2^{R4496C+/-}-Sham und RyR2^{R4496C+/-}-TAC vor.

Chi-Quadrat	,161
df	3
Asymptotische Signifikanz	,984

Der Kruskal-Wallis-H-Test ergab mit $P = 0,984$ ein Fehlen signifikanter Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen WT-Sham, WT-TAC, RyR2^{R4496C+/-}-Sham und RyR2^{R4496C+/-}-TAC. Das Vorhandensein von Unterschieden in den DNA-Bruchraten ist somit unwahrscheinlich, da eine zufällige Verteilung der Daten nicht ausgeschlossen werden kann.

4. Diskussion

4.1 Gravimetrie

Mit einem Testergebnis von $P < 0,05$ kann davon ausgegangen werden, dass das Herz- und Lungengewicht der Versuchstiere durch den vorgenommenen Eingriff beeinflusst wurde. Die im Vergleich zu den Gewichten nach einer Sham-Operation erhöhten Organgewichte nach einer TAC sind als Folge der druckbedingten Kardiomyopathie mit Hypertrophie, Linksherzinsuffizienz und Rückstau des zirkulierenden Blutes in die Lungen zu interpretieren. Dies zeigt, dass die TAC erfolgreich durchgeführt wurde und die Versuchstiere sich sechs Wochen nach dem Eingriff in einem fortgeschrittenen Stadium der Linksherzinsuffizienz befanden. Die fehlenden Unterschiede beim Gewicht der Leber zwischen den Gruppen können durch die zu diesem Zeitpunkt noch erhaltene Rechtsherzfunktion erklärt werden. Damit liegt keine Globalinsuffizienz, sondern lediglich eine späte Linksherzinsuffizienz vor.

Mit einem $P > 0,05$ wurden keine Unterschiede in den Organgewichten zwischen den Genotypen beobachtet (siehe Tabelle 4). Die heterozygoten Mäuse ($RyR2^{R4496C+/-}$) wiesen aufgrund des Genotyps keine höhere Organmasse verglichen mit den WT-Tieren auf. Die Tabelle 15 des Anhangs zeigt für die Quotienten aus Herzgewicht zu Körpergewicht ($P = 0,082$) und Lungengewicht zu Körpergewicht ($P = 0,088$) mit einem Testergebnis von $P < 0,1$ eine Tendenz zu signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen WT-Sham, WT-TAC, $RyR2^{R4496C+/-}$ -Sham und $RyR2^{R4496C+/-}$ -TAC. Mit dem Blick auf die einzelnen Gruppen WT-Sham und $RyR2^{R4496C+/-}$ -Sham wären also Unterschiede möglich. Dies müsste jedoch nochmal im Rahmen eines höheren Stichprobenumfangs überprüft werden (siehe Kapitel 2.2.5 Statistische Methoden).

4.2 Apoptoserate

Die statistische Auswertung der TUNEL-Färbung der beiden Genotypen unter TAC- oder Sham-Bedingungen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der jeweiligen Gruppen. Das Fehlerbalkendiagramm lässt augenscheinlich einen Trend im Sinne eines Anstiegs der Rhodamin-positiven Kerne in den heterozygoten Gruppen vermuten (Abbildung 13 links). Die Box-Plot-Analyse (Abbildung 13 rechts) zeigt jedoch, dass dieser Anstieg auf einige hochabweichende Werte zurückzuführen ist, und dass sich das 75%-Perzentil aller vier Gruppen im Bereich von zirka 10 Rhodamin-positiven Kernen auf 100.000 DAPI-Kerne bewegt. Mit dieser Häufigkeit liegen die Ergebnisse im Bereich der physiologischen Apoptoserate in gesunden humanen Herzen (Dorn 2009) aber etwas über der von Wencker et al. (2003) postulierten Rate von 1 zu 100.000 in Maus Herzen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem SR-Ca²⁺-Leck und Apoptose kann daher sechs Wochen nach Induktion einer Druckbelastung nicht hergestellt werden. Die möglichen Ursachen für die fehlenden Unterschiede zwischen den Gruppen werden nachfolgend diskutiert.

4.3 Potentielle Einflussfaktoren auf die Resultate

Die fehlende Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen im Hinblick auf die Mittelwerte der Häufigkeiten Rhodamin-positiver Kerne kann verschiedene Ursachen haben, die im Weiteren genauer analysiert werden:

1. Das zur Detektion gewählte Verfahren kann für die Fragestellung ungeeignet sein.
2. Die Versuchsanordnung kann durch die festgelegte Struktur oder durch bestimmte Unregelmäßigkeiten dazu beigetragen haben, dass keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisbar sind.
3. Wesentliche Unterschiede können fehlen, da Apoptose keine signifikante Rolle in der Ca²⁺-bedingten Progression der Herzinsuffizienz spielt. Ein anderer pathophysiologischer Mechanismus wie beispielsweise die Nekrose oder die Autophagie steht im Vordergrund.

4.3.1 Beurteilung des TUNEL-Verfahrens

Obwohl die TUNEL-Färbung zunächst als geeignetes Verfahren zur Kenntlichmachung apoptotischer Zellen beschrieben wurde (Sgonc & Gruber 1998), geriet sie im Laufe der Zeit aus verschiedenen Gründen in die Kritik. Das Verfahren besitzt zwar eine hohe Sensitivität für DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, doch können diese auch auf anderen Mechanismen, wie beispielsweise auf Nekrose, DNA-Reparaturprozessen oder Fixierungsschäden beruhen. Da die TUNEL-Färbung zwischen diesen Möglichkeiten nicht unterscheiden kann, ist die Spezifität, mit der sie Apoptoseereignisse nachweist, relativ gering. Ein weiterer Kritikpunkt ist die relativ hohe Zahl falsch-positiver Kerne, welche sich bei den sehr geringen Apoptoseraten limitierend auf die Interpretierbarkeit der Ergebnisse auswirken kann (Kang & Izumo 2000). Der Prozentsatz an falsch-positiven bzw. falsch-negativen Zellkernen hängt im Wesentlichen von der Prozessierung und Färbung der Schnitte ab. Die in der Tabelle 8 aufgelisteten Faktoren können maßgeblichen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

Tabelle 8: Einflussfaktoren und deren potentiell verfälschende Auswirkung auf die Messergebnisse. Abgeändert nach Vorlage von (Krause 2007).

Einflussfaktor	Effekt
Gewebsrandnähe	Randphänomen (Färbefehler)
Gewebsaustrocknung	↑ falsch positive Kerne
DNA-Risse bei der Schnitterstellung	↑ falsch positive Kerne
Inkubationsdauer zu kurz	↑ falsch negative Kerne
Inkubationsdauer zu lang	↑ falsch positive Kerne
Fixierung zu spät	↑ falsch positive Kerne
Fixierung zu kurz	↑ falsch positive Kerne
Fixierung zu lang	↑ falsch negative Kerne
TdT-Konzentration und Reaktionszeit	↑oder↓ Zahl der positiven Kerne

Das NCCD weist darüber hinaus darauf hin, dass die Apoptose ohne oligonukleosomale DNA-Fragmentierung ablaufen kann und daher biochemische Analysen wie DNA-Bruch-Markierungen alleine nicht zur Erfassung dieser Form des Zelltodes ausreichen (Kroemer et al. 2009).

Trotz dieser Einschränkungen stellt die Rhodamin-Färbung ein gutes Verfahren dar, um sich grundlegend einen Überblick über potentiell pathologische Prozesse in Geweben zu verschaffen. Sie ist in der Lage, auch die Nekrose mit DNA-Fragmentierung als mögliche Form des Zelltodes zu detektieren. Obwohl das Verfahren nicht genau zwischen den einzelnen Abläufen unterscheiden kann, dient es der sicheren Erfassung von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Nach einer TUNEL-Färbung als einleitender Analyse können im Sinne eines deduktiven Schlusses in Abhängigkeit von den erzielten Ergebnissen weitere Untersuchungen folgen, um die Form der vorgefundenen Pathologie genauer zu spezifizieren.

Da bei auf intrazellulären Ca^{2+} -Dysregulationen basierenden Prozessen von einer EndoG- und AIF-Aktivierung auszugehen ist (siehe Kapitel 1.3.1 Apoptose), stellt die generelle Möglichkeit einer DNA-Bruch-freien Apoptose bei der vorliegenden Untersuchung keinen Hinderungsgrund zur Verwendung der TUNEL-Färbung dar. Auch die oft kritisierte Anzahl an falsch-positiven und falsch-negativen Kernen kann durch standardisierte Handlungsabläufe, gleichbleibende Analyseprotokolle sowie durch eine genaue optische Kontrolle auf Signalkongruenz auf ein Minimum reduziert werden (siehe Abbildung 10).

Eine Korrektur der absoluten Häufigkeiten kann dann im Rahmen der notwendigen Prozessdifferenzierung durch zusätzliche Analyseverfahren erfolgen.

Die TUNEL-Färbung hat bei der vorliegenden Aufgabenstellung daher durchaus ihre Berechtigung und gilt als ein Goldstandard zur Erfassung von DNA-Strangbrüchen. Eine Verfälschung der Häufigkeitsunterschiede ist durch dieses Verfahren bei präziser Vorgehensweise und Kenntnis potentieller Fehler (siehe Tabelle 8) nicht zu erwarten.

4.3.2 Beurteilung des Versuchsaufbaus

Die randomisierte Auswahl der ROI, wie sie in dieser Studie angewandt wurde, kann möglicherweise zu einer erhöhten Streuung der Apoptoseraten zwischen den einzelnen Regionen führen. Ursache dafür ist die Beobachtung, dass Apoptoseraten zwischen dem Subendokard und dem Subepikard um den Faktor zehn variieren können (Goldspink, Burniston & Tan 2003). Je nach Auswahl der Regionen aus dem Bereich des linksventrikulären Herzmuskels unterliegen diese somit den entsprechenden Schwankungen in den Häufigkeiten der Rhodamin-positiven Kerne. Um hohe Schwankungen zwischen den ROI zu vermeiden, wurden pro Gruppe 180 Regionen ausgewertet. Diese verhältnismäßig hohe Zahl sollte lokal auftretende

Häufigkeitsunterschiede statistisch nivellieren. Die Streuung kann jedoch grundsätzlich die Inhomogenität der Häufigkeitsverteilungen verstärken.

Großen Einfluss auf die detektierbare Apoptoserate hat der Zeitpunkt, an dem das jeweilige Gewebe auf pathologische Prozesse untersucht wird. Die TUNEL-Färbung stellt eine Momentaufnahme eines mehr oder weniger kontinuierlichen Prozesses dar. Im Rahmen dieses Prozesses existieren sowohl für die Apoptose als auch für die Nekrose bestimmte Intervalle, in denen nach einem bestimmten Stimulus ein temporärer Anstieg der jeweiligen Form des Zelltodes nachgewiesen werden kann (Goldspink, Burniston & Tan 2003). Aufgrund der hohen Geschwindigkeit, mit der die Apoptose abläuft (Melino 2001), kann es problematisch sein, diesen Zeitpunkt genau einzugrenzen.

Eine TAC setzt mit der Druckbelastung einen kontinuierlichen, pathologischen Stimulus, der vier Wochen nach der Intervention durch eine erhöhte Rate an Rhodamin-positiven Zellen beantwortet wird (Okada et al. 2004). Verlaufsbeobachtungen haben gezeigt, dass die erhöhte Rate an Rhodamin-positiven Zellen in WT-TAC-Mäusen im Vergleich zu WT-Sham-Mäusen 4 Wochen nach der Operation Signifikanz erreicht, kontinuierlich ansteigt und in Woche 16 zirka um das 60-fache erhöht ist, bevor die Tiere dann versterben. Mit einer signifikanten Erhöhung des Herzgewichts ist bei den Tieren ebenfalls ab der vierten Woche zu rechnen, Unterschiede im Lungen- und Lebergewicht wurden im Schnitt ab Woche 16 beobachtet (Li et al. 2009). Die von PD. Dr. rer. nat. S. Sedej erhobenen Daten (siehe Kapitel 1.4.2 Transverse Aortenkonstriktion (TAC) in $RyR2^{R4496C+/-}$ -Mäusen) konnten belegen, dass bei den $RyR2^{R4496C+/-}$ -Mäusen bereits 3 Wochen nach einer TAC das Herz- und Lungengewicht signifikant erhöht ist. Die Versuchstiere befinden sich also bereits nach 3 Wochen in einem Stadium der Herzinsuffizienz, das bei WT-TAC-Mäusen erst nach zirka 12-16 Wochen erreicht wird. Der Analysezeitpunkt von sechs Wochen nach der jeweiligen Operation wurde zum einen so gewählt, um in der Kontrollgruppe sicher eine erhöhte Rate an Rhodamin-positiven Kernen nachweisen zu können und zum anderen, um eine späte Form der Herzinsuffizienz erforschen zu können. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten gravimetrischen Analysen zeigten kein erhöhtes Lebergewicht der TAC-Mäuse im Vergleich zu den Sham-Tieren (siehe Tabelle 4), so dass davon auszugehen ist, dass die Tiere in den Wochen 3-6 in einem Stadium der späten Linksherzinsuffizienz verblieben, dass dem der WT-Mäuse 12-16 Wochen nach der TAC entspricht. Da zu diesem Zeitpunkt bei den WT-TAC-Tieren ein maximaler Anstieg der Apoptoserate beobachtet wurde, war davon auszugehen, dass die $RyR2^{R4496C+/-}$ -Mäuse ähnlich reagieren würden. Diese Vermutung wurde insofern nicht bestätigt, als dass keine

signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt wurden. Die erfassten Häufigkeiten waren bis auf einige wenige, stark abweichende Werte in allen vier Gruppen relativ ähnlich (siehe Abbildung 13 rechts) und lagen mit einem Hauptteil der Daten (Box-Plot) im Bereich von zirka 10 Rhodamin-positiven Kernen auf 100.000 DAPI-Kerne. Grundsätzlich kann dieses Ergebnis durch den spät gewählten Analysezeitpunkt erklärt werden, doch ist es aufgrund des Vergleichs mit den Verlaufsbeobachtungen der WT-TAC-Mäuse unwahrscheinlich, dass die pathologischen Prozesse im Herzen bereits abgeschlossen waren. Viel wahrscheinlicher ist, dass aufgrund der zusätzlichen Ca^{2+} -Dysregulation die Zellen nach transverser Aortenkonstriktion nicht mehr in der Lage sind, auf diesen pathologischen Stimulus mit Apoptose zu reagieren und einer anderen Form des Zelltodes, wie beispielsweise der Nekrose, zum Opfer fallen.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend kann die TUNEL-Färbung als gutes Verfahren zur Quantifizierung von DNA-Brüchen beschrieben werden. Zur Spezifizierung einer vorgefundenen Pathologie sollten jedoch ergänzende Verfahren zum Einsatz kommen. Komplementär bieten sich Methoden an, die nicht auf dem Nachweis von DNA-Bruchstellen basieren. Es könnten beispielsweise „Caspase-Assays“ oder Immunoblots zum Einsatz kommen. Die hierfür empfohlenen Verfahren werden vom NCCD zusammenfassend dargestellt (Kroemer et al. 2009).

Wie vorangehend beschrieben, konnten im Rahmen der untersuchten, späten Form der Herzinsuffizienz keine Unterschiede in den Häufigkeiten Rhodamin-positiver Zellen festgestellt werden. Dieser Befund schließt eine kausale Beteiligung der Apoptose an der Progredienz der späten Herzinsuffizienz bei zusätzlicher $\text{RyR2}^{\text{R4496C}/-}$ -Mutation aus. Grundsätzlich ist eine Beteiligung der Apoptose am Fortschreiten einer Herzinsuffizienz jedoch, beispielsweise in früheren Phasen, möglich (Okada et al. 2004), so dass die Progression einer Herzinsuffizienz als Abfolge verschiedener Formen von Zelltod zu verstehen wäre. Ausschlaggebend für die jeweilige Form von Zelltod im Herzen scheinen hauptsächlich der Füllungsgrad der ATP-Speicher und die Schwere der Ca^{2+} -Dysregulation zu sein. Aufgrund des Vergleichs der gravimetrischen Daten von $\text{RyR2}^{\text{R4496C}/-}$ - und WT-Mäusen nach einer TAC und im Hinblick auf die zu erwartende Anzahl an apoptotischen Zellen liegt jedoch der Verdacht nahe, dass Apoptose bei diesem Ryanodin-Rezeptor-Defekt keine Rolle bei der Progredienz der Herzinsuffizienz spielt. Vor diesem

Hintergrund wäre die Nekrose als Form des Zelltodes bei schweren zellulären Ca^{2+} -Dysregulationen denkbar. Da die TUNEL-Färbung eine Nekrose mit DNA-Brüchen zu diesem Zeitpunkt ausschließt, sollten sich weitere Untersuchungen auf die Evaluation einer DNA-Bruch-freien Nekrose konzentrieren. Diese Form des Zelltodes sollte verifiziert werden, um die späte Transformation des Herzmuskels bei einer $\text{RyR2}^{\text{R4496C+/-}}$ -Mutation im Rahmen einer Herzinsuffizienz abschließend zu verstehen. Die hierfür aktuell gängigen Methoden werden ebenfalls vom NCCD zusammengefasst (Kroemer et al. 2009).

Weiterhin wären in weiterführenden Experimenten auch für $\text{RyR2}^{\text{R4496C+/-}}$ -Mäuse Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion einer Druckbelastung wünschenswert, um durch mehrere Momentaufnahmen näherungsweise die Kontinuität des Prozesses der Nekrose (vielleicht auch in frühen Phasen der Apoptose) zu rekonstruieren. Da, wie vorangehend beschrieben, bei einem SR-Ca^{2+} -Leck die Progression der Herzinsuffizienz zirka doppelt so schnell abläuft wie ohne dieses Leck, sollten bei zusätzlicher Druckbelastung durch eine TAC relativ kurze Beobachtungsintervalle gewählt werden, um die Stärke des Anstiegs, aber auch das Maximum der jeweiligen Form des Zelltodes richtig zu erfassen. Die Rekonstruktion des zeitlichen Verlaufs und die Analyse der Form des Zelltodes zu den einzelnen Zeitpunkten könnte helfen, die Art und die Geschwindigkeit der Progression der Herzinsuffizienz bei einer zusätzlichen $\text{RyR2}^{\text{R4496C+/-}}$ -Mutation zu objektivieren. Darüber hinaus könnte mit einer derartigen Analyse der Zeitpunkt genauer definiert werden, zu dem unter kontrollierten Bedingungen die Transformation zur Gewebsfibrose abgeschlossen ist. Dies wäre von therapeutischem Nutzen, da man so den Zeitpunkt eines potentiellen pharmakologischen Eingriffs optimieren könnte.

5. Literaturverzeichnis

- Abraham, M.C. & Shaham, S. 2004, "Death without caspases, caspases without death", *Trends in cell biology*, vol. 14, no. 4, pp. 184-193.
- Adams, J.M. & Cory, S. 2007, "Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential", *Current opinion in immunology*, vol. 19, no. 5, pp. 488-496.
- Asai, K., Yang, G.P., Geng, Y.J., Takagi, G., Bishop, S., Ishikawa, Y., Shannon, R.P., Wagner, T.E., Vatner, D.E., Homcy, C.J. & Vatner, S.F. 1999, "Beta-adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic G(salpa) mouse", *The Journal of clinical investigation*, vol. 104, no. 5, pp. 551-558.
- Bers, D.M. 2002, "Cardiac excitation-contraction coupling", *Nature*, vol. 415, no. 6868, pp. 198-205.
- Bortz, J. (ed) 2005, *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*, 6th edn, Springer, Heidelberg.
- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M. & Shore, G.C. 2003, "Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways", *Oncogene*, vol. 22, no. 53, pp. 8608-8618.
- Cerrone, M., Colombi, B., Santoro, M., di Barletta, M.R., Scelsi, M., Villani, L., Napolitano, C. & Priori, S.G. 2005, "Bidirectional ventricular tachycardia and fibrillation elicited in a knock-in mouse model carrier of a mutation in the cardiac ryanodine receptor", *Circulation research*, vol. 96, no. 10, pp. e77-82.
- Chacko, K.A. 1995, "AHA Medical/Scientific Statement: 1994 revisions to classification of functional capacity and objective assessment of patients with diseases of the heart", *Circulation*, vol. 92, no. 7, pp. 2003-2005.
- Chen, X., Zhang, X., Kubo, H., Harris, D.M., Mills, G.D., Moyer, J., Berretta, R., Potts, S.T., Marsh, J.D. & Houser, S.R. 2005, "Ca²⁺ influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes", *Circulation research*, vol. 97, no. 10, pp. 1009-1017.
- Condorelli, G., Morisco, C., Stassi, G., Notte, A., Farina, F., Sgaramella, G., de Rienzo, A., Roncarati, R., Trimarco, B. & Lembo, G. 1999, "Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat", *Circulation*, vol. 99, no. 23, pp. 3071-3078.
- Crow, M.T., Mani, K., Nam, Y.J. & Kitsis, R.N. 2004, "The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis", *Circulation research*, vol. 95, no. 10, pp. 957-970.
- Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J. 2004, "Cell death: critical control points", *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 205-219.

- Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M.C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J. & Kroemer, G. 2000, "Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis", *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 14, no. 5, pp. 729-739.
- Davis, B.A., Schwartz, A., Samaha, F.J. & Kranias, E.G. 1983, "Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by calcium-calmodulin-dependent phosphorylation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 258, no. 22, pp. 13587-13591.
- Demaurex, N. & Distelhorst, C. 2003, "Cell biology. Apoptosis--the calcium connection", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 300, no. 5616, pp. 65-67.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. 1997, "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases", *Nature*, vol. 388, no. 6639, pp. 300-304.
- Dorn, G.W., 2nd 2009, "Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling", *Cardiovascular research*, vol. 81, no. 3, pp. 465-473.
- Drazner, M.H. 2011, "The progression of hypertensive heart disease", *Circulation*, vol. 123, no. 3, pp. 327-334.
- Eguchi, Y., Shimizu, S. & Tsujimoto, Y. 1997, "Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis", *Cancer research*, vol. 57, no. 10, pp. 1835-1840.
- Eriksson, H., Svardsudd, K., Larsson, B., Ohlson, L.O., Tibblin, G., Welin, L. & Wilhelmsen, L. 1989, "Risk factors for heart failure in the general population: the study of men born in 1913", *European heart journal*, vol. 10, no. 7, pp. 647-656.
- Fabiato, A. 1983, "Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum", *The American Journal of Physiology*, vol. 245, no. 1, pp. C1-14.
- Fatt, P. & Ginsborg, B.L. 1958, "The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres", *The Journal of physiology*, vol. 142, no. 3, pp. 516-543.
- Fernandez-Velasco, M., Rueda, A., Rizzi, N., Benitah, J.P., Colombi, B., Napolitano, C., Priori, S.G., Richard, S. & Gomez, A.M. 2009, "Increased Ca²⁺ sensitivity of the ryanodine receptor mutant RyR2R4496C underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia", *Circulation research*, vol. 104, no. 2, pp. 201-9, 12p following 209.
- Fisher, S.A., Langille, B.L. & Srivastava, D. 2000, "Apoptosis during cardiovascular development", *Circulation research*, vol. 87, no. 10, pp. 856-864.
- Galvez, A.S., Brunskill, E.W., Marreez, Y., Benner, B.J., Regula, K.M., Kirschenbaum, L.A. & Dorn, G.W., 2nd 2006, "Distinct pathways regulate proapoptotic Nix and BNip3 in cardiac stress", *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 3, pp. 1442-1448.

- Gaut, J.R. & Hendershot, L.M. 1993, "The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum", *Current opinion in cell biology*, vol. 5, no. 4, pp. 589-595.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A. 1992, "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation", *The Journal of cell biology*, vol. 119, no. 3, pp. 493-501.
- George, C.H., Higgs, G.V. & Lai, F.A. 2003, "Ryanodine receptor mutations associated with stress-induced ventricular tachycardia mediate increased calcium release in stimulated cardiomyocytes", *Circulation research*, vol. 93, no. 6, pp. 531-540.
- Goldspink, D.F., Burniston, J.G. & Tan, L.B. 2003, "Cardiomyocyte death and the ageing and failing heart", *Experimental physiology*, vol. 88, no. 3, pp. 447-458.
- Gustafsson, A.B. & Gottlieb, R.A. 2007, "Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart", *American journal of physiology. Cell physiology*, vol. 292, no. 1, pp. C45-51.
- Haider, N., Narula, N. & Narula, J. 2002, "Apoptosis in heart failure represents programmed cell survival, not death, of cardiomyocytes and likelihood of reverse remodeling", *Journal of cardiac failure*, vol. 8, no. 6 Suppl, pp. S512-7.
- Hajnoczky, G., Csordas, G., Madesh, M. & Pacher, P. 2000, "Control of apoptosis by IP(3) and ryanodine receptor driven calcium signals", *Cell calcium*, vol. 28, no. 5-6, pp. 349-363.
- Hajnoczky, G., Davies, E. & Madesh, M. 2003, "Calcium signaling and apoptosis", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 304, no. 3, pp. 445-454.
- Hasenfuss, G. 1998, "Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure", *Cardiovascular research*, vol. 37, no. 2, pp. 279-289.
- Hehlgans, T. & Pfeffer, K. 2005, "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games", *Immunology*, vol. 115, no. 1, pp. 1-20.
- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E. & Swanson, P.E. 2009, "Cell death", *The New England journal of medicine*, vol. 361, no. 16, pp. 1570-1583.
- Hu, P., Zhang, D., Swenson, L., Chakrabarti, G., Abel, E.D. & Litwin, S.E. 2003, "Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 285, no. 3, pp. H1261-9.
- Ikeda, S. & Ozaki, K. 1997, "Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum (II)", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 235, no. 2, pp. 291-294.
- Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Hernando, V. & Soler-Soler, J. 2005, "Calpain-mediated impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia", *Circulation research*, vol. 97, no. 5, pp. 465-473.

- Kang, P.M. & Izumo, S. 2000, "Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature", *Circulation research*, vol. 86, no. 11, pp. 1107-1113.
- Kapuscinski, J. 1990, "Interactions of nucleic acids with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes", *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, vol. 38, no. 9, pp. 1323-1329.
- Kashimura, T., Briston, S.J., Trafford, A.W., Napolitano, C., Priori, S.G., Eisner, D.A. & Venetucci, L.A. 2010, "In the RyR2(R4496C) mouse model of CPVT, beta-adrenergic stimulation induces Ca waves by increasing SR Ca content and not by decreasing the threshold for Ca waves", *Circulation research*, vol. 107, no. 12, pp. 1483-1489.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. 1972, "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics", *British journal of cancer*, vol. 26, no. 4, pp. 239-257.
- Kilter, H. & Bohm, M. 2004, "From hypertension to heart failure-a pathophysiological continuum", *Herz*, vol. 29, no. 3, pp. 239-247.
- Klionsky, D.J. 2007, "Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 8, no. 11, pp. 931-937.
- Kockskämper, J. & Heinzl, F. n.d., *CONTICA - Control of Intracellular Calcium and Arrhythmias*, [Online]. Available: <http://www.contica.eu> [2010, Aug].
- Krause, M. 2007, *Apoptose in STH- bildenden Hypophysenadenomen: Korrelation zu morphologischen und klinischen Befunden*, Universität Hamburg, FB Medizin.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. & Nomenclature Committee on Cell Death 2009 2009, "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009", *Cell death and differentiation*, vol. 16, no. 1, pp. 3-11.
- Kroemer, G. & Jaattela, M. 2005, "Lysosomes and autophagy in cell death control", *Nature reviews.Cancer*, vol. 5, no. 11, pp. 886-897.
- Kubista, M., Akerman, B. & Norden, B. 1987, "Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy", *Biochemistry*, vol. 26, no. 14, pp. 4545-4553.
- Kushnir, A., Betzenhauser, M.J. & Marks, A.R. 2010, "Ryanodine receptor studies using genetically engineered mice", *FEBS letters*, vol. 584, no. 10, pp. 1956-1965.
- Lee, Y. & Gustafsson, A.B. 2009, "Role of apoptosis in cardiovascular disease", *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, vol. 14, no. 4, pp. 536-548.

- Leenhardt, A., Lucet, V., Denjoy, I., Grau, F., Ngoc, D.D. & Coumel, P. 1995, "Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients", *Circulation*, vol. 91, no. 5, pp. 1512-1519.
- Lehnart, S.E., Terrenoire, C., Reiken, S., Wehrens, X.H., Song, L.S., Tillman, E.J., Mancarella, S., Coromilas, J., Lederer, W.J., Kass, R.S. & Marks, A.R. 2006, "Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 20, pp. 7906-7910.
- Lehnart, S.E., Wehrens, X.H., Laitinen, P.J., Reiken, S.R., Deng, S.X., Cheng, Z., Landry, D.W., Kontula, K., Swan, H. & Marks, A.R. 2004, "Sudden death in familial polymorphic ventricular tachycardia associated with calcium release channel (ryanodine receptor) leak", *Circulation*, vol. 109, no. 25, pp. 3208-3214.
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S. & Nicotera, P. 1997, "Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis", *The Journal of experimental medicine*, vol. 185, no. 8, pp. 1481-1486.
- Levine, B. & Yuan, J. 2005, "Autophagy in cell death: an innocent convict?", *The Journal of clinical investigation*, vol. 115, no. 10, pp. 2679-2688.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. & Wang, X. 1997, "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade", *Cell*, vol. 91, no. 4, pp. 479-489.
- Li, X.M., Ma, Y.T., Yang, Y.N., Liu, F., Chen, B.D., Han, W., Zhang, J.F. & Gao, X.M. 2009, "Downregulation of survival signalling pathways and increased apoptosis in the transition of pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure", *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, vol. 36, no. 11, pp. 1054-1061.
- Liu, N., Colombi, B., Memmi, M., Zissimopoulos, S., Rizzi, N., Negri, S., Imbriani, M., Napolitano, C., Lai, F.A. & Priori, S.G. 2006, "Arrhythmogenesis in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: insights from a RyR2 R4496C knock-in mouse model", *Circulation research*, vol. 99, no. 3, pp. 292-298.
- Majno, G. & Joris, I. 1995, "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death", *The American journal of pathology*, vol. 146, no. 1, pp. 3-15.
- Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N. & Marks, A.R. 2000, "PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts", *Cell*, vol. 101, no. 4, pp. 365-376.
- McMurray, J.J. & Pfeffer, M.A. 2005, "Heart failure", *Lancet*, vol. 365, no. 9474, pp. 1877-1889.
- Meerson, F.Z. 1962, "Compensatory hyperfunction of the heart and cardiac insufficiency", *Circulation research*, vol. 10, pp. 250-258.

- Melino, G. 2001, "The Sirens' song", *Nature*, vol. 412, no. 6842, pp. 23.
- Molecular Probes, I. 2009, , *ProLong® Gold and SlowFade® Gold Antifade Reagent* [Homepage of Invitrogen], [Online]. Available: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp36930.pdf> [2009, Sept].
- Molecular Probes, I. 2006, *DAPI Nucleic Acid Stain* [Homepage of Invitrogen], [Online]. Available: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01306.pdf> [2009, Sept].
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T. & Tsujimoto, Y. 2005, "Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death", *Nature*, vol. 434, no. 7033, pp. 652-658.
- Narula, J., Arbustini, E., Chandrasekhar, Y. & Schwaiger, M. 2001, "Apoptosis and the systolic dysfunction in congestive heart failure. Story of apoptosis interruptus and zombie myocytes", *Cardiology clinics*, vol. 19, no. 1, pp. 113-126.
- Nishimura, Y. & Lemasters, J.J. 2001, "Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia", *Cell death and differentiation*, vol. 8, no. 8, pp. 850-858.
- Norberg, E., Gogvadze, V., Ott, M., Horn, M., Uhlen, P., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. 2008, "An increase in intracellular Ca²⁺ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death", *Cell death and differentiation*, vol. 15, no. 12, pp. 1857-1864.
- Okada, K., Minamino, T., Tsukamoto, Y., Liao, Y., Tsukamoto, O., Takashima, S., Hirata, A., Fujita, M., Nagamachi, Y., Nakatani, T., Yutani, C., Ozawa, K., Ogawa, S., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M. 2004, "Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis", *Circulation*, vol. 110, no. 6, pp. 705-712.
- Pfeiffer, T., Schuster, S. & Bonhoeffer, S. 2001, "Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 292, no. 5516, pp. 504-507.
- Priori, S.G. & Chen, S.R. 2011, "Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and arrhythmogenesis", *Circulation research*, vol. 108, no. 7, pp. 871-883.
- Priori, S.G., Napolitano, C., Tiso, N., Memmi, M., Vignati, G., Bloise, R., Sorrentino, V. & Danieli, G.A. 2001, "Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia", *Circulation*, vol. 103, no. 2, pp. 196-200.
- Roche Applied Science 2006, *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red* [Homepage of Roche Diagnostics GmbH], [Online]. Available: www.roche-applied-science.com [2009, Sept].

- Rockman, H.A., Ross, R.S., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Steinhilber, M.E., Field, L.J., Ross, J., Jr & Chien, K.R. 1991, "Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 18, pp. 8277-8281.
- Roskamm, H., Neumann, J., Kalusche, D. & Bestehorn, P. (eds) 2004, *Herzkrankheiten*, 5th edn, Springer, Berlin.
- Roy, S.S. & Hajnoczky, G. 2008, "Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements", *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 46, no. 3, pp. 213-223.
- Schroder, M. & Kaufman, R.J. 2005, "The mammalian unfolded protein response", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 74, pp. 739-789.
- Sedej, S., Heinzl, F.R., Walther, S., Dybkova, N., Wakula, P., Groborz, J., Gronau, P., Maier, L.S., Vos, M.A., Lai, F.A., Napolitano, C., Priori, S.G., Kockskamper, J. & Pieske, B. 2010, "Na⁺-dependent SR Ca²⁺ overload induces arrhythmogenic events in mouse cardiomyocytes with a human CPVT mutation", *Cardiovascular research*, vol. 87, no. 1, pp. 50-59.
- Sedej, S., Walther, S. & Schmidt, A. 2009, Accelerated transition of pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice with a human CPVT mutation, Data Club, Medical University of Graz.
- Sgonc, R. & Gruber, J. 1998, "Apoptosis detection: an overview", *Experimental gerontology*, vol. 33, no. 6, pp. 525-533.
- Stevenson, W.G., Stevenson, L.W., Middlekauff, H.R. & Saxon, L.A. 1993, "Sudden death prevention in patients with advanced ventricular dysfunction", *Circulation*, vol. 88, no. 6, pp. 2953-2961.
- Suzuki, K. & Sorimachi, H. 1998, "A novel aspect of calpain activation", *FEBS letters*, vol. 433, no. 1-2, pp. 1-4.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M. & Samali, A. 2006, "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis", *EMBO reports*, vol. 7, no. 9, pp. 880-885.
- Tanious, F.A., Veal, J.M., Buczak, H., Ratmeyer, L.S. & Wilson, W.D. 1992, "DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites", *Biochemistry*, vol. 31, no. 12, pp. 3103-3112.
- Thorburn, A. 2004, "Death receptor-induced cell killing", *Cellular signalling*, vol. 16, no. 2, pp. 139-144.
- Vahsen, N., Cande, C., Briere, J.J., Benit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P.G., Pequignot, M.O., Casares, N., Lazar, V., Feraud, O., Debili, N., Wissing, S., Engelhardt, S., Madeo, F., Piacentini, M., Penninger, J.M., Schagger, H., Rustin, P. & Kroemer, G. 2004, "AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation", *The EMBO journal*, vol. 23, no. 23, pp. 4679-4689.

- Vandenabeele, P., Declercq, W., Van Herreweghe, F. & Vanden Berghe, T. 2010, "The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis", *Science signaling*, vol. 3, no. 115, pp. re4.
- Wang, K.K. 2000, "Calpain and caspase: can you tell the difference?", *Trends in neurosciences*, vol. 23, no. 1, pp. 20-26.
- Wencker, D., Chandra, M., Nguyen, K., Miao, W., Garantziotis, S., Factor, S.M., Shirani, J., Armstrong, R.C. & Kitsis, R.N. 2003, "A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure", *The Journal of clinical investigation*, vol. 111, no. 10, pp. 1497-1504.
- Zalk, R., Lehnart, S.E. & Marks, A.R. 2007, "Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 76, pp. 367-385.
- Zhu, L., Yu, Y., Chua, B.H., Ho, Y.S. & Kuo, T.H. 2001, "Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by Bcl-2 in the heart of transgenic mice", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 33, no. 12, pp. 2135-2144.
- Zong, W.X. & Thompson, C.B. 2006, "Necrotic death as a cell fate", *Genes & development*, vol. 20, no. 1, pp. 1-15.
- Zweier, J.L., Flaherty, J.T. & Weisfeldt, M.L. 1987, "Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 5, pp. 1404-1407.

6. Anhang

Ergänzende Statistik zur Gravimetrie der Versuchsgruppen

Tabelle 9: Deskriptive Statistik der Gruppenvariable Genotyp. Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts sowie Minimum, Maximum und die Perzentile der Daten.

	Genotyp	N	MW	SD	SE	Min	Max	Perzentile		
								25	50	75
Körpergewicht (g)	WT	14	24,8	2,2	0,6	22,2	28,5	23,2	23,9	25,86
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	23,8	2,0	0,5	20,7	26,9	22,1	24,3	25,28
Herzgewicht, feucht (mg)	WT	14	232,9	95,1	25,4	134,0	451,0	148,0	215,0	272
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	256,6	93,4	25,0	164,0	468,0	173,0	229,0	327
Lungengewicht, trocken (mg)	WT	14	67,4	42,0	11,2	27,0	181,0	44,0	53,5	65
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	75,1	40,1	10,7	42,0	150,0	46,0	59,0	77
Lebergewicht, feucht (mg)	WT	14	1057,6	211,2	56,5	679,0	1347,0	898,0	1079,0	1237
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	1086,3	172,2	46,0	828,0	1388,0	986,0	1072,0	1213
Tibiallänge (mm)	WT	14	17,4	0,3	0,1	16,7	17,9	17,2	17,4	17,6
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	17,4	0,2	0,1	17,0	17,8	17,2	17,4	17,5
Herzgewicht/Körpergewicht (mg/g)	WT	14	9,4	3,9	1,0	4,7	17,4	6,7	8,0	11,42
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	10,9	4,3	1,2	6,8	21,9	7,1	10,3	12,5
Herzgewicht/Tibiallänge (mg/mm)	WT	14	13,4	5,5	1,5	7,6	25,8	8,6	12,8	15,81
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	14,8	5,4	1,4	9,5	27,2	10,2	13,1	18,84
Lungengewicht/Körpergewicht (mg/g)	WT	14	2,8	1,9	0,5	1,1	8,1	1,7	2,1	2,82
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	3,2	1,9	0,5	1,8	7,2	2,0	2,5	2,93
Lungengewicht/Tibiallänge (mg/mm)	WT	14	3,9	2,4	0,7	1,6	10,5	2,6	3,1	3,64
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	4,3	2,3	0,6	2,4	8,7	2,7	3,4	4,48

Tabelle 10: Mittlerer Rang und Rangsummen der Gruppenvariable Genotyp.

	Genotyp	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Körpergewicht (g)	WT	14	15,86	222,00
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	13,14	184,00
	Gesamt	28		
Herzgewicht, feucht (mg)	WT	14	13,18	184,50
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	15,82	221,50
	Gesamt	28		
Lungengewicht, trocken (mg)	WT	14	12,79	179,00
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	16,21	227,00
	Gesamt	28		
Lebergewicht, trocken (mg)	WT	14	14,14	198,00
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	14,86	208,00
	Gesamt	28		
Tibiallänge (mm)	WT	14	14,96	209,50
	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	14,04	196,50
	Gesamt	28		
Herzgewicht/Körpergewicht	WT	14	12,93	181,00

(mg/g)	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	16,07	225,00
	Gesamt	28		
Herzgewicht/Tibialänge	WT	14	13,07	183,00
(mg/mm)	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	15,93	223,00
	Gesamt	28		
Lungengewicht/Körpergewicht	WT	14	12,68	177,50
(mg/g)	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	16,32	228,50
	Gesamt	28		
Lungengewicht/Tibialänge	WT	14	12,71	178,00
(mg/mm)	RyR2 ^{R4496C+/-}	14	16,29	228,00
	Gesamt	28		

Tabelle 11: Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen der Gruppenvariable Genotyp ($P < 0,05$): Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen WT und RyR2^{R4496C+/-} nachgewiesen werden.

	Mann-Whitney-U	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Körpergewicht (g)	79,000	,383
Herzgewicht, feucht (mg)	79,500	,395
Lungengewicht, trocken (mg)	74,000	,270
Lebergewicht, feucht (mg)	93,000	,818
Tibialänge (mm)	91,500	,763
Herzgewicht/Körpergewicht (mg/g)	76,000	,312
Herzgewicht/Tibialänge (mg/mm)	78,000	,358
Lungengewicht/Körpergewicht (mg/g)	72,500	,241
Lungengewicht/Tibialänge (mg/mm)	73,000	,250

Tabelle 12: Deskriptive Statistik der Gruppenvariable Eingriff. Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts sowie Minimum, Maximum und die Perzentile der Daten.

	Eingriff	N	MW	SD	SE	Min	Max	Perzentile		
								25	50	75
Körpergewicht (g)	Sham	7	25,1	2,4	,9	22,3	28,5	23,4	24,1	28,3
	TAC	21	24,0	2,0	,4	20,7	27,8	22,4	24,4	25,4
Herzgewicht, feucht (mg)	Sham	7	184,3	56,7	21,4	134,0	284,0	134,0	164,0	234,0
	TAC	21	265,0	95,3	20,8	144,0	468,0	179,0	253,0	327,0
Lungengewicht, trocken (mg)	Sham	7	47,9	8,4	3,2	40,0	64,0	42,0	45,0	54,0
	TAC	21	79,0	44,0	9,6	27,0	181,0	49,0	60,0	113,0
Lebergewicht, feucht (mg)	Sham	7	1118,1	202,7	76,6	765,0	1388,0	1006,0	1172,0	1254,0
	TAC	21	1056,6	187,7	41,0	679,0	1347,0	913,0	1001,0	1213,0
Tibialänge (mm)	Sham	7	17,3	,4	,1	16,7	17,8	17,0	17,3	17,6
	TAC	21	17,4	,2	,1	17,0	17,9	17,2	17,4	17,6
Herzgewicht/Körpergewicht (mg/g)	Sham	7	7,3	2,1	,8	4,7	11,1	5,7	6,8	8,2
	TAC	21	11,1	4,2	,9	5,9	21,9	7,7	10,0	14,3
Herzgewicht/Tibialänge	Sham	7	10,7	3,4	1,3	7,6	16,4	7,7	9,7	14,0

(mg/mm)	TAC	21	15,2	5,5	1,2	8,2	27,2	10,2	14,6	18,8
Lungengewicht/Körpergewicht (mg/g)	Sham	7	1,9	,3	,1	1,6	2,5	1,7	1,9	2,0
	TAC	21	3,4	2,1	,4	1,1	8,1	2,1	2,6	4,4
Lungengewicht/Tibiallänge (mg/mm)	Sham	7	2,8	,5	,2	2,3	3,7	2,4	2,6	3,1
	TAC	21	4,5	2,6	,6	1,6	10,5	2,9	3,5	6,5

Tabelle 13: Mittlerer Rang und Rangsumme der Variable Eingriff.

	Eingriff	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Körpergewicht (g)	Sham	7	17,00	119,00
	TAC	21	13,67	287,00
	Gesamt	28		
Herzgewicht, feucht (mg)	Sham	7	8,50	59,50
	TAC	21	16,50	346,50
	Gesamt	28		
Lungengewicht, trocken (mg)	Sham	7	8,79	61,50
	TAC	21	16,40	344,50
	Gesamt	28		
Lebergewicht, feucht (mg)	Sham	7	17,14	120,00
	TAC	21	13,62	286,00
	Gesamt	28		
Tibiallänge (mm)	Sham	7	13,64	95,50
	TAC	21	14,79	310,50
	Gesamt	28		
Herzgewicht/Körpergewicht (mg/g)	Sham	7	8,29	58,00
	TAC	21	16,57	348,00
	Gesamt	28		
Herzgewicht/Tibiallänge (mg/mm)	Sham	7	8,86	62,00
	TAC	21	16,38	344,00
	Gesamt	28		
Lungengewicht/Körpergewicht (mg/g)	Sham	7	8,14	57,00
	TAC	21	16,62	349,00
	Gesamt	28		
Lungengewicht/Tibiallänge (mg/mm)	Sham	7	9,21	64,50
	TAC	21	16,26	341,50
	Gesamt	28		

Tabelle 14: Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der Unterschiede zwischen der Gruppenvariable Eingriff ($P < 0,05$). Bei einem Testergebnis von $P < 0,05$ ist von signifikanten Unterschieden (rot) zwischen den Variablen in Abhängigkeit vom vorgenommenen Eingriff (TAC oder Sham) auszugehen.

	Mann-Whitney-U	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Körpergewicht (g)	56,000	,353
Herzgewicht, feucht (mg)	31,500	,026
Lungengewicht, trocken (mg)	33,500	,034
Lebergewicht, feucht (mg)	55,000	,326
Tibiallänge (mm)	67,500	,748
Herzgewicht/Körpergewicht (mg/g)	30,000	,021
Herzgewicht/Tibiallänge (mg/mm)	34,000	,036
Lungengewicht/Körpergewicht (mg/g)	29,000	,018
Lungengewicht/Tibiallänge (mg/mm)	36,500	,050

Tabelle 15: Kruskal-Wallis-H-Test: Unterschiede zwischen den 4 Gruppen. Die Normierung von Herz- und Lungengewicht auf das Körpergewicht zeigt mit $P = 0,082$, bzw. $P = 0,088$ eine Tendenz zur Signifikanz ($P < 0,1$).

	Chi-Quadrat	df	Asymptotische Signifikanz
Körpergewicht (g)	1,519	3	,678
Herzgewicht, feucht (mg)	6,134	3	,105
Lungengewicht, trocken (mg)	5,392	3	,145
Lebergewicht, feucht (mg)	1,968	3	,579
Tibiallänge (mm)	,274	3	,965
Herzgewicht/Körpergewicht (mg/g)	6,690	3	,082
Herzgewicht/Tibiallänge (mg/mm)	5,765	3	,124
Lungengewicht/Körpergewicht (mg/g)	6,545	3	,088
Lungengewicht/Tibiallänge (mg/mm)	4,842	3	,184

7. Lebenslauf

	Georg Arnstein	
Adresse	Brüxerstr. 1 D-93057 Regensburg	
Mobil	+49 179 121 388 4	
E-Mail	g.arnstein@gmx.de	
Nationalität	deutsch	
Geburtsdatum	02.02.1982	
Geburtsort	Olmütz, Tschechische Republik	
	Bildungsgang	
2005-2011	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz	
2003-2005	Studium der Politikwissenschaft, Soziologie und Psychologie an der Universität Regensburg	
1994-2002	Werner-von-Siemens-Gymnasium Regensburg, Abitur, Juni 2002	
	Famulaturen	
Juni-August 2011	Praktisches Jahr, Innere Medizin, Universitätsspital Zürich, Schweiz	
April 2011	Famulatur im Sukraraj Infectiology Hospital Kathmandu, Nepal	
Januar-März 2011	Praktisches Jahr, Anästhesiologie, LKH Graz, Österreich	
Nov.-Dezember 2010	Praktisches Jahr, pädiatrische Intensivstation, LKH Graz, Österreich	
Oktober 2010	Praktisches Jahr, Allgemeinmedizin, Dr. med. Herbert Apfalter, Graz, Österreich	
Februar 2010	Barmherzige Brüder Regensburg, Gastrologie, Infektiologie Rheumatologie, Regensburg, Deutschland	
Februar 2009	Barmherzige Brüder Regensburg, Neurologie, Regensburg, Deutschland	
September 2008	Joseph´s Mission Hospital, Innere Medizin, Peramiho, Tanzania	
August 2008	Machame Hospital, Innere Medizin, Machame, Tanzania	
Februar 2008	Universitätsklinikum Regensburg, Gastroenterologie, Regensburg, Deutschland	
August 2007	Chir. Praxis M.D. Ilona Michalova, Prag, Tschechische Republik	
Februar 2007	Universitätsklinikum Regensburg, Unfallchirurgie, Regensburg, Deutschland	

Berufserfahrung

2010-3/2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der klinischen Abteilung für Kardiologie, Medizinische Universität Graz, Österreich

Qualifikationen

Labor TUNEL Assay
Zellisolation
Konfokale Mikroskopie
Life cell imaging
Spark- und Transientenmessungen

Sprachen Deutsch (Muttersprache)
Tschechisch (Muttersprache)
Englisch (fließend)
Französisch (Grundkenntnisse)
Ki-Swahili (Grundkenntnisse)

EDV-Kenntnisse SPSS, MS Office: Outlook, PowerPoint, Excel, Word

Sonstiges

Stipendien Förderstipendium der Medizinischen Universität Graz, 2010



(Georg Arnstein)