

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und
Internistische Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Geschlechtsspezifische myokardiale Adaptation
unter mTOR-Inhibition mit Rapamycin im
normotensiven DOCA-Salz Hypertrophiemodell
der Maus**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Robin Klewitz
aus Lübben/Spreewald

Datum der Promotion:

25.Juni 2017

Meinem verstorbenen Großvater
Siegfried Klewitz

Abstract

Patients with chronic kidney disease develop cardiac disease with left ventricular hypertrophy, interstitial fibrosis and decreased cardiac function in parallel. This clinical condition is described by the term chronic cardiorenal syndrome type IV (CRS IV). Male individuals more likely develop severe phenotype whereas female sex acts as a safe-guard against adverse cardiac remodeling in premenopausal stage. The deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt mouse model is an established animal model to simulate the pathomechanisms in CRS type IV. Sex specific differences observed in human cardiac adaption could be reproduced in experimental settings in mice. Male DOCA-salt hydralazine challenged mice exhibit adverse cardiac remodeling. In contrast, female mice are protected against maladaptive cardiac remodeling in this model under normotensive conditions. Previous experiments identified stimulus dependent sex-specific regulation of cellular signaling pathways in the heart including the mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway. Therefore, it is hypothesized that intact mTOR signaling is essential for intrinsic female cardiac protection. In order to characterize sex specific and mTOR signaling-dependent differences in cardiac phenotype as well as intracellular signaling in cardiomyocytes, DOCA-salt hydralazine treated mice upon mTOR inhibition with selective mTOR complex 1 (mTORC1) inhibitor rapamycin were investigated.

No differences in blood pressure detected by continuous radio-telemetric measurement and carotis catheterization were observed. Rapamycin significantly reduced left ventricular hypertrophy and revealed concentric cardiac phenotype in male mice with preserved ejection fraction and reduced fibrosis. In parallel, decreased mTORC1 and compensatory upregulation of mTOR complex 2 (mTORC2) activity in rapamycin-treated male mice compared with vehicle controls were detected. In contrast, female mice developed eccentric left ventricular hypertrophy and augmented cardiac fibrosis. Treatment with rapamycin led to reduced activity of both mTOR complexes, mTORC1 and mTORC2, in these groups. Similar results were observed in an earlier study with DOCA-salt female mice lacking the estrogen receptor β (ER β). ER β knockout caused dilative left ventricular hypertrophy and augmented cardiac fibrosis as well as reduced mTORC1 and mTORC2 activity. Interestingly, mTOR inhibition upon rapamycin treatment decreased ER β -expression in female mice. In conclusion, the results of this study suggest that ER β -dependent regulation involves sex-specific use of mTOR signaling branches in the normotensive DOCA-salt model. Maintenance of both mTORC1 and mTORC2 signaling seems to be essential for adaptive cardiac remodeling in females and supports a rationale for sex-specific therapeutic strategies in left ventricular hypertrophy.

Kurzdarstellung

Im Kontext des renokardialen Syndroms führt eine primäre Abnahme der Nierenfunktion sekundär zu einem kardialen Remodeling mit myokardialer Hypertrophie, interstitieller Fibrose und Funktionsverlust. Bezüglich der Ausprägung dieser kardialen Adaptation bestehen geschlechtsspezifische Unterschiede, wobei im weiblichen Geschlecht grundsätzlich günstigere Verläufe beobachtet werden. Das normotensive Deoxykortikosteronacetat (DOCA)-Salz-Modell der Maus simuliert die Pathomechanismen des renokardialen Syndroms aus der Humanklinik. Auch im Tiermodell kann die beschriebene Geschlechtsspezifität der kardialen Anpassungsreaktion beobachtet werden. Basierend auf Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen und der Beobachtung einer geschlechtsspezifischen Regulation des mechanistic target of Rapamycin (mTOR) ergab sich die Hypothese, dass die endogene mTOR-Signaltransduktion eine wichtige Rolle in der relativen weiblichen Kardioprotektion spielt. Dazu wurden weibliche und männliche Wildtyp-Mäuse unter den Bedingungen des normotensiven DOCA-Salz-Modells mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin behandelt und deren kardiale Phänotypen sowie die intrazelluläre Signaltransduktion gegen Kontrollgruppen ohne Rapamycin-Intervention verglichen.

Blutdruckunterschiede zwischen den Versuchsgruppen konnten durch eine 6-wöchige, kontinuierliche Blutdruckmessung mit Hilfe eines Radio-Telemetriesenders sowie durch Messung des mittleren arteriellen Drucks (MAP) mittels Karotis-Katheters zum Versuchsende ausgeschlossen werden. Bei den männlichen Versuchstieren ging die Rapamycinintervention mit einer signifikanten Reduzierung der linksventrikulären Hypertrophie und einem Rückgang der interstitiellen Fibrose einher. Auf morphologischer Ebene wiesen diese Tiere eine konzentrische Hypertrophie mit Erhalt der Ejektionsfraktion auf. Im Bezug auf die Signaltransduktion konnte bei den Rapamycin-Männchen eine Reduzierung der Aktivität des mTOR-Komplex 1 (mTORC1) bei gleichzeitiger mTORC2-Aktivitätserhöhung nachgewiesen werden. Im Gegenzug entwickelten die weiblichen Versuchstiere unter Rapamycin eine dilatative, linksventrikuläre Hypertrophie mit vermehrter interstitieller Fibrose. Ausgehend von hohen konsekutiven Aktivitäten des mTORC1 und mTORC2 unter Placebo ging die Rapamycin-Intervention bei den Weibchen mit einer deutlichen Aktivitätsminderung beider mTOR-Komplexe einher. Vergleichbare Ergebnisse konnten bereits in vorangegangenen Studien zur Rolle des Östrogenrezeptors β (ER β) im DOCA-Salz-Modell der Maus beobachtet werden. Der ER β -Knockout führte bei den Weibchen ebenfalls zu einem dilatativen kardialen Phänotypen mit vermehrter Fibrose und Reduzierung der mTORC1- sowie mTORC2-Aktivität. Interessanterweise

war in der vorliegenden Studie bei den weiblichen Versuchstieren unter Rapamycin eine Beeinflussung der ER β -Proteinexpression nachweisbar, wonach eine Wechselwirkung der Rapamycinbehandlung mit der hormonellen Regulation der Östrogene denkbar und möglich erscheint.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in der Regulation der beiden mTOR-Komplexe existieren und dass die Rapamycinbehandlung einen Einfluss auf die ER β -Expression hat. Die intakte Signaltransduktion von mTORC1 und mTORC2 scheint für die relative weibliche Kardioprotektion eine wichtige Bedeutung einzunehmen. Insbesondere der mTORC2 scheint östrogenabhängig einer geschlechtsspezifischen Regulation zu unterliegen und bedeutende Signale der weiblichen Kardioprotektion zu vermitteln. Diese Erkenntnis könnte in der Zukunft neue Denkansätze für eine geschlechtsspezifische Therapie der hypertrophen Kardiomyopathie liefern.

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT	I
KURZDARSTELLUNG	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS	XI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Gender Medicine - Geschlechtsspezifische Aspekte bei kardio-renalen Erkrankungen	1
1.2 Das kardio-renale Syndrom	3
1.3 Die Niere und das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem	5
1.4 Tierexperimentelle Modelle zur kardioresenalen Interaktion	8
1.5 Die Myokardhypertrophie	10
1.5.1 Signalwege in der Myokardhypertrophie	11
1.5.2 Der mTOR-Signalweg in der MH	13
1.6 Rapamycin - Wirkung und klinische Anwendung	16
1.7 Fragestellung und Zielsetzung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Tierversuch	19
2.1.1 Versuchsdesign	19
2.1.2 Eingriffe und Behandlungen	20
2.1.2.1 Anästhesie	21
2.1.2.2 Uninephrektomie und Pellet-Implantation	22
2.1.2.3 Rapamycin-Behandlung	22
2.1.3 Funktionelle Untersuchungen	23
2.1.3.1 Messung der Körperzusammensetzung	23
2.1.3.2 Echokardiographie	23
2.1.3.3 Metabolische Käfige	25
2.1.3.4 Blutdruckmessung mittels Karotiskatheter	25

2.1.3.5	Telemetrische Blutdruckmessung	25
2.1.4	Blut-und Organentnahme	26
2.2	Histologie	27
2.2.1	Paraffineinbettung und Schneidung	27
2.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	27
2.2.3	PAS-Färbung und Messung der Kardiomyozytenquerschnittsflächen	27
2.2.4	Sirius-Rot-Färbung und Kollagenquantifizierung	29
2.2.5	Immunhistochemie	30
2.3	Proteinanalysen aus kardialem Gewebe	30
2.3.1	Proteinisolation	31
2.3.2	Bestimmung der Proteinmenge	31
2.3.3	Western-Blot Analyse	32
2.3.3.1	Proteinseparation mittels SDS-PAGE	32
2.3.3.2	Proteintransfer (Blotting)	34
2.3.3.3	Antikörperinkubation	34
2.3.3.4	Antikörperdetektion	34
2.4	Genexpressionsanalyse	35
2.4.1	Isolierung der Gesamt-RNA aus Myokardgewebe	35
2.4.2	Bestimmung von Qualität und Konzentration der RNA	35
2.4.3	Reverse Transkription (RT-PCR)	36
2.4.4	Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)	37
2.5	Statistik	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Pathophysiologische Effekte von Mineralokortikoidexzess und Salzbelastung	41
3.1.1	Elektrolyt - und Wasserhomöostase	41
3.1.2	Hämodynamik	44
3.2	Serumkonzentrationen von Rapamycin	47
3.3	Kardiale Morphologie und Herzfunktion unter DOCA-Salz und Rapamycin	47
3.3.1	Herzgewichte als Parameter der MH	47
3.3.2	Charakterisierung der Herzdimensionen	49
3.3.3	Bestimmung der Herzauswurfleistung	52
3.3.4	Die MH auf zellulärer Ebene - Kardiomyozytenquerschnittsflächen	54
3.4	Die kardiale Fibrose	55
3.4.1	Quantifizierung der Fibrose	55
3.4.2	Bestandteile der Extrazellulären Matrix	57
3.5	Gefäßmorphologie und Angiogenese	58

3.6	Die myokardiale Signaltransduktion unter Mineralokortikoidexzess und Rapamycinbehandlung	59
3.6.1	Bestimmung der kardialen mTORC1 - Aktivität	59
3.6.2	Die kardiale mTORC2-Aktivität	60
3.6.3	Die kardiale ERK1/2 - Aktivität	61
3.6.4	Charakterisierung der p38MAPK-Phosphorylierung im Herzen	63
3.6.5	Gehalt an mTOR-Protein im Myokard	64
3.6.6	Einfluss von Rapamycin auf die Östrogenrezeptor-Synthese	67
4	Diskussion	69
4.1	Auswahl des Tiermodells	69
4.2	Wasser- u. Elektrolythaushalt im DOCA-Salz Modell	70
4.3	Hämodynamik	71
4.4	Das kardiale Remodeling	73
4.4.1	Erfassung der MH	73
4.4.2	Echokardiographische Auswertung	75
4.4.3	Die Hypertrophie auf zellulärer Ebene	76
4.4.4	Die kardiale Fibrose	76
4.5	Die kardiale Signaltransduktion	81
4.5.1	Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg	81
4.5.2	Der ERK1/2- u. p38- Signalweg	86
4.5.3	Der Einfluss von Östrogen auf den mTOR-Signalweg	89
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	91
	Literatur	93
	Anhang	105
	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	105
	Puffer, Lösungen und Stocks	107
	Laborgerätschaften	110
	Antikörper	112
	Danksagung	113
	Eidesstattliche Erklärung	114
	Lebenslauf	117
	Publikationen	119

Abbildungsverzeichnis

1.1	Kumulative Inzidenz der terminalen Niereninsuffizienz über das Lebensalter	2
1.2	Einteilung des kardioresalen Syndroms nach Ronco	3
1.3	Pathomechanismen im renokardialen Syndrom Typ IV	4
1.4	Histologischer Aufbau der Niere	6
1.5	Kardiovaskuläre Effekte des Aldosterons	7
1.6	Pathomechanismen im DOCA-Salz-Modell	9
1.7	Phänotypen der Myokardhypertrophie	11
1.8	Signalwege der MH	12
1.9	Pathologische und physiologische Signaltransduktion der MH	13
1.10	mTOR1- u. mTOR2-Komplex	14
1.11	Das mTOR-Netzwerk	16
2.1	Versuchsübersicht	21
2.2	2-dimensionale Übersichtsaufnahme (B-Mode) des Herzens im Querschnitt	24
2.3	1-dimensionale Aufnahme (M-Mode)	24
2.4	Messung der Myozytenquerschnittsflächen	28
2.5	Kollagenfärbung des Myokards	29
3.1	Natrium - und Kaliumkonzentration im Serum	42
3.2	Bestimmung der Diurese und fraktionellen Natriumexkretion über 24h	43
3.3	Messung der Körperzusammensetzung	43
3.4	Messung des Blutdrucks mittels Telemetriesender	44
3.5	Invasive Blutdruckmessung mittels Karotiskatheter	45
3.6	Telemetrische Messung der Herzfrequenzen	46
3.7	Invasive Messung der Herzfrequenzen	46
3.8	Rapamycinspiegel im Serum	47
3.9	HG in Relation zur Tibialänge und Makroskopie	48
3.10	HG in Relation zum Körpergewicht	49
3.11	Echokardiographische Bestimmung der Wandstärken (Diastole)	50
3.12	Echokardiographische Vermessung des LV-Kammerdurchmessers (Diastole)	51
3.13	Echokardiographische Bestimmung der EF	52
3.14	Querschnittsflächen der Kardiomyozyten	55

3.15	Kollagenfärbung nach Sirius Red	56
3.16	Genexpression der Kollagen-Isoformen I u. III	57
3.17	Beurteilung der Gefäßintegrität	59
3.18	mTORC1-Aktivität im Myokard	60
3.19	mTORC1-Aktivität im Myokard	61
3.20	Western-Blot-Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung	62
3.21	Zelluläre Lokalisation von p-ERK1/2 in den Kardiomyozyten	63
3.22	p38MAPK-Aktivität im Myokard	64
3.23	Menge an mTOR-Gesamtprotein im Myokardgewebe	65
3.24	Differenzierung zwischen dem Gehalt an Raptor- und Rictor-Protein	66
3.25	Expression von ER α und ER β	67
4.1	Negative Feedback-Mechanismen des mTORC1	84

Tabellenverzeichnis

2.1	Versuchsgruppen und Gruppengröße	20
2.2	Herstellung der Laemmli-Lysate	32
2.3	Acrylamid-Gelzusammensetzung	33
2.4	Reaktionsansatz der Reversen Transkription	37
2.5	Reaktionsansatz der qRT-PCR	38
2.6	Primer Sequenzen für die qRT-PCR	39
3.1	Physiologische Parameter der Versuchstiere	53

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ACE	engl. Angiotensine-Converting-Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
AKT	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
Ang	Angiotensin
ATR	Angiotensin-Rezeptor
bpm	engl. beats per minute (Schläge pro Minute)
bspw	beispielsweise
cdNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
Cln-I	Calcineurininhibitor
CNI	chronische Niereninsuffizienz
CRS	kardi-renales Syndrom (engl. cardiorenal syndrome)
CVD	kardiovaskuläre Erkrankung (engl. cardiovascular disease)
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCA	engl. deoxycorticosterone acetat, Deoxykortikosteronacetat
ECM	Extrazellulärmatrix (engl. extracellular matrix)
EF	Ejektionsfraktion
ER	Östrogenrezeptor (engl. Estrogen receptor)
ERK1/2	extracellular regulated kinase 1 + 2
ESRD	terminale Niereninsuffizienz (eng. end stage renal disease)
ET-1	Endothelin
E2	Östradiol
FKBP12	12-kDa FK506-binding protein
FOV	engl. field of view (Sichtfeld in der Mikroskopie)
FoxO1/3a	forkhead box O1/3a

GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GPCR	G protein-coupled receptor
HG	Herzgewicht
HI	Herzinsuffizienz
HRPO	Horseradishperoxidase
IGF-1	Insuline-like growth factor
IVS	interventrikuläres Septum
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
kDA	kiloDalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzerkrankung
LV	Linker Ventrikel
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
LVID	linksventrikulärer Innendurchmesser
LVPW	Hinterwand (engl. left ventricular posterior wall)
MAD	mittlerer arterieller (Blut-)Druck
MCA	Myozytenquerschnittsfläche, engl. myocyte cross sectional area
MH	Myokardhypertrophie
MI	Myokardinfarkt
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mTOR	mechanistic target of Rapamycin
mTORC1	mTOR-Komplex 1 (engl. mTOR complex 1)
mTORC2	mTOR-Komplex 2 (engl. mTOR complex 2)
mTOR-I	mTOR-Inhibitor
mSin1	mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1
NaCl	Natriumchlorid
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-Transporter
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NTx	Nierentransplantation
NW	Nebenwirkungen
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (eng. polymerase chain reaction)
PKD1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PECAM-1	engl. platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PH-domain	pleckstrin homology domain
PIC	pre-initiation complex
PI3K	Phosphoinosid-3-Kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PIP₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PNET	Progressive neuroendokrine Tumoren
PRAS40	proline-rich Akt substrate 40 kDa
Protoc 1/2)	protein observed with rictor 1 and 2
PTEN	phosphatase and tensin homolog
qRT-PCR	Quantitative Real Time-PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raptor	regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	Ribonukleinsäure
RSK1	ribosomal S6 kinase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SGK1	serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1
SHR	spontan hypertensive Ratte
S6K1	S6 Kinase 1
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS-T	Tris buffered saline/Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TL	Tibiallänge
TSC1	Hamartin
TSC2	Tuberin
V.	Vena
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VSMC	glatte Gefäßmuskelzelle (engl. vascular smooth muscle cell)
4EBP-1	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein

1 Einleitung

1.1 Gender Medicine - Geschlechtsspezifische Aspekte bei kardio-renalen Erkrankungen

„Frauen werden anders krank als Männer“. Die Idee eines einheitlichen Krankheitsmodells mit Gültigkeit für beide Geschlechter muss in vieler Hinsicht neu überdacht werden. Nicht wenige Erkrankungen weisen im Bezug auf das Geschlecht erhebliche Unterschiede in der Prävalenz, Progression, Mortalität sowie der klinischen Symptomatik auf. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde diesen Unterschieden vermehrt Beachtung geschenkt. Es etablierte sich der Begriff „gender medicine“ als ein eigenständiger Teilbereich der medizinischen Forschung. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Aspekten der „gender medicine“ in den Bereichen der Kardiologie und Nephrologie. Geschlechtsspezifische Unterschiede werden hier vor allem bei den kardiovaskulären Erkrankungen (engl. „cardiovascular disease“, CVD) sowie der chronischen Niereninsuffizienz (CNI) beobachtet.

In den USA erkranken jährlich ca. 1,5mal so viele Männer an einer terminalen Niereninsuffizienz (engl. „end stage renal disease“, ESRD) als Frauen [1]. Frauen besitzen vor allem in ihrer reproduktiven Phase ein geringeres Risiko eine ESRD zu entwickeln [2] (siehe Abb. 1.1). Der positive Einfluss des weiblichen Geschlechts auf die Progression der CNI wird daran erkennbar, dass die Erkrankung bei Männern unabhängig von Blutdruck und Lipidwerten schneller voranschreitet [3] und jährlich eine größere Anzahl männlicher Patienten eine Nierenersatztherapie beginnen müssen als Frauen [4]. Unterschiede lassen sich auch bei den Herz - Kreislauferkrankungen und der Herzinsuffizienz (HI) beobachten. Zusammen stellen sie weltweit die häufigste Todesursache dar. Zwar ist das Lebenszeitrisiko an einer HI zu erkranken bei beiden Geschlechtern gleich hoch, jedoch entwickeln Frauen die Erkrankungen erst später als Männer [5] und besitzen eine bessere Prognose hinsichtlich der Progression [6]. Zu Beginn einer CVD stehen kardiale Remodeling-Prozesse wie eine Myokardhypertrophie (MH) oder die Entwicklung einer Fibrose im Vordergrund. Männer entwickeln eine MH in den meisten Fällen durch ischämische Zustände auf der Grundlage einer koronaren Herzerkrankung (KHK), während bei Frauen häufiger nicht-ischämische Ursachen wie Hypertonie, Übergewicht und Diabetes mellitus beobachtet werden [7]. Auf kardiovaskuläre Komplikationen reagieren Männer mit einer stärker ausgeprägten MH mit exzentrischem Phänotyp, wohingegen die Hypertrophie bei Frauen milder ausfällt und eine konzentrische Morphologie aufweist [8] (zu den Formen der MH siehe Kap. 1.5). Funktionell tendieren Männer mit manifester MH zu

einer systolischen Funktionsstörung mit reduzierter Auswurfleistung im Sinne einer eingeschränkten Ejektionsfraktion (EF). Frauen hingegen präsentieren eher eine diastolische Funktionsstörung mit erhaltener EF [9, 10], was als prognostisch günstiger gewertet wird. Auch in der physiologischen Entwicklung sind Unterschiede erkennbar. Ausgehend von gleichen Herzgewichten (HG) in der Kindheit entwickeln Männer in der Adoleszenz ein um 15-30% höheres HG als Frauen [11]. Der physiologische Alterungsprozess geht bei Männern anders als bei Frauen mit einem verstärktem Zelluntergang und reaktiver Hypertrophie der verbliebenen Kardiomyozyten einher [12].

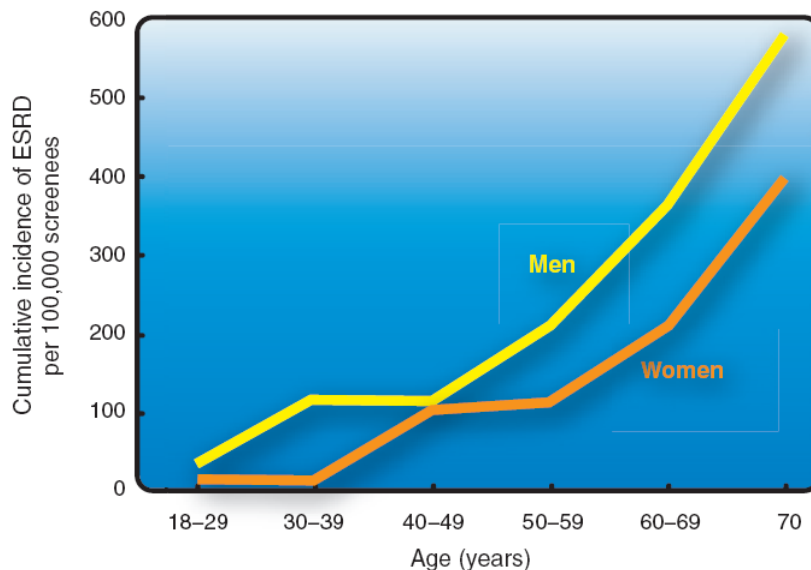


Abb. 1.1 Kumulative Inszidenz der terminalen Niereninsuffizienz über das Lebensalter [13]

Die Häufigkeit der ESRD nimmt bei Männern ab dem 29. Lebensjahr zu. Bei Frauen ist ein Anstieg erst 10 Jahre später zu verzeichnen. Ab dem 49. Lebensjahr steigt die Inzidenz bei beiden Geschlechtern in etwa gleich stark, die Zahl der betroffenen Frauen bleibt jedoch stets unter den Männern.

Die kardiovaskuläre Protektion der Frauen in jungen Jahren legen einen Einfluss des Östrogens nahe. Der Östrogenrezeptor (engl. estrogen receptor, ER) kommt in zwei Isoformen vor ($ER\alpha$ und $ER\beta$). Diese bilden mit Östrogen einen Komplex und vermitteln ihre Signale durch Translokation in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktor die Expression östrogenabhängiger Gene steigern. Für das Östrogen wurden protektive Effekte auf das kardiovaskuläre System ausführlich beschrieben [14]. Durch eine steigende Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei Frauen nach der Menopause wird die Bedeutung sinkender Östrogenspiegel erkennbar. Da auch für das männliche Geschlecht zirkulierende ER-Komplexe nachgewiesen werden können [15], bleibt der protektive Östrogeneinfluss nicht nur auf das weibliche Geschlecht beschränkt. Die Östrogenspiegel sind bei Männern jedoch vergleichsweise gering und die Testosteronwirkung überwiegt. Testosteron vermittelt seine Effekte über den Androgenrezeptor (AR) ebenfalls über die Regulation der Genexpression. Ihm werden nachteilige Effekte auf das kardiovaskuläre System zugeschrieben (zusammengefasst in [16])

1.2 Das kardio-renale Syndrom

Das Herz und die Nieren nehmen eine zentrale Rolle in der Regulation der Kreislauffunktion sowie des Flüssigkeitshaushalts im menschlichen Körper ein. Beide Organe bilden eine eng aufeinander abgestimmte Einheit und beeinflussen sich gegenseitig maßgeblich in ihrer Funktion. Eine primäre Störung der Funktion eines der beiden Organe führt daher zwangsläufig auch zu einer sekundären Funktionseinschränkung oder gar strukturellen Schädigung des Anderen. Diese pathophysiologischen Zusammenhänge werden mit Blick auf das klinische Erscheinungsbild als „kardiorenales Syndrom“ (engl. „cardio-renal-syndrome“, CRS) zusammengefasst. Im Jahre 2009 führte Claudio Ronco eine bis dahin neuartige Klassifikation ein und beschrieb die zugrunde liegenden Interaktionen. Er unternahm eine Einteilung anhand des zeitlichen Verlaufes sowie des primär geschädigten Organs. Dabei unterschied er akute Dysfunktionen (CRS Typ I und III) von chronischen Funktionseinbußen (CRS Typ II und IV) sowie primäre kardiale Störungen (CRS Typ I und II) von primär renalen Erkrankungen (CRS Typ III und IV) [17]. Letztere werden auch aufgrund der kausalen Zusammenhänge als „renokardiales Syndrom“ bezeichnet.

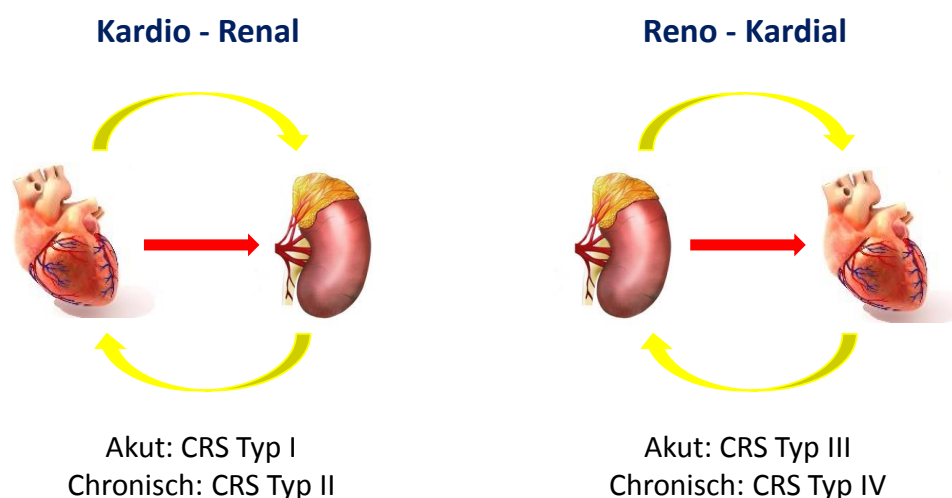


Abb. 1.2 Einteilung des kardiorenenalen Syndroms nach Ronco (angelehnt an [17])

Die theoretische Grundlage dieser Arbeit bilden Patienten, die an einer CNI leiden. Diese ist gekennzeichnet durch eine glomeruläre Schädigung, die zu einer Abnahme funktionell intakter Nephrone führt und mit einem Rückgang der glomerulären Filtrationsrate (GFR) einhergeht. Eine CNI ist mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko vergesellschaftet und führt zu einer reduzierten Herzfunktion, ventrikulären Hypertrophie und diastolischen Funktionsstörung [17]. Das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse steigt dabei umgekehrt proportional zur Abnahme der GFR an, sobald die GFR die Grenze von $60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ unterschreitet [18, 19]. Am stärksten gefährdet sind demnach Patienten mit einer ESRD und Betroffene, die sich einer Nierentransplantation (NTx) unterzogen haben. Etwa die Hälfte aller Patienten mit einer ESRD versterben an den Folgen einer KHK [17]. Dialyse-Patienten besitzen sogar ein 10-20fach höheres Risiko einen Herztod zu erleiden als

Menschen gleichen Alters und Geschlechts ohne CNI [20]. Dieser Zustand wird als das „chronische renokardiale Syndrom“ (CRS Typ IV) zusammengefasst. Den zentralen Pathomechanismus stellt in dieser Situation das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) dar, welches kompensatorisch aktiviert ist um der Abnahme der GFR entgegen zu wirken. Die Folge ist eine volumeninduzierte Hypertonie bedingt durch eine gesteigerte Natrium - u. Wasserretention in der Niere. Diese sorgt nicht nur für eine erhöhte kardiale Belastung, sondern führt auch zu mechanischem Stress für die glomerulären Filtrationseinheiten, was eine renale Schädigung weiter vorantreibt. Eine Zunahme pro-fibrotischer Wachstumsfaktoren wie Aldosteron und Angiotensin II (Ang II) führt zur Induktion von Entzündungs- u. Remodelingprozessen, was letzten Endes die Entstehung einer kardialen Fibrose begünstigt. Die sukzessive Abnahme der Nierenfunktion begünstigt das Auftreten weiterer Risikofaktoren wie Urämietoxine, renale Anämie und kardiale Hypoxie, was das Herz zusätzlich in seiner Leistungsfähigkeit einschränkt. Im weiteren Verlauf der Erkrankung stellen sich Störungen des Calcium-Phosphat-Haushalts ein. In Kombination mit anderen Risikofaktoren wie den erwähnten Urämietoxinen bedingen sie Gefäßverletzungen, welche das Voranschreiten einer Arteriosklerose begünstigen. Die erhöhte Steifigkeit der Gefäßwände verstärkt ihrerseits die Erhöhung des arteriellen Blutdrucks. Arteriosklerotische Plaques führen zu Stenosierungen, welche eine chronisch-ischämische Herzkrankheit fördern und das Risiko weiterer kardiovaskulärer Ereignisse erhöhen. Eine Zusammenfassung über die Situation im CRS Typ IV gibt die Abbildung 1.3.

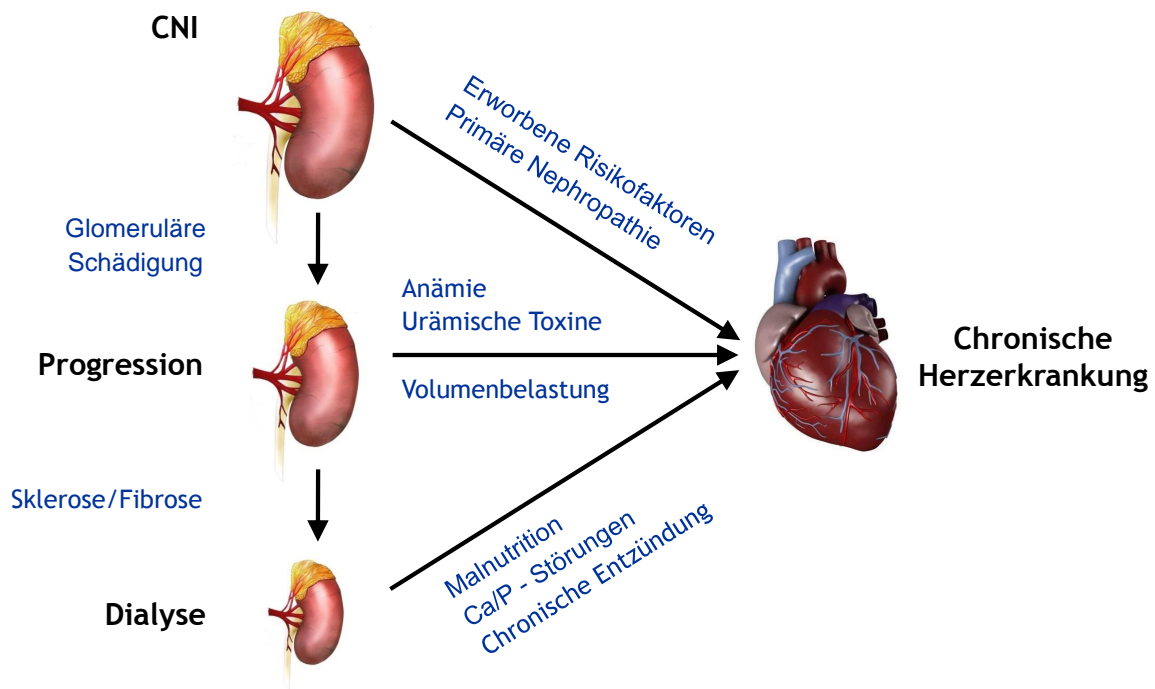


Abb. 1.3 Pathomechanismen im renokardialen Syndrom Typ IV (modifiziert nach [17])

Mit dem Fortschreiten der CNI akkumulieren kardiale Stressfaktoren, die die Belastung des Herzens erhöhen. Es entsteht ein Milieu, das die Kardiomyozyten in ihrer Funktion einschränkt und die Regenerationsfähigkeit herabsetzt. Die Gefahr einer chronischen Herzerkrankung ist die Folge.

Die Behandlung des CRS richtet sich nach Typ und Grunderkrankung. Bei den akuten Formen steht die Beseitigung des Funktionsverlustes des betroffenen Organs im Vordergrund um sekundäre Schädigungen des Partnerorgans zu vermeiden. Bei den chronischen Formen ist die Schädigung von Herz und Niere meist zu weit fortgeschritten und eine Wiederherstellung der Organfunktion nicht mehr möglich. In dieser Situation steht die Abmilderung der Progression und die Erhaltung der Organrestfunktion im Vordergrund. Im Falle des CRS Typ IV sind die Blockierung des RAAS als zentraler Pathomechanismus der Erkrankung und die Normalisierung des Blutdrucks wichtige Säulen der Therapie. Aufgrund ihres nephroprotektiven Effekts werden Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzymes (ACE) oder Antagonisten des Ang II-Rezeptors vom Typ 1 (AT₁-Blocker) verwendet. Bei nicht ausreichender Blutdrucksenkung können weitere Antihypertensiva verabreicht werden. Zusätzliche Risikofaktoren wie Übergewicht, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie sollten minimiert und Begleiterkrankungen wie eine renale Anämie behandelt werden.

1.3 Die Niere und das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem

Die Niere ist ein paariges, bohnenförmiges Organ im Retroperitonealraum mit einem Gewicht von 120-200g. Exokrine Funktionen übernimmt sie mit der Bildung des Harns, wodurch anfallende wasserlösliche Stoffwechselendprodukte ausgeschieden werden und gleichzeitig die Wasser- u. Elektrolythomöostase sowie der Säure-Basen-Haushalt reguliert werden. Zu den endokrinen Funktionen zählen die Synthese von Erythropoietin und Renin, wodurch die Niere entscheidenden Einfluss auf die Erythropoese und Blutdruckregulation nimmt. Über die Hydroxylierung von Calcidiol zum aktiven Vitamin D₃ (Calcitriol) ist sie ebenfalls am Calcium-Phosphat-Stoffwechsel beteiligt. Histologisch unterteilt man die Niere in Rinde (Cortex) und Mark (Medulla). Die kleinste Funktionseinheit ist das sogenannte Nephron, welches aus dem Nierenkörperchen und dem Tubulusapparat besteht. Die Nierenkörperchen liegen im Cortex und werden aus dem Glomerulum, einem Kapillarknäuel, das aus der afferenten Arteriole hervorgeht und der Bowman-Kapsel gebildet. Die Bowman-Kapsel liegt mit ihrem viszeralem Blatt, das aus den Podozyten besteht, dem Glomerulum direkt auf. Die Podozyten stellen zusammen mit dem Kapillarendothel und der Basalmembran des Glomerulums die Blut-Harnschanke dar. Das Nierenkörperchen ist der Ort der Primärharnbildung. Täglich werden ca. 180l Primärharn durch Filtration des Blutplasmas durch die Blut-Harnschanke produziert und in den Tubulusapparat abgegeben. Hier findet eine Modifizierung und Konzentrierung statt, wodurch der Primärharn auf eine tägliche Urinmenge von ca. 1,5l reduziert wird. Bevor der Tubulusapparat in das Sammelrohr mündet legt er sich mit seinem distalen geschlängelten Abschnitt (distales Konvolut) an einer Stelle dicht an den Gefäßpol des Glomerulums an. Dort bildet er zusammen mit spezialisierten Zellen der afferenten Arteriole und extraglomerulären Mesangiumzellen den juxtaglomerulären Apparat (JGA) (schematische Darstellung in Abb.1.4). Dieser nimmt in der Regulation des RAAS eine zentrale Rolle ein.

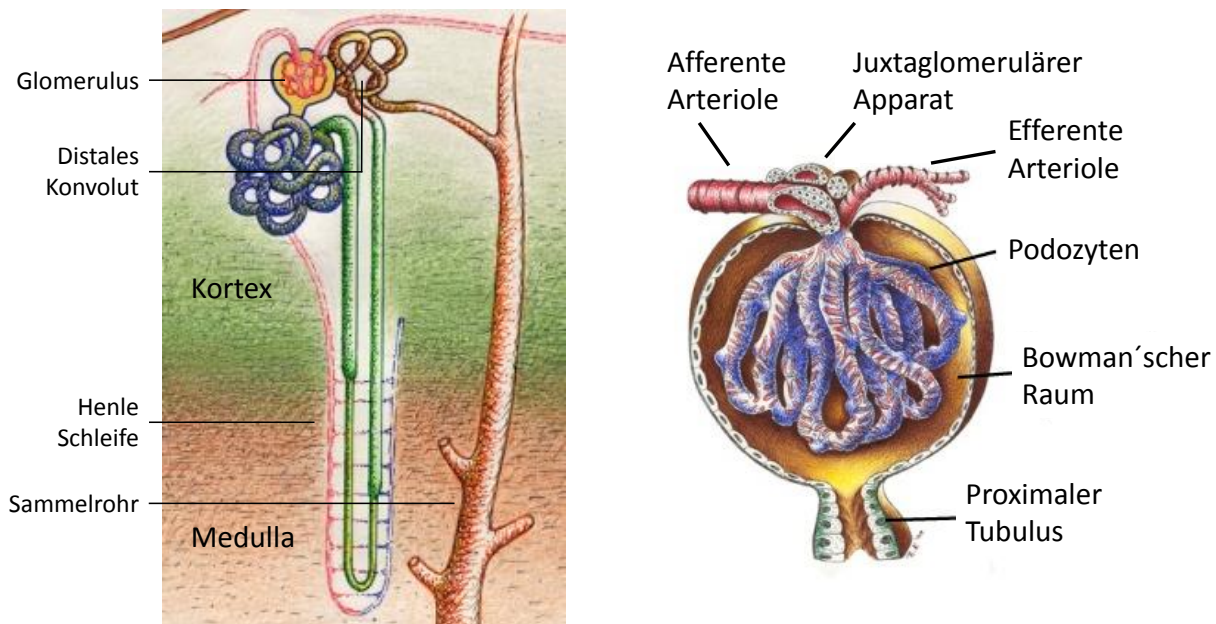


Abb. 1.4 Histologischer Aufbau der Niere (Abb. modifiziert nach [21])

Über das RAAS steuert die Niere den Wasser- u. Elektrolythaushalt und nimmt auf diese Weise entscheidenden Einfluss auf die mittelfristige Blutdruckeinstellung des Körpers. Am Anfang des Regelkreises steht das Renin, welches im JGA von spezialisierten Zellen der afferenten Arteriole synthetisiert wird. Die Freisetzung wird zum Einen direkt durch den Sympathikus über β -Rezeptoren im JGA stimuliert. Weiterhin bewirkt eine geringe Natriumkonzentration im distalen Tubulus, welche in der Macula densa als spezialisierter Bereich distaler Tubulusepithelzellen gemessen wird, sowie ein geringer Blutdruck in der afferenten Arteriole eine Freisetzung. Renin spaltet das in der Leber synthetisierte Peptid Angiotensinogen zum Prohormon Angiotensin I (Ang I). Ang I wird im Anschluss durch das ACE in den Endothelzellen der Lunge zum aktiven Gewebshormon Ang II überführt. Seine Wirkung entfaltet Ang II über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, hauptsächlich über die beiden Isoformen Typ 1 (AT_1R) und Typ 2 (AT_2R). Der AT_1R ist in vielen Geweben vorhanden, wird aber vornehmlich in Gefäßen, Leber, Lunge, Gehirn und Herz expremiert [22]. An den Gefäßen vermittelt der AT_1R eine direkte Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen (engl. vascular smooth muscle cell, VSMC) und hat damit einen blutdrucksteigernden Effekt. Weitere Wirkungen des AT_1R auf das kardiovaskuläre System sind eine gesteigerte Kontraktilität der Kardiomyozyten, die Induzierung einer kardialen Hypertrophie, eine gesteigerte Plättchenaggregation und Thrombogenese sowie die Induzierung fibrotischer Prozesse [22]. Der AT_2R scheint in der Embryogenese eine wichtige Rolle zu spielen und ist für das kardiovaskuläre System von untergeordneter Bedeutung. Ihm werden eher antiproliferative und pro-apoptische Wirkungen zugeschrieben [22].

Die für das RAAS bedeutendste Funktion von Ang II ist die AT_1R -vermittelte Stimulation der Synthese und Freisetzung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Aldosteron ist der wichtigste Vertreter der Mineralokortikoide und entfaltet seine Wirkung über den Mineralokortikoidrezeptor (MR). Der MR gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren mit zytosolischer Lokalisation. Die Bindung von Aldosteron an den MR führt zur Translokalisierung des Komplexes in den Zellkern, wo er als Transkriptionsfaktor die Expression MR-abhängiger Gene reguliert. Über die genomischen Effekte stimuliert Aldosteron im distalen Tubulus die Rückresorption von Natrium in den systemischen Kreislauf. Aufgrund osmotischer Effekte folgt diesem Vorgang die passive Resorption von Wasser, wodurch Aldosteron insgesamt eine entscheidende Rolle im Wasser- u. Elektrolythaushalt sowie für die mittelfristige Blutdruckeinstellung des Körpers einnimmt [23]. Neben den langsamen, genomisch vermittelten Effekten wurden unter anderem für Endothelzellen, VSMCs und Kardiomyozyten auch schneller vermittelte Aldosteroneffekte beschrieben [24]. Ob für diese sog. „second messenger“-Signalwege ebenfalls der MR verantwortlich ist, oder ob alternative Rezeptoren existieren, ist noch nicht abschließend geklärt. Unter chronischem Einfluss kann Aldosteron eine pathophysiologische Bedeutung für das kardiovaskuläre System annehmen. In zahlreichen Tiermodellen konnte bereits die Rolle von Aldosteron für die renale und kardiovaskuläre Schädigung mit der Induzierung eines fibrotischen Gewebsumbaus demonstriert werden [25, 26]. Besonders umfangreich wurden die Effekte eines Mineralokortikoidexzesses auf das Herz untersucht. Eine Behandlung mit Aldosteron führt in Kombination mit einer Kochsalzdiät unweigerlich zu einer arteriellen Hypertonie in Kombination mit linksventrikulärer Hypertrophie und kardialer Fibrose [27]. In den RALES und EPEPHUS Studien konnte zudem bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion durch die Behandlung mit Aldosteronantagonisten unabhängig vom Blutdruck das Gesamtüberleben verbessert und das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse reduziert werden. [28, 29]. Eine Übersicht der kardiovaskulären Aldosteroneffekte gibt Abb. 1.5.

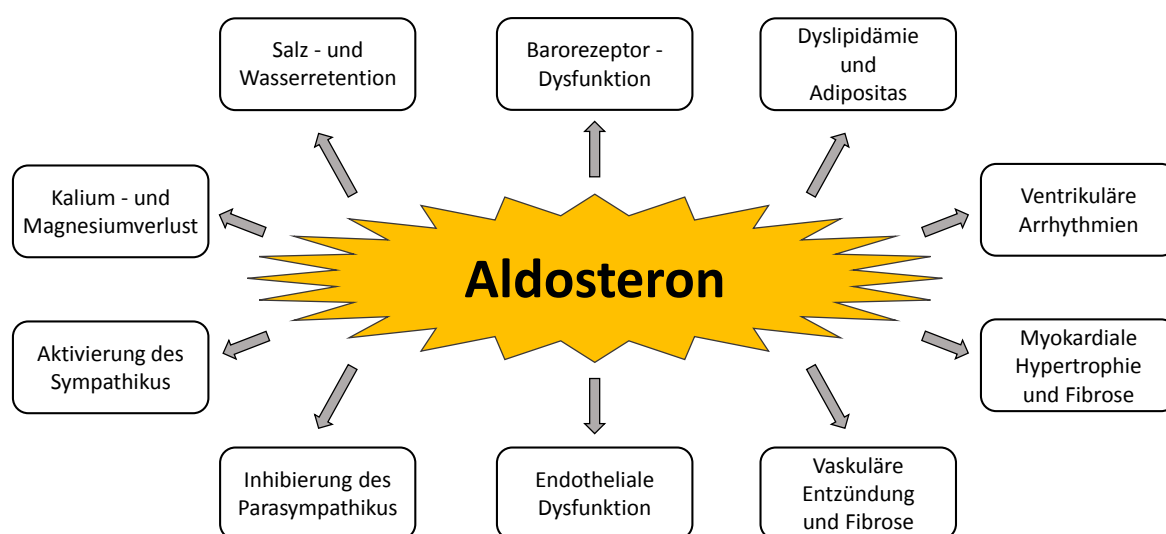


Abb. 1.5 Kardiovaskuläre Effekte des Aldosterons (modifiziert nach [22])

1.4 Tierexperimentelle Modelle zur kardiorenenalen Interaktion

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist die klinische Situation von Patienten mit CNI. Wie in Kapitel 1.2 bereits erläutert, sind diese Patienten prädisponiert für die Entwicklung eines CRS IV. Ein aktiviertes RAAS führt zu hohen Konzentrationen von zirkulierendem Ang II und Aldosteron und in der Folge zur Entwicklung einer arteriellen Hypertonie. Unter chronischem Einfluss sind sowohl direkte Gewebseffekte der zirkulierenden Botenstoffe (siehe Kap.1.3) als auch die arterielle Hypertonie an sich Risikofaktoren für die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie (LVH) mit kardialem Remodeling und Funktionseinbußen. Es existieren verschiedene Tiermodelle zur Untersuchung der kardiorenenalen Interaktion. Beispielsweise kann über die kontinuierliche Infusion von AngII ein chronisch aktiviertes RAAS simuliert werden. Das in der vorliegenden Arbeit angewandte DOCA-Salz Modell ist jedoch besser geeignet die kardiorenenalen Interaktionen vor dem Hintergrund einer CNI zu imitieren. Die Abnahme der renalen Filtrationskapazität wird über die Reduktion der Nephronenzahl durch eine unilaterale Nephrektomie erreicht. Ein Hyperaldosteronismus wird durch die subkutane Applikation des Aldosteronagonisten Deoxykortikosteronacetat (DOCA) simuliert. Um die DOCA-Effekte zu verstärken wurde den Tieren eine 1% NaCl-Lösung mit dem Trinkwasser verabreicht. Die Entwicklung einer Hypertonie unter DOCA-Salz verläuft in mehreren Phasen [30], die sich bezüglich der zugrunde liegenden Pathomechanismen unterscheiden. Es wird eine frühe Phase innerhalb der ersten Tage von einer zweiten Phase unterschieden, die sich über die darauffolgenden Wochen erstreckt. Wird die Behandlung weiter fortgesetzt, so stellt sich innerhalb weniger Monate eine maligne Phase mit therapieresistenter Hypertonie ein [30]. Titze et al. beschrieben in einer DOCA-Salz-Studie an Ratten eine Natriumretention unter der Behandlung, die nur mit einer moderaten Wasserretention einherging [31]. Es konnte eine vermehrte Speicherung des rückresorbierten Natriums hauptsächlich im Muskelgewebe und der Haut demonstriert werden, welche teilweise über den Verlust von Kalium osmotisch neutralisiert wurde. Dieser Vorgang wird auch als „Natriumescape“ bezeichnet und stabilisiert die Flüssigkeits-homöostase in einem gewissen Maß. Außerdem führt eine erhöhte Salzzufuhr kompensatorisch zu einer vermehrten Salz - u. Wasserexkretion in der Niere [32]. Ein erhöhtes intravasales Volumen kann also nur bedingt verantwortlich sein für die induzierte Hypertonie im DOCA-Salz-Modell. Sie spielt nur in den ersten Tagen der Behandlung eine Rolle, bevor die genannten Kompensationsmechanismen greifen. Schenk und McNeill stellten in einer Übersichtsarbeit die Bedeutung von neurohumoralen Mechanismen heraus [33]. Eine wichtige Rolle scheint in dem Zusammenhang eine erhöhte Sympathikusaktivität zu spielen, was durch erhöhte Katecholaminspiegel unter DOCA+Salz belegt werden kann[34]. Die erhöhten NaCl-Serumspiegel scheinen über eine erhöhte Sensitivität des Sympathikus ein wichtiger Triggerfaktor für die Entstehung der Hypertonie zu sein und verstärken die DOCA-Wirkung [35]. Umgekehrt kann ein abrupter Abfall der NaCl-Spiegel in der frühen Phase der DOCA-Behandlung den Blutdruck und die Sympathikusaktivität

normalisieren [35]. In der späten Phase der DOCA-Salz-Hypertonie spielen vermehrt humorale Mechanismen vermittelt durch Endothelin (ET-1) und Vasopressin eine Rolle [30]. Neben den blutdrucksteigernden Effekten können diese Botenstoffe auch über direkte hormonelle Effekte eine Myokardhypertrophie vermitteln (siehe Kap. 1.5.1).

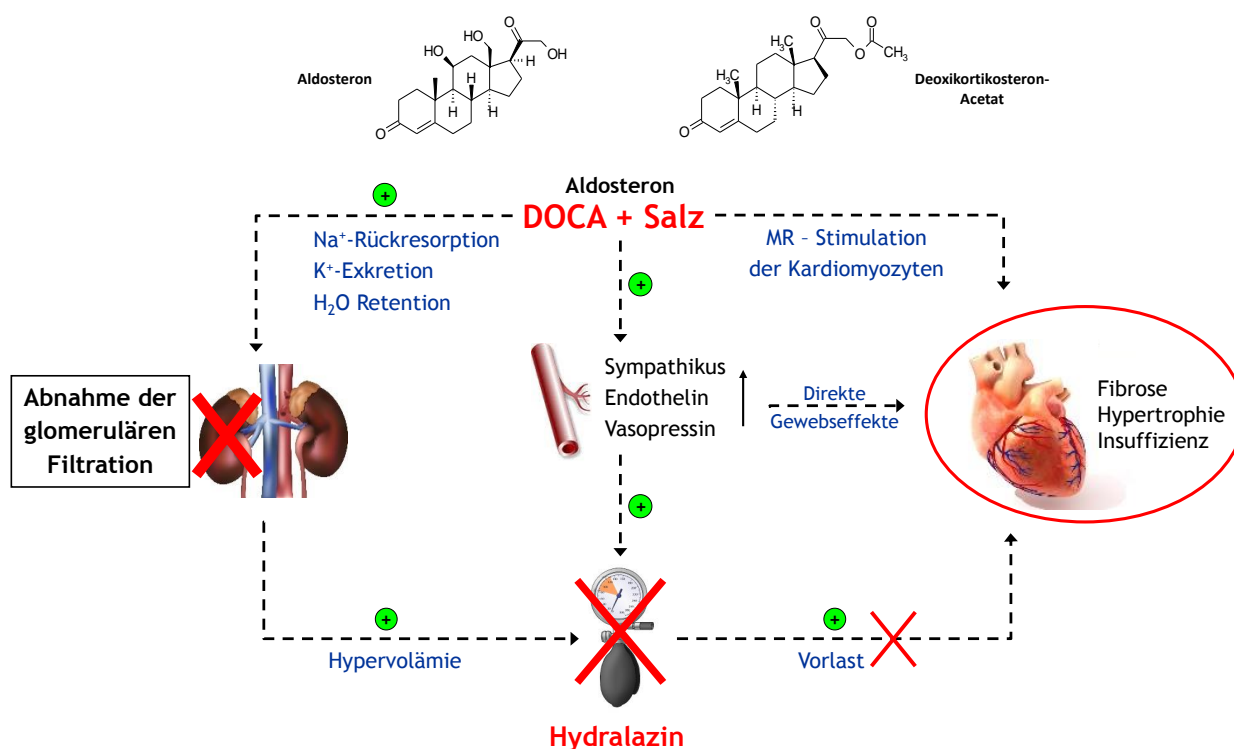


Abb. 1.6 Pathomechanismen im DOCA-Salz-Modell

Das kardiale Remodeling erfolgt im DOCA-Salz Modell im Wesentlichen über 2 Mechanismen. Über die Erhöhung neurohumoraler Botenstoffe wie Katecholamine, Aldosteron und Endothelin werden direkte Effekte über die Aktivierung gewebständiger kardialer Rezeptoren vermittelt. Weiterhin erhöht eine vermehrte renale Absorption von Natrium und Wasser das intravasale Volumen. In Kombination mit der Katecholamin vermittelten Vasokonstriktion steigt der arterielle Blutdruck und damit die kardiale Vorlast. Dieser Effekt wird durch die Normalisierung des Blutdrucks mit dem Vasodilatator Hydralazin neutralisiert

Im klinischen Alltag werden Patienten mit erhöhtem Blutdruck in der Regel antihypertensiv behandelt. Um diese Situation zu simulieren und um blutdruckunabhängige Effekte des DOCA-Salz-Modells zu untersuchen, wurden die Versuchstiere mit dem Vasodilatator Hydralazin behandelt. Zu Versuchsende erfolgte die Untersuchung der Herzen auf etwaige Adaptationsvorgänge und deren molekulare Mechanismen.

1.5 Die Myokardhypertrophie

Die Myokardhypertrophie (MH) wird definiert als eine Zunahme des Herzgewichts und tritt in der Regel als Folge einer chronischen Dauerbelastung des Herzens auf. Kardiomyozyten besitzen als postmitotische Zellen keine Fähigkeit zur Zellteilung [36]. Ein Zuwachs an Myokardgewebe kann nur durch eine Zellhypertrophie, also die Vergrößerung individueller Herzmuskelzellen, erfolgen. Abhängig vom vorherrschenden Stimulus kann sich eine MH in physiologische oder pathologische Formen entwickeln. Pathologische Hypertrophieformen treten meist als Folge einer Druck - od. Volumenbelastung auf, können sich aber auch nach Myokardinfarkt (MI) und chronisch-ischämischen Zuständen entwickeln. Die dauerhafte Aktivierung hypertropher Signalwege führt zur Dekompensation der adaptativen Prozesse [37] und geht mit einer chronischen Gewebsinflammation einher [38]. Dies sorgt zusammen mit einer verschlechterten Sauerstoffversorgung der hypertrophen Kardiomyozyten [39] für eine fortschreitende Degeneration und schließlich zum Zelluntergang. Der Verlust der Kardiomyozyten wird von Fibroblasten und Adipozyten durch Kollagen und Fett ersetzt, was zu einer kardialen Fibrose mit reduzierter Pumpleistung und Ventrikeldilatation führt [40]. Je nach Ausprägungsgrad sind die Veränderungen potentiell reversibel, gehen bei fortgeschrittener Erkrankung jedoch meist in ein irreversibles Stadium über. In dieser Form gilt die MH als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen [41]. Eine physiologische Zunahme des Herzgewichts tritt vor allem in der kindlichen Wachstumsphase und der Schwangerschaft auf, wird aber auch unter dem Einfluss des sportlichen Trainings beobachtet. Sie weist eine normale bis verbesserte Herzfunktion mit normaler histologischer Struktur auf und ist vollständig reversibel [42]. Das durch exzessives Training ausgebildete sog. „Sportlerherz“ ist nicht mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert [43]. Im Falle der CNI ist die Entwicklung der MH auf das aktivierte RAAS zurückzuführen. Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, führt die Akkumulation der hormonaktiven Substanzen AngII und Aldosteron über hämodynamische Veränderungen und direkte Gewebseffekte auf das Myokard zur Ausbildung einer MH.

Bezüglich der Herzmorphologie kann man die MH in eine konzentrische und exzentrische Form einteilen. Die exzentrische Form entwickelt sich meist auf dem Boden einer dauerhaften Volumenbelastung, die die Wandspannung in der Diastole erhöht. Sie ist gekennzeichnet durch eine Dilatation der Kammern mit erhöhtem Kammervolumen und herabgesetzter oder unveränderter relativer Wanddicke. Auf histologischer Ebene wird ein Längenzuwachs der Kardiomyozyten ohne Veränderung des Querdurchmessers beobachtet. Dem gegenüber steht die konzentrische MH, die durch eine chronische Druckbelastung hervorgerufen wird. Auf die erhöhte Wandspannung in der Systole reagiert das Herz mit einer Zunahme der relativen Wandstärke und einer Abnahme des Kammervolumens. Auf histologischer Ebene wird eine Zunahme des Myozytenquerdurchmessers bei unveränderter Länge beobachtet. Bei Beseitigung der hervorrufenden Stimuli ist diese Form potentiell reversibel. Halten die Stimuli jedoch an ist ein Übergang in die dilatative Form möglich (zusammengefasst in [44]). Klinische Studien weisen darauf hin, dass die exzentrische MH mit

einem höheren kardialen Risiko behaftet ist als die Konzentrische [45]. Eine Übersicht gibt die Abbildung 1.7.

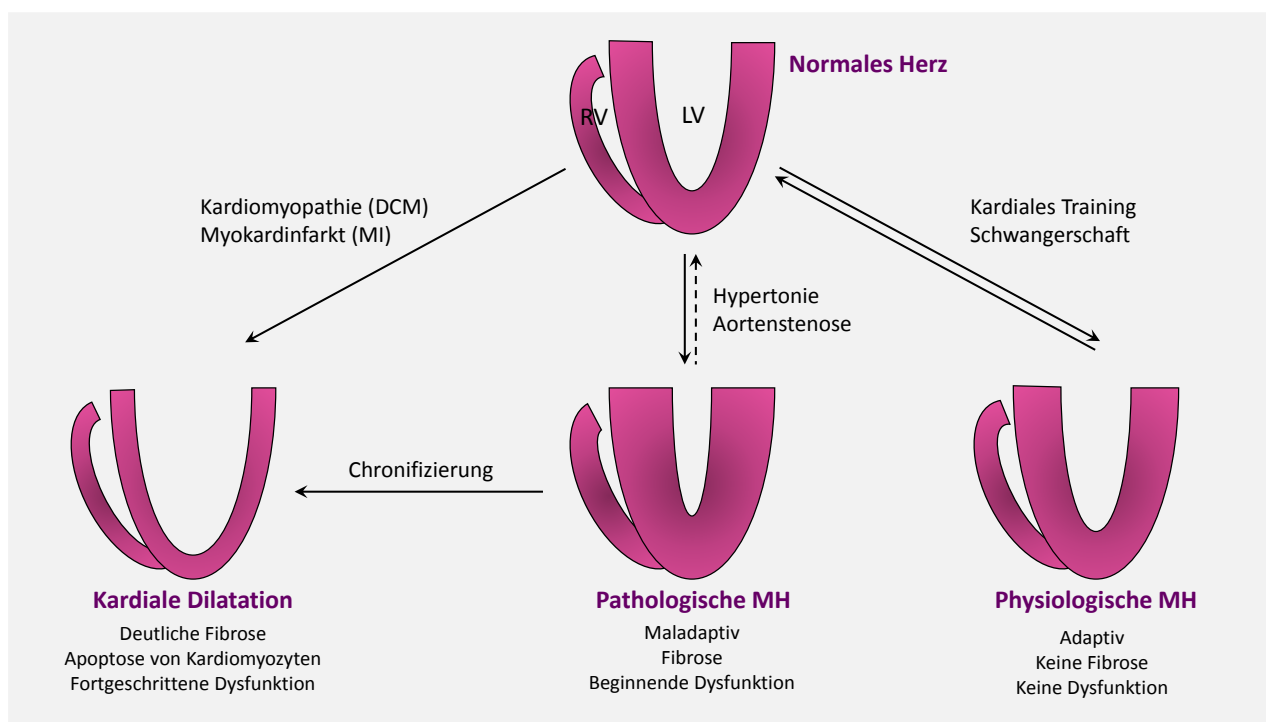


Abb. 1.7 Phänotypen der Myokardhypertrophie (modifiziert nach [46])

Schwangerschaft oder kardiales Training bewirkt einen adaptiven Zuwachs an Herzmuskelgewebe ohne fibrotische Umbauprozesse. Die Herzfunktion ist verbessert oder unverändert. Nach Wegfall der stimulierenden Reize ist diese Form der MH reversibel. Als Folge von krankhaften Prozessen, wie Klappenfehlern oder Hypertonie, entwickelt sich eine pathologische MH mit histologischen Veränderungen. Die Herzfunktion ist verschlechtert. Die konzentrische Form ist teilweise reversibel, kann bei Chronifizierung jedoch in die dilatative Form übergehen. Diese besitzt kein reversibles Potential.

1.5.1 Signalwege in der Myokardhypertrophie

Die Myokardhypertrophie kann im Wesentlichen durch Dehnungsreize oder neurohumorale Faktoren stimuliert werden [46]. Im letzteren Fall kommt es über die Freisetzung von Hormonen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren zur Aktivierung kardialer, membranständiger Rezeptoren. Zu den häufigsten Rezeptortypen zählen die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) [46]. Diese Rezeptoren sind eng mit einem komplexen Netzwerk an Signalkaskaden verknüpft. Sie nehmen Einfluss auf die Genexpression im Zellkern und auf die Proteinsynthese bzw. den Proteinabbau und koordinieren so das hypertrophe Wachstum des Myokards [46]. Eine zentrale Rolle für die Vermittlung des hypertrophen Myokardwachstums nehmen der Calcineurin/NFAT- und PI3K/AKT/mTOR-Signalweg sowie das Netzwerk der mitogen-aktivierten Kinasen (MAPK) ein (Abb. 1.8).

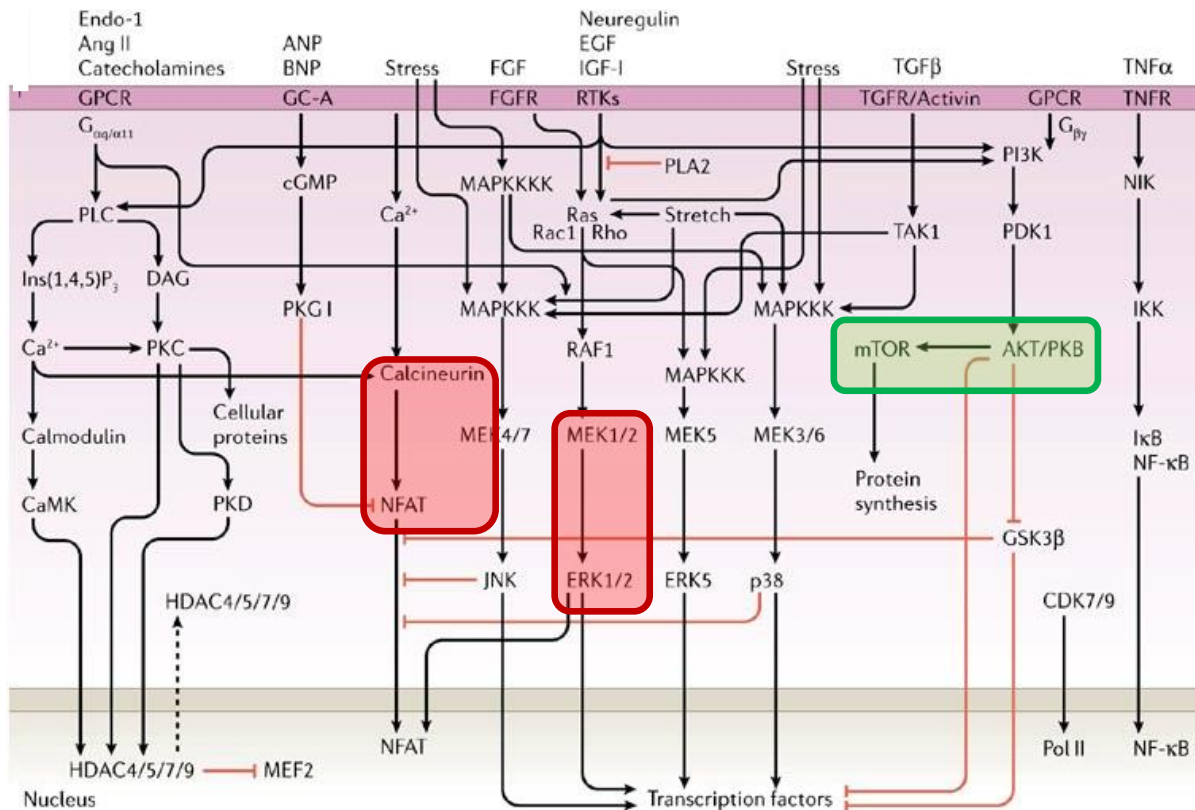


Abb. 1.8 Signalwege der MH (modifiziert nach [46])

Die Differenzierung zwischen physiologischer und pathologischer MH hängt vom vorliegenden Stimulus und der nachgeschalteten Aktivierung spezifischer Signalwege ab. Wachstumsfaktoren wie der Insuline-like growth factor (IGF-1) werden im postnatalen Wachstum oder als Folge von sportlichem Training ausgeschüttet und induzieren die Entwicklung einer physiologischen MH [44]. Das Myokard verfügt über einen Insulin-like growth factor Rezeptor (IGF-1R), welcher als RTK die Aktivierung der Phosphoinosid-3-Kinase (PI3K) bewirkt. In der Folge kommt es über die Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT) zur Aktivierung eines Proteinkomplexes, der als mechanistic target of Rapamycin (mTOR) bezeichnet wird. Da der PI3K/AKT/mTOR - Signalweg den inhaltlichen Kern der vorliegenden Arbeit bildet, soll er im nachfolgenden Kapitel näher beschrieben werden.

Pathologische Zustände wie bspw. ein Bluthochdruck oder Klappenvitien gehen mit einer Freisetzung der hormonell aktiven Substanzen Ang II, ET-1 und Katecholaminen einher. Diese binden als Liganden an kardiale GPCRs und aktivieren über die Isoform $G_{\alpha_{q/11}}$ „downstream“ Signalproteine wie MAPKs, Proteinkinase C (PKC) und Phospholipase C (PLC). Das Resultat ist die Induzierung der Effektorproteine Calcineurin/NFAT (NFAT, engl. nuclear factor of activated T-cells) und der extracellular regulated kinase 1/2 (ERK1/2), welche in dieser Situation die pathologische Hypertrophie des Herzens vermitteln (siehe auch Abb. 1.9).

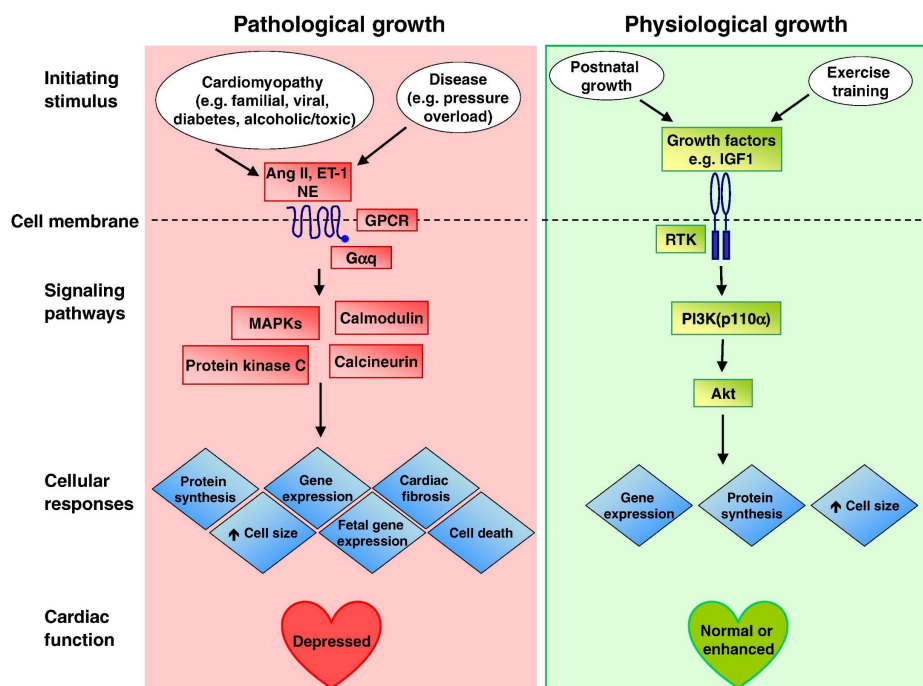


Abb. 1.9 Pathologische und physiologische Signaltransduktion der MH [44]

Ang II, ET-1 und Katecholamine induzieren über GPCRs die Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalweges und der MAPKs, was eine maladaptive MH mit reduzierter Herzleistung zur Folge hat (links). Adaptives Myokardwachstum (rechts) hervorgerufen durch Wachstum oder Training wird durch den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg vermittelt. Die Herzfunktion verbessert sich oder bleibt gleich.

1.5.2 Der mTOR-Signalweg in der MH

In den frühen 90ern wurde mTOR als das Zielmolekül von Rapamycin entdeckt [47]. Das mTOR-Molekül ist eine atypische Serin/Threonin-Kinase und nimmt eine zentrale Stellung im Zellstoffwechsel ein. Es unterliegt Einflüssen aus Nährstoffangebot, zellulärem Stress und Wachstumsfaktoren und steuert zelluläre Prozesse wie Proteinsynthese, Autophagie, Zellzyklus und Wachstum [48]. mTOR formt im Zusammenspiel mit zahlreichen anderen Proteinen zwei funktionell und strukturell unterscheidbare Komplexe mit dem Namen mTOR-Komplex 1 (mTORC1) und 2 (mTORC2). Eine Übersicht über Struktur, Einflüsse und Funktionen der mTOR-Komplexe gibt die Abbildung 1.10.

Die beiden strukturbestimmenden Komponenten des mTORC1 sind das Gerüstprotein Raptor [49] sowie das regulative PRAS40 [50]. Zu seinen Hauptfunktionen zählt die Regulierung von Zellwachstum u. -teilung [48, 51]. Die Aktivierung von mTORC1 verläuft indirekt über Harnitin/Tuberin (TSC1/2) und Rheb (Ras homolog enriched in brain) [51]. TSC1/2 ist eine GTPase für Rheb und überführt es durch Dephosphorylierung in seine inaktive GDP-gebundene Form [52]. Da aktives GTP-Rheb die Kinaseaktivität von mTORC1 sehr stark stimuliert, fungiert TSC1/2 also als dessen negativer Regulator [48]. TSC1/2 unterliegt der Beeinflussung zahlreicher PI3K

abhängiger „upstream“-Signale wie Wachstumsfaktoren und Insulin. Verschiedenste Signalproteine, u.a. AKT und ERK1/2, inaktivieren TSC1/2 und stimulieren so die mTORC1-Aktivität [48]. MTORC1 initiiert in erster Linie einleitende Prozesse der Proteinbiosynthese durch Phosphorylierung seiner beiden Substrate eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein (4EBP-1) und S6 Kinase 1 (S6K1) an der Aminosäure (AS) Thr389 (p70S6K^{Thr389}). Diese vermitteln anschließend die Dissoziation von Inhibitoren des Translationsapparates [53]. Weitere für die Initiation der Translation wichtige Faktoren werden zuvor von der p70S6K aktiviert und bilden gemeinsam den pre-initiation complex (PIC) [54]. Ihre volle Aktivität erreicht die p70S6K jedoch erst durch eine weitere Phosphorylierung, die durch die 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) vollzogen wird [55]. Dieser Ablauf ist die Voraussetzung für den Abschluss der Initiationsphase der Proteinbiosynthese und den Übergang in die Translationsphase [56].

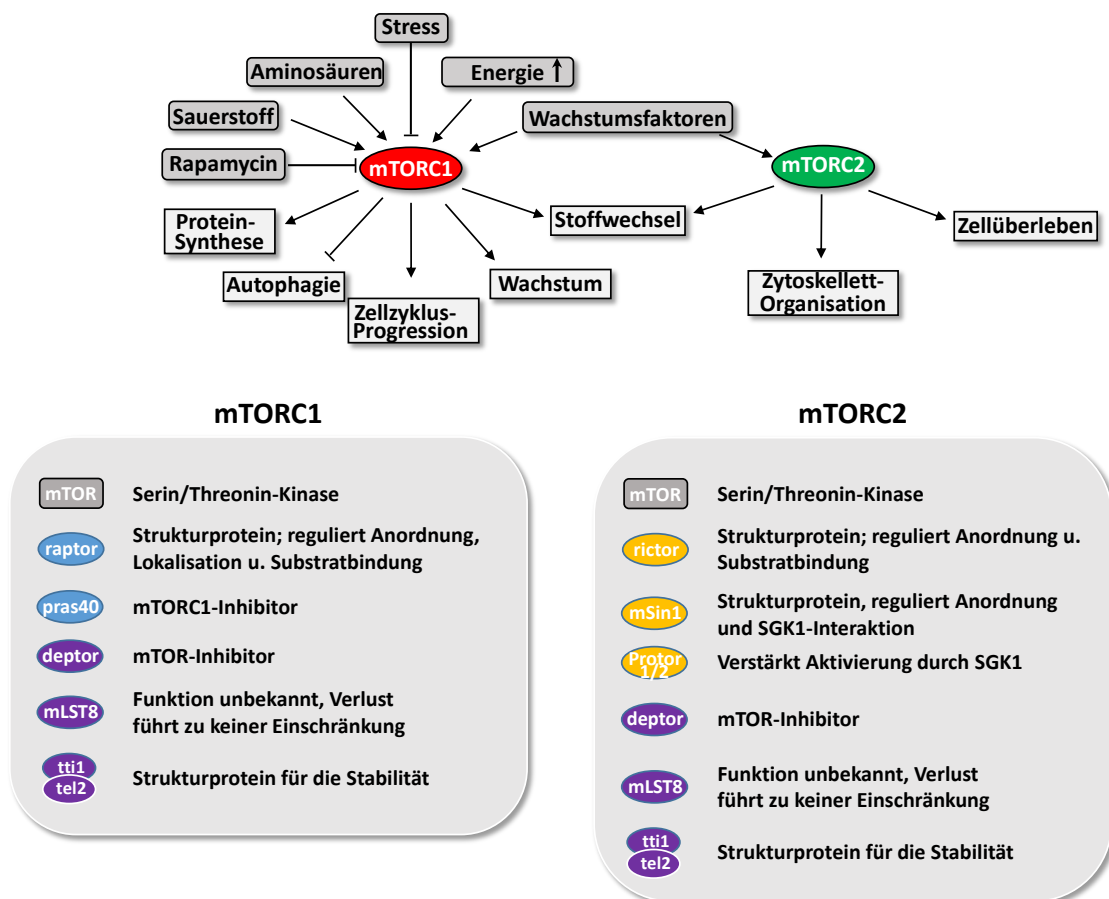


Abb. 1.10 mTOR1- u. mTOR2-Komplex (modifiziert nach [48])

Der mTORC2 unterscheidet sich strukturell durch seine Bindung an Rictor, mSin1 und Protor 1/2 [57]. Im Vergleich zu mTORC1 ist viel weniger über das mTORC2-Netzwerk bekannt. Einflüsse des Nährstoffangebots scheinen die mTORC2-Aktivität nicht zu beeinflussen, Wachstumsfaktoren wie Insulin jedoch wirken stimulierend [48]. Der Mechanismus der mTORC2-Aktivierung ist noch

nicht vollständig verstanden. Es gibt Hinweise darauf, dass sie ebenfalls PI3K-abhängig erfolgt und die Anwesenheit von Ribosomen erfordert [58]. MTORC2 kontrolliert Kinasen wie AKT, SGK1 (serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1) oder PKC α . Über die Aktivierung von PKC α nimmt der mTORC2 abhängig vom Zelltypen Einfluss auf die Zellform, indem es die Organisation des Aktin-Zytoskellets reguliert [57, 59]. AKT ist ein zentraler Regulator von Prozessen des Metabolismus, der Apoptose und Proliferation. MTORC2 phosphoryliert AKT an der AS Ser473, was essenziell für dessen volle Kinaseaktivität ist [60]. Über diesen Mechanismus werden dem MTORC2 antiapoptotische Effekte zugeschrieben.

Die alleinige Phosphorylierung an Ser473 reicht jedoch nicht aus um AKT vollständig zu aktivieren. Dazu ist eine weitere Phosphorylierung an der Stelle Thr308 notwendig. Diese wird über die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade vermittelt. Die für die MH relevante Signaltransduktion beginnt bei der Aktivierung kardialer Rezeptoren aus der Familie der RTKs durch IGF-1 oder Insulin. Durch die Ligandenbindung erfährt die RTK eine Konformationsänderung, welche über eine Autophosphorylierung der intrazellulären Untereinheit zur Aktivierung der Kinase führt. In der Folge wird über die Phosphorylierung von Adaptermolekülen die PI3K aktiviert. Die PI3K ist eine Enzymfamilie, welche in 3 Klassen unterteilt wird, wobei die Klasse I im kardiovaskulären System expremiert wird [61]. Über die Stimulation von RTKs erfolgt eine Aktivierung der PI3K der Klasse I_A, indem sich die beiden Untereinheiten p85 α und p110 α in Assoziation zur RTK zu einer funktionellen Einheit zusammenfügen [62]. Diese sind in der Lage membranständige Phospholipide zu phosphorylieren. Im Detail erfolgt die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) an der 3-OH Stelle des Inositolringes, wodurch der „second messenger“ Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) generiert wird. Die Menge an PIP₃ wiederum wird durch Phosphatasen wie PTEN (phosphatase and tensin homolog) eng kontrolliert. PTEN entfernt die Phosphatgruppe an der 3-OH Stelle und antagonisiert auf diese Weise die PI3K-vermittelte PIP₃-Generierung. PIP₃ ist in der Lage Enzyme, die über eine sogenannte pleckstrin homology domain (PH-domain) verfügen zu binden [63]. Auf diese Weise werden sowohl AKT als auch die PDK1 an der Zellmembran stabilisiert [64]. In dieser Konstellation kommt es zur Phosphorylierung von AKT an seiner katalytischen Domäne Thr308 durch die PDK1 [65]. AKT ist eine Serin/Threonin Kinase und kommt in den 3 Isoformen AKT1-3 vor, von denen lediglich AKT1 u. AKT2 im Herzen expremiert werden [46]. Als zentrales Enzym besitzt es über 100 Substrate. Es vermittelt sowohl proliferative, als auch antiapoptotische Effekte. Durch die Hemmung von TSC1/2 ist es über die Aktivierung von mTORC1 an der Regulierung der Proteintranslation beteiligt. Wie bereits erwähnt ist für die volle AKT Aktivierung sowohl die Phosphorylierung an Threonin 308 als auch an Serin 473 erforderlich [66]. Neben zahlreichen anderen Molekülen wird diese durch mTORC2 vermittelt. Damit befindet sich AKT als wichtiger Aktivator von mTORC1 auf der einen Seite „upstream“ vom mTOR-Molekül, auf der anderen Seite ist es als wichtiges Substrat von mTORC2 ebenfalls „downstream“ lokalisiert. Zusammen mit den zahlreichen Feedbackmechanismen und Interaktionen mit anderen Signalwegen unterstreicht dies die Komplexität des mTOR-Netzwerkes.

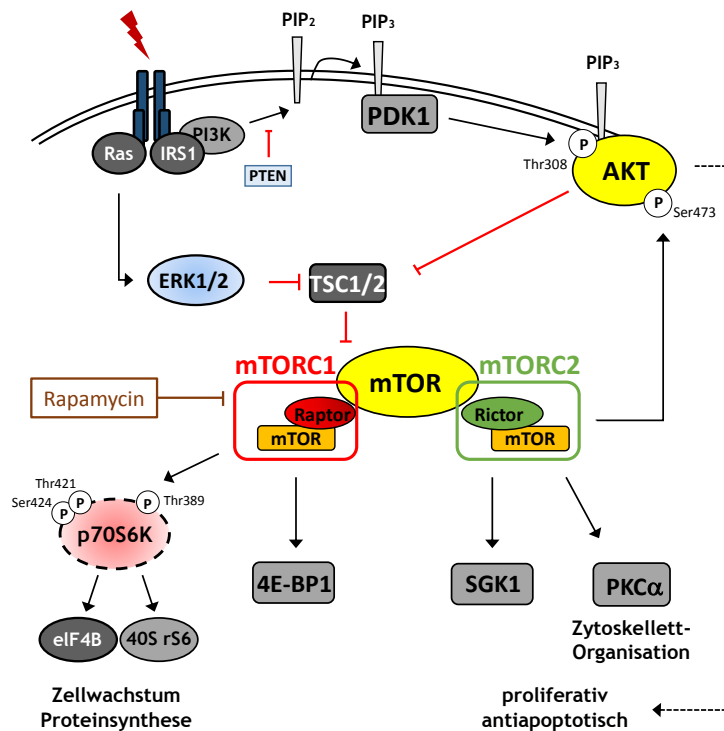


Abb. 1.11 Das mTOR-Netzwerk

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg wird mit der physiologischen Form der MH in Verbindung gebracht. Tierexperimentelle Studien bestätigen eine mTOR-Aktivierung durch chronisches Training, was in der Folge eine Phosphorylierung von AKT^{Ser473} mit sich führt [67]. Ein „Knockout“ für AKT1 in Mäusen schwächt dagegen die Ausbildung einer adaptiven MH unter chronischem Schwimmtraining ab ohne dabei die maladaptive, hypertrophe Antwort auf eine chronische Druckbelastung zu verändern [68]. Andererseits geht ein konstitutiv aktives AKT über einen längeren Zeitraum mit einer dilatativen MH und fibrotischem Remodelling einher [69]. Zusammen mit dem positiven Effekt einer pharmakologischen mTOR-Blockade (siehe Kap. 1.6) wird daher deutlich, dass der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg auch für die pathologische MH eine Rolle spielt.

1.6 Rapamycin - Wirkung und klinische Anwendung

Rapamycin, auch Sirolimus genannt, wurde ursprünglich als antimykotisch wirkendes Metabolit des Bakteriums *Streptomyces hygroscopicus* entdeckt. Vermehrte Aufmerksamkeit erhielt es durch den Nachweis einer breiten antiproliferativen und immunsuppressiven Wirkung auf Säugetierzellen. Rapamycin bildet mit dem intrazellulären 12-kDa FK506-binding Protein (FKBP12) einen Komplex, der mit mTORC1 interagiert und dessen Funktion inhibiert [47, 70]. Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden. Diskutiert werden sowohl eine Änderung der

strukturellen Integrität [71] sowie die Reduzierung der Kinaseaktivität [72]. Eine Interaktion von Rapamycin mit mTORC2 ist nicht möglich, weshalb dieser lange Zeit als Rapamycin-insensitiv galt. Später konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Langzeitbehandlung mit Rapamycin auf bislang unbekannte Weise in einigen Zelltypen zu einer Reduzierung der mTORC2-Aktivität führt [73].

Die für den Hintergrund dieser Arbeit relevante klinische Anwendung von Rapamycin ist die immunsuppressive Therapie nach NTx. Die klassische Therapie besteht aus einem Calcineurin-Inhibitor (Cln-I), Mycophenolat Mofetil und Prednisolon. Dieses Regime verhindert Abstoßungsreaktionen effektiv [74], begrenzt allerdings durch die erhebliche Nephrotoxizität der Cln-I das Transplantatüberleben [75]. Weiterhin steigt unter Cln-I das kardiovaskuläre Risiko sowie das Auftreten maligner Neoplasien. Folglich versterben die meisten NTx-Patienten an kardiovaskulären Ursachen oder Malignomen [76]. Aufgrund dieser starken Nebenwirkungen (NW) wurde nach alternativen Therapie-Regimen gesucht und den mTOR-Inhibitoren (mTOR-I) als neuere Immunsuppressiva vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt. mTOR-I sind weniger nephrotoxisch als Cln-I. Sie verhindern akute Abstoßungsreaktionen genauso effektiv wie Cln-I bei signifikant niedrigeren Serumkreatinin-Werten [74]. Niedrige Serumkonzentrationen an Kreatinin zeigen eine gute Transplantatfunktion an und sind ein positiver Prädiktor für das Langzeitüberleben des Transplantates [77]. Weiterhin konnte unter mTOR-I eine effektive Reduktion der Inzidenz von malignen Neoplasien um 40% nachgewiesen werden [76]. Aufgrund fehlender Langzeiterfahrungen kann jedoch noch keine generelle Empfehlung für eine mTOR-I basierte Immunsuppression nach NTx gegeben werden. Eine Umstellung der Therapie kann beim Auftreten Cln-I assoziierter NW (Hypertonie, Diab. mell., Nephrotoxizität) sowie Tumoren jedoch erwogen werden. Ihre immunsuppressive Wirkung entfalten mTOR-I über die Inhibition der B- u. T-Zellaktivität durch Unterbrechung des Zellzyklus in der späten G1-Phase [78]. Im Gegensatz zu Cln-I sind sie in der Lage sowohl Ca^{+2} -abhängige als auch Ca^{+2} -unabhängige Signalwege zu blockieren, wodurch die Stimuli verschiedenster Interleukine wie IL-2, IL-4 und IL-15 effektiv blockiert werden [79]. Die häufigsten NW von Rapamycin sind Dyslipidämie, eine gestörte Glucosetoleranz und Wundheilungsstörungen. In seltenen Fällen kann bei vorbestehendem Nierenschaden eine Proteinurie beobachtet werden. Die Bioverfügbarkeit ist interindividuell sehr variabel, weshalb die Dosierung mit Hilfe von Blutspiegelkontrollen angepasst wird (Zielbereich: 4-12 ng/ml).

NTx-Patienten sind besonders gefährdet ein CRS IV mit kardialem Remodeling zu entwickeln. Ein Hauptmerkmal der zellulären Hypertrophie ist eine gesteigerte Proteinbiosynthese, welche dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg unterliegt. Besonders interessant ist in dieser Situation, wie sich eine pharmakologische mTOR-Inhibition auf den kardialen Phänotypen auswirkt. In Mäusen konnte Rapamycin die Entwicklung einer druckinduzierten MH mindern [80] bzw. eine manifeste MH nach Druckbelastung sogar umkehren [81]. Klinische Studien belegen den positiven Effekt einer Sirolimus-basierten Immunsuppression bei NTx-Patienten auf das kardiale Remodelling [82]. Mögliche Geschlechtseffekte wurden in diesen Studien jedoch nicht untersucht.

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

In der Klinik werden seit Langem geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ausprägung und Progression der chronischen Nieren- u. Herzkreislauferkrankungen beobachtet. Frauen weisen zumindest in ihrer reproduktiven Phase geringere Prävalenzen und günstigere Verläufe dieser Erkrankungen auf. Dies gilt auch für das chronische renokardiale Syndrom, bei dem die Betroffenen in der Folge einer primär chronischen Abnahme der Nierenfunktion ein sekundäres kardiales Remodeling mit Myokardhypertrophie und Fibrose entwickeln.

Diese Situation kann im normotensiven DOCA-Salz Modell der Maus durch Reduktion der glomerulären Filtrationskapazität und der Induktion eines Mineralokortikoidexzesses unter antihypertensiver Therapie simuliert werden. Auch bei Mäusen konnten geschlechtsspezifische Unterschiede in der kardialen Adaptation nachgewiesen werden [83]. Im DOCA-Salz Modell sind weibliche Tiere auf funktioneller, struktureller und molekularbiologischer Ebene gegenüber ihren männlichen Partnern bevorteilt [84]. Männliche Tiere reagieren im Gegensatz zu den Weibchen auf den Mineralokortikoidexzess mit der Ausbildung einer maladaptiven LVH, die molekularbiologisch mit der Aktivierung des Calcineurin-Signalweges assoziiert ist [84]. Einen entscheidenden Einfluss auf die Vermittlung dieser Unterschiede scheint dem Effekt der weiblichen Geschlechtshormone auf das kardiovaskuläre System zu zukommen. Eine Studie an mit DOCA-Salz behandelten Mäusen konnte die Rolle des $ER\beta$ für die relative weibliche Kardioprotektion herausstellen [85]. Weibliche Mäuse mit einem $ER\beta$ -“Knockout“ entwickelten unter DOCA-Salz einen dilatativen kardialen Phänotypen mit deutlicher Fibrose und Funktionseinbußen [85]. Die Vermittlung dieser maladaptiven MH ging allerdings nicht mit der Aktivierung des Calcineurin-Signalweges einher, was die Bedeutung von alternativen Signalwegen unterstreicht. Es wird vermutet, dass für die relative weibliche Kardioprotektion die Aktivierung physiologischer Mechanismen eine essentielle Bedeutung hat. In dieser Überlegung rückt der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg als zentrale Schnittstelle der Proteinbiosynthese und Regulation des Zellwachstums in den Fokus neuer Untersuchungen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Effekt einer pharmakologischen mTOR-Inhibition mit Rapamycin auf die kardiale Adaptation im renokardialen Syndrom zu untersuchen und etwaige Unterschiede zwischen den Geschlechtern auf morphologischer, funktioneller und molekularbiologischer Ebene zu identifizieren. Dazu wurden männliche und weibliche Mäuse unter dem Einfluss von DOCA-Salz und antihypertensiver Therapie mit Rapamycin behandelt und gegen eine Vehikelbehandlung verglichen. Mit dem vermehrten Einzug der mTOR-Inhibitoren in die immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation könnten die Ergebnisse der Arbeit neue Anreize für eine geschlechtsspezifische Anpassung der pharmakologischen Strategie in dieser Situation liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuch

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Tierversuch wurde entsprechend den Richtlinien der American Physiological Society durchgeführt. Die notwendige Genehmigung gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes erteilte das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin am 31.07.2011 unter dem Aktenzeichen G 0028/11. Als Versuchsleiter war Dr. rer. nat. Dennis Gürgen zur experimentellen Arbeit an lebenden Wirbeltieren berechtigt. Alle Eingriffe und Untersuchungen an den Versuchstieren wurden von ihm bzw. unter seiner Aufsicht durchgeführt.

Als Tiermodell wurden C57BL/6-Mäuse (C57BL/6JRccHsd) aus der Zucht von Harlan Winkelmann, Germany verwendet. Die Unterbringung der Tiere erfolgte im Center for Cardiovascular Research (CCR, Charité Universitätsmedizin-Berlin, Campus Mitte, Hessische Straße 3-4, 10115 Berlin) unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen und in individuell belüfteten Käfigen (IVC, Makrolon Typ II). Dabei hatten die Mäuse jederzeit *ad libitum* Zugang zu Wasser und Standardfutter. Die Käfige befanden sich in klimatisierten Räumen mit einer mittleren Temperatur von 21-24 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55%. Ein automatisiertes Beleuchtungsregime sorgte für einen zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus, wobei im Hellmodus ca. 60 Lux im Käfig erreicht wurden.

Die Durchführung der telemetrischen Blutdruckmessung fand im Max-Dellbrück Zentrum Berlin (MDC, Robert-Rösslestr. 10 in 13092 Berlin) im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Volkmar Gross statt.

2.1.1 Versuchsdesign

Zentraler Punkt der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses einer mTOR-Blockade mit Rapamycin auf die myokardiale Hypertrophie in einem Modell des CRS Typ IV unter normotensiven Bedingungen. Die Herzen der Versuchstiere wurden daher auf ihre morphologischen, funktionellen und molekularbiologischen Merkmale untersucht. Besonderes Augenmerk lag in diesem Zusammenhang auf etwaige geschlechtsspezifische Unterschiede in der kardialen Anpassungsreaktion auf den DOCA-Salz Stimulus. Aufgrund der zu berücksichtigenden Faktoren ergab sich für das Versuchsdesign eine Aufteilung der Tiere in 8 Versuchsgruppen, in denen zum Einen

die Geschlechter getrennt betrachtet, zum Zweiten die Rapamycinintervention gegen eine Vehikelkontrolle verglichen und zum Dritten die DOCA+Salz-Behandlung gegen eine einfache unilaterale Nephrektomie mit Salzdiät kontrolliert wurde.

Bei allen Versuchsgruppen wurde zu Beginn des Versuches eine linksseitige unilaterale Nephrektomie durchgeführt. Im Anschluss daran erhielten die Versuchstiere für die gesamte Versuchsdauer eine 1%ige Kochsalzdiät. Die Kontrollgruppen werden daher vereinfacht mit Uni-Nx bezeichnet. Tieren der experimentellen Gruppen mit Mineralokortikoidexzess wurde zusätzlich ein DOCA-Pellet implantiert und zur Normalisierung des Blutdruckes dem Trinkwasser der vasodilatorische Wirkstoff Hydralazin in einer Konzentration von 250ng/l zugesetzt. Als Bezeichnung wurde der Begriff DOCA-Salz verwendet. Die eigentliche pharmakologische Intervention mit Rapamycin oder der Vehikelsubstanz als Kontrolle erfolgte per intraperitonealer Injektion an jedem dritten Versuchstag. Durch die Kombination der Behandlungen ergaben sich also 4 Versuchsgruppen pro Geschlecht. Die genaue Gruppenbezeichnung und Tieranzahl sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Geschlecht	UniNx + Salz	DOCA + Salz	UniNx + Salz	DOCA + Salz
	Vehikel	Vehikel	Rapamycin	Rapamycin
♂	9	10	9	14
♀	9	10	10	15
Gesamtanzahl	74			

Tabelle 2.1 Versuchsgruppen und Gruppengröße

Parallel zum eigentlichen Versuch wurden zusätzlich 6 männliche und 6 weibliche Tiere mit einem Radio-Telemtriesender zur kontinuierlichen Blutdrucküberwachung ausgestattet (siehe Kap.2.1.3.5). Diese Tiere erhielten die gleiche Behandlung wie die Tiere der Interventionsgruppen mit DOCA-Salz + Rapamycin. Das Ziel war es, durch die kontinuierliche Blutdrucküberwachung einen Einfluss der Behandlungen auf den Blutdruck auszuschließen und mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede zu erkennen.

2.1.2 Eingriffe und Behandlungen

Im Alter von 10 Wochen erfolgte die Erfassung des Grundzustandes der Tiere. Dazu wurde ihre Körperzusammensetzung durch ein MRT-Verfahren ermittelt sowie eine echokardiographische Untersuchung der Herzmorphologie und -funktion durchgeführt. Nach drei weiteren Tagen begann die Behandlungsphase, welche sich über insgesamt 6 Wochen erstreckte. Am 1. Tag erfolgte bei allen Tieren die linksseitige unilaterale Nephrektomie. Tieren mit DOCA-Behandlung wurde zur gleichen Zeit ein subkutanes DOCA-Pellet implantiert. In der letzten Versuchswoche fand erneut

eine MRT-Messung der Körperzusammensetzung sowie eine echokardiographische Untersuchung des Herzens statt. Weiterhin wurden die Tiere zur Sammeluriningewinnung über 24h in Stoffwechselfäfigen gehalten. Am letzten Versuchstag wurde mittels operativer Einbringung eines Karotiskatheters unter Isofluran-Narkose der arterielle Blutdruck gemessen und die Tiere anschließend durch Entbluten euthanasiert. Das Blut wurde für labortechnische Analysen gesammelt sowie die Herzen zur histologischen und molekularbiologischen Untersuchung entnommen. Eine Übersicht der Eingriffe und Behandlungen gibt Abbildung 2.1. Eine exakte Beschreibung der Eingriffe ist in den folgenden Abschnitten zu finden.

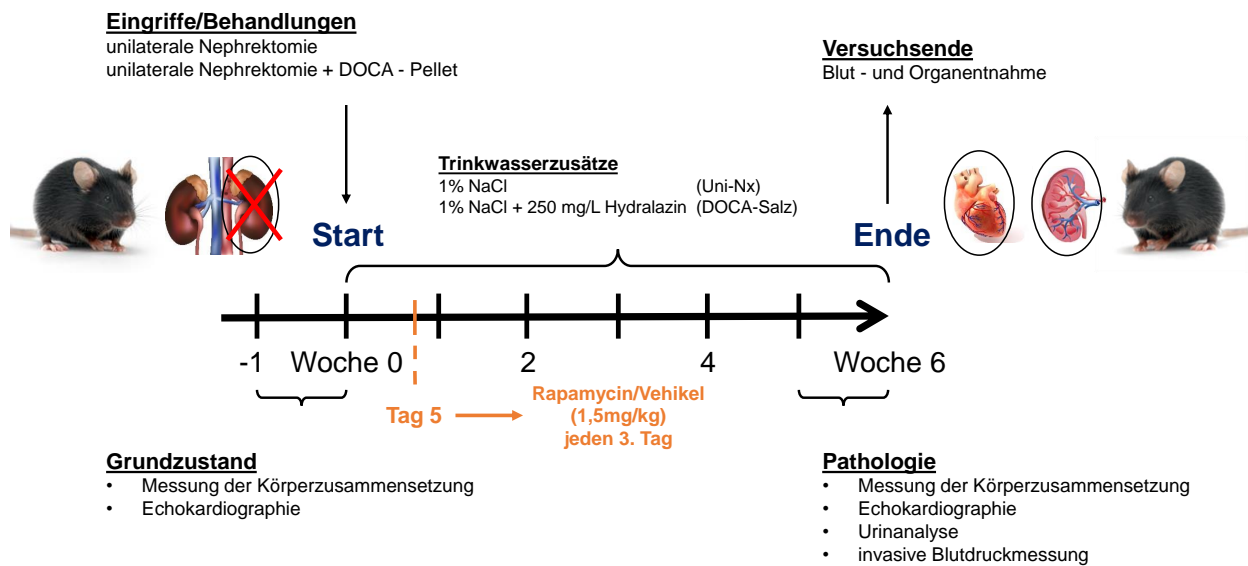


Abb. 2.1 Versuchsübersicht

Zeitliche Darstellung der Eingriffe, Behandlungen und Untersuchungen. Der Versuch erstreckte sich über 6 Wochen. In der Woche vor Versuchsbeginn wurde der Grundzustand der Tiere erfasst, die Charakterisierung pathologischer Veränderungen erfolgte in der letzten Versuchswoche.

2.1.2.1 Anästhesie

Für die operativen Eingriffe wurden die Tiere mittels Inhalationsnarkose sediert. Die Narkoseeinleitung erfolgte durch Inhalation eines Gasgemisches aus 2-3% Isofluran und Sauerstoff über eine Atemmaske. Für die Narkoseerhaltung wurde die Isoflurankonzentration individuell so angepasst, dass eine ruhige Spontanatmung beobachtet werden konnte (1-1,5% Isofluran). Während der gesamten Operationszeit befanden sich die Tiere fixiert auf einem temperierten Operationstisch (42 °C). Diese Bedingungen galten sowohl für alle operativen Eingriffe als auch für die hämodynamischen Blutdruckmessungen sowie für die Echokardiographie.

2.1.2.2 Uninephrektomie und Pellet-Implantation

Im Anschluss an die Narkoseeinleitung wurden die Tiere in Seitenlage fixiert und das Abdomen nach vorangegangener Rasur und Desinfektion durch einen ca. 1cm langen Flankenschnitt eröffnet. Der Operationsbereich wurde über die gesamte Dauer mit isotonischer Kochsalzlösung feucht gehalten. Im nächsten Schritt wurden durch stumpfe Präparation die linke Niere sowie ihre abgehenden Gefäße und die abdominale Aorta dargestellt. Danach erfolgte die Ligation der linken Nierenarterie u. – vene unter Verwendung eines Seidenfadens der Stärke 6.0. In der Folge wurden die Gefäße sowie der Ureter mit Hilfe einer Mikroschere durchtrennt, das Organ aus dem perirenal Fettgewebe herausgelöst und entnommen. Nach erfolgter Sichtprüfung der ligierten Gefäßstümpfe wurde der Flankenschnitt mittels fortlaufender Naht durch Muskelschicht und Kutis wieder verschlossen. Zur lokalen Schmerztherapie wurde die Wunde mit einer geringen Menge Xylocain-Gel bestrichen.

Im Operationsverlauf folgte für die DOCA-behandelten Tiere nun die Pellet-Implantation. Dazu wurden die Tiere in Bauchlage gebracht und im Nackenbereich ein ca. 0,5cm langer Hautschnitt gesetzt. Mit einer dünnen Pinzette wurde stumpf eine subkutane Tasche freipräpariert und das DOCA-Pellet mindestens 2cm vom Schnitt entfernt platziert. Der Wundverschluss erfolgte mit einer geringen Menge Sprühpflaster.

2.1.2.3 Rapamycin-Behandlung

Die Rapamycin-Zielspiegel der Interventionstiere betragen im vorliegenden Versuchsdesign etwa 3-4ng/ml. Vor diesem Hintergrund wurde im Vorfeld unserer Studie ein Vorversuch zur Ermittlung adäquater Rapamycindosen durchgeführt. Dabei erhielten 12 männliche und weibliche Tiere eine Rapamycinbehandlung mit unterschiedlichen Dosierungen für 1 bzw. 3 Wochen. Nach der Tötung wurden die Rapamycin-Serumspiegel gemessen. Die Auswertung ergab für den Hauptversuch eine Dosierung von 1,5mg/kgKG, welche den Tieren an jedem 3. Versuchstag als intraperitoneale Bolusinjektion verabreicht wurde. Die Behandlung begann am 5. postoperativen Tag nach der Uninephrektomie und wurde bis zum Ende des Experiments (42.Tag) fortgeführt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten in gleicher Weise Injektionen mit der Vehikelsubstanz bestehend aus Dimethylsulfoxid gelöst in Phosphatgepufferter Salzlösung.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde bei Tieren der Interventionsgruppe nach deren Tötung (siehe 2.1.4 ein Teil des entnommenen Blutes (200µl) separiert und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Nach einem Intervall von höchstens 24 Stunden wurde im Zentrallabor der Charité, CVK der Serumlevel mit dem ARCHITECT i2000 sirolimus assay (Abbott, USA) bestimmt.

2.1.3 Funktionelle Untersuchungen

2.1.3.1 Messung der Körperzusammensetzung

Die Messung der Körperzusammensetzung erfolgte mit dem Echo MRI Analyzer jeweils vor Studienbeginn und nach der 6-wöchigen Versuchsdauer. Dafür wurden die Tiere in eine Plastikröhre ($\varnothing 5\text{cm}$) gesetzt und in der Messkammer des Gerätes platziert. Während des ca. 2-minütigen Messvorganges verblieben die Tiere ohne Fixation oder Narkose im Gerät.

2.1.3.2 Echokardiographie

Die für die echokardiographische Untersuchung des Herzens notwendige Narkotisierung der Tiere wurde gemäß Punkt 2.1.2.1 durchgeführt. Um eine vollständige Haarentfernung zu gewährleisten wurde der Brustkorb vor der Untersuchung sorgfältig rasiert und zusätzlich mit einer Enthaarungscreme behandelt. Im Anschluss wurde die Maus mit Klebeband auf einem beheizten Tisch fixiert, wobei die Pfoten des Tieres jeweils auf einer EKG-Elektrode zuliegen kamen. So konnte das Echogerät (VisualSonics Vevo 770) durch eine EKG-Ableitung simultan zur Echokardiographie die Herzfrequenz bestimmen. Über die Regulierung des Narkosegases konnte Einfluss auf die Herzfrequenz genommen werden. Der für die Untersuchung ideale Bereich lag bei 450 bis 550 Schlägen pro Minute (bpm).

Zu Beginn der Untersuchung erfolgte eine 2-dimensionale Übersichtsaufnahme des Herzens im so genannten B-Mode. Diese eignet sich besonders zur Beurteilung von Kammergröße und Pumpfunktion und ist zur Bestimmung der Ejektionsfraktion (EF) notwendig. Für eine aussagekräftige Messung wurde die Schnittebene so gewählt, dass die Papillarmuskeln des LV parallel zueinander stehen. Weiterhin sollte ihre Kontraktion erkennbar sein ohne jedoch den Durchmesser des LV vollständig auszufüllen. In der Abbildung 2.2 ist eine Aufnahme im B-Mode beispielhaft dargestellt.

Anhand der erhaltenen Messwerte in Systole und Diastole konnte die Gerätesoftware (Vevo Software 3.0.0) die Ejektionsfraktion nach folgender Formel berechnen:

$$EF = \frac{100 \times (\text{LV Volumen, Diastole} - \text{LV Volumen, Systole})}{\text{LV Volumen, Diastole}}$$

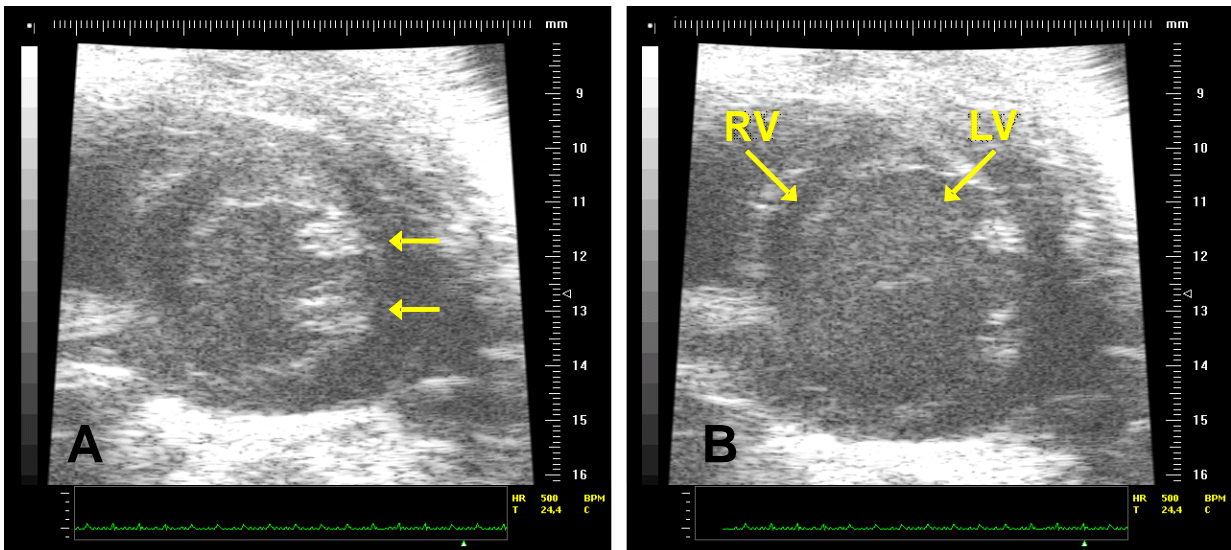


Abb. 2.2 2-dimensionale Übersichtsaufnahme (B-Mode) des Herzens im Querschnitt

Beispielhafte Darstellung in der Systole (A) und Diastole (B). Im linken Bild sind die parallel angeordneten Papillarmuskeln (Pfeile) markiert. Rechtes Bild: linker (LV) und rechter Ventrikel (RV) in der Diastole.

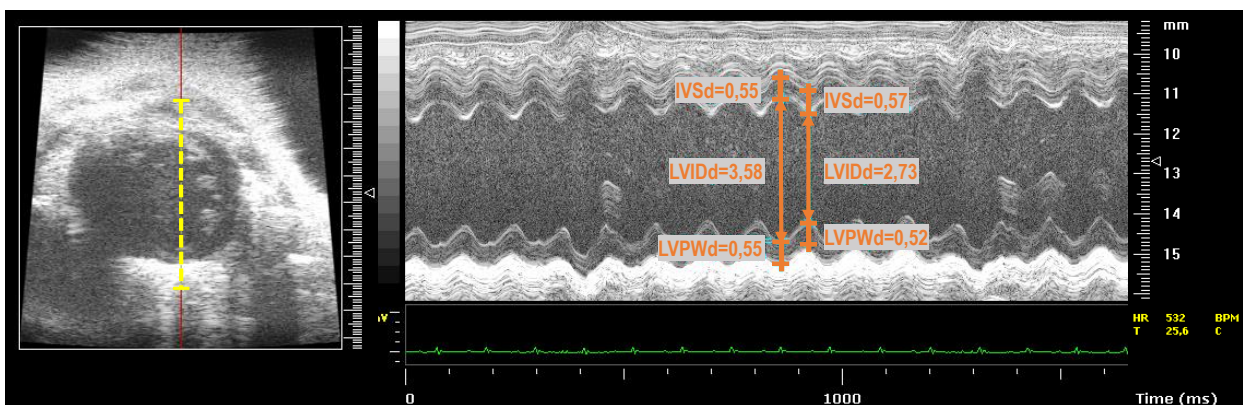


Abb. 2.3 1-dimensionale Aufnahme (M-Mode)

Die Einstellung der Schnittebene erfolgte im größten Querdurchmesser (siehe gelbe Linie im linken Bildausschnitt). Anschließend konnten anhand der aufgezeichneten Bilder die Dimensionen von Herzhöhlen u. -wänden ausgemessen werden.

Die 1-dimensionale Darstellung (M-Mode) diente der Messung des inneren linksventrikulären Durchmessers (engl. left ventricular inner diameter, LVID) sowie den Wandstärken von interventrikulärem Septum (IVS) bzw. Hinterwand (engl. left ventricular posterior wall, LVPW). Die Abbildung 2.3 stellt die Ansicht des Herzens im M-Mode beispielhaft dar. Mit Hilfe des linken Bildausschnittes konnte die Schnittebene so gewählt werden, dass sie in etwa dem größten Querdurchmesser des Herzens entspricht. Der rechte Bildausschnitt demonstriert die aufgezeichneten

1-dimensionalen Echokardiogramme, anhand welcher in einer späteren Auswertung die o.g. Herzdimensionen ausgemessen wurden.

2.1.3.3 Metabolische Käfige

In der letzten Versuchswoche wurden die Tiere zur quantitativen Bestimmung der Urinproduktion und zur laborchemischen Urinanalyse für 24h in Stoffwechselkäfigen gehalten. Dabei wurde der angefallene Sammelurin frei von Verunreinigungen durch Faeces oder Futter gewonnen, das Urinvolumen bestimmt und anschließend an das Zentrallabor der Charite am Campus Virchow-Klinikum übergeben. Dort wurden die Natrium- und Kaliumexkretion sowie der Harnstoff-, Kreatinin- und Proteingehalt des Urins bestimmt.

2.1.3.4 Blutdruckmessung mittels Karotiskatheter

Zu Beginn jeder Messung wurde der Katheter (Samba Preclin 420, SAMBA Systems; TIP-Katheter 1.4F, Millar) automatisch durch das Gerät kalibriert und bis zur Verwendung in isotonischer Kochsalzlösung gelagert. Für den Eingriff wurden die Tiere wie unter Abschnitt 2.1.2.1 bereits beschrieben narkotisiert und in Rückenlage auf einem beheizten OP-Tisch fixiert. Als Zugang wurde ein Hautschnitt in Längsrichtung im ventralen Halsbereich gewählt. Nach stumpfer Durchtrennung der Halsmuskulatur erfolgte die Darstellung der rechten *A. carotis communis* unter sorgfältiger Schonung von angrenzenden Gefäß- u. Nervenstrukturen. Anschließend wurden unter Verwendung eines Fadens der Stärke 6.0 proximal und distal Gefäßligaturen angelegt, von welchen die kranial gelegene sofort fest verknotet wurde. Nach dem Eröffnen des Gefäßes mit einer Mikroschere wurde nun der Katheter umgehend eingeführt und über die kaudale Gefäßligatur vorgeschoben. Durch das Zuziehen dieser konnte der Katheter nun fixiert werden und war in der Lage, die systemischen Blutdrücke zu detektieren. Die aufgezeichneten Signale des Drucksensors an der Katheterspitze wurden über eine Verstärkereinheit (MIO-0501, Föhr Medical Instruments®; SAMBA 201 CU, SAMBA Systems) an einen Messwandler (PowerLab®) weitergeleitet und letztendlich durch das Messmodul des Programms Chart® 5.0 dargestellt. Nach einer ca. 5 minütigen Aufzeichnung einer stabilen arteriellen Blutdruckkurve wurde der Katheter entfernt und die Messung beendet. Die Auswertung der aufgezeichneten Druckverläufe erfolgte später mit Hilfe der genannten Software.

2.1.3.5 Telemetrische Blutdruckmessung

Die Mäuse wurden wie in Kapitel 2.1.2.1 beschrieben narkotisiert und auf einem beheizten OP-Tisch fixiert. Nach erfolgter Rasur und Desinfektion des Operationsgebietes wurde das Abdomen

durch eine rechtsseitige Laparotomie eröffnet und die *Aorta abdominalis* vom perivaskulären Gewebe befreit bzw. von der *Vena cava* separiert. Für die Dauer der Katheterplatzierung in der Aorta wurde diese durch das Anlegen einer Klemme von der Zirkulation getrennt. Anschließend wurde der Katheter der Sendeeinheit durch Punktion der rechten *A. femoralis* in das Gefäßsystem eingeführt und bis in die abdominelle Aorta vorgeschoben. In der Folge wurde der Katheter durch Gewebskleber an seiner Eintrittsstelle fixiert und der Sender in einer Gewebstasche in der rechten Flanke des Tieres mit Hilfe einer einfachen Naht befestigt. Während des gesamten Eingriffs wurden die Organe mit angewärmter isotonischer Kochsalzlösung gespült um das Operationsgebiet feuchtzuhalten. Zuletzt wurde noch die Sendeeinheit auf ihre Funktionstüchtigkeit hin überprüft, bevor die OP-Wunde durch fortlaufende Naht (Polyester 6.0) von Muskelschicht und Haut wieder verschlossen wurde.

Der implantierte Sender wog 1,2g und wurde von den Tieren problemlos toleriert. Der Senderimplantation schloss sich eine Erholungsphase von 12 Tagen an, in welcher die Tiere behandlungsfrei blieben. Danach wurde ebenfalls eine unilaterale Nephrektomie wie unter 2.1.2.2 beschrieben durchgeführt, gefolgt von einer weiteren 13-tägigen Erholungsphase, in welcher dem Trinkwasser schon 1% NaCl zugestetzt wurde. Abschließend begann die Behandlungsphase für die Telemetriertiere mit der DOCA-Pellet Implantation (beschrieben unter 2.1.2.2) sowie der Rapamycinapplikation. Der Sender zeichnete kontinuierlich alle 5min über 10sek Daten zur Hämodynamik auf. Für die Auswertung wurden die Einzelmessungen eines Tages- bzw. Nachtzyklus gemittelt und zu einem 24 stündigen Tageswert zusammengefasst.

2.1.4 Blut-und Organentnahme

Für die labortechnischen Serumanalysen wurden ca. 700µl Vollblut der Tiere benötigt, was dazu führte, dass die Blutentnahme mit der Tötung der Tiere einherging. Diese erfolgte zum Ende der 6-wöchigen Versuchsdauer im Rahmen der invasiven Blutdruckmessung (siehe auch 2.1.3.4) durch Entfernung des Katheters aus der *A. carotis*. Für die Blutentnahme der Telemetrie-Tiere wurde die *A. carotis* operativ freipräpariert und durchtrennt. Unter beiden Prozeduren befanden sich die Tiere die gesamte Zeit unter Isofluran-Vollnarkose. Das aus dem Gefäß tretende Blut wurde mit Hilfe geeigneter Kapillargefäße aufgefangen und zur Serumgewinnung für 10min bei 5000U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum zur Bestimmung von Natrium, Kalium, Kreatinin und Harnstoff an das Zentrallabor der Charité im CVK übergeben. Im Anschluss an die Blutentnahme wurden Herz, die verbliebene Niere sowie die Aorta entnommen und für spätere molekularbiologische, immunhistochemische und histologische Untersuchungen in flüssigen Stickstoff schockgefroren bzw. in HistoFix[®]-Lösung fixiert.

2.2 Histologie

2.2.1 Paraffineinbettung und Schneidung

Umgehend nach ihrer Entnahme wurde jeweils ein Teilstück der Organe (Herz, Niere, Aorta) für 24h in gepufferter 4% Paraformaldehydlösung (HistoFix[®]) fixiert. Anschließend wurden sie nach kurzzeitigem Spülen unter fließendem Wasser in 70% Ethanollösung überführt, in welcher sie bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert wurden. Die Einbettung der Gewebe erfolgte mit Hilfe eines standardisierten Verfahrens des Gewebeeinbettautomaten (Shandon Citadell 1000, Thermo Electron Corporation). Zunächst wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70, 80, 96 und 100 % Ethanol) dehydriert. Danach folgten 3 Waschgänge in Xylol und schließlich die Überführung in flüssiges Paraffin (56 °C). In der Folge wurden die Gewebestücke in Gießformen umgebettet und abgekühlt, wonach nach Aushärtung des Paraffins schließlich mit einem Schlittenmikrotom (Biocut, Reichert-Jung) 3µm dicke Schnitte angefertigt werden konnten. Diese wurden dann auf einen Objektträger überführt und im Trockenschrank bei 55-60°C getrocknet bevor das Paraffin mit Hilfe von drei Roti-Clear[®] Tauchbädern von je 10min wieder gelöst und ausgewaschen wurde. Im letzten Schritt wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe (100, 96, 70 und 50% Ethanol) rehydriert und kurz in *Aqua dest.* gespült.

2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die H.E.-Färbung ist eine histologische Übersichtsfärbung, welche die Zellkerne blau-violett und das Zytoplasma rötlich darstellt. Dazu wurden die histologischen Schnitte für 15min in einer Hämalaun-Lösung nach Mayer gefärbt. Für die Ausbildung der Farbstoffstruktur war das anschließende Spülen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser („Bläuen“) verantwortlich. Abschließend folgte die Eosinfärbung mit einer 5%igen Eosin-G-Lösung für 5min. Bevor die Proben mit einem Eindeckmedium (NeoMount[®]) konserviert werden konnten, mussten sie zunächst durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und kurz mit Roti-Clear[®] behandelt werden.

2.2.3 PAS-Färbung und Messung der Kardiomyozytenquerschnittsflächen

Die PAS-Reaktion (Periodic Acid Schiff) ist eine Methode zum Nachweis von Glykolgruppen in Gewebeproben. Die für die Reaktion wesentlichen Stoffe sind das Oxidationsmittel Perjodsäure sowie die Schiffs Reagenz, welche fuchsinschwefelige Säure enthält. Zunächst werden durch die

Perjodsäure freie 1,2-Glykolgruppen zu Aldehydgruppen oxidiert. Diese gehen im Anschluss eine Verbindung mit der Schiffs Reagenz ein und bilden einen margenta-roten Farbkomplex. Auf diese Weise können Polysaccharide, neutrale Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteine, Glykolipide, ungesättigte Fette und Phospolipide angefärbt und lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Für die Färbung wurden die entsprechend Punkt 2.2.1 vorbehandelten Schnitte zunächst für 5min in 5% Perjodsäurelösung getaucht und für 3min unter fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend wurden sie für 15min mit der Schiffs Reagenz inkubiert, worauf eine weitere Spülung unter fließendem Leitungswasser folgte. Im letzten Schritt wurden die Präparate erneut durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, kurz in Roti-Clear[®] getaucht und zuletzt mit dem Eindeckmedium Neo-Mount[®] und einem Deckgläschen luftdicht abgedeckt.

Um die myokardiale Hypertrophie auch auf zellulärer Ebene beurteilen zu können wurde eine Messung der Kardiomyozytenquerschnittsflächen (MCA - myocyte cross sectional area) vorgenommen. Dazu wurden die Schnitte im Hellfeld betrachtet und geeignete Gebiete in der Wand des LV und im Septum ausfindig gemacht, in der die Zellen überwiegend im Querschnitt getroffen wurden (siehe Abb.2.4) Pro Schnitt wurden so 3-4 Sichtbereiche (FOV) erfasst und als Bild gespeichert. Diese wurden anschließend mit Hilfe der Software Axiovision Rel. 4.6 ausgewertet indem die im Querschnitt getroffenen Myozyten mit dem Tool „Messen der Kontor“ entlang ihrer Zellmembran manuell umrandet wurden. Das Programm konnte nun unter Berücksichtigung der Vergrößerung die Fläche des umrandeten Gebietes ausrechnen. Dieser Wert entspricht der Myozytenquerschnittsfläche. Für die Auswertung wurden 40-60 Zellen pro Schnitt und Tier erfasst und die durchschnittliche Querschnittsfläche ermittelt. Diese wurden wiederum innerhalb der Gruppen zu einem Mittelwert zusammengefasst.

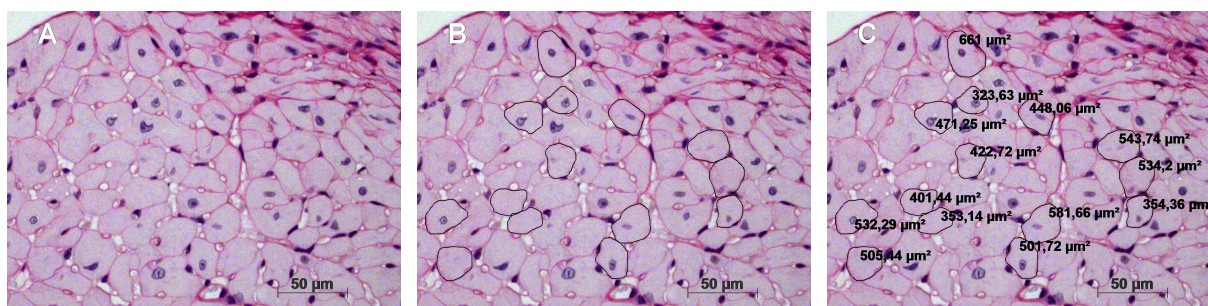


Abb. 2.4 Messung der Myozytenquerschnittsflächen

Die PAS-Schnitte wurden im Hellfeld mikroskopiert und unter 400facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert (A). Anschließend wurden im Querschnitt getroffene Kardiomyozyten mit dem Konturwerkzeug entlang ihrer Zellmembran umrandet (B). Die von der Markierung eingeschlossene Fläche entspricht der MCA, welche von der Software unter Berücksichtigung der Vergrößerung berechnet werden konnte (C).

2.2.4 Sirius-Rot-Färbung und Kollagenquantifizierung

Die Sirius-Rot-Färbung hat die Eigenschaft kollagenhaltige Strukturen in einem kräftigem Rot anzufärben, während die restlichen zellulären Bestandteile unter dem Lichtmikroskop gelb erscheinen. Das erlaubt eine kontrastreiche Darstellung kollagenhaltiger Bindegewebsstrukturen im Myokard, weshalb sich diese Färbemethode für die Quantifizierung der kardialen Fibrosierung besonders gut eignet. Nach entsprechender Vorbehandlung der Schnitte (siehe Punkt 2.2.1) wurden diese für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur in Sirius-Rot-Färbelösung inkubiert. Nach anschließendem Waschen in Aqua dest. und Essigsäurelösung (5 ml Eisessig/1 L Aqua dest.) erfolgte die Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe, bevor die Schnitte kurz in Roti-Clear[®] überführt und mit einem Eindeckmedium luftdicht verschlossen wurden.

Für die Auswertung der Kollagenfärbung wurden die Schnitte mit 400 facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Es wurden pro Schnitt 10 FOVs mit einer Digitalkamera aufgenommen (Abb.2.5) , welche später zur Kollagenquantifizierung mit dem Programm Axiovision Rev. 4.1.2 herangezogen wurden. Die Reihenfolge erfolgte dabei zufällig und ohne Kenntnis der Versuchsgruppe. Das Programm berechnete automatisch den prozentualen Anteil des Kollagens zur Gesamtfläche des FOVs, nachdem zuvor manuell die Grenze des Farbbereiches angegeben wurde, in welchem ein Signal als „kollagenpositiv“ gilt. Für die statistische Auswertung wurde so für jedes Tier ein durchschnittlicher Kollagengehalt ermittelt, welcher innerhalb der Gruppe zu einem Mittelwert zusammengefasst wurde.

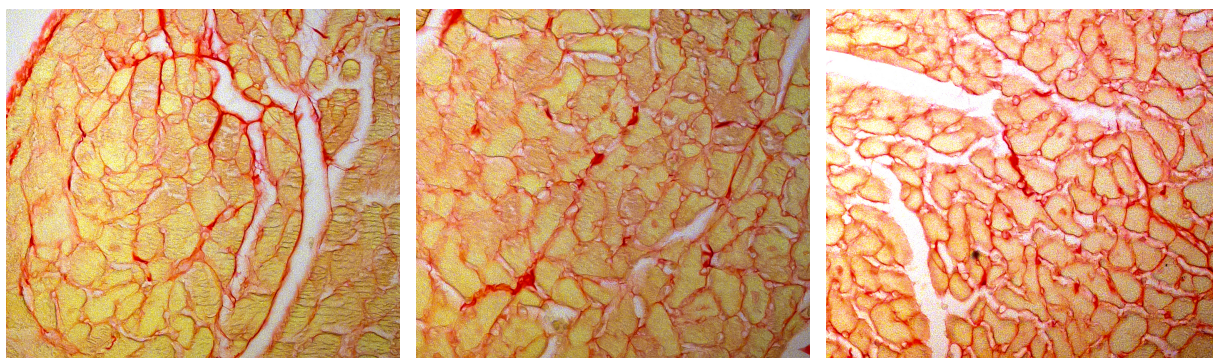


Abb. 2.5 Kollagenfärbung des Myokards

linksventrikuläre Gewebsschnitte, gefärbt nach Sirius Red, Vergrößerung: 400fach. Man erkennt die kräftig rot angefärbten Kollagenfasern, welche sich von den übrigen Gewebsstrukturen (einheitlich gelb gefärbt) kontrastreich abheben. Die Schnitte wurden unter 400facher Vergrößerung rasterförmig untersucht. Für die Quantifizierung errechnete die Software den prozentualen Anteil des Kollagens an der Gesamtfläche des FOV.

2.2.5 Immunhistochemie

Zunächst wurden die Schnitte gemäß Kapitel 2.2.1 hergestellt und deparaffiniert. Anschließend folgte ein 10 minütiger Kochvorgang mit Zitratpuffer (0,1 M) in einem Dampfdruckkochtopf zur Demaskierung der Antigenbindungsstellen. Nach dem Abkühlen und kurzen Waschen in TBS-T begann die Färbung nach Protokoll für die Antigene PECAM-1 (engl. platelet endothelial cell adhesion molecule-1) und pERK1/2.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurden die Gewebeschnitte im ersten Schritt für jeweils 20min mit Avidin- und Biotin-Blockierungsreagenzien behandelt. Im Anschluss an die beiden Inkubationsschritte, sowie auch nach jeder folgenden Inkubation erfolgte eine Waschung der Schnitte für jeweils 3 mal 2 min in TBS-T-Lösung. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch ein 10 minütiges Bad in einer 3%igen H₂O₂-Lösung in Methanol blockiert. Anschließend wurden die Schnitte zusätzlich in einer weiteren Blockierungslösung behandelt um noch verbliebene unspezifische Proteinbindungsstellen zu maskieren. Nun erfolgte direkt und ohne Waschen in TBS-T die Inkubation in der Primärantikörperlösung über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurden die Schnitte nach einer Aufwärmphase auf Raumtemperatur wie beschrieben gewaschen und für 15min in der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Anschließend erfolgte ebenfalls für 15min eine Behandlung mit einem Streptavidin-Biotin-Komplex und mit der Lösung des Amplifizierungsreagenz, bevor mit der Entwicklung des gebildeten Antikörper-Peroxidasekonjugats begonnen wurde. Dazu wurde 3,3-Diaminobenzidin (DAB) als Substrat auf die Schnitte gegeben um die Peroxidaseaktivität als Maß der Antikörperbindung zu detektieren. Die entstehende Färbung wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Nach Erreichen der gewünschten Signalintensität wurde die Reaktion durch Waschen in PBS gestoppt. Zuletzt erfolgte gemäß Kapitel 2.2.2 die Gegenfärbung der Gewebe mit Hämatoxylin und das „Bläuen“ unter fließendem Leitungswasser. Zur Konservierung der gefärbten Präparate diente ein Eindeckmedium auf Wasserbasis. Zur Gegenkontrolle etwaiger unspezifischer Bindungen wurde eine Negativkontrolle, die ohne Primärantikörper und nur in PBS inkubiert wurde, mitgeführt.

2.3 Proteinanalysen aus kardialem Gewebe

Die Proteinanalyse erfolgte ausschließlich aus linksventrikulärem Myokardgewebe. Dazu wurde direkt nach der Organentnahme die Herzspitze mit einem Skalpell abgetrennt, anliegendes Gewebe des rechten Ventrikels entfernt und das übrig gebliebene Stück in zwei gleich große Teile zu ca. 30mg geschnitten. Diese wurden umgehend in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Aufbereitung gelagert.

2.3.1 Proteinisolation

Für die Proteinisolation wurden zunächst geeignete Reaktionsgefäße zur Hälfte mit Keramikkügelchen (Precellys24, Peqlab, Deutschland) gefüllt und auf Trockeneis gelagert. Nachdem jeweils eine tiefgefrorene Probe aus linksventrikulärem Gewebe (siehe 2.3) in jedes der Gefäße überführt wurde, erfolgte die Zugabe von 500µl eiskaltem Protein-Lysis-Puffer. Im Anschluss wurden die Proben umgehend mit dem Probenpräparationssystem FastPrep[®]-24 in zwei Durchgängen zu jeweils 20 Sekunden bei Raumtemperatur mechanisch homogenisiert. Im folgenden Schritt wurden die Lysate mit 5µl einer 10%igen SDS-Lösung versetzt, mit einem Vortexer kräftig durchgeschüttelt und für 20min bei 4°C gelagert um die vollständige Lyse des Gewebes zu gewährleisten. Daraufhin erfolgte nach wiederholtem Durchschütteln der Proben die Zentrifugation mit einer auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge bei 14,000x g für 15 min. Überstände von nicht homogenisierten Fett- bzw. Gewebsteilen wurden vom homogenen Proteinlysate getrennt, aus welchem anschließend die Gesamtproteinkonzentration gemäß 2.3.2 bestimmt wurde. Unter Kenntnis der Gesamtproteinkonzentration der einzelnen Herzlysate wurden Probelysate mit einem Proteingehalt von 40µg zur gelelektrophoretischen Trennung hergestellt und bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Die übrig gebliebenen Stammlysate wurden in Aliquots überführt und bei -80°C gelagert.

2.3.2 Bestimmung der Proteinmenge

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den Herzlysaten wurde der DC[™] Protein Assay der Firma BioRad verwendet. Dieser wurde in Anlehnung an die Proteinbestimmung nach Lowry entwickelt. Er beruht auf der Bildung eines Protein-Kupfer-Komplexes, welcher im alkalischen Milieu ein Folinreagenz reduziert und so zur Bildung eines blauen Farbkomplexes führt, dessen Absorptionsmaximum zwischen 405 und 750nm liegt.

Zunächst wurden die Lysate 1:15 in Lysepuffer verdünnt und von jeder Verdünnung jeweils drei Proben zu 5µl in Mikrotiterplatten vorgelegt. Das zum Protein Assay zugehörige Kit enthält drei Reaktionslösungen, die mit den Buchstaben A, B und S gekennzeichnet sind. Als Erstes wurde ein Reaktionsgemisch der Lösungen A und S (500µl/10µl) hergestellt, von welchem dann je 25µl zu den Proben gegeben wurde. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten mit je 200µl der Lösung B aufgefüllt. Für die Erstellung einer Kalibrierreihe wurde Rinderalbumin (BSA, engl. bovine serum albumin) in den Konzentrationen 0,25/0,5/1,0/1,5 und 2,0 µg/µl sowie einer Hintergrundkontrolle mit allen Reagenzien ohne Protein verwendet, deren Aufbereitung auf gleiche Weise erfolgte. Zuletzt wurden die Bestimmungsansätze bei RT für 10 min auf einem Rütteltisch durchgeschüttelt und dann die Extinktionsmessung mit einem Plattenphotometer (ELISA-Reader) bei einer Wellenlänge von 690nm durchgeführt.

Für die Kalibriergerade wurden die Extinktionen der Proteinstandards gegen ihre Konzentrationen aufgetragen und eine Geradengleichung erstellt. Durch das Einsetzen der gemessenen Extinktionswerte der jeweiligen Proben in die Geradengleichung und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors konnte die Proteinkonzentration der Lysate in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ errechnet werden. Damit für die anschließende Western-Blot-Analyse vergleichbare Proben mit gleicher Menge an Gesamtprotein zur Verfügung standen, wurden Probenlysate nach Laemmli mit einem Gesamtproteingehalt von $40\mu\text{g}$ auf $30\mu\text{l}$ hergestellt.

Komponente	Menge [μl]	Beispiel (Probe: $7\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Lysat	$V = \frac{40\mu\text{g}}{c_{\text{Probe}}}$	$V = \frac{40\mu\text{g}}{7\mu\text{g}/\mu\text{l}} = 5,71\mu\text{l}$
Laemmli	6,00	6,00 μl
H ₂ O	Rest zu 30	18,29 μl
Gesamt	30	30 μl

Tabelle 2.2 Herstellung der Laemmli-Lysate

2.3.3 Western-Blot Analyse

Die myokardiale Proteinexpression wurde mit Hilfe der Western-Blot Analyse bestimmt. Bei diesem Verfahren können einzelne Proteine in einem komplexen Proteingemisch durch Übertragung (Blotting) auf eine Trägermembran sowohl nachgewiesen als auch quantifiziert werden. Seinen Ursprung hat die Methode in dem 1975 von Edwin Southern entwickelten Southern Blot, welcher als erste Blotting-Methode dem Nachweis von DNA-Fragmente diente. Daran angelehnt wurde der Northern Blot als Nachweis von RNA sowie der Western Blot zum Proteinnachweis entwickelt. Ein Western Blot besteht im Wesentlichen aus drei Schritten:

1. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe
2. Blotvorgang auf eine PVDF-oder Nitrocellulose Membran
3. Detektion, welche oft auf immunologischem Wege mittels Antikörperreaktionen erfolgt

2.3.3.1 Proteinseparation mittels SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat - haltige Polyacrylamid-Gel - Elektrophorese) gewährleistet die Auftrennung der Proteine ausschließlich nach ihrer Größe. Als Trennmedium wird ein Acrylamid/Bisacrylamidgel verwendet. Das Gel entsteht in einer chemischen Reaktion, in der sich Acrylamid (AA) in Anwesenheit von freien Radikalen zu Polymeren verbindet. Bisacrylamid sorgt für eine zusätzliche Quervernetzung dieser Polymere, sodass ein engporig-molekulares Gerüst entsteht, welches den Lauf der Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße unterschiedlich stark

abbremst. Als Radikalbildner für die Reaktion kommt Ammoniumpersulfat (APS) zum Einsatz, als Katalysator dient Tetramethylethyldiamin (TEMED). Um die Proteine zur Durchwanderung des Gels zu bewegen, wird ein elektrisches Spannungsfeld angelegt. Damit die Eigenladungen der Proteine die Auftrennung nicht beeinflussen, kommt das anionische Detergens Natrium dodecylsulfate (SDS), engl. für Natriumdodecylsulfat zum Einsatz. Es überdeckt die Eigenladungen, wodurch die Proteine eine homogen-negative Ladungsverteilung aufweisen. 1,4g SDS können ca. 1g Protein binden. Durch den Zusatz von Thiolverbindungen in den Probenpuffer können zusätzlich Disulfidbrücken aufgebrochen werden und durch Erhitzen der Proben auf mind. 95 °C werden Wasserstoffbrückenbindungen gebrochen, wodurch das Molekül gestreckt wird. Im Idealfall weisen die Proteine nach ihrer Behandlung also eine mit SDS beladene, ellipsoide Form auf und ihre Laufgeschwindigkeit durch das Gel hängt nur noch von ihrem Molekulargewicht ab.

Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden Gele mit unterschiedlicher Porengröße verwendet, wobei die AA-Konzentration im Trenngel bei 8-12,5% lag. Bevor die Proben auf die Gele aufgetragen wurden, wurden sie zuvor nach einem Standardprotokoll (Laemmli, 1970) mit Laemmli-Puffer (siehe 2.2) unter reduzierenden Bedingungen bei 95°C für 7min denaturiert. Um eine ansprechende Bandenschärfe zu gewährleisten wurde die Elektrophorese mit einer Spannung von 80V für 30 min begonnen, bevor die endgültige Spannung von 120V eingestellt wurde. Insgesamt dauerte die Auftrennung 2 Stunden.

Für die Herstellung von Protein-Gelen wurde die folgende Zusammensetzung gewählt, bei der 30% AA-Mix für eine Lösung aus entgastem, 30%igem Acrylamid mit einer Beimischung von 1:37 einer Lösung aus 0,8 % Bis-acrylamid steht.

Trenngel	8,5%	9%	10%	11%	12,5%	Sammelgel	5%
H₂O	3,3 ml	3,2 ml	2,9 ml	2,7 ml	2,3 ml	H₂O	1,0 ml
30%-AA-mix	2,3 ml	2,4 ml	2,7 ml	2,9 ml	3,3 ml	30%-AA-mix	350 µl
3,5 x Gelpuffer	2,3 ml	2,3 ml	2,3 ml	2,3 ml	2,3 ml	3,5 x Gelpuffer	600 µl
10%-APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	10%-APS	30 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	TEMED	5 µl
Volumen	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml	Volumen	2 ml

Tabelle 2.3 Acrylamid-Gelzusammensetzung

2.3.3.2 Proteintransfer (Blotting)

Nach der Gelelektrophorese wurden die ihrer Größe nach aufgetrennten Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 0,35 - 0,4 A für 2 Stunden auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Kontrolle des Transfers wurden die Membranen mit Ponceau S Lösung eingefärbt und eingescannt.

2.3.3.3 Antikörperinkubation

Nach erfolgtem Proteintransfer wurden die Membranen zunächst für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einer Blocklösung gewaschen um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden sie über Nacht bei 4°C mit den Primärantikörpern für die zu untersuchenden Antigene inkubiert. Die entsprechenden Antikörper können samt den verwendeten Konzentrationen der Materialliste entnommen werden. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Membranen dreimal für 5-10min in TBS-T Lösung gewaschen, bevor die Inkubation in Sekundärantikörperlösung für 2 Stunden bei RT erfolgte. Die Sekundärantikörper waren gegen die IgG der Spezies des Primärantikörpers gerichtet und an eine „Meerrettich-Peroxidase“ („horseradishperoxidase“-HRPO) gekoppelt. Vor der Entwicklung erfolgte ein weiterer Waschgang mit TBS-T für 3 x 5min. Alle beschriebenen Inkubations- u. Waschvorgänge wurden in konischen Zentrifugenröhrchen (50ml), die kontinuierlich auf einem Taumelrollenmischer gedreht wurden, durchgeführt.

2.3.3.4 Antikörperdetektion

Für die Auswertung der Antikörper-Proteinbindung wurden Chemilumineszenz-Reaktionslösungen der Firma Thermo Scientific gemäß den Herstellerangaben verwendet. Durch die enzymatische Aktivität der an den Sekundärantikörper gebundenen HRPO wird das in der Substratlösung enthaltene Luminol in mehreren Schritten umgesetzt. Am Ende der Reaktion wird freiwerdende Energie als Licht emittiert. Die Stärke der Lichtemission hängt von der Menge des Enzyms und somit indirekt von der vorhandenen Menge an Antikörper-gebundenem Protein ab. Sie kann also zum quantitativen Proteinnachweis herangezogen werden. Die Detektion der Lichtemission fand in einer Detektionsbox der Firma Syngene Bio Imaging (G-Box XL 1.4) statt. Dabei wurde das Licht von einer im Gerät installierten Kamera aufgezeichnet und mittels der Herstellersoftware GeneSys nachbearbeitet sowie als digitale .tif-Datei gespeichert. Die Belichtungszeit wurde entsprechend der Signalstärke angepasst und lag zwischen 30sek. und 1Std. Um auf bereits verwendeten Membranen erneut eine Antikörperreaktion durchführen zu können, wurden diese zunächst dreimal in TBS-T gespült und anschließend bei 52°C für 45 min. mit „Stripping-Puffer“ unter leichter Agitation inkubiert. Nach weiteren Waschzyklen und erneutem Blockieren konnten die Membranen nun einer erneuten Antikörperreaktion ausgesetzt werden. Die quantitative Auswertung des Bandenmusters

erfolgte mit dem Programm Image J (Version 1.46;<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), welches die Intensität der Banden als Fläche unter der Kurve darstellt. Innerhalb eines Gels konnten die Banden durch Quotientenbildung mit einem Referenzprotein verglichen werden. Für den Vergleich mehrerer Gele wurden die Werte anhand einer stetig mitgeführten Kalibriergeraden normiert.

2.4 Genexpressionsanalyse

2.4.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus Myokardgewebe

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte aus linksventrikulärem Gewebe nach einem Standardprotokoll der Firma 5Prime. Reaktionsgefäße wurden autoklaviert und anschließend mit Keramikkügelchen (Lysis Matrix D) der Firma Peqlap befüllt. Im Anschluss wurden die tiefgefrorenen Gewebeproben (ca. 30mg) in die Gefäße überführt und umgehend in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Nun wurde 1 ml Isol-RNA Lysis Reagent zugegeben und die Gewebstücke mit Hilfe des FastPrep24-Homogenisators innerhalb von zwei Schritten zu jeweils 20 sek. mechanisch zerkleinert. Nach einer Inkubation von 5min bei RT wurde den Suspensionen zur Phasentrennung 0,2ml Chloroform zugegeben und mit Hilfe eines Tischmixers (Vortex) eine Durchmischung vollzogen. Im Anschluss wurde die Phasentrennung für 3min abgewartet. Von nun an erfolgte die weitere Arbeit im Eisbad um eine effiziente Kühlung der Proben zu gewährleisten. In einer auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge wurden die Suspensionen anschließend für 15min bei 12.000xg zentrifugiert. Die flüssige Phase mit der Gesamt-RNA wurde von den festen Bestandteilen getrennt und 0,4ml davon in neue Reaktionsgefäße überführt. Der Überstand wurde bei -80°C für spätere Versuche gelagert. Der nächste Schritt bestand in der Fällung der RNA aus der wässrigen Phase. Dazu wurde den Proben 0,5ml Isopropanolol zugegeben und nach erneuter Durchmischung die Fällung für 10min abgewartet. Durch erneute Zentrifugation bei 4°C und 12.000xg für 10min konnte die RNA pelletiert werden. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die RNA-Pellets anschließend nacheinander in jeweils 80% und 100% Ethanol gewaschen. Nach einer letzten Zentrifugation bei 7500xg und 4°C für 5min wurden die RNA-Pellets für wenige Minuten im Heizblock bei 50°C getrocknet. Zuletzt wurden die RNA in 25µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H₂O gelöst und bei -80°C zur Lagerung tiefgefroren.

2.4.2 Bestimmung von Qualität und Konzentration der RNA

Die Menge der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines UV-Spektrometers NanoDrop (ND-1000) bestimmt. Nachdem 1,5-2µl der Proben luftblasenfrei auf die Aufnahmeplatte pipettiert wurden,

übernahm das Gerät automatisch die Messung durch das Programm ND-1000 (Version 3.7.0). Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung der Konzentration durchgeführt. Das Ergebnis wurde gemittelt und im Anschluss die Konzentration der Proben durch Zugabe von DEPC-H₂O auf 100ng/μl eingestellt. Für den nächsten Schritt der reversen Transkription in komplementäre DNA (cDNA) ist es äußerst wichtig exakte Mengen an RNA zu verwenden. Deshalb erfolgte zur Kontrolle eine erneute doppelte Messung der eingestellten RNA-Konzentration.

Im Anschluss wurde die Güte der aus dem Myokardgewebe isolierten RNA durch eine Agaroseelektrophorese überprüft. Es wurde aus Agarose und TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer ein 1%iges Gel hergestellt und mit 0,1% Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit RNA-Molekülen interkaliert und diese bei UV-Licht der Wellenlänge 254nm sichtbar macht. Für die Elektrophorese wurde eine RNA-Gesamtmenge von 200ng mit Ladepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und durch das Anlegen einer Spannung von 90V für 50min aufgetrennt. Dabei entsteht für die RNA charakteristisch eine 18s und eine 21s Bande. Für die Beurteilung der Molekülgröße wurde auf jedem Gel ein RNA-Größenmarker mitgeführt. Der Nachweis der deutlichen 18s- und 21s-Banden erlaubt Rückschlüsse auf die Reinheit der RNA und erlaubt eine weitere Verwendung der Probe für die weiteren Analysen.

2.4.3 Reverse Transkription (RT-PCR)

Die gemäß Kapitel 2.4.1 isolierte und auf 100ng/μl eingestellte RNA wurde direkt für die Reverse Transkription verwendet. Für den Reaktionsansatz wurde eine RNA-Menge von 500ng verwendet und auf ein Gesamtvolumen von 25μl mit einem vorher angesetzten Reagenzgemisch (master mix) aufgefüllt. Dieser enthielt unter anderem eine DNA-Polymerase (MuLV Reverse Transkriptase) und die Triphosphate (dGTP, dATP, dTTP, dCTP). Im Rahmen der RT-PCR konnte die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Die genaue Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes kann aus der Tabelle 2.4 entnommen werden. Im Anschluss an die RT-PCR wurde der Probenansatz mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 50μl aufgefüllt. Ausgehend vom ursprünglichen Volumen (5μl) handelte es sich also um eine 10fache Verdünnung, sodass eine cDNA-Konzentration resultierte, die von 10ng/μl RNA abgeleitet war.

Komponente		1x Ansatz [25µl]	Stoffmenge
DEPC-H ₂ O		10µl	-
10x PCR Puffer		2,5µl	1x
MgCl ₂	(25 mM)	4µl	4 mM
dNTP Mix	(10 mM)	0,5µl	0,2 mM
RNase Inhibitor	(20 U/µl)	1µl	20 U
MuLV RT	(50 U/µl)	1µl	50 U
Random Hexamers	(50 µM)	1µl	2 µM
Gesamt-RNA Probe		5µl	500 ng

Tabelle 2.4 Reaktionsansatz der Reversen Transkription

2.4.4 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Um die Expression relevanter Gene beurteilen zu können wurde das Verfahren der quantitativen Real Time-PCR durchgeführt. Dazu wurde ein industriell gefertigtes Reagenz (Power SYBR[®] Green PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems) unter Beachtung des vorgegebenen Protokolls verwendet. Die zuvor durch die RT-PCR hergestellte cDNA (Aliquots zu 50µl) hatte eine RNA-Ausgangskonzentration von 10ng/µl. Davon wurden 2µl Probenlösung zusammen mit den restlichen Komponenten (siehe Tabelle 2.5) in eine 96-Lochplatte pipettiert und vor dem PCR-Ansatz noch einmal bei 4°C auf einer Plattenzentrifuge gut durchmischt.

Um die Amplifikatbildung im Rahmen der qRT-PCR zu kontrollieren, wurden vereinzelte Proben im Anschluss einer Agarosegelelektrophorese gemäß Kapitel 2.4.2 unterzogen. So konnte die Größe der synthetisierten DNA-Fragmente ermittelt und mit der theoretischen Größe der durch die Primer erfassten mRNA-Abschnitte verglichen werden. Das Primerdesign für die relevanten mRNA-Abschnitte erfolgte unter Zuhilfenahme der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI). Für deren Generierung wurde das Programm Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/releases.php>) unter Berücksichtigung folgender Kriterien verwendet: 1. Die Schmelztemperatur der Primer lag bei ca. 60°C; 2. Ein 2-3 Exon übergreifender mRNA-Abschnitt wurde abgedeckt; 3. Der GC-Gehalt der Primer sollte >50% sein; 4. Die Primerlänge sollte mindestens 20 Nukleotide betragen; 5. Die Amplifikatlänge sollte zwischen 100-200 Basen umfassen. Die verwendeten Primer können der Tabelle 2.6 entnommen werden.

Die letztendliche Quantifizierung der Gene erfolgte nach der Δ CT-Methode (cycle threshold, CT). Hierbei handelt es sich um eine relative Quantifizierungsmethode, bei der der mRNA-Gehalt des Zielgens in Relation zu einem Referenzgen („Housekeeper“) bestimmt wird. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde β -2 Mikroglobulin als Referenzgen verwendet, welches durch die Behandlung nicht verändert wurde. In der Theorie verdoppelt sich bei optimaler Effektivität der PCR in jedem Zyklus die Zahl der Transkripte. Am Ende eines jeden Zyklus liegt die DNA in Doppelsträngen vor und kann mit dem im Reaktionsansatz vorhandenen Fluoreszenzfarbstoff interagieren. Die Intensität der Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und korreliert mit der Menge der vorhandenen Transkripte. Anfangs liegt sie unterhalb der Messschwelle des Gerätes. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Intensität und steigt somit exponentiell an, sodass diese Messschwelle überschritten wird (Ct-Wert). Mit zunehmender Dauer der PCR nimmt dieser Anstieg aufgrund von Substratmangel wieder ab. Der gemessene Ct-Wert ist umso kleiner, je größer die Ausgangsmenge der untersuchten Genabschnitte ist. Durch Subtraktion der Ct-Werte von Ziel- u. Referenzgen werden beide ins Verhältnis zueinander gesetzt. Der Messwert einer einzelnen Probe errechnet sich unter Berücksichtigung der exponentiellen Zunahme nach folgender Formel: $x = \frac{1}{2^{\Delta Ct}}$. Die berechneten Einzelwerte innerhalb der Versuchsgruppen wurden gemittelt und mit den Mittelwerten der anderen Versuchsgruppen verglichen.

Komponente		1x Ansatz [20 μ l]	Stoffmenge
2x Power SYBR [®] Green PCR Master Mix*		10 μ l	1x
ddH ₂ O		4	-
Primer sense	(10 μ M)	2 μ l	50 nM
Primer antisense	(10 μ M)	2 μ l	50 nM
cDNA-Probe		2 μ l	entspr. 10ng/ μ l

Tabelle 2.5 Reaktionsansatz der qRT-PCR

*SYBR[®] Green I Dye, AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, dNTPs, passive reference, optimized buffer components

Gen	Beschreibung	Primer Sequenzen (5'→3')	Annealing [°C]
Col1	sense	GAGCGGAGAGTACTGGATCG	55
	antisense	GTTCGGGCTGATGTACCAGT	55
Col3	sense	GCACAGCAGTCCAACGTAG	55
	antisense	TCTCCAAATGGGATCTCTGG	55
VEGF	sense	CAGGCTGCTGTAACGATGAA	55
	antisense	GCATTCACATCTGCTGTGCT	55
β-2 Mikro- globulin	sense	GAAATCCAAATGCTGAAGAACG	55
	antisense	CAAATGAATCTTCAGAGCATCATG	55

Tabelle 2.6 Primer Sequenzen für die qRT-PCR

Alle Primer wurden durch die Firma TIB MOLBIOL in einer Gesamtmenge von 0,01 µmol (HPSF purification) synthetisiert. Zur Erstellung einer Stammlösung (100pmol/µl) wurden die Oligonukleotide zunächst in 50µl in Aquadest gelöst. Zur weiteren Verwendung wurden kleinere Aliquots durch eine weitere Verdünnung mit Aquadest um den Faktor 20 hergestellt. Die Endkonzentration betrug 5pmol/µl, die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.5 Statistik

Die im Ergebnisteil aufgeführten Versuchsergebnisse werden stets als Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler (MW±SEM) angegeben. Für die graphische Darstellung wurden überwiegend Balken - teilweise auch Punktdiagramme verwendet. Zur Erfassung der Daten diente das Tabellenkalkulationsprogramm Excel™ (Microsoft). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen SPSS™ Statistics 21 (IBM) bzw. GraphPad Prism 5.0

Im Fokus der Arbeit stand die Überprüfung einer möglichen Interaktion zwischen den Merkmalen Geschlecht, Behandlung (DOCA+Salz) und pharmakologischer Intervention (mit Rapamycin). Dazu wurden 3F-Anova bzw. 2F-Anova Analysen der Wertegesamtheiten aus den jeweiligen Versuchsgruppen durchgeführt. Als signifikant galten Interaktionen unter Angabe einer entsprechend hohen Effektgröße als partielles Eta-Quadrat (η_p^2) ab einem p-Wert von $p < 0,05$. Die Voraussetzung zur Anwendung von Varianzanalysen ist eine Normalverteilung der Messwerte. Aus diesem Grund wurde vor dem Vergleich multipler Gruppen die Wertegesamtheit innerhalb der jeweiligen Gruppe auf Normalverteilung hin überprüft. Dies gelang mit Hilfe des D'Agostino and Pearson omnibus normality tests. Sofern diese Voraussetzung gegeben war, wurde anschließend ein Vergleich der Versuchsgruppen durch eine univariate Varianzanalyse (1-way Anova) mit anschließendem Posttest

(Bonferroni multiple comparisons test) durchgeführt. Erhaltene p-Werte von $p < 0,05$ wurden als Nachweis für signifikante Unterschiede angenommen. Zur Angabe unterschiedlicher Signifikanzstufen fand in den graphischen Darstellungen dieser Arbeit das „*“-Symbol Verwendung, wobei gilt: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$)

3 Ergebnisse

Um die Interpretation der Ergebnisse im folgenden Kapitel zu erleichtern, sollen zunächst die verwendeten Abkürzungen sowie die graphische Darstellungsweise der Ergebnisse einleitend erläutert werden. Gemäß Abschnitt 2.1.1 ergaben sich aus dem Versuchsdesign pro Geschlecht folgende 4 Versuchsgruppen: Uni-Nx, Vehikel; DOCA-Salz, Vehikel; Uni-Nx, Rapa und DOCA-Salz, Rapa. Diese Gruppenreihenfolge soll auch in der Präsentation der Ergebnisse beibehalten werden. Durch die zusätzliche Unterteilung in die Geschlechter ergaben sich also 8 Versuchsgruppen. Zur graphischen Darstellung wurde in den meisten Fällen die Form eines Balkendiagramms gewählt. Die zwei Balkengruppierungen auf der x-Achse repräsentieren linksseitig die männlichen und rechtsseitig die weiblichen Versuchstiere. Zur besseren Anschaulichkeit sind die Balken der DOCA-Salz Gruppen grau hervorgehoben, während solche der Uni-Nx Tiere weiß bleiben. Die Balken der Vehikel-Tiere weisen zusätzlich zur farblichen Kodierung eine quergestreifte Füllung auf.

3.1 Pathophysiologische Effekte von Mineralokortikoidexzess und Salzbelastung

3.1.1 Elektrolyt - und Wasserhomöostase

Der Mineralokortikoidexzess führt zu einer Dysregulation der Elektrolyt - und Wasserhomöostase. Auf renaler Ebene führt ein Hyperaldosteronismus zu einer Natriumretention sowie einer vermehrten Kaliumexkretion, wodurch die systemische Na^+ -Konzentration ansteigt und die K^+ -Konzentration abfällt. Diese Effekte konnten auch bei unseren Versuchstieren beobachtet werden. Bei allen DOCA-Tieren erhöhte sich die Serum-Natriumkonzentration im Durchschnitt um etwa 6-8 mmol/l auf Werte von ca. 153mmol/l, während die Kaliumwerte im Mittel einen Abfall um 2,5mmol/l auf Werte von ca. 3,5mmol/l zu verzeichnen hatten (siehe Abb. 3.1). Die Elektrolytverschiebungen waren unabhängig vom Geschlecht und der Rapamycinintervention.

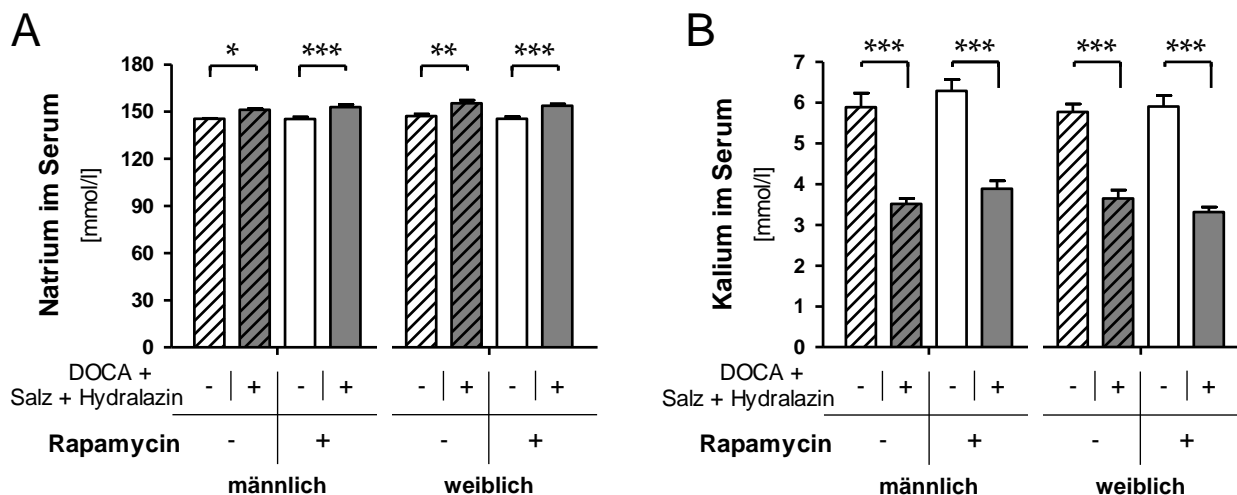


Abb. 3.1 Natrium - und Kaliumkonzentration im Serum

Eine DOCA-Salz vermittelte Veränderung der Natrium - bzw. Kaliumkonzentrationen im Serum konnte in allen Versuchsgruppen beobachtet werden. Der Natriumwert stieg dabei im Mittel um 7,5mmol/l im Vergleich zu den Kontrollgruppen an (A). Für die Kaliumwerte konnte ein Abfall um durchschnittlich 2,4mmol/l beobachtet werden (B). Die Ausgangswerte der Kontrollgruppen unterschieden sich nicht voneinander. MW \pm SEM; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Die Urinausscheidung steigt unter DOCA-Salz Behandlung an. Dieser Effekt konnte bei den weiblichen Tieren deutlicher nachgewiesen werden, wohingegen die männlichen Tieren nur eine leichte Tendenz zu einer erhöhten Diurese zeigten (Abb. 3.2). Die höchste Zunahme der Urinmenge unter DOCA-Salz-Behandlung im 24h-Sammelurin wurde bei den Vehikel-Weibchen verzeichnet. Unter DOCA-Salz stieg gleichzeitig die fraktionelle Natriumexkretion an. Eine statistische Signifikanz konnte nur bei den Weibchen nachgewiesen werden.

An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass die Gewinnung des 24h-Sammelurins durch die angewandte Methode erheblichen Störfaktoren unterlag. Die Tiere wirkten durch die neue Umgebung der metabolischen Käfige und der damit einhergehenden Einzelhaltung sehr gestresst, was durch eine gestörte Nahrungs- u. Trinkwasseraufnahme gekennzeichnet war. Es ist davon auszugehen, dass sie unter ihren gewohnten Bedingungen eine andere Ausscheidung gezeigt hätten. In der subjektiven Wahrnehmung während der täglichen Pflege der Tiere erschienen die Käfige der DOCA-Tiere deutlich feuchter, was auch ein gehäuftes Wechseln des Streuguts mit sich führte. In der Trinkwasseraufnahme zeigten die DOCA behandelten Tiere mit 20-25ml/Tag ein teilweise doppelt so starkes Trinkverhalten wie die Tiere der Uni-Nx Gruppe (10-15ml/Tag) (Werte nicht dargestellt).

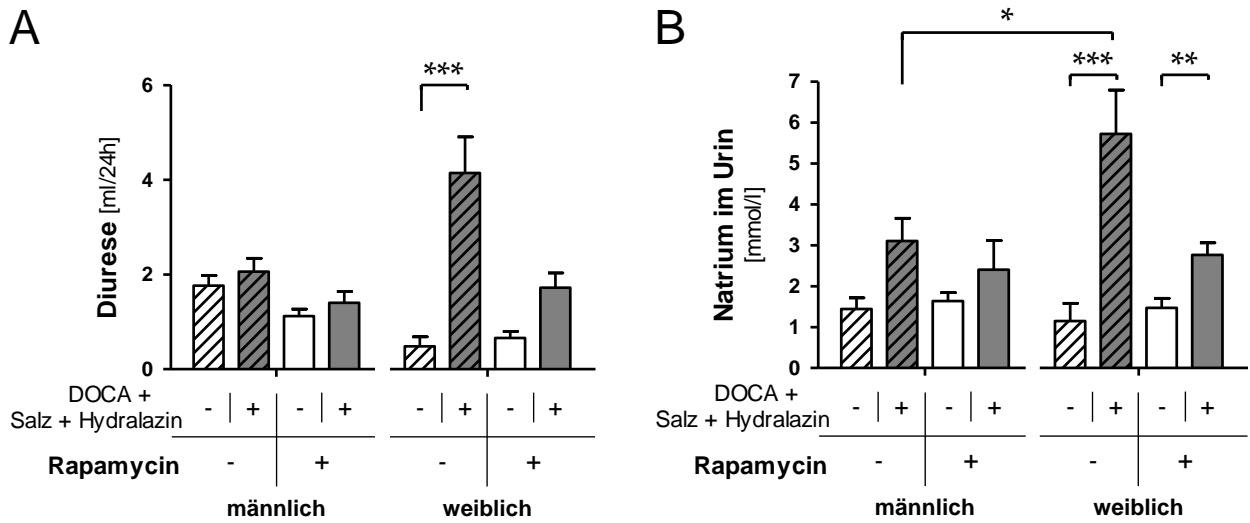


Abb. 3.2 Bestimmung der Diurese und fraktionellen Natriumexkretion über 24h

Eine Steigerung der Diurese unter DOCA-Behandlung konnte hauptsächlich bei den Weibchen beobachtet werden. Bei den Männchen blieb die Ausscheidung nahezu gleich (A). Die fraktionelle Natriumexkretion stieg unter DOCA-Salz in allen Versuchsgruppen an (B). MW ± SEM; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Die oben beschriebenen Veränderungen der Elektrolyt- und Wasserhomöostase im DOCA-Salz Modell gingen nicht mit einer Volumenretention einher. Dies konnte mit Hilfe der MRI-basierten Messung der Körperzusammensetzung nachgewiesen werden. Der Quotient aus dem Körperwassergehalt und dem Anteil am fettfreien Muskel- und Stützgewebe (beide als prozentualer Anteil zum Körpergewicht) wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf (Abb.3.3).

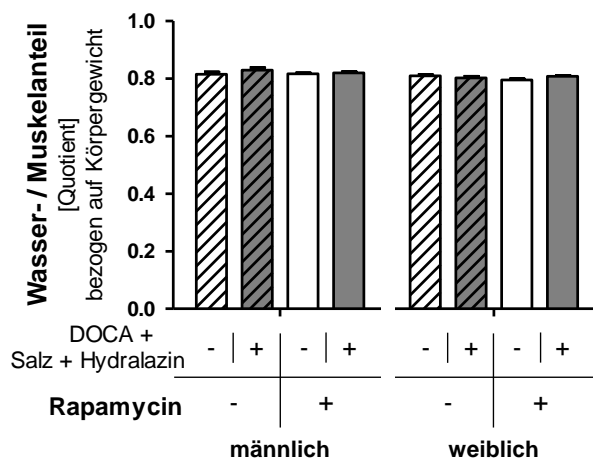


Abb. 3.3 Messung der Körperzusammensetzung

Die Messung der Körperzusammensetzung mittels MRI-Technik ergab keinen Anhalt auf eine Wasserretention. Der Quotient aus Körperwasser und Muskelmasse der Tiere ergab für alle Versuchsgruppen vergleichbare Werte. MW ± SEM

3.1.2 Hämodynamik

In der vorliegenden Arbeit sollten blutdruckunabhängige Effekte einer Rapamycinbehandlung auf die myokardiale Anpassung im CRS IV untersucht werden. Da eine alleinige Behandlung mit DOCA jedoch recht schnell eine Blutdruckerhöhung mit sich führen würde, erhielten die DOCA-Tiere ab dem ersten Tag der Behandlung den Vasodilatator Hydralazin mit dem Trinkwasser. Der Blutdruck konnte auf diese Weise effektiv normalisiert werden. In der Abb. 3.4 sind die telemetrisch gemessenen mittleren arteriellen Drücke (MAD) dargestellt. Durch den implantierten Sender war eine kontinuierliche Messung des Blutdrucks in nicht anästhesierten und sich frei bewegenden Tieren möglich.

Der erste Zeitraum (Grundlinie) stellt eine 12tägige Erholungsphase der Telemetrie-Tiere nach der Senderimplantation dar. Nach anfänglich leicht erhöhten Messwerten stabilisierten sich die MAD innerhalb weniger Tage auf Werte um 110 mmHG. Die nachfolgende 13tägige Phase zeigt die Blutdrücke nach erfolgter Nephrektomie und 1%iger Salzdiät (Uni-Nx + Salz), in welcher es zu keiner signifikanten Blutdruckerhöhung kam. Der letzte Abschnitt stellt die eigentliche Behandlungsphase mit DOCA+Salz und Rapamycin dar. Auch in diesem Zeitraum konnte keine Erhöhung des MAD im Vergleich zu Grundlinie erkannt werden, wenn auch die Werte im Tagesvergleich größeren Schwankungen unterlagen. Im Geschlechtervergleich kam es zu keiner Phase des Experiments zu erkennbaren Unterschieden.

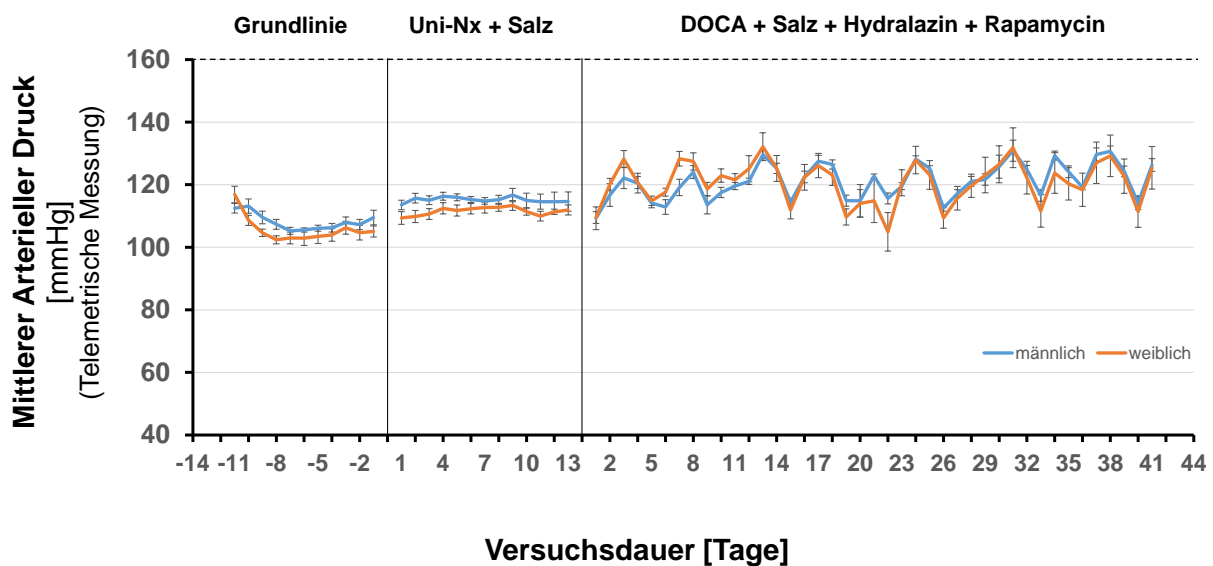


Abb. 3.4 Messung des Blutdrucks mittels Telemetriesender

Der MAD von 110mmHg in der Grundlinie wurde in beiden Geschlechtern weder durch Uni-Nx + Salz noch durch die DOCA-Salz + Rapamycinbehandlung signifikant geändert. MW \pm SEM (n=7)

3. ERGEBNISSE

Die invasive Messung des Blutdrucks mittels Karotiskatheter fand unmittelbar vor der Organentnahme und somit am Ende der 6wöchigen Versuchsdauer statt. Sie konnte die Beobachtungen aus der telemetrischen Messung bestätigen. Auch wenn durch die Isofluran-Narkose ein im Schnitt um 20mmHG niedrigerer Blutdruck als bei den Telemetriertieren gemessen wurde, konnten keine signifikanten Unterschiede der MAD-Werte zwischen den Versuchsgruppen beobachtet werden.

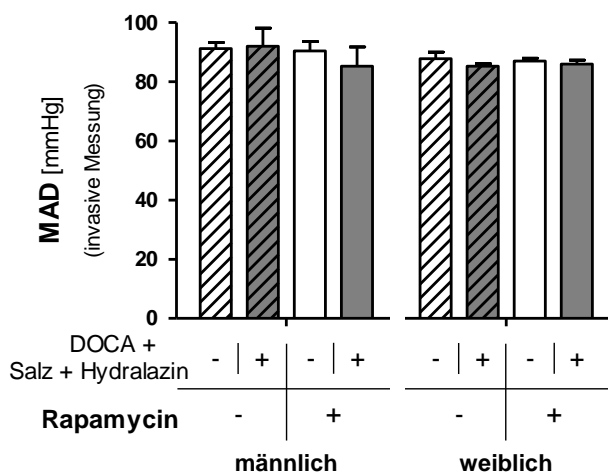


Abb. 3.5 Invasive Blutdruckmessung mittels Karotiskatheter

Die Isoflurannarkose senkte die Blutdruckwerte um durchschnittlich 20mmHG. Alle Versuchsgruppen wiesen einen MAD von 90-95mmHg auf. Zu signifikanten Unterschieden zwischen einzelnen Gruppen bzw. zwischen den Geschlechtern kam es nicht. MW \pm SEM

Bei beiden Messverfahren wurde parallel zum Blutdruck auch die Herzfrequenz (HF) aufgezeichnet. Die Abbildung 3.6 stellt die ermittelten Werte aus der telemetrischen Messung dar. Zum Startpunkt der Messung nach Senderimplantation wiesen die Weibchen leicht erhöhte Herzfrequenzen auf, welche sich jedoch in den ersten Tagen weitgehend auf physiologische Werte (<600bpm) absenkten. Die Männchen zeigten sofort nach der Senderimplantation normale Frequenzen, welche sich über die gesamte Versuchsdauer auf konstantem Niveau bewegten. Auch die Weibchen ließen konstante Herzfrequenzen erkennen. Allerdings lagen ihre Werte stets geringfügig über denen der Männchen, blieben jedoch ständig in dem für Mäusen physiologischen Bereich. Dieser Unterschied konnte durch die invasive Kathetermessung nicht bestätigt werden (3.7). Hier wiesen männliche und weibliche Tiere in allen Gruppen annähernd gleiche Herzfrequenzen zwischen 500-550 bpm nach. Bei den Männchen zeigten die Tiere der DOCA-Gruppe eine statistisch nicht signifikante Tendenz zu leicht höheren Frequenzen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für die Weibchen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

3. ERGEBNISSE

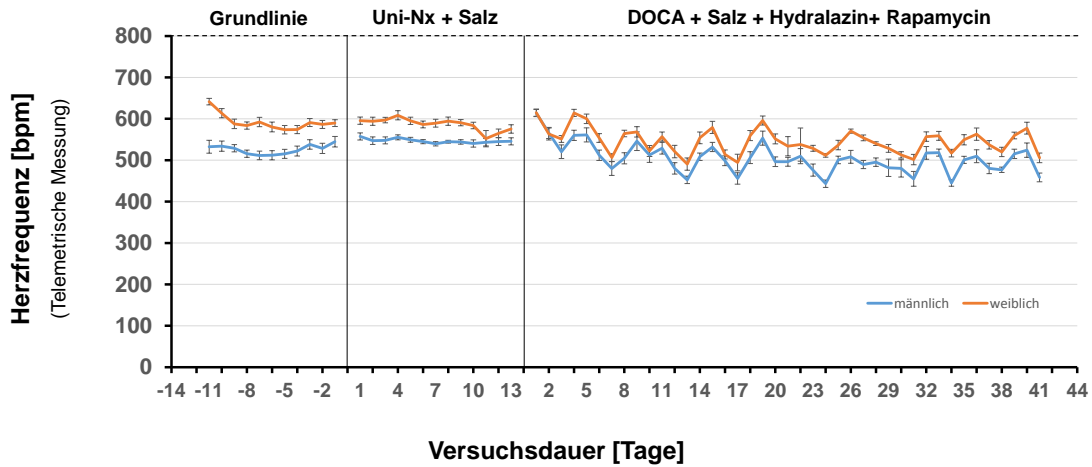


Abb. 3.6 Telemetrische Messung der Herzfrequenzen

Die Weibchen wiesen über die Versuchsdauer leicht höhere HF auf als die Männchen, bewegten sich jedoch nach anfänglich leicht erhöhten Werten stets im physiologischen Bereich (<600bpm). Die Männchen zeigten über die gesamte Versuchsdauer stabile Werte. Eine Beeinflussung der Behandlungen auf die HF konnte bei beiden Geschlechtern nicht beobachtet werden $MW \pm SEM$ (n=7)

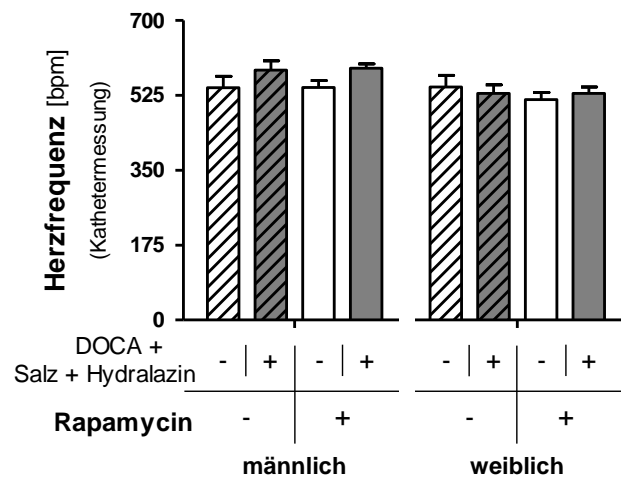


Abb. 3.7 Invasive Messung der Herzfrequenzen

In allen Versuchsgruppen konnten annähernd gleiche Werte zwischen 500-550bpm gemessen werden. Die DOCA-Männchen zeigten Tendenzen zu leicht höheren Frequenzen als die Kontrollgruppe, eine Signifikanz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Bei den Weibchen war dies nicht zu beobachten. $MW \pm SEM$

3.2 Serumkonzentrationen von Rapamycin

Die Abbildung 3.8 zeigt die gemessenen Rapamycinspiegel der Versuchstiere zum Ende der Studie. Alle Gruppen wiesen durchschnittliche Serumkonzentrationen um 4 ng/ml auf und lagen somit innerhalb unseres angestrebten therapeutischen Bereiches. Mit 3,3 ng/ml wurden die niedrigsten Konzentrationen in den DOCA-Salz Weibchen gemessen. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nicht.

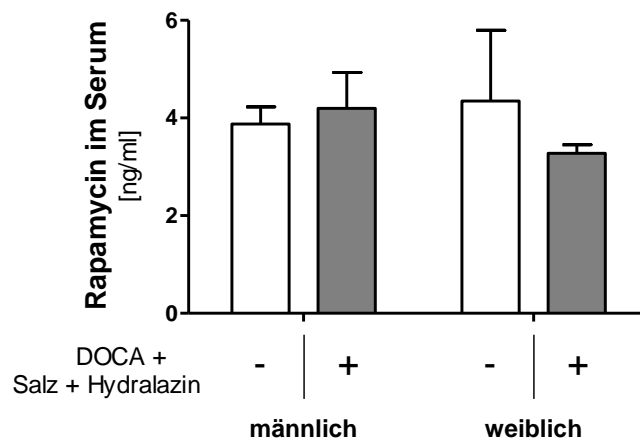


Abb. 3.8 Rapamycinspiegel im Serum

Mit Rapamycinkonzentrationen zwischen 3,3-4,2ng/ml lagen alle Interventionsgruppen im Wirkungsbereich für dieses Medikament. Signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht nachgewiesen. $MW \pm SEM$

3.3 Kardiale Morphologie und Herzfunktion unter DOCA-Salz und Rapamycin

3.3.1 Herzgewichte als Parameter der MH

Eine Möglichkeit zur Quantifizierung der MH ist die Korrelation des Herzgewichts (HG) zur Tibialänge (TL) (Abb. 3.9 A). Während die Männchen unter DOCA-Salz eine Erhöhung des HG um 27% gegenüber ihrer Uni-Nx Kontrollgruppe entwickelten, so fiel die Zunahme bei den Weibchen mit 15% geringer aus. Im direkten Vergleich lagen die Herzgewichte der DOCA-Weibchen mit einem HG/TL-Quotienten von 7,2 deutlich unter denen ihrer männlichen Vergleichsgruppe mit einem Quotienten von 8,9. Unter der Rapamycin-Intervention kehrten sich die Verhältnisse um. Während die Männchen unter DOCA-Salz eine nicht signifikante Erhöhung des HG von vergleichsweise niedrigen 9% aufwiesen, so entwickelten die weiblichen Versuchstiere einen deutlichen Anstieg

3. ERGEBNISSE

des HG unter DOCA-Salz von 37%. Im direkten Vergleich der DOCA-Salz-Gruppen fällt auf, dass die HG der Männchen unter Rapamycin signifikant abnahmen. Bei den Weibchen konnte diese Abnahme nicht beobachtet werden. Lagen die HG der Weibchen unter Vehikel-Intervention noch unter denen der korrespondierenden Männchen, so bewegten sie sich unter Rapamycin auf dem gleichen Niveau.

In der Abb. 3.9 B sind repräsentativ Fotos von Herzen aus den DOCA-Salz Gruppen dargestellt. Der makroskopische Eindruck der blutleeren Herzen bestätigte die gemessenen Herzgewichte. Während die Herzen der Männchen unter Rapamycin-Intervention insgesamt kleinere Ausmaße aufwiesen als jene der Vehikel-Tiere, so konnten bei den Weibchen keine relevanten Größenunterschiede festgestellt werden.

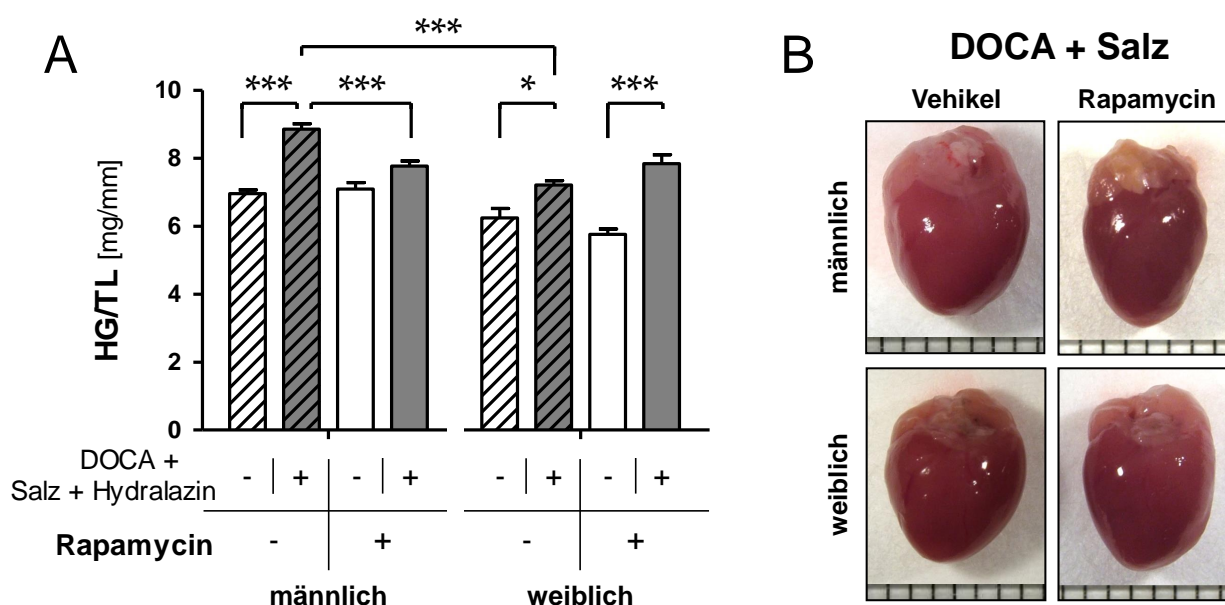


Abb. 3.9 HG in Relation zur Tibiallänge und Makroskopie

In der Korrelation des HG zur TL (A) konnte bei den Männchen unter Rapamycin eine Abnahme des HG unter DOCA-Salz-Behandlung beobachtet werden. Die Weibchen zeigten in der Rapamycin-Gruppe eine höhere Gewichtszunahme der Herzen unter DOCA-Salz Einfluss als in der Vehikelgruppe. Die Fotos zeigen repräsentativ die makroskopischen Unterschiede unter den DOCA-Salz Gruppen (B). Statistik: 3F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Behandlung-Intervention: $\eta_p^2 = 0,188$; $p < 0,001$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Behandlung in den Vehikelgruppen: $\eta_p^2 = 0,176$; $p = 0,012$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Behandlung in der Rapamycingruppe: $\eta_p^2 = 0,209$; $p = 0,002$; 2F-ANOVA für die Interaktion Behandlung-Intervention unter den Männchen: $\eta_p^2 = 0,304$; $p < 0,001$; 2F-ANOVA für die Interaktion Behandlung-Intervention unter den Weibchen: $\eta_p^2 = 0,130$; $p = 0,020$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter DOCA+Salz-Behandlung: $\eta_p^2 = 0,301$; $p < 0,001$; MW \pm SEM; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$

Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung der kardialen Hypertrophie ist die Korrelation des HG zum Körpergewicht (siehe Abb. 3.10). Auch in dieser Betrachtung wurde der Geschlechterunterschied der kardialen Adaptation unter DOCA+Salz erkennbar. In den Vehikel-Gruppen stieg das

HG unter DOCA+Salz bei den Männchen um rund 15% an, wohingegen für die Weibchen keine Änderung des HG beobachtet wurde. Unter Rapamycin jedoch kehrten sich die Verhältnisse um. Hier waren es die männlichen Versuchstiere, bei denen kein Unterschied des HG zwischen DOCA-Salz- sowie Uni-Nx-Kontrollgruppe verzeichnet wurde. Das HG der DOCA-Salz-Gruppe wurde durch die Rapamycin-Intervention signifikant gegenüber jenes der Placebo-Vergleichsgruppe gesenkt. Dem gegenüber standen die weiblichen Versuchstiere, bei denen der Einfluss des Rapamycins einen Anstieg des HG unter DOCA+Salz von 16% mit sich führte, wodurch die DOCA-Salz-Weibchen der Rapamycingruppe die höchsten Herzgewichte unter allen Versuchsgruppen entwickelten.

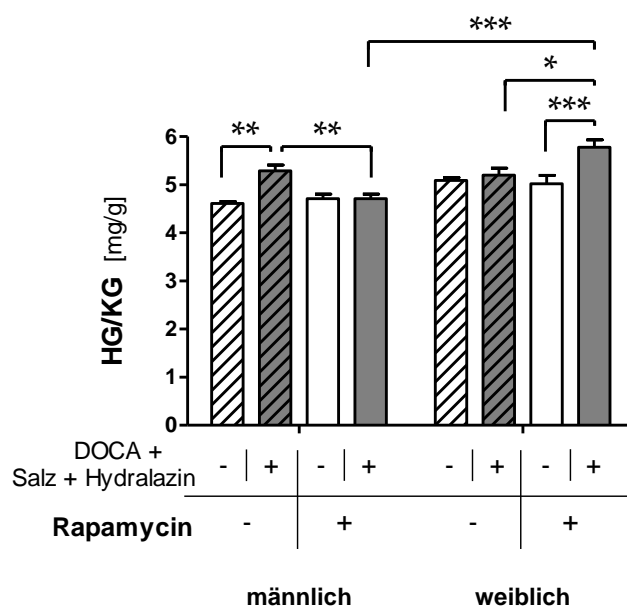


Abb. 3.10 HG in Relation zum Körpergewicht

Unter den Vehikeltieren zeigten die Männchen eine Erhöhung des HG von 15% unter DOCA+Salz, wohingegen bei den Weibchen das HG konstant blieb. Unter Rapamycin jedoch waren es die Männchen, die ein konstantes HG präsentierten, wohingegen die Rapa-Weibchen unter DOCA+Salz die höchsten HG aller Versuchstiere entwickelten. Statistik: 3F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Behandlung-Intervention: $\eta_p^2 = 0,166$; $p < 0,001$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Behandlung in der Vehikelgruppe: $\eta_p^2 = 0,198$; $p = 0,009$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Behandlung in der Rapamycingruppe: $\eta_p^2 = 0,162$; $p = 0,011$; 2F-ANOVA für die Interaktion Behandlung-Intervention unter den Männchen: $\eta_p^2 = 0,250$; $p = 0,001$; 2F-ANOVA für die Interaktion Behandlung-Intervention unter den Weibchen: $\eta_p^2 = 0,118$; $p = 0,047$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter DOCA+Salz-Behandlung: $\eta_p^2 = 0,312$; $p < 0,001$; MW \pm SEM; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ ***, $p < 0,001$

3.3.2 Charakterisierung der Herzdimensionen

Zur Erfassung der Herzdimensionen wurden die Wandstärken der Hinterwand (LVPW, left ventricular posterior wall) (Abb. 3.11 A) sowie des interventrikulären Septums (IVS) (Abb. 3.11 B)

echokardiographisch vermessen. Die DOCA-Salz-Behandlung führte in allen Versuchsgruppen in unterschiedlichem Ausmaß zu einer Verdickung der Herzwände. Für die Männchen konnte keine entscheidende Beeinflussung der Rapamycinbehandlung auf die Ausmaße der Herzwände beobachtet werden. Sowohl LVPW als auch IVS wiesen in der Rapamycin- sowie Vehikelgruppe annähernd gleiche Wandstärken auf. Die geringere Zunahme der Hinterwanddicke bei den Vehikeltieren ist auf die höheren Ausgangswerte in der Uni-Nx-Kontrollgruppe zurückzuführen.

Bei den weiblichen Versuchstieren jedoch konnte ein Unterschied zwischen Vehikel- und Rapamycin-Intervention beobachtet werden. Während die Wandstärken der Vehikel-Tiere sowohl für die LVPW als auch das IVS vergleichbare Werte zu den Männchen erkennen ließen, so war die Wandverdickung unter DOCA-Salz-Behandlung bei den Rapamycintieren weit weniger stark ausgeprägt. Unter Rapamycin wurden für die mit DOCA-Salz behandelten Weibchen signifikant niedrigere Werte als unter Vehikel-Intervention gemessen. Im Geschlechtervergleich zeigten die DOCA-Weibchen der Rapamycingruppe dünnere Wände als ihre korrespondierenden Männchen.

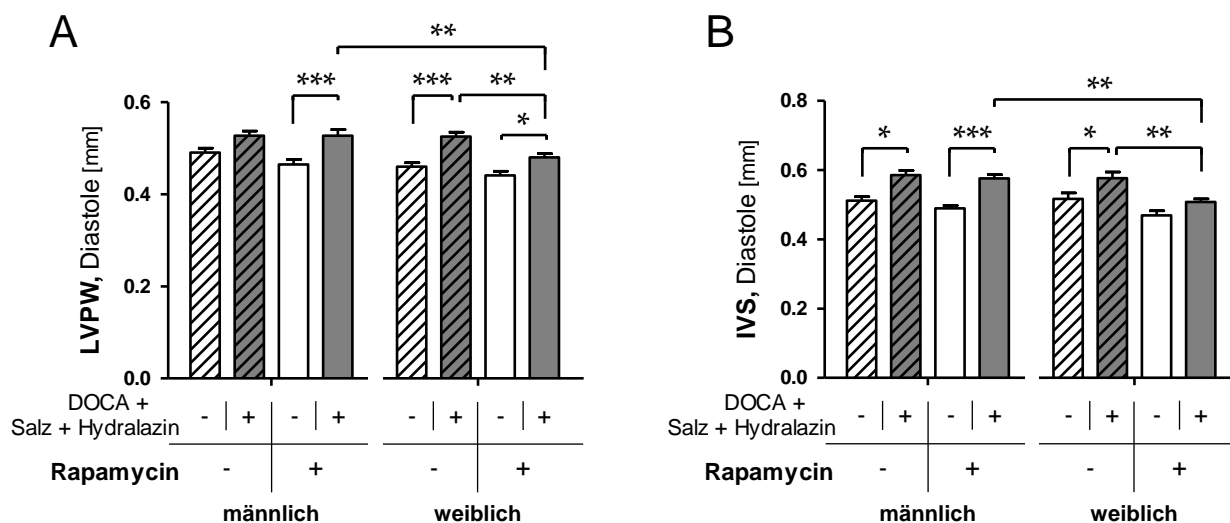


Abb. 3.11 Echokardiographische Bestimmung der Wandstärken (Diastole)

Wandstärken der Hinterwand (A) und des interventrikulären Septums (B). Die weiblichen Tiere zeigten unter Rapamycin signifikant dünnere Herzwände in der DOCA-Salz Gruppe. Für die Männchen war kein Einfluss der Rapamycin-Intervention zu verzeichnen. Statistik für LVPW: 3F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Behandlung-Intervention: $\eta_p^2 = 0,078$; $p = 0,031$; 2F-ANOVA für die Interaktion Behandlung-Intervention unter den Weibchen: $\eta_p^2 = 0,127$; $p = 0,028$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Behandlung unter Rapamycin: $\eta_p^2 = 0,159$; $p = 0,019$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Behandlung unter Rapamycin: $\eta_p^2 = 0,162$; $p = 0,018$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter DOCA-Salz-Behandlung: $\eta_p^2 = 0,187$; $p = 0,015$; Statistik für IVS: 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Behandlung unter Rapamycin: $\eta_p^2 = 0,127$; $p = 0,028$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter DOCA-Salz-Behandlung: $\eta_p^2 = 0,144$; $p = 0,027$; MW \pm SEM; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ ***, $p < 0,001$

Die Vermessung des inneren linksventrikulären Kammerdurchmessers (LVID, left ventricular inner diameter) ergab für die Männchen keinerlei Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Unabhängig von der Behandlung wurden für alle männlichen Tiere Kammerdurchmesser um 4,2mm gemessen. Die Weibchen hingegen entwickelten unter DOCA-Salz und Rapamycin einen signifikant größeren LVID als ihre Uni-Nx Kontrollgruppe (siehe Abb. 3.12).

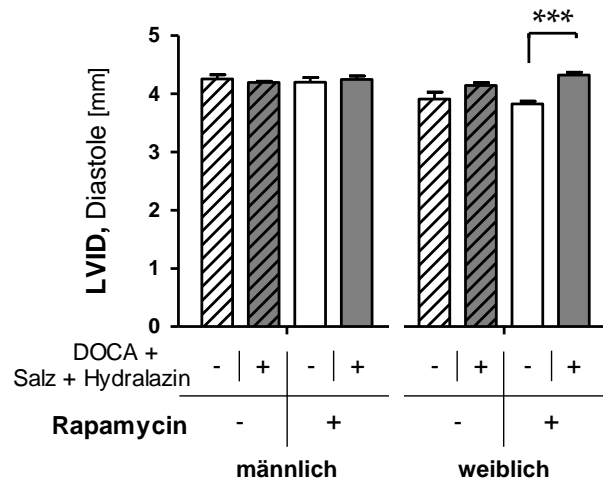


Abb. 3.12 Echokardiographische Vermessung des LV-Kammerdurchmessers (Diastole)

Die Weibchen entwickelten unter Einfluss von Rapamycin eine statistisch signifikante Größenzunahme des LVID unter DOCA-Salz. Die Männchen präsentierten in allen Gruppen vergleichbare Werte. Statistik: 3F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Behandlung-Intervention: $\eta_p^2 = 0,067$; $p < 0,03$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Behandlung unter Rapamycin: $\eta_p^2 = 0,127$; $p < 0,014$; 2F-ANOVA für die Interaktion Behandlung-Intervention unter den Männchen: $\eta_p^2 = 0,150$; $p < 0,018$; 2F-ANOVA für die Interaktion Behandlung-Intervention unter den Weibchen: $\eta_p^2 = 0,109$; $p < 0,052$; MW \pm SEM; ***, $p < 0,001$

3.3.3 Bestimmung der Herzauswurfleistung

Die Messungen aus der Echokardiographie ergaben ein einheitliches Bild. In fast allen Versuchsgruppen führte die DOCA-Salz Behandlung zu einer konstanten Steigerung der Ejektionsfraktion (EF) um 10% im Vergleich zu den Uni-Nx Kontrolltieren. Nur in der weiblichen Rapamycingruppe fiel die Zunahme der EF mit 5% geringer aus und war zudem statistisch nicht signifikant.

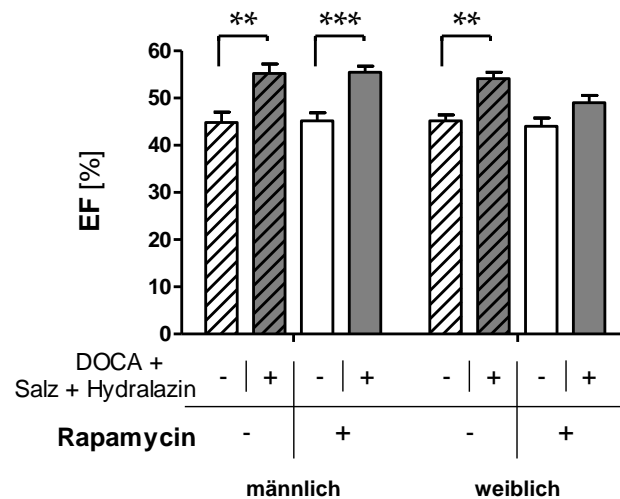


Abb. 3.13 Echokardiographische Bestimmung der EF

Unter DOCA-Salz Einfluss nahm die EF in fast allen Versuchsgruppen signifikant um 10% zu. Die einzige Ausnahme bildeten die mit Rapamycin behandelten Weibchen, bei denen der Zuwachs geringer und zudem nicht signifikant ausfiel. MW \pm SEM; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Tabelle 3.1 Physiologische Parameter der Versuchstiere

Parameter	männlich						weiblich					
	Uni-Nx + Salz		DOCA + Salz		Uni-Nx + Salz		DOCA + Salz		Uni-Nx + Salz		DOCA + Salz	
	Vehikel	Rapamycin	Vehikel	Rapamycin	Vehikel	Rapamycin	Vehikel	Rapamycin	Vehikel	Rapamycin	Vehikel	Rapamycin
Anzahl der Tiere	9	10	9	14	9	15	9	10	10	15	15	
Körpergewicht [g]	27,0±0,5	28,5±0,5	26,3±0,7	28,9±0,6†	21,7±0,4	23,0±0,4¶	20,9±0,3	24,0±0,5‡¶				
Herzgewicht [mg]	129,2±4,2	150,5±3,3*	129,4±6,4	140,7±3,5	110,6±5,1	128,1±3,5§	100,3±3,8	135,1±5,7‡				
Tibiallänge [mm]	17,45±0,08	17,29±0,11	17,45±0,15	17,63±0,13	17,18±0,09	17,16±0,18	16,89±0,17	17,56±0,20*				
HG/KG [mg/g]	4,61±0,04	5,29±0,01*	4,94±0,23	4,94±0,15	5,09±0,05	5,31±0,13	4,83±0,16	5,54±0,15‡§				
HG/TL [mg/mm]	6,94±0,09	8,86±0,16‡	7,10±0,19	7,77±0,15**	6,24±0,28	7,22±0,12*¶	5,76±0,16	7,84±0,26‡				
IVSs [mm]	0,54±0,01	0,60±0,02†	0,50±0,01	0,58±0,01‡	0,53±0,01	0,58±0,01*	0,49±0,01	0,51±0,01¶**				
IVSd [mm]	0,51±0,01	0,59±0,01†	0,49±0,01	0,58±0,01‡	0,52±0,02	0,58±0,02*	0,47±0,01	0,51±0,01 #				
LVPWs [mm]	0,51±0,02	0,55±0,01	0,48±0,01	0,55±0,01‡	0,48±0,01	0,55±0,01‡	0,46±0,01	0,49±0,01 **				
LVPWd [mm]	0,49±0,01	0,53±0,01	0,46±0,01	0,53±0,01‡	0,46±0,01	0,53±0,01‡	0,44±0,01	0,48±0,01* #				
LVIDs [mm]	3,26±0,12	2,99±0,06	3,27±0,10	3,02±0,08	2,83±0,12	3,00±0,05	2,99±0,07	3,30±0,06*				
LVIDd [mm]	4,26±0,08	4,20±0,02	4,20±0,08	4,25±0,06	3,91±0,12	4,15±0,05	3,83±0,05	4,33±0,04‡				
FS [%]	22,1±1,3	28,6±1,4†	22,3±0,9	28,1±1,0†	23,3±1,3	27,8±0,9*	21,6±1,0	25,2±1,0				
EF [%]	44,8±2,2	55,2±2,0†	45,2±1,7	54,5±1,3‡	45,2±1,2	54,1±1,3‡	44,0±1,8	49,1±1,5				

Erklärungen: KG, Körpergewicht; HG, Herzgewicht; TL, Tibiallänge; IVSs, interventrikuläre Septumdicke (Systole); IVSd, interventrikuläre Septumdicke (Diastole); LVIDs, linksventrikulärer innerer Kammerdurchmesser (Systole); LVIDd, linksventrikulärer innerer Kammerdurchmesser (Diastole); LVPWs, linksventrikuläre Hinterwand (Systole); LVPWd, linksventrikuläre Hinterwand (Diastole); FS, Verkürzungsfraction; EF, Ejektionsfraction

* P<0.05 für DOCA+Salz vs. Uni-Nx Kontrolle des gleichen Geschlechtes und Intervention

† P<0.01 für DOCA+Salz vs. Uni-Nx Kontrolle des gleichen Geschlechtes und Intervention

‡ P<0.001 für DOCA+Salz vs. Uni-Nx Kontrolle des gleichen Geschlechtes und Intervention

§ P<0.05 für DOCA+Salz Weibchen vs. DOCA+Salz Männchen mit der gleichen Intervention

|| P<0.01 für DOCA+Salz Weibchen vs. DOCA+Salz Männchen mit der gleichen Intervention

¶ P<0.001 für DOCA+Salz Weibchen vs. DOCA+Salz Männchen mit der gleichen Intervention

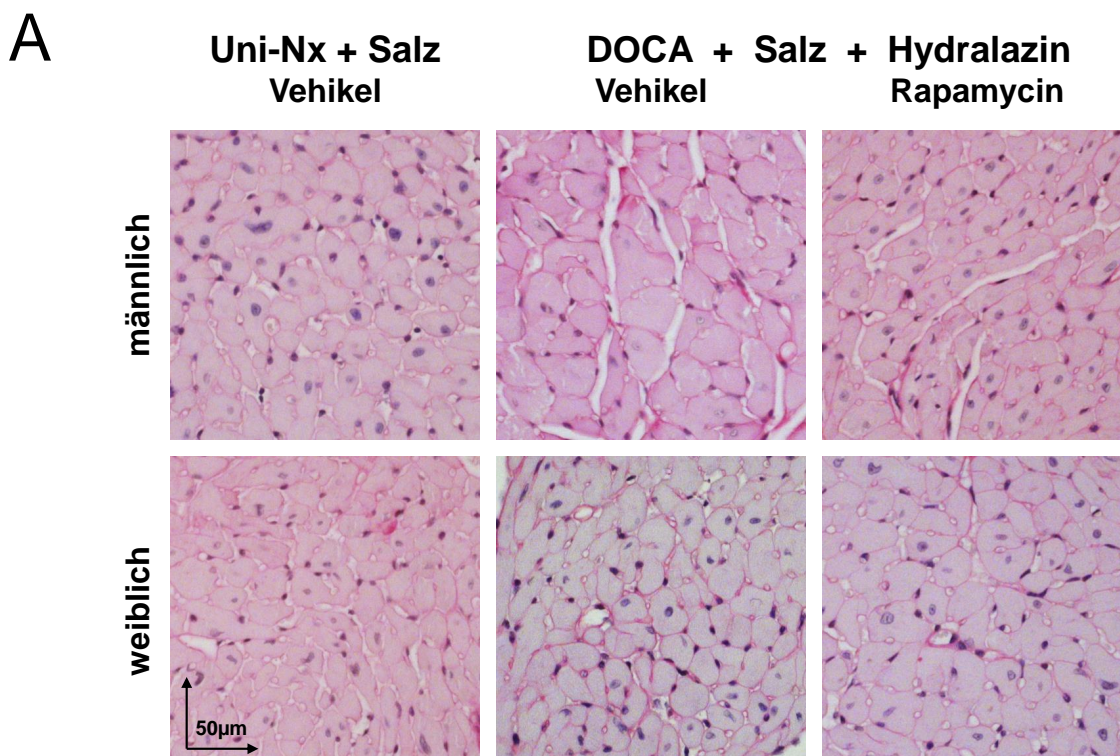
P<0.01 für Rapamycin vs. Vehikelkontrolle innerhalb des gleichen Geschlechtes und Behandlung

** P<0.001 für Rapamycin vs. Vehikelkontrolle innerhalb des gleichen Geschlechtes und Behandlung

3.3.4 Die MH auf zellulärer Ebene - Kardiomyozytenquerschnittsflächen

Zur morphologischen Beurteilung der Herzhypertrophie auf zellulärer Ebene wurden PAS-gefärbte Gewebsschnitte im Hellfeld mikroskopiert und die Querschnittsflächen einzelner Kardiomyozyten (myocyte cross sectional area, MCA) vermessen. Die Abbildung 3.14 A zeigt repräsentative Schnitte aus den DOCA-Salz-Gruppen der Rapamycin - bzw. Vehikelintervention sowie aus der Uni-Nx + Salz, Vehikel - Kontrolle. Unter DOCA-Salz konnte in beiden Geschlechtern eine Größenzunahme der MCA verglichen mit der Uni-Nx Kontrolle gemessen werden. Im direkten Vergleich der DOCA-Salz Gruppen wurde kein Größenunterschied der Kardiomyozyten zwischen den Rapamycin- u. Vehikelgruppen erkannt. Dies führt zu der Annahme, dass die Rapamycin-Intervention keinen Einfluss auf die Querschnittsflächen der Kardiomyozyten ausübt.

In der Abbildung 3.14 B ist analog dazu die quantitative Auswertung der MCA-Vermessung dargestellt. In beiden Geschlechtern konnten in den Uni-Nx Kontrollen konstante Werte um $350 \mu\text{m}^2$ gemessen werden. Die DOCA-Salz Behandlung führte unabhängig vom Geschlecht oder der Intervention zu einer Zunahme der MCA um durchschnittlich 25-30%, sodass im Mittel in allen DOCA-Salz Gruppen die Querschnittsflächen bei $450 \mu\text{m}^2$ lagen. Ein Einfluss der Rapamycin-Intervention auf die MCA war demnach nicht erkennbar.



B

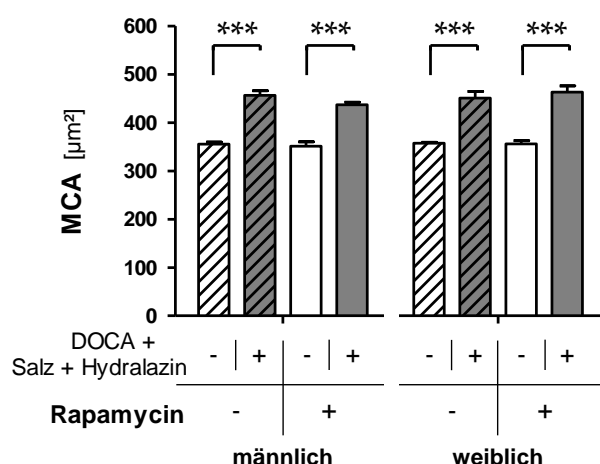


Abb. 3.14 Querschnittsflächen der Kardiomyozyten

Die DOCA-Salz Behandlung führte in allen Versuchsgruppen zu einer Zunahme der MCA um 25-30% im Vergleich zu den Uni-Nx Kontrollen. Die Rapamycin-Intervention hatte keinen Einfluss auf die MCA. MW ± SEM; ***, $p < 0,001$

3.4 Die kardiale Fibrose

3.4.1 Quantifizierung der Fibrose

Zur Quantifizierung der Fibrose wurden extrazelluläre Kollagenstrukturen mittels Sirius-Red-Methode angefärbt und zur Quantifizierung deren Anteil an der Gesamtfläche ermittelt. In der Abbildung 3.15 A sind repräsentativ Bildausschnitte aus den Geweben DOCA-Salz behandelter Tiere sowie der Uni-Nx, Vehikel - Kontrollen dargestellt. Als Ausgangswert für die vergleichende Betrachtung zeigten die Kontrolltiere wenig extrazelluläres Bindegewebe. Unter DOCA-Salz wurde bei den Vehikel-Männchen eine Zunahme an rotgefärbten Kollagenstrukturen erkennbar, wohingegen für die Weibchen keine Veränderung zu den Uni-Nx-Kontrollen wahrgenommen wurde. Unter Rapamycin kehrten sich die Verhältnisse um. Die gefärbten Herzschnitte der Männchen zeigten eine Reduzierung der Fibrose unter der Rapamycin, während in solchen der Weibchen ein höherer extrazellulärer Kollagengehalt als noch unter Vehikelapplikation beobachtet werden konnte.

Abbildung 3.15 B zeigt die quantitative Auswertung der lichtmikroskopischen Untersuchung. Unter Vehikel-Applikation kam es bei den Männchen unter dem DOCA-Salz Stimulus zu einer Zunahme des kollagenen Bindegewebes von 3,4% auf 5,2% an der Gesamtfläche verglichen mit den Uni-Nx-Kontrollen. Unter Rapamycin führte der DOCA-Salz Stimulus in den männlichen Versuchstieren hingegen zu keiner Zunahme der Fibrose. Die Vehikel-Weibchen präsentierten die niedrigsten

Kollagenanteile aller Versuchsgruppen. Im Vergleich der weiblichen Uni-Nx Gruppen konnte unter Rapamycin eine deutliche Zunahme der Fibrose verzeichnet werden. Selbst ohne DOCA-Salz Stimulus führte die Rapamycin-Intervention zu einer signifikanten Zunahme des extrazellulären Kollagens um 1,4% gegenüber den Vehikel-Kontrollen.

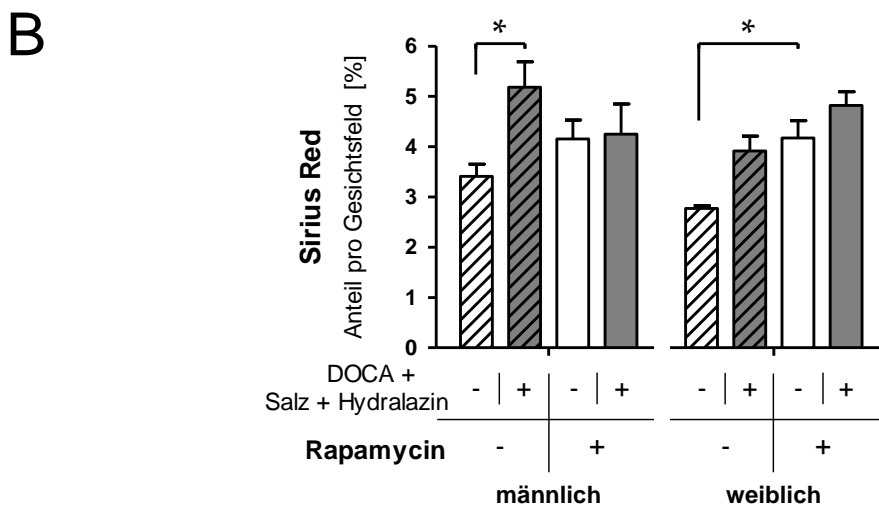
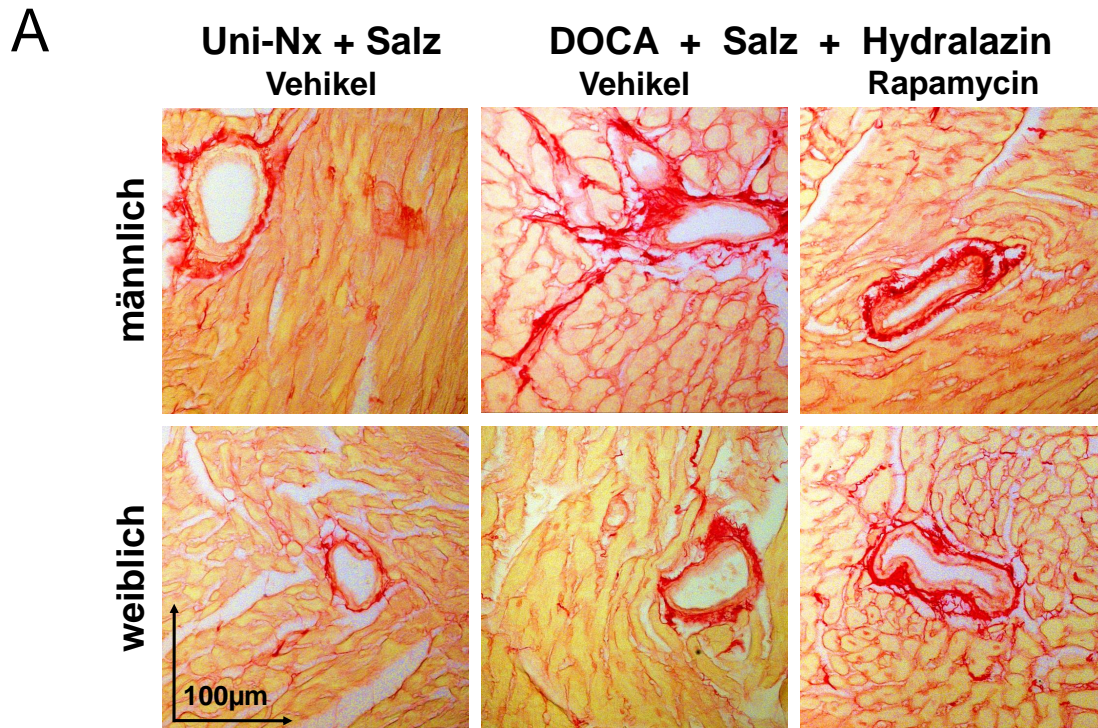


Abb. 3.15 Kollagenfärbung nach Sirius Red

Das lichtmikroskopische Bild (A) und die quantitative Auswertung der Sirius-Red-Färbung (B) ergeben für die Männchen eine Rapamycin-vermittelte Reduzierung der Fibrose unter DOCA-Salz. Die Weibchen hingegen reagierten auf die Rapamycin-Intervention mit einer Zunahme des extrazellulären Kollagenanteils. MW ± SEM; *, $p < 0,05$

3.4.2 Bestandteile der Extrazellulären Matrix

Das kardiale Remodeling ist durch eine Fibrose des Herzmuskelgewebes und somit durch die verstärkte Bildung von extrazellulärem Bindegewebe gekennzeichnet. Neben der Quantifizierung des Gesamtkollagens im interstitiellen Raum mittels Sirius-Red-Färbung wurde auch die qualitative Zusammensetzung der ECM durch relative Messung der Genexpression für Kollagen I u. III untersucht (siehe Abb. 3.16). Für beide Kollagenisoformen konnte bei den Vehikel-Männchen unter DOCA-Salz eine statistisch signifikante Zunahme der Genexpression auf ca. das Doppelte des Ausgangswertes der Uni-Nx Kontrollen gemessen werden. Durch die Rapamycin-Intervention fiel der Anstieg unter DOCA-Salz geringer aus. Bei den weiblichen Vehikel-Tieren kam es ebenfalls zu einem Anstieg der mRNA-Mengen für Kollagen I u. III unter DOCA-Salz, für welchen jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte. Anders als bei den Männchen führte die Rapamycin-Intervention bei den Weibchen selbst ohne den DOCA-Salz Einfluss zu einer signifikanten Zunahme der Genexpression beider Kollagenisoformen. Im direkten Geschlechtervergleich konnten bei den Rapamycin-Weibchen unter DOCA-Salz für beide Kollagenisoformen signifikant höhere Mengen an mRNA als in den männlichen Vergleichsgruppen gemessen werden.

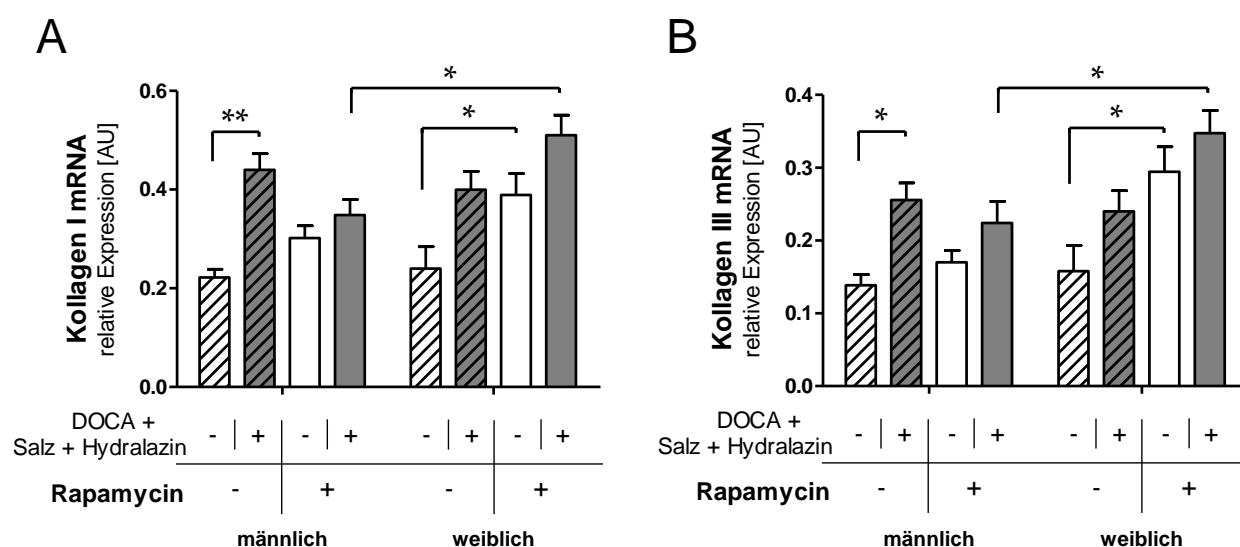


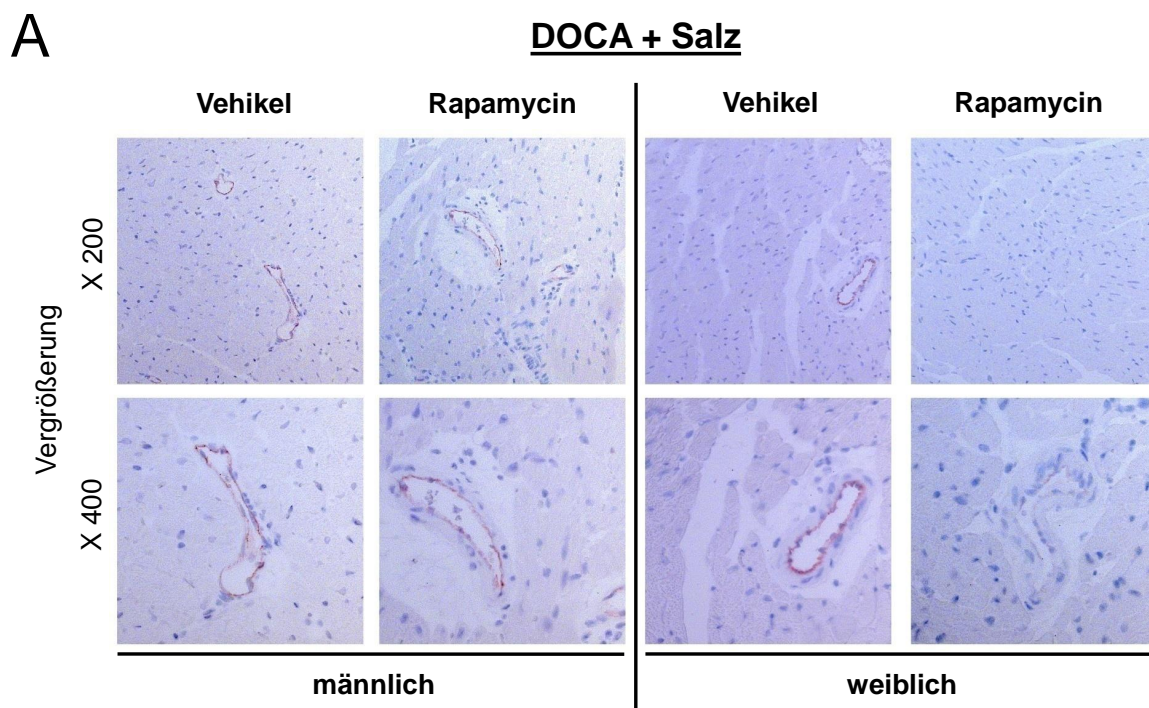
Abb. 3.16 Genexpression der Kollagen-Isoformen I u. III

Die Männchen entwickelten unter DOCA-Salz eine Zunahme der Genexpression beider Kollagenisoformen, welche durch Rapamycin abgeschwächt wurde. Bei den Weibchen hingegen führte die Rapamycin-Intervention zu einem Anstieg der mRNA-Transkripte beider Kollagenisoformen. Statistik für Kollagen I: 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter DOCA-Salz-Behandlung: $\eta_p^2 = 0,292$; $p = 0,011$; 2F-ANOVA für die Interaktion Behandlung-Intervention unter den Männchen: $\eta_p^2 = 0,345$; $p = 0,006$; Statistik für Kollagen III: 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter DOCA-Salz-Behandlung: $\eta_p^2 = 0,205$; $p = 0,026$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter den Uni-Nx-Kontrollen: $\eta_p^2 = 0,156$; $p = 0,056$; MW \pm SEM; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

3.5 Gefäßmorphologie und Angiogenese

Zur lichtmikroskopischen Beurteilung der Gefäßmorphologie wurden die Endothelien durch immunhistologische Färbemethoden gegen PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) sichtbar gemacht und im Hellfeld untersucht. Abbildung 3.17 A zeigt repräsentative Bilder aus den DOCA-Salz-Gruppen. In der vergleichenden Betrachtung unter dem Lichtmikroskop zeigten beinahe alle Versuchsgruppen homogene Bilder (Ausschnitte der Uni-Nx-Kontrollen nicht dargestellt). Die PECAM-1 - Färbung lieferte überwiegend starke Signale, wodurch die Endothelien deutlich abgegrenzt vom umliegenden Gewebe sichtbar wurden. Unterbrechungen im Signal, die auf eine Störung der Endothelintegrität hinweisen würden, konnten lediglich bei den DOCA-Salz Weibchen unter Rapamycin beobachtet werden. Bei diesen Tieren herrschte generell ein schwaches PECAM-1 - Signal, was auf Störungen in der Interaktion der Endothelzellen untereinander hinweist.

Vergleichbare Hinweise lieferte die Quantifizierung der mRNA für VEGF (engl. Vascular endothelial growth factor), die einen Hinweis auf die Angiogenese liefert (siehe Abb. 3.17B). Während die übrigen Versuchsgruppen allesamt vergleichbare Werte zeigten, konnte bei den Weibchen unter DOCA+Salz+Rapamycin ein signifikanter Abfall der mRNA-Transkripte für VEGF auf etwa die Hälfte des Ausgangsniveaus verzeichnet werden.



B

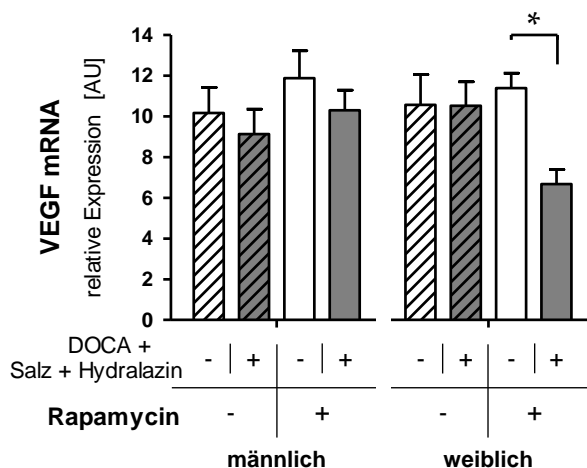


Abb. 3.17 Beurteilung der Gefäßintegrität

Die immunhistologische Färbung gegen PECAM-1 (A) zeigte in nahezu allen Versuchsgruppen intakte Gefäßendothelien. Lediglich die Weibchen präsentierten unter DOCA+Salz und Rapamycin abgeschwächte Signale als Hinweis auf Störungen der Endothelintegrität. Simultan dazu wurde in dieser Versuchsgruppe eine Halbierung der Transkripte der VEGF-mRNA gemessen (B) Statistik: 2F-ANOVA für die Interaktion Behandlung-Intervention unter den Weibchen: $\eta_p^2 = 0,164$; $p = 0,036$; $MW \pm SEM$; *, $p < 0,05$

3.6 Die myokardiale Signaltransduktion unter Mineralokortikoidexzess und Rapamycinbehandlung

3.6.1 Bestimmung der kardialen mTORC1 - Aktivität

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg erfasst und vereinigt Signale aus Nährstoffangebot, Wachstumsfaktoren und Stresssituationen und reguliert über den mTORC1-Komplex essentielle zelluläre Prozesse wie Protein- u. Lipidsynthese, Zellwachstum und Autophagie. Die Aktivierung der mTOR-Signalkaskade wird mit der physiologischen und somit adaptiven MH in Verbindung gebracht. Anhand des Phosphorylierungsstatus der Enzyme p70S6K und AKT kann die Aktivität der beiden mTOR-Komplexe (mTORC1/mTORC2) differenziert werden.

Ein wesentliches Zielmolekül des mTORC1-Komplexes ist die p70S6K (siehe Schema Abb. 3.18). Gemessen an der Phosphorylierung der p70S6K an der AS Thr308 zeigten die Weibchen unter Placebo eine Tendenz zu einer leicht höheren intrinsischen mTORC1-Aktivität als die Männchen. Unter Rapamycin wurde bei beiden Geschlechtern eine deutliche Reduzierung der p70S6K-Phosphorylierung beobachtet. Die Rapamycin-Intervention reduzierte die mTORC1-Aktivität bei beiden Geschlechtern in gleichem Maße.

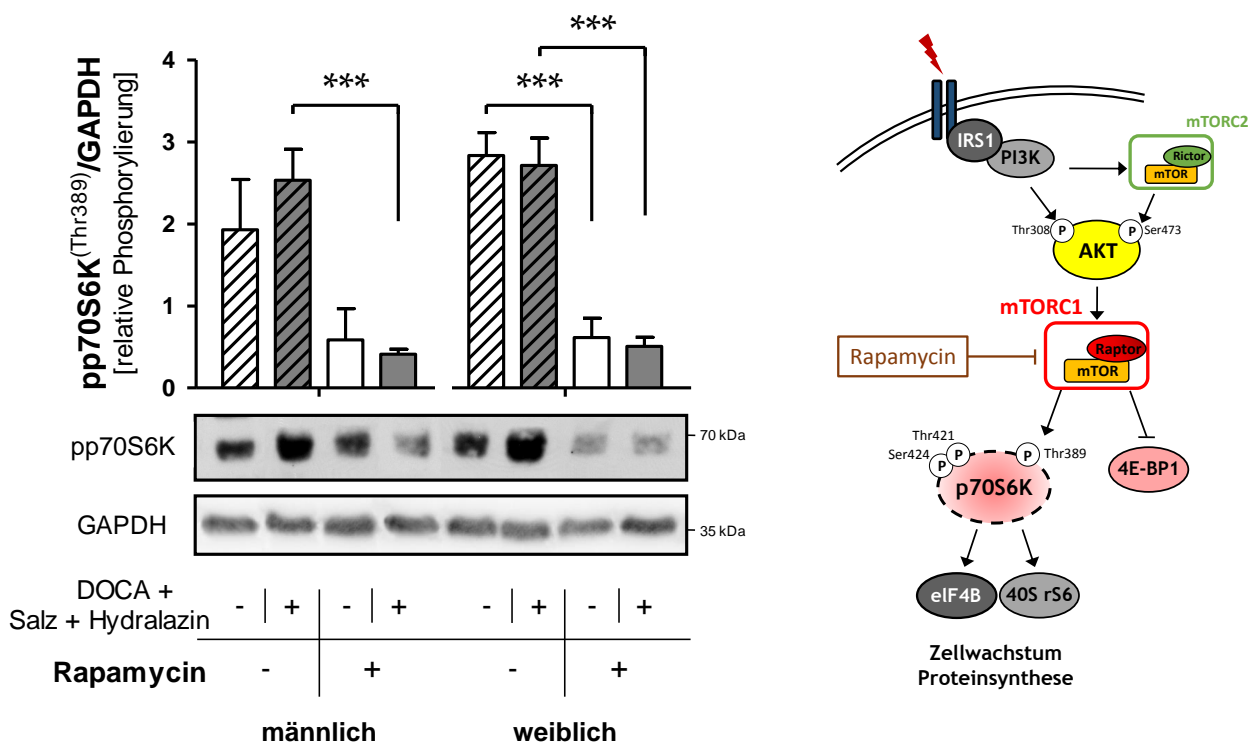


Abb. 3.18 mTORC1-Aktivität im Myokard

Unter Vehikel-Applikation zeigte sich bei den Weibchen eine leicht höhere mTORC1-Aktivierung als bei den Männchen. Durch die Rapamycin-Intervention wurde der mTORC1-Komplex entsprechend des Versuchsdesigns bei beiden Geschlechtern gleichermaßen effektiv blockiert. MW ± SEM; ***, $p < 0,001$

3.6.2 Die kardiale mTORC2-Aktivität

Der mTORC2-Komplex wird hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren über die PI3K aktiviert und übt Einfluss auf den Zellzyklus sowie die Organisation des Zytoskeletts aus. Über eine Inhibition des Transkriptionsfaktors FoxO wirkt mTORC2 antiapoptotisch und verlängert das Zellüberleben. Eine Aktivierung beider mTORC-Komplexe ist mit der adaptiven MH verknüpft.

Als direktes Zielprotein kann mit Hilfe der Phosphorylierungsstelle Serin 437 des Enzyms AKT auf die mTORC2-Aktivität geschlossen werden. Bei den Vehikeltieren präsentierten die Weibchen eine höhere intrinsische mTORC2-Aktivität als die Männchen. Unter Rapamycin kehrten sich die Verhältnisse jedoch um. Während bei den Männchen die Rapamycinbehandlung mit einer deutlichen mTORC2-Aktivitätssteigerung einher ging, wurde der Komplex bei den Weibchen durch Rapamycin gehemmt.

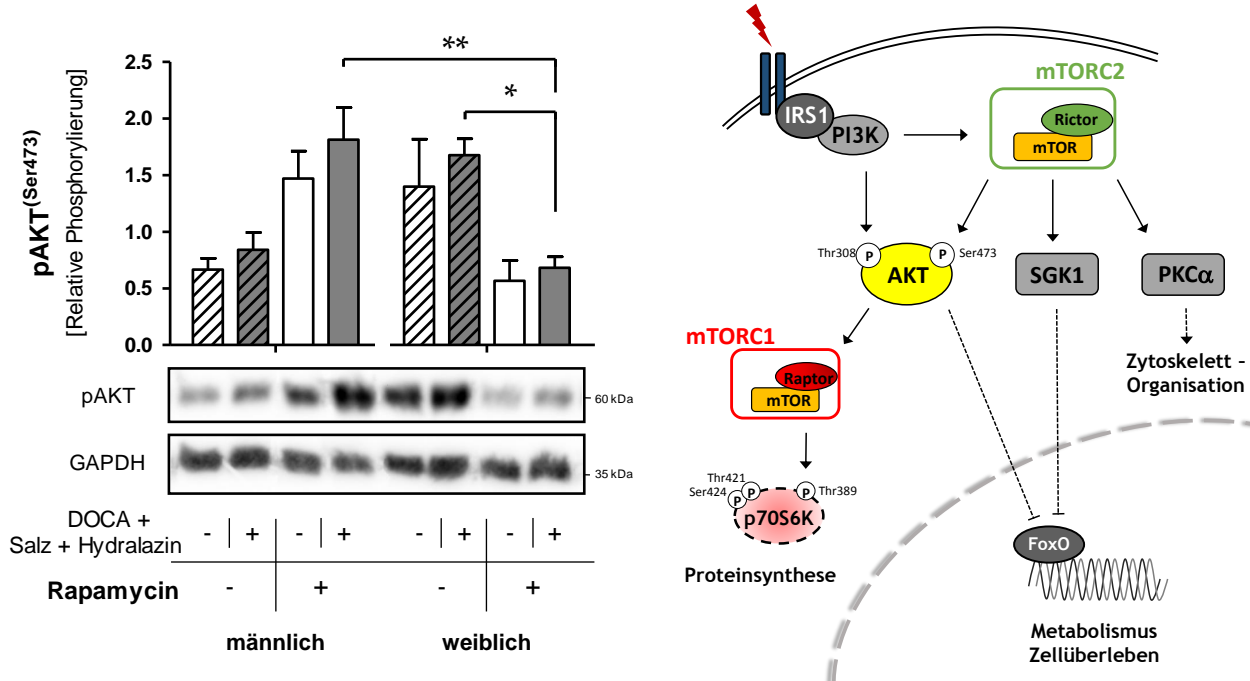


Abb. 3.19 mTORC2-Aktivität im Myokard

Unter den Vehikeltieren konnte bei den Weibchen eine höhere intrinsische mTORC2-Aktivierung nachgewiesen werden als bei den Männchen. Durch den Rapamycineinfluss kam es bei den Männchen zu einer mTORC2-Aktivierung, während mTORC2 bei den Weibchen gehemmt wurde. Statistik: 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter DOCA-Behandlung: $\eta_p^2 = 0,505$; $p < 0,001$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter den Uni-Nx-Kontrolltieren: $\eta_p^2 = 0,257$; $p = 0,004$; MW \pm SEM; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

3.6.3 Die kardiale ERK1/2 - Aktivität

Der ERK1/2-Signalweg spielt eine zentrale Rolle für die Regulation zellulärer Prozesse auf Stressreize. Er übt Einfluss auf nukleäre Transkription aus und fördert dadurch die Proliferation und das Zellwachstum. Eine Beteiligung der ERK1/2-Kaskade an der myokardialen Hypertrophie gilt als bewiesen. Mittels Western-Blot wurde der Phosphorylierungsstatus der ERK1/2-MAPK an den beiden Phosphorylierungsstellen Thr202 sowie Tyr204 untersucht und durch photometrische Methoden quantifiziert. Die höchste Phosphorylierung der ERK1/2 konnte bei den mit Rapamycin behandelten Männchen gemessen werden (Abb. 3.20). Hier zeigten die Tiere der DOCA-Gruppe etwa doppelt so hohe Werte wie ihre mit Vehikel behandelte Vergleichsgruppe. Bei den Vehikelweibchen war im Vergleich zu ihren männlichen Partnern eine etwas stärkere Phosphorylierung zu beobachten. Bei ihnen führte die Rapamycinbehandlung gegensätzlich zu einer signifikanten Reduzierung des Phosphorylierungsgrades, sodass die Rapa-Weibchen die niedrigsten Werte aller Versuchsgruppen aufwiesen.

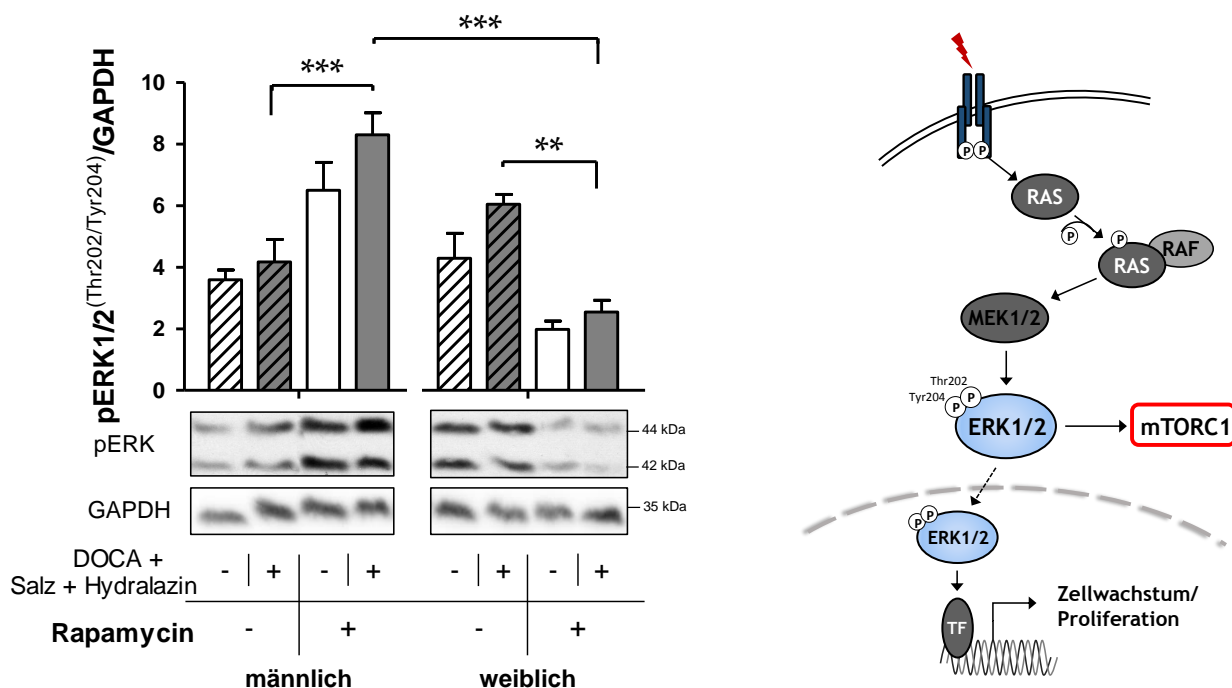


Abb. 3.20 Western-Blot-Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung

Bei den Männchen führte die Rapamycinbehandlung zu einer Zunahme des ERK1/2-Phosphorylierungsgrades, sodass die Rapa-Männchen die höchsten Werte aller Versuchstiere aufwiesen. Die Weibchen zeigten initial unter Vehikelbehandlung höhere Werte als ihre männlichen Partner. Im Gegensatz zu den Männchen führte die Rapamycinbehandlung bei ihnen allerdings zu einer deutlichen Reduzierung der ERK1/2-Phosphorylierung. Statistik: 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter den DOCA-Tieren: $\eta_p^2 = 0,717$; $p < 0,001$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter den Uni-Nx-Kontrollen: $\eta_p^2 = 0,448$; $p = 0,001$; MW \pm SEM; **, $p < 0,01$ ***, $p < 0,001$

Zusätzlich zum Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Färbemethoden außerdem die zelluläre Lokalisation untersucht. Diese spielt neben der Phosphorylierung eine wichtige Rolle für die Funktion von ERK1/2 in der Zelle. Die Abbildung 3.21 zeigt repräsentative Bilder aus der jeweiligen Versuchsgruppe. Unter Vehikel-Applikation präsentierten die Weibchen sowohl unter DOCA+Salz-Behandlung als auch unter Uni-Nx-Kontrollbedingungen eine rein zytosolische Lokalisation von Phospho-ERK1/2 (E u. G). Im Gegensatz dazu war Phospho-ERK1/2 bei den Männchen unter den selben Voraussetzungen hauptsächlich im Zellkern lokalisiert (A u. C). Durch die Rapamycin-Intervention änderte sich das Bild bei beiden Geschlechtern ins Gegenteil. Bei den Männchen verlagerte sich Phospho-ERK1/2 unter Rapamycin sowohl in der Uni-Nx- (B) als auch in der DOCA-Gruppe (D) vom Zellkern ins Zytosol. Die Weibchen änderten ihre Phospho-ERK1/2-Lokalisation unter Rapamycin entsprechend vom Zytosol in den Zellkern (F u. H)

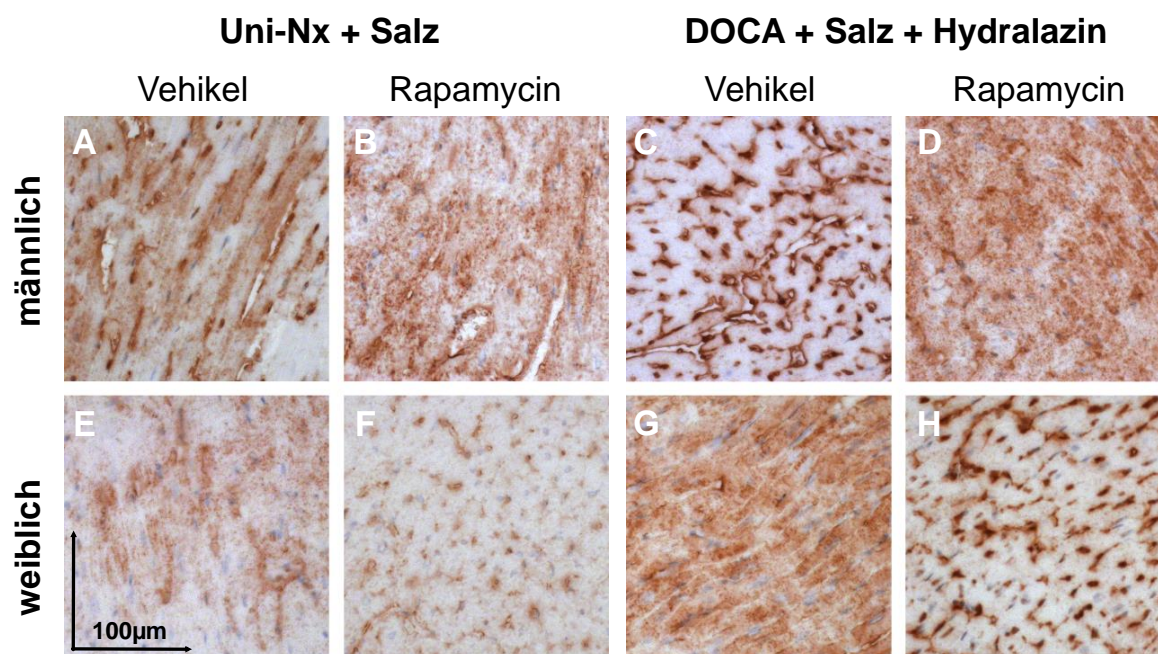


Abb. 3.21 Zelluläre Lokalisation von p-ERK1/2 in den Kardiomyozyten

Durch die Rapamycin-Intervention verlagerte sich bei den Männchen die ursprünglich im Zellkern gelegene Lokalisation der Phospho-ERK1/2 ins Zytosol. Bei den Weibchen, deren p-ERK1/2 unter der Vehikelsubstanz überwiegend im Zytosol zu beobachten war, waren die Signale unter Rapamycin hingegen im Zellkern lokalisiert.

3.6.4 Charakterisierung der p38MAPK-Phosphorylierung im Herzen

Der p38MAPK wird vor allem eine protektive Funktion in der LVH zugewiesen, indem sie Prozesse der MH -u. Fibrose-Induktion antagonisiert und so den Ventrikel vor dysfunktionellen Störungen beschützt. Eine entscheidende Rolle spielt in diesem Zusammenhang der hemmende Einfluss auf NFAT-vermittelte Signale in der prohypertrophen Genexpression (siehe Schema Abb. 3.22). Über die Messung der Menge des phosphorylierten Enzyms an den Stellen Thr180 und Tyr182 kann auf den Aktivitätszustand der p38MAPK geschlossen werden. Unter den Vehikeltieren wiesen die Weibchen etwas höhere Phosphorylierungsraten auf als die Männchen. Unter Rapamycin stieg bei den Männchen der Anteil an phosphoryliertem p38 deutlich an, sodass diese Tiere die höchsten Werte in unserer Versuchsreihe erreichten. Im Gegensatz dazu brachte bei den Weibchen die Rapamycinbehandlung eine Downregulation der p38-Phosphorylierung mit sich. Im direkten Vergleich der Rapamycintiere konnte bei den Weibchen also eine deutlich geringere p38-Aktivität als bei den Männchen gemessen werden.

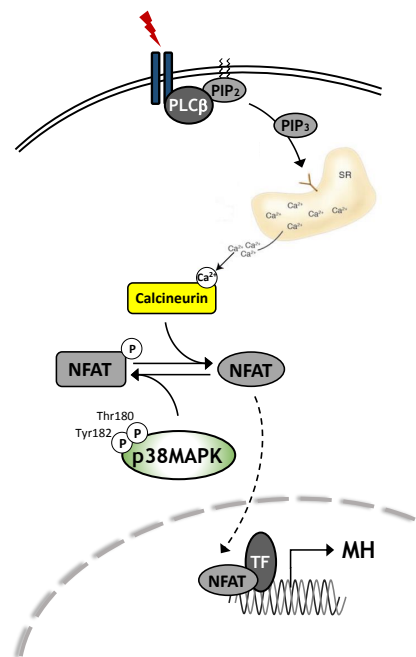
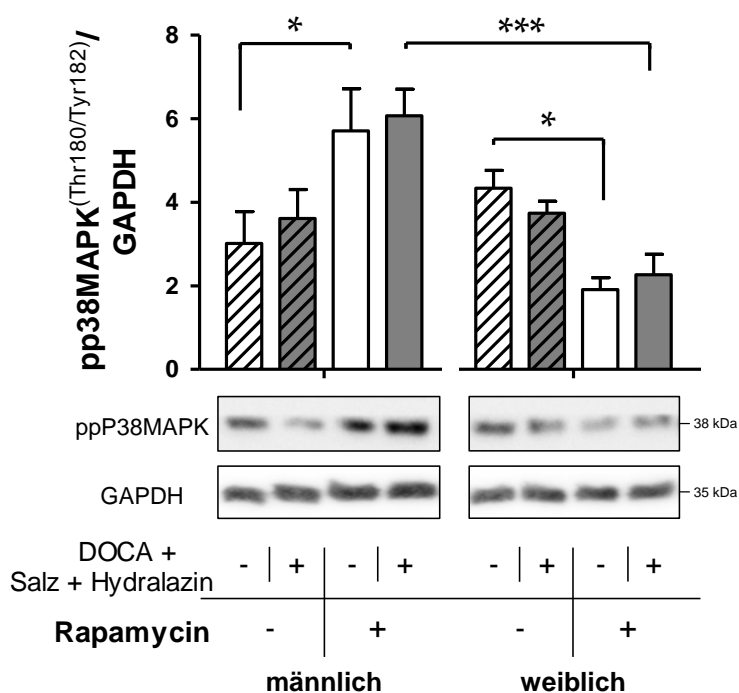


Abb. 3.22 p38MAPK-Aktivität im Myokard

Die Rapamycinbehandlung führte bei beiden Geschlechtern zu gegensätzlichen Effekten. Während sie bei den Männchen zu einer Steigerung der p38-Aktivität führte, nahm die Phosphorylierung des Enzyms bei den Weibchen deutlich ab. Statistik: 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter DOCA-Behandlung: $\eta_p^2 = 0,425$; $p = 0,002$; 2F-ANOVA für die Interaktion Geschlecht-Intervention unter den Uni-Nx-Kontrolltieren: $\eta_p^2 = 0,430$; $p = 0,001$; $MW \pm SEM$; ***, $p < 0,001$

3.6.5 Gehalt an mTOR-Protein im Myokard

Aus der Darstellung der Ergebnisse in den vorangegangenen Abschnitten wird ersichtlich, dass eine mTOR-Inhibition mit Rapamycin lediglich in den weiblichen Versuchsgruppen zu einer Inversion des kardialen Phänotypen mit verstärktem Remodeling führte. Weiterhin wurden Unterschiede zwischen den Geschlechtern in der Aktivierung der beiden mTOR-Komplexe erkannt. Diese Konstellation war ausschlaggebend dafür, dass alle weiteren detaillierten Untersuchungen dieser Arbeit ausschließlich an weiblichen Tieren vorgenommen wurden.

In der Bestimmung der Menge an mTOR-Gesamtprotein mittels Western-Blot konnte eine signifikante Verminderung der Signalstärke unter Rapamycin auf ca. die Hälfte des Wertes von Tieren mit Vehikel-Intervention beobachtet werden (siehe Abb. 3.23).

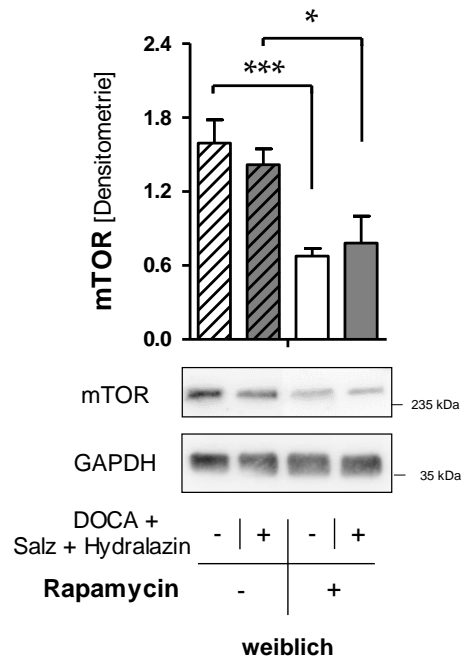


Abb. 3.23 Menge an mTOR-Gesamtprotein im Myokardgewebe

*Die Rapamycin-Intervention ging für die weiblichen Versuchstiere mit einer signifikanten Erniedrigung der Gesamtmenge für das mTOR-Protein einher. MW ± SEM; *, p<0,05; ***, p<0,001*

3. ERGEBNISSE

Funktionell aktiv ist das mTOR-Molekül in der Zelle allerdings nur durch den Zusammenschluss mit einer Vielzahl an anderen Proteinen zu den beiden Komplexen mTORC1 u. mTORC2. Eine wichtige Rolle zur Steuerung der Funktion der beiden Komplexe spielen dabei die Proteine Raptor (für mTORC1) und Rictor (für mTORC2). Um eine differenzierte Aussage über die funktionelle Menge an mTORC1 bzw. mTORC2 treffen zu können, bestimmten wir ebenfalls mittels Western-Blot den Gehalt dieser beiden Proteine in den Herzlysaten unserer weiblichen Versuchstiere.

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind in der Abbildung 3.24 dargestellt. Im Vergleich zu den Vehikel-Tieren wurde unter Rapamycin eine ungefähre Halbierung der Proteinmengen für Raptor (A) und Rictor (B) gemessen. Eine statistische Signifikanz konnte lediglich für Raptor nachgewiesen werden. Die DOCA-Salz-Behandlung beeinflusste die Menge an beiden Proteinen nicht.

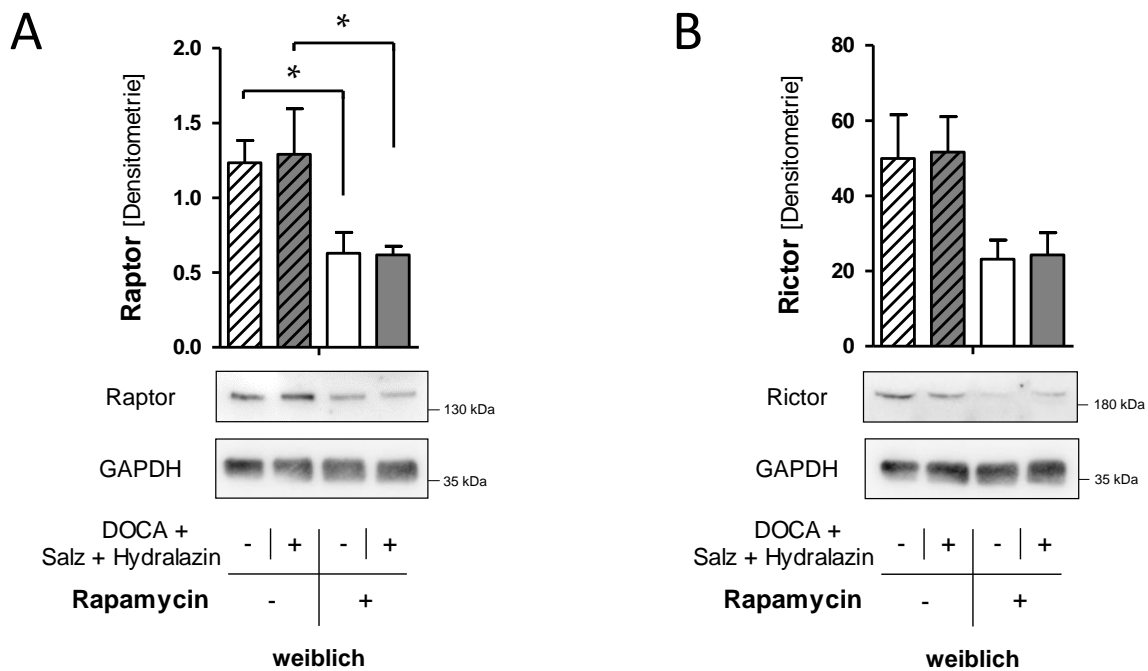


Abb. 3.24 Differenzierung zwischen dem Gehalt an Raptor- und Rictor-Protein

Sowohl für Raptor (A) als auch für Rictor (B) wurde unter Rapamycin eine Halbierung der Signalstärke im Western-Blot im Vergleich zu den Vehikel-Tieren beobachtet. Eine statistische Signifikanz dieser Verminderung wurde nur für Raptor nachgewiesen. MW \pm SEM; *, $p < 0,05$

3.6.6 Einfluss von Rapamycin auf die Östrogenrezeptor-Synthese

Zuletzt untersuchten wir für die weiblichen Versuchstiere die myokardiale Synthese der Östrogenrezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$ mittels Western Blot. Für den $ER\alpha$ wurde in allen weiblichen Versuchsgruppen eine vergleichbare Proteinmenge gemessen (siehe Abb. 3.25 A). Der Gehalt an $ER\beta$ -Protein wurde durch die Intervention mit Rapamycin jedoch signifikant auf etwa die Hälfte reduziert (Abb. 3.25 B).

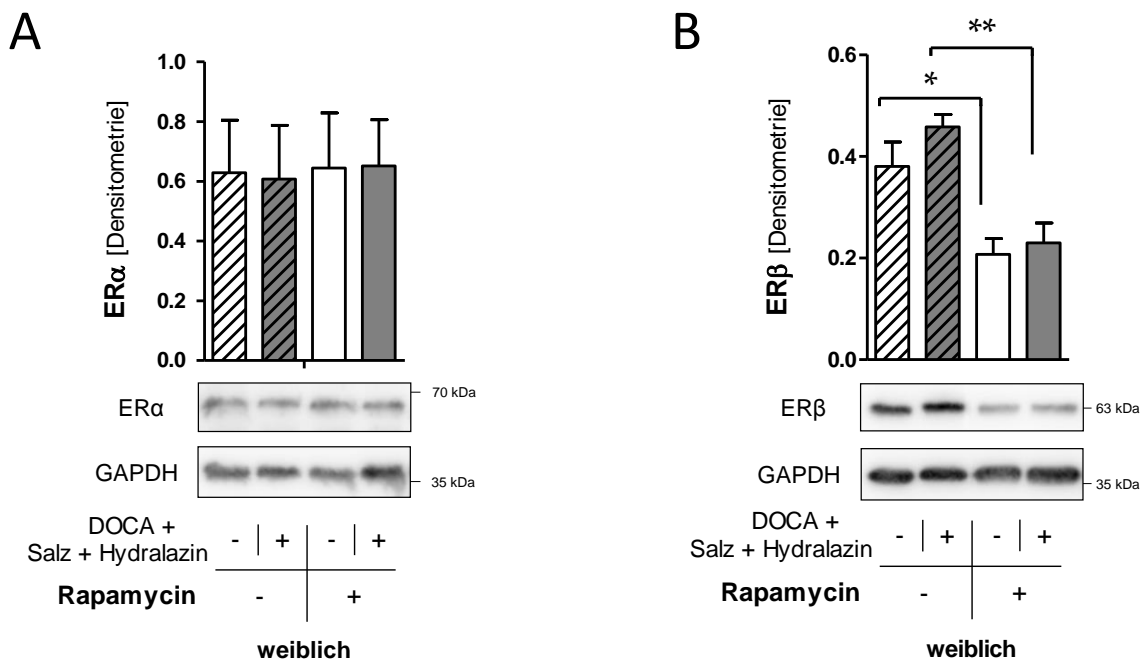


Abb. 3.25 Expression von $ER\alpha$ und $ER\beta$

Densitometrische Auswertung des Westernblotsignals für die beiden Östrogenrezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$. Während für das $ER\alpha$ -Protein in allen weiblichen Versuchsgruppen gleich starke Signale gemessen wurden (A), kam es für den $ER\beta$ zu einer Halbierung der Signalstärke durch die Rapamycin-Intervention (B). MW \pm SEM; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

4 Diskussion

4.1 Auswahl des Tiermodells

Am Anfang einer jeden Versuchsplanung gilt es zunächst das geeignete Versuchsmodell zu finden, mit dessen Hilfe sich die Fragestellung am besten beantworten lässt. Aus ethischen Gründen sollte dabei auch immer nach Alternativen zu Versuchen an lebenden Organismen gesucht werden. *In vitro* Untersuchungen an isolierten Organen bzw. Zellen sind für die Beantwortung von spezifischen Fragestellungen durchaus sinnvoll, offenbaren allerdings Schwächen in der Simulation komplexer pathophysiologischer Zusammenhänge. Um die Komplexität des renokardialen Syndroms in seiner Gesamtheit zu erfassen, kam nur die Verwendung eines Tiermodells in Frage. In der tierexperimentellen Forschung hat sich die Hausmaus („*mus musculus*“) über viele Jahrzehnte hinweg als geeigneter Organismus zur Untersuchung humaner Erkrankungen bewährt und etabliert. Ihre Vorteile liegen in einer hohen Reproduktionsrate, geringer Lebenserwartung und früher Geschlechtsreife, wodurch sich Behandlungseffekte auch schon nach kurzer Versuchsdauer nachweisen lassen. Zudem ähneln sie auf biochemischer und genetischer Ebene dem Menschen in ausreichendem Maße, sodass die gewonnenen Erkenntnisse auch Rückschlüsse auf den humanen Organismus zulassen. Ein weiterer Vorteil eines Mausmodells ist die Möglichkeit der gezielten genetischen Manipulation, welche heute bereits weit verbreitet eingesetzt wird. Ratten wären für kardiovaskuläre Fragestellungen dem menschlichen Organismus noch ähnlicher. Bislang fehlt jedoch eine etablierte Möglichkeit für gezielte Genveränderungen. Dem Menschen näher verwandte Arten wie bspw. Primaten sind dem humanen Organismus zwar in allen Belangen noch ähnlicher, durch ihre lange Lebenserwartung ließen sich Krankheitsverläufe jedoch nur über eine sehr lange Versuchsdauer beobachten.

Eine arterielle Hypertonie geht in der Regel mit einer LVH einher, die wiederum als eigenständiger Risikofaktor für das Auftreten kardiovaskulärer Zwischenfälle gilt. Zur Untersuchung adaptiver Vorgänge unter chronisch erhöhten Blutdrücken wurden eine Reihe von Hypertoniemodellen entwickelt. Diese können zusammengefasst werden in Modelle für die primäre und sekundäre arterielle Hypertonie [86]. Genetische Modelle wie die spontan-hypertensive Ratte (SHR) oder Veränderungen der Umwelteinflüsse wie die Kälte-induzierte Hypertonie repräsentieren dabei die primäre Hypertonie. Pharmakologische Interventionen oder die Induzierung einer renalen Hypertonie simulieren sekundäre Formen des Bluthochdrucks. Ein gängiges Modell für die renale Hypertonie ist das sog. „Goldblatt“-Modell, bei dem eine Nierenarterie mit einem Metallclip eingeeengt und somit eine Nierenarterienstenose simuliert wird. Als pharmakologische Intervention hat sich unter Anderem die kontinuierliche AT II-Infusion bewährt, welche durch die vermittelte Vasokonstriktion

schnell zu einer arteriellen Hypertonie führt. Zur Untersuchung speziell kardialer Fragestellungen ist die mechanische Obstruktion des kardialen Ausflusstraktes (TAC-Modell) weit verbreitet. Diese Modelle haben gemeinsam, dass die kardiale Adaptation direkt von der durch die Hypertonie erhöhte Druckbelastung des Herzens abhängig ist. Von hoher klinischer Relevanz ist es allerdings auch blutdruckunabhängige Mechanismen der LVH zu untersuchen, da im klinischen Alltag bei Hypertonie-Patienten der Blutdruck pharmakologisch normalisiert wird. Endorganschäden lassen sich häufig dennoch nicht vollständig vermeiden, weil endokrine Stimuli der Grunderkrankung weiterhin einwirken. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das DOCA-Salz Modell verwendet, da es auch unter Normalisierung des Blutdrucks mit Hydralazin die pathophysiologischen Zusammenhänge, wie sie etwa im menschlichen Organismus beim „renokardialen Syndrom“ auftreten, am besten simuliert.

Doch auch das DOCA-Salz Modell hat seine Grenzen. In der klinischen Situation des „renokardialen Syndroms“ hat die zunehmende Niereninsuffizienz eine chronische Aktivierung des RAAS zur Folge. Eine Ausschüttung von Renin aus den Zellen des JGA führt zu hohen Plasmoreninspiegeln, wodurch die Signalkaskade des RAAS in Gang gesetzt wird. Es kommt zum Anstieg aller Zwischenprodukte des RAAS, wodurch sich eine Konstellation aus hohen Konzentrationen von Renin, AT II und Aldosteron ergibt. Aldosteron ist zwar für einen Großteil der vermittelten Effekte verantwortlich, jedoch besitzen auch Renin und AT II über eigenständige Rezeptoren eine Wirkung auf Gewebe und Organe. Diese können durch das DOCA-Salz Modell nicht abgebildet werden. Die Applikation des Aldosteronanalogs DOCA geht nicht mit einer Aktivierung des RAAS einher, sondern simuliert lediglich die Symptome eines Hyperaldosteronismus. Über negative Rückkopplungsmechanismen weisen die Versuchstiere niedrige Renin- u. AT II-Spiegel auf (im Versuch nicht gemessen). Durch den durchgeführten Versuch können also keine Rückschlüsse auf Renin- u. AT II-vermittelte Endorganschäden, wie sie bei Patienten mit „renokardialen Syndrom“ vorliegen, getroffen werden. Nichtsdestotrotz stellt das DOCA-Salz Modell eine standardmäßig verwendete Methode zur Induktion einer pathologischen MH dar. Wie von Selye 1943 erstmals beschrieben, geht die Kombinationsbehandlung aus DOCA und einer Kochsalzdiät mit einer Fibrose multipler Organe einher [87]. In der vorliegenden Arbeit galt es, den Einfluss einer Rapamycinbehandlung auf die kardiale Adaptation unter einem geschlechtsspezifischen Aspekt zu untersuchen.

4.2 Wasser- u. Elektrolythaushalt im DOCA-Salz Modell

DOCA simuliert als Aldosteron-Analogon einen Hyperaldosteronismus. Dieser geht mit einer erhöhten Natriumreabsorption und Kaliumexkretion in der Niere einher. In der Folge steigt der Gesamtgehalt an Natrium des Körpers. Nur ein kleiner Teil der retenierten Natriummenge entfällt dabei auf das Interstitium und führt zu erhöhten Natrium-Serumspiegeln. Der weitaus größere Teil

wird in körpereigenen Depots gespeichert, wodurch osmotische Effekte und Elektrolytverschiebungen abgepuffert werden können [88]. Die Speicherung von Natrium in Muskeln, Knochen und Haut ist osmotisch inaktiv bzw. durch den Austausch gegen Kalium osmotisch neutral. Folglich ist nur ein kleiner Teil des resorbierten Natriums in der Lage einen extrazellulären Volumenanstieg zu vermitteln [31]. Im vorliegenden Versuch führte die Behandlung mit DOCA-Salz in allen Versuchsgruppen zu einem gleichmäßigen Anstieg des Serumnatriums um 6-8mmol/l (Abb.3.1A), der unabhängig vom Geschlecht oder der Rapamycin-Intervention war. Über die Bestimmung der Körperzusammensetzung konnte durch Berechnung des Quotienten von Körperwasser und Muskelgewebe auf den Gesamtkörperwasseranteil geschlossen werden. Unsere Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Versuchsgruppen (Abb.3.3). Dadurch kann folglich ausgeschlossen werden, dass ein Gewebsödem über die kardiale Einlagerung von Wasser Einfluss auf die Herzgewichte in den DOCA-Gruppen genommen hat. Die Erhöhung der HG in diesen Gruppen war somit ausschließlich durch die Vermehrung von kardialem Gewebe bedingt. Die Ergebnisse von Titze et al. [31, 88], dass eine DOCA-Salz-Behandlung nicht mit einer Volumenretention einhergeht, wurden somit auch in unserem Versuch bestätigt.

Ein weiteres Charakteristikum eines Hyperaldosteronismus ist eine erhöhte Kaliumausscheidung über die Nieren und eine daraus resultierende Hypokaliämie. Die Messung des Serum-Kaliumspiegels ergab bei unseren Versuchstieren einen Abfall der Kaliumkonzentration unter DOCA-Salz um ca. 2,5mmol/l (Abb. 3.1B), wodurch dieser Effekt durch unser Modell bestätigt werden konnte. Eine Hypokaliämie als Folge eines Hyperaldosteronismus kann als eigenständiger Risikofaktor für die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Dysfunktion angesehen werden [89, 90]. Im vorliegenden Versuch wiesen alle DOCA-Salz-Gruppen konstante Kaliumwerte um 3,5mmol/l auf. Signifikante Unterschieden zwischen den Geschlechtern oder den Rapamycin- u. Vehikelgruppen konnten nicht nachgewiesen werden. Die im Versuch gezeigten Unterschiede der kardialen Adaptation sind folglich nicht auf unterschiedlich hohe Kaliumspiegel der DOCA-Salz-Gruppen zurückzuführen.

4.3 Hämodynamik

Die kardiale Schädigung, die durch die DOCA-Salz-Behandlung hervorgerufen wird, unterliegt einem komplexen Netzwerk unterschiedlicher Einflussfaktoren. Neben der durch DOCA-Salz induzierten Hypertonie kommen ebenfalls endokrine Wirkungen des Mineralokortikoidexzesses, der veränderte Elektrolytstatus sowie eine erhöhte Sympathikusaktivität als pathologische Stimuli in Frage. Da im Versuchsdesign ein erhöhter Blutdruck als möglicher Einflussfaktor ausgeschaltet und blutdruckunabhängige Faktoren der DOCA-Salz-Behandlung untersucht werden sollten, wurde den Tieren Hydralazin verabreicht. Hydralazin ist ein direkt vasodilatatorischer Wirkstoff. Über

die Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen wird die Wandspannung herabgesetzt und das Lumen erweitert. In der Folge nimmt der systemische Gefäßwiderstand ab, die Nachlast des Herzen wird vermindert und der arterielle Blutdruck sinkt. Mit einer telemetrischen Blutdruckmessung konnte an wachen, sich frei bewegenden Tieren der arterielle Blutdruck kontinuierlich gemessen werden. In der Auswertung (Abb. 3.4) wird ersichtlich, dass der durchschnittliche MAD durch die Kombinationsbehandlung aus DOCA-Salz und Rapamycin bei gleichzeitiger Verabreichung von Hydralazin über die gesamte Versuchsdauer bei ca. 115mmHG konstant blieb. Im Vergleich zur Grundlinie, welche die Versuchstiere ohne Behandlung darstellt, ist kein signifikanter Blutdruckanstieg erkennbar. Die Applikation von Hydralazin konnte den Blutdruck der Tiere effizient normalisieren. In vorangegangenen Experimenten mit C57BL/6J-Mäusen wurde ein minimal erhöhter Blutdruck der männlichen Tiere gegenüber den Weibchen beobachtet [84]. Auch im vorliegenden Versuch zeichnete sich zu Beginn ein minimal höherer MAD (max. 5mmHG) der männlichen Tiere ab. Während der Behandlungsphase war diese Differenz nicht mehr erkennbar. Ein Einfluss des Blutdrucks auf Unterschiede in der kardialen Adaptation konnte im vorliegenden Versuch also ausgeschlossen werden. Unterstützt wird diese Aussage durch die invasive Blutdruckmessung zum Versuchsende, in der bei den narkotisierten Tieren ebenfalls keine Blutdruckunterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.5). Mit 90-95mmHg lag der bei dieser Methode gemessene MAD in allen Versuchsgruppen ca. 20mmHg unter dem der Telemetriemessung. Dies ist durch die Isoflurannarkose begründet, welche neben Veränderungen der HF auch eine Senkung des systemischen Blutdrucks bedingt [91, 92].

Die Applikation von Hydralazin und die damit verbundene Vasodilatation geht mit einer reflektorischen Aktivierung des Baroreflexes einher. In der Folge kommt es zu einer Aktivierung des Sympathikus mit Erhöhung der Katecholaminkonzentration im Blut. Über die Erhöhung von HF, EF und des peripheren Gefäßwiderstandes bewirkt ein hoher Sympathikotonus die Anhebung des arteriellen Blutdrucks. Eine chronische Erhöhung der Katecholaminspiegel hingegen begünstigt langfristig das Auftreten pathologischer Zustände wie maligne Hypertonie, MH und HI [93] (siehe auch Kap. 1.5.1). Auch die DOCA-Salz Behandlung an sich geht mit einer Erhöhung des Sympathikotonus einher [94], was wiederum über eine verstärkte Natriumretention in der Niere die Entstehung einer Hypertonie beschleunigt und verstärkt [95]. Eine unterschiedlich starke Aktivierung des Sympathikus wäre im vorliegenden Experiment also durchaus in der Lage, die Entwicklung der MH zu beeinflussen. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der autonomen Regulation sind sowohl in Tieren als auch beim Menschen beschrieben worden. Versuche mit orthostatischem Stress konnten demonstrieren, dass bei Männern eine stärkere Aktivierung des Sympathikus zur Aufrechterhaltung der kardiovaskulären Zirkulation vorliegt als bei gleichaltrigen Frauen [96, 97]. Mögliche Erklärungen dieser Unterschiede könnten die ER-abhängige Stimulierung zentraler autonomer Nervenkerne [98] bzw. eine geschlechtsspezifische Signalwirkung des Noradrenalins sein [99]. Eine unterschiedlich starke Sympathikusaktivierung als Folge der Hydralazinapplikation wäre also denkbar. In der telemetrischen Messung der HF an nicht narkotisierten Tieren präsentierten die Weibchen über

die gesamte Versuchsdauer um ca. 50bpm leicht höhere HF als die Männchen (siehe Abb. 3.6). Daher muss die Möglichkeit eines erhöhten Sympathikotonus bei den weiblichen Versuchstieren in Betracht gezogen werden. Untersuchungen der orthostatischen Regulation konnten zeigen, dass bei Männern und Frauen die physiologische Antwort auf einen erhöhten Sympathikotonus durch eine vermutlich unterschiedliche Verteilung der Adrenorezeptoren verschieden ausfällt [100]. Bei vergleichbaren Katecholaminspiegeln konnte bei Frauen eine Tendenz zu höheren HF nachgewiesen werden, wohingegen Männer eher mit einer zunehmenden Vasokonstriktion reagierten. Deshalb lässt allein die Betrachtung der HF keine sicheren Rückschlüsse auf den Sympathikotonus zu. Weiterführende physiologische Untersuchungen wie die Messung der Katecholaminspiegel im Blut waren nicht Gegenstand des vorliegenden Versuches und lassen sich im Nachhinein nicht mehr nachvollziehen.

Vorangegangene Untersuchungen mit ähnlichem Versuchsdesign konnten Unterschiede in der Sympathikusaktivierung durch die DOCA-Salz Behandlung weitestgehend ausschließen [84, 85]. Im vorliegenden Versuch wurden die Tiere zusätzlich mit Rapamycin behandelt. Immunsuppressiva haben nachweislich einen Einfluss auf die Hämodynamik und induzieren eine Hypertonie mit Tachykardie. Dies gilt allerdings vorrangig für die Cln-I CyclosporinA und Tacrolimus, wohingegen Rapamycin der Vorteil zugesprochen wird, frei von diesen hämodynamischen Effekten zu sein. So entstand die Hypothese, dass der Grund der hypertensiven Wirkung der Immunsuppression in der Calcineurin-Inhibition zu suchen sei [101, 102]. Sabbatini et al. konnten beweisen, dass Rapamycin in hohen Dosen durchaus einen Effekt auf die glomeruläre Perfusion hat [103]. Über die Konstriktion der afferenten Arteriole und folglich Minderperfusion des Glomerulums könnten renale afferente Neurone eine generalisierte Sympathikusaktivierung hervorrufen. Ein hämodynamischer Effekt von Rapamycin wäre also denkbar. Eine Studie an Ratten mit niedrigeren Rapamycindosierungen, die eher dem klinischen Anwendungsbereich entsprechen, konnte dies jedoch nicht bestätigen. Die Infusion mit Rapamycin führte hier zu keiner relevanten Blutdruckerhöhung oder Tachykardie [104]. Alle Studien wurden jedoch an männlichen Tieren durchgeführt. Für eventuelle Geschlechtsunterschiede des Sympathikotonus unter Rapamycin gibt es keine Hinweise und wären rein spekulativ. Unter den im Versuch verwendeten Dosierungen kann davon ausgegangen werden, dass das applizierte Rapamycin keinen Effekt auf die Hämodynamik hatte.

4.4 Das kardiale Remodeling

4.4.1 Erfassung der MH

Eine der zentralen Beobachtungen des durchgeführten Versuches ist jene, dass weibliche Tiere durch die Intervention mit Rapamycin eine stärkere Hypertrophie als Placebo behandelte Weibchen

entwickeln. Diese war zudem durch eine stärkere Fibrose und der Ausbildung eines dilatativen Phänotypen gekennzeichnet. Bereits anhand dieser makroskopischen Beobachtung kann eine zentrale Bedeutung von mTOR für die weibliche Kardioprotektion bei der DOCA-Salz induzierten LVH angenommen werden.

Zur quantitativen Bestimmung der LVH wurden als Bezugsgröße zu den Herzgewichten (HG) sowohl das Körpergewicht (KG) als auch die Tibialänge (TL) gewählt. Die Tibialänge ist als konstanter Wachstumsparameter ein Maß für die Körpergröße. Das Körpergewicht hingegen kann durch mittelfristige Schwankungen der Gesamtkörpermasse die Hypertrophiequantifizierung beeinflussen. Durch die MRT-Untersuchung konnte eine Veränderung des Körperwasseranteils und somit indirekt eine Einlagerung von Wasser in die Gewebe ausgeschlossen werden (Abb.3.3). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Erhöhung des Herzgewichts auf eine Zunahme der Muskelmasse und nicht auf eine Ödementwicklung zurückzuführen ist. Betrachtet man zunächst die Versuchsreihen ohne Rapamycinintervention, so lassen sich auch in diesem Versuch die bereits bekannten kardialen Anpassungsvorgänge nachvollziehen. Auffällig ist, dass die HG der weiblichen Uni-Nx Kontrollen im Bezug auf das Körpergewicht (KG) gegenüber den Männchen bereits höhere Ausgangswerte aufwiesen (Abb. 3.10). Dies konnte schon in früheren Versuchen beobachtet werden [84, 85]. Für das Bezugsmaß der Tibialänge (TL) trifft dies nicht zu, hier waren die HG eher geringer als die der Männchen (Abb. 3.9). Unter DOCA-Salz konnte bezogen auf den HG/TL-Quotienten eine stärkere kardiale Gewichtszunahme bei den Männchen beobachtet werden. Im direkten Vergleich präsentierten die DOCA-Weibchen signifikant leichtere Herzen als die Männchen. Noch prägnanter waren die Unterschiede bezogen auf das KG, bei dem die Weibchen unter DOCA-Salz überhaupt keine Zunahme des HG entwickelten. Damit bestätigen die Ergebnisse Beobachtungen aus früheren Versuchen, bei denen die DOCA-Salz Behandlung bei männlichen Versuchstieren zu einer deutlich ausgeprägteren MH führt als in der weiblichen Vergleichsgruppe [84, 85].

Die Rapamycinintervention führte im Gegensatz zu einer stärkeren MH bei den weiblichen verglichen mit den männlichen Versuchstieren. Bezogen auf die TL betrug die Zunahme der HG durch die DOCA-Salz Behandlung unter Rapamycin bei den Weibchen 37% und war damit der größte Zuwachs unter allen Versuchsgruppen. Die Männchen entwickelten unter Rapamycin eine deutlich geringer ausgeprägte MH als unter Placebo. Folgerichtig waren im direkten Vergleich der DOCA-Salz Gruppen die Herzen der Rapa-Männchen signifikant leichter als diejenigen der männlichen Vergleichsgruppe ohne Rapamycinintervention. Noch deutlicher konnte der Effekt des Rapamycins auf die MH für die Bezugsgröße des KG erkannt werden. Hier entwickelten die Männchen durch die DOCA-Salz Behandlung überhaupt keine Zunahme des HG. Die Weibchen hingegen zeigten einen deutlichen relativen Anstieg des HG gegenüber ihren UniNx-Kontrollen und besaßen auch für die absoluten Werte die schwersten Herzen unter allen Versuchsgruppen. Zusammengefasst wird daher deutlich, dass die Männchen im Kontext der induzierten MH unter Mineralokortikoidexzess von einer Rapamycinintervention profitierten und die MH durch das Medikament abgemildert wurde.

Bei den Weibchen hingegen war eine Inversion des kardialen Phänotypen hin zu einer deutlich ausgeprägten MH durch das Rapamycin erkennbar.

4.4.2 Echokardiographische Auswertung

Die Echokardiographische Auswertung spiegelte die Ergebnisse der Hypertrophieindizes wider. Die DOCA-Salz Behandlung führte in allen Gruppen zu einer Verdickung der Herzwände des LV im Vergleich zu ihren UniNx-Kontrollen (Abb. 3.11). Die Zunahme der Wandstärke war sowohl für die Hinterwand als auch das Septum konstant, sodass alle DOCA-Gruppen in etwa die gleichen absoluten Werte aufwiesen. Einzige Ausnahme bildeten lediglich die Weibchen mit Rapamycinintervention, die in der Auswertung der Hypertrophieindizes die höchste Zunahme der HG zeigten. In dieser Gruppe fiel die Zunahme der Wandstärken unter DOCA-Salz deutlich geringer aus, sodass die Wände des LV im Vergleich zu allen anderen DOCA-Gruppen signifikant dünner waren. Parallel dazu wurde bei den Rapamycin-Weibchen als einzige Versuchsgruppe eine signifikante Zunahme des linksventrikulären Kammerdurchmessers (LVID) unter DOCA-Salz gemessen (Abb. 3.12). Bei den Weibchen ohne Rapamycinintervention war die Zunahme des LVID geringer und nicht signifikant, womit sie sich auf dem gleichen Niveau von Werten früherer Studien bewegt [85]. Bei den Männchen hingegen konnte gar keine Zunahme des LVID beobachtet werden. Die morphologischen Veränderungen unter DOCA+Salz gingen gleichzeitig mit einer konstanten signifikanten Zunahme der Pumpleistung gemessen an der EF einher (Abb. 3.13). Einzig bei den Weibchen der Rapamycinintervention viel die Zunahme im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen deutlich geringer aus und war nicht signifikant.

Zusammengefasst konnte bei allen männlichen Versuchsgruppen und bei den Weibchen ohne Rapamycinintervention unter DOCA+Salz eine Zunahme der Wandstärke des LV bei gleichbleibendem inneren Kammerdurchmesser ermittelt werden. Diese Veränderungen sprechen für die Ausbildung einer konzentrischen MH in diesen Gruppen. Die gemessene Zunahme der Pumpleistung kann durch die kurze Versuchsdauer von 6 Wochen und mit dem einhergehend frühen Messzeitpunkt erklärt werden. In der Initialphase einer volumen- od. druckinduzierten Anpassungsreaktion im Sinne einer pathologischen MH können ähnlich zu den physiologischen Formen erhöhte Pumpleistungen festgestellt werden [45]. Erst mit zunehmender Dauer des pathologischen Reizes nimmt die Verbesserung der Pumpfunktion ab und kann in der chronischen Phase sogar mit einem progredienten Funktionsverlust einhergehen [105]. Die einzige Ausnahme in der phänotypischen Ausprägung der DOCA-Salz induzierten MH bildeten die Weibchen der Rapamycinintervention. Signifikant dünnere Herzwände im Vergleich zu allen anderen DOCA-Gruppen sowie die signifikante Zunahme des inneren Kammerdurchmessers sprechen hier für die Ausbildung einer exzentrischen, dilatativen Form der MH. Bereits nach 6 wöchiger Behandlungsdauer war bei diesen Tieren die Zunahme der EF unter DOCA-Salz deutlich geringer als in den anderen Versuchsgruppen, was als

Hinweis auf eine beginnende Funktionseinschränkung im Sinne einer kardialen Dekompensation gewertet werden kann. Damit wird deutlich, dass eine mTOR-Blockade mit Rapamycin im Kontext der DOCA-Salz induzierten MH einzig bei den weiblichen Versuchsgruppen für eine Umkehr des kardialen Phänotyps sorgt, welcher durch eine Dilatation und beginnende Funktionseinschränkung gekennzeichnet ist. Im Umkehrschluss scheint ein intakter mTOR-Signalweg eine wichtige Rolle für die weibliche Kardioprotektion unter Mineralokortikoidexzess zu spielen.

4.4.3 Die Hypertrophie auf zellulärer Ebene

Die Zunahme des HG im Rahmen einer MH geht mit einer individuellen Vergrößerung der Kardiomyozyten einher [106]. Durch die Messung der MCA an PAS-Gewebeschnitten konnte dieser Effekt in allen DOCA+Salz Gruppen demonstriert werden (Abb. 3.14). Bei gleichen Ausgangswerten in den UniNx-Kontrollen kam es in allen Versuchsgruppen zu einer vergleichbaren Zunahme der MCA von ca. 30%, sodass keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern bzw. der Rapamycin-intervention erkennbar waren. Die Auswertung der Hypertrophieindizes bescheinigte den Weibchen der Rapamycinintervention eine stärkere MH im Vergleich zu ihrer Vehikel-Kontrollgruppe. Da die stärkere Zunahme des HG der Rapa-Weibchen ohne eine relative Vergrößerung der MCA verglichen mit ihrer Vehikel-Kontrollgruppe einherging, wäre ein vermehrtes Längenwachstum der Kardiomyozyten in diesem Zusammenhang also denkbar. Dies würde zu der durch die Echokardiographie charakterisierten dilatativen Form der MH bei diesen Tieren passen. Die Vermessung der Kardiomyozytenlänge war durch die angefertigten Schnitte nicht möglich. Dazu wäre die Isolierung von Einzelzellen notwendig. Die verminderte Wanddicke der Herzen der Rapamycin-Weibchen bei gleichzeitig höheren HGs im Vergleich zu den Vehikel-Kontrollen und unveränderter MCA sprechen allerdings für eine veränderte räumliche Anordnung der Kardiomyozyten. Abschließend bleibt festzuhalten, dass die signifikante Zunahme der MCA durch den pathologischen DOCA-Salz Stimulus die Ergebnisse der Hypertrophieindizes bestätigen und die Funktionalität des DOCA-Salz Modells beweisen konnte.

4.4.4 Die kardiale Fibrose

Die Fibrose bezeichnet die Akkumulation von Kollagen in der ECM und ist ein Bestandteil des kardialen Remodelings. Die Einlagerung von Kollagen in das Myokardgewebe findet vorrangig im interstitiellen Bereich zwischen den Muskelfasern oder perivaskulär um die Blutgefäße statt. Durch die veränderte Zusammensetzung der ECM zugunsten des Kollagens wird die Elastizität sowie Kontraktilität des Myokards verändert, was zu Funktionsstörungen des Herzens führt [107].

Neben der Beeinträchtigung der systolischen Kontraktion und diastolischen Relaxation des Myokards, führt eine zunehmende Fibrose ebenfalls zu Störungen der elektrischen Erregungsausbreitung sowie zu einer Hypoxie der Kardiomyozyten bedingt durch die vergrößerte Diffusionsstrecke zu den Blutgefäßen [108]. Damit kommt der gestörten Hämostase der ECM eine Schlüsselrolle in der Progression der Herzinsuffizienz zu [109]. Sowohl Tierversuche [110, 111] als auch humane Studien [112] liefern Hinweise darauf, dass dem weiblichen Geschlecht Vorteile hinsichtlich der Progression des kardialen Remodelings eingeräumt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand einer Sirius-Red Färbung des Herzgewebes der Kollagengehalt der ECM quantitativ bestimmt (Abb. 3.15). Die Ergebnisse bestätigten im direkten Vergleich der Vehikel-Gruppen einen möglichen Geschlechtereinfluss, bei dem die Weibchen zu niedrigeren Kollagenmengen tendierten als die Männchen. Weiterhin führte bei den Männchen die DOCA-Salz Behandlung in Abwesenheit von Rapamycin zu einem deutlichen, signifikanten Anstieg des Kollagengehaltes in der ECM. Dieser konnte durch die Rapamycinintervention abgemildert werden, was teilweise auch in den leicht höheren Ausgangswerten der UniNx-Kontrollen begründet war. Bei den weiblichen Versuchstieren hingegen führte die mTOR-Blockade mit Rapamycin auch ohne den pathologischen DOCA-Salz Stimulus schon zu einer signifikanten Zunahme der kardialen Fibrose, wie im direkten Vergleich der UniNx-Gruppen erkennbar wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen erkennen, dass eine mTOR-Blockade mit Rapamycin einen geschlechtsabhängigen Einfluss auf die Produktion der ECM hat. Die antifibrotischen Eigenschaften von Rapamycin sind vielseitig untersucht und beschrieben worden. Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg steuert Wachstum und Proliferation verschiedenster Zellreihen und nimmt so auch Einfluss auf die Differenzierung von Fibroblasten. Ong et al. konnten zeigen, dass mTOR eine zentrale Rolle in der Expression der ECM-Komponenten einnimmt und darüber Einfluss auf den Kollagengehalt im Interstitium ausübt [113]. Im Einklang dazu ist Rapamycin in der Lage eine kardiale Fibrose unterschiedlichster Genese abzumildern. Yu et al. konnten in einer Studie an Ratten mit Adriamycin induzierter, dilatativer Kardiomyopathie eine erhöhte mTOR-Aktivität im fibrotischen Myokardgewebe nachweisen [114]. Die Applikation von Rapamycin führte in diesen Tieren zu einer signifikanten Abnahme der Fibrose und einer nachweislich besseren Herzfunktion. Weiterhin reduziert Rapamycin bzw. sein klinisch verwendetes Derivat Everolimus das kardiale Remodeling bei Patienten nach Herztransplantation [115] sowie den fibrotischen Umbau durch eine chronische Druckbelastung [116]. Buss et al. zeigten, dass Rapamycin unter ischämischen Bedingungen nach Herzinfarkt in der Lage ist, die Größe der Infarkt Narbe signifikant zu reduzieren und so das Remodeling positiv zu beeinflussen [117]. Der zugrundeliegende Mechanismus liegt in einer durch die mTORC1-Blockade gesteigerten Autophagozytose. Die Autophagie ist ein Energie bereitstellender Prozess, welcher der Zelle unter ischämischen Bedingungen zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels verhilft [118]. Über den Abbau geschädigter zelleigener Proteine wird das Zellüberleben positiv beeinflusst [118]. In diesen Studien wurde jedoch der Rapamycineffekt nicht auf mögliche Geschlechtsunterschiede hin untersucht. Im Widerspruch zu Buss et al. ergab eine Studie

an weiblichen Ratten, dass eine Applikation von Rapamycin nach induziertem Herzinfarkt zu einer Vergrößerung der Infarktnarbe und verschlechterter Herzfunktion führte [119]. Diese Beobachtung lässt Rückschlüsse auf eine mögliche geschlechtsspezifische Aktivierung des mTOR-Signalweges zu, die zu unterschiedlichen Rapamycineffekten führt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein positiver Effekt der Rapamycinintervention auf das Remodeling unter DOCA-Salz nur bei den männlichen Tieren beobachtet werden. Bei den weiblichen Versuchstieren führte Rapamycin hingegen bereits ohne pathologischen Stimulus zu einer Zunahme der Fibrose, welche unter DOCA-Salz nochmals verstärkt wurde und zudem mit einer Ventrikeldilatation einherging.

Wie bereits erwähnt führt eine gesteigerte Fibrose bedingt durch eine verlängerte Diffusionsstrecke zwischen Kardiomyozyt und Gefäßen zu einer chronischen Hypoxie des Arbeitsmyokards. Ein möglicher Kompensationsmechanismus des Organismus einer chronischen Gewebshypoxie entgegenzuwirken ist das Ausbilden neuer Gefäße, die sog. Angiogenese. Ein zentraler Wachstumsfaktor, der über eine Endothelproliferation und -migration maßgeblich an der Gefäßneubildung beteiligt ist, ist der vascular endothelial growth factor (VEGF)[120]. Wir bestimmten aus dem Myokard unserer Versuchstiere die VEGF-mRNA um Hinweise auf die Aktivität der Angiogenese zu erhalten. Wie in der Abb. 3.17B ersichtlich, wiesen fast alle Versuchsgruppen vergleichbare mRNA-Konzentrationen für VEGF auf. Lediglich die Weibchen der Rapamycingruppe zeigten deutlich erniedrigte Werte, im Vergleich zu ihrer Vehikel-Kontrollgruppe war der Unterschied statistisch signifikant. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Li et al., die an Versuchen mit Ratten-Endothelzellen zeigen konnten, dass die Hypoxie-induzierte Endothelproliferation stark von einer intakten mTOR-Signaltransduktion abhängig ist [121]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass beide mTOR-Komplexe an der Vermittlung der Endothelproliferation beteiligt sind. Die Rapamycin-Weibchen unserer Versuchsreihe waren die einzige Versuchsgruppe, die sowohl für mTORC1 als auch für mTORC2 niedrige Aktivitäten aufwiesen (siehe Kap. 3.6). Dass diese Versuchsgruppe in der vorliegenden Studie die niedrigste VEGF-mRNA Konzentration aufwies, bestätigt die Ergebnisse von Li et al. hinsichtlich der Notwendigkeit beider mTOR-Komplexe für eine intakte Endothelproliferation. Eine eingeschränkte Angiogenese bedeutet im Kontext des kardialen Remodelings, dass die Fibrose bedingte, chronische Hypoxie des Arbeitsmyokards nur schlecht durch die Ausbildung neuer Gefäße kompensiert werden kann. Durch die chronische Hypoxie wird ein Vorschreiten des kardialen Remodelings mit der Ausbildung einer vermehrten Fibrose begünstigt. Zur visuellen Kontrolle führten wir eine Immunhistochemie mit PECAM-1 durch (siehe Abb.3.17A). PECAM-1 ist ein Oberflächenmolekül, welches in hoher Konzentration an den interzellulären Verbindungsstellen von Endothelzellen exprimiert wird. Durch die immunhistochemische Anfärbung dieses Moleküls kann eine Aussage über die Beschaffenheit der Endothelschicht getroffen werden. Die repräsentativen Ausschnitte in Abb.3.17A zeigen, dass die Endothelien in den meisten Versuchsgruppen durch die PECAM-1 Immunhistochemie bandförmig angefärbt werden. Dies spricht für eine intakte Zell-Zell-Verbindung und damit ein funktionsfähiges Endothel. Lediglich in der

Gruppe der Rapamycin-Weibchen war die Färbung deutlich geringer ausgeprägt bzw. gar nicht vorhanden, was einen Hinweis auf eine Störung der Endothelfunktion liefert.

Neben der Quantifizierung der Fibrose wurde mittels der Genexpressionsanalyse von Kollagen Typ I u. Typ III die ECM auch auf ihre qualitative Zusammensetzung hin untersucht (Abb. 3.16). Kollagene bilden mengenmäßig den größten Teil der ECM und sorgen für die strukturelle Integrität des Herzens [109]. Von den mehr als 20 bekannten Kollagentypen bilden Kollagen I u. III die Hauptkomponenten des kardialen Interstitiums, wo sie die Kardiomyozyten umgeben und zu mechanischen Einheiten verbinden [122]. Mit 85% bildet Typ I Kollagen einen weitaus größeren Anteil der ECM als der Typ III mit 11% [122]. Die restlichen 4% der ECM entfallen auf Kollagen vom Typ IV, Laminin, Proteoglykane und Glykosaminglykane und sind strukturell von untergeordneter Bedeutung [108]. Strukturell und mechanisch unterscheiden sich Kollagen Typ I u. III in ihren Eigenschaften. Der Typ I bildet dicke, kräftige Fibrillen aus, die sich durch eine sehr starke Zugfestigkeit auszeichnen und den Geweben ihre Formstabilität verleihen [123]. Die Fibrillen des Kollagen Typ III hingegen sind deutlich dünner und organisieren sich zu einem feinen retikulären Netzwerk mit hoher Elastizität [123]. Die Akkumulation von Kollagenen in der kardialen ECM führt direkt zu einer veränderten Herzgeometrie, die über eine erhöhte Steifigkeit der Herzwände und eingeschränkter Kontraktilität zu einer konsekutiven Störung der Herzfunktion führen kann [124].

Die Auswertung der Genexpression steht im Einklang mit den Ergebnissen der Sirius-Red Färbung. Allgemein konnte unter DOCA-Salz bei beiden Geschlechtern ein Anstieg der Genexpression von Kollagen I u. III beobachtet werden. Analog zur Sirius-Red Färbung zeigte sich hierbei ein geschlechtsspezifischer Einfluss des Rapamycins. Die männlichen Versuchstiere exprimierten unter DOCA-Salz und Rapamycin weniger Kollagen-mRNA als ihre Vehikel-Kontrollgruppe. Bei den Weibchen hingegen wurde auch ohne den pathologischen DOCA-Salz Stimulus ein signifikanter Anstieg der Genexpression von Kollagen I u. III unter Rapamycin beobachtet. Da die Signalerhöhungen in der Sirius-Red Färbung vergleichbare Verhältnisse des Rapamycineinflusses zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die mRNA-Erhöhungen auch mit einer vermehrten Kollagensynthese einhergingen. Dies unterstreicht die Rolle der beiden Kollagentypen I u. III an der Ausbildung der kardialen Fibrose und den nachteiligen Effekt des Rapamycins für die weiblichen Versuchstiere im Bezug auf das fibrotische Remodeling unter DOCA-Salz. Neben der Kollagenmenge in der ECM spielt jedoch auch das Verhältnis der beiden Isoformen Typ I u. III eine Rolle für die Herzgeometrie. Der Quotient aus Kollagen I/III kann dabei als Maß für die relative Steifigkeit des Myokardgewebes angesehen werden, wobei eine relative Erhöhung zu Gunsten von Kollagen Typ III für ein vermehrt dehnbares Gewebe steht [122]. Bei den männlichen Versuchstieren konnten keine Veränderungen im Verhältnis der mRNA-Mengen beider Kollagenisoformen durch die Rapamycinintervention festgestellt werden (Quotienten nicht dargestellt). Auch die Weibchen der Vehikelgruppen wiesen einen den Männchen vergleichbaren Kollagen I/III-Quotienten

auf. Lediglich die Weibchen mit Rapamycin-Intervention präsentierten leicht kleinere Quotienten (Ergebnisse nicht dargestellt). Auch wenn die Unterschiede sehr gering und nicht signifikant waren, so konnte bei den Weibchen unter Rapamycin also eine leichte Tendenz zu einer relativen Erhöhung der Kollagen III-Transkripte beobachtet werden. In dieser Tatsache könnte begründet sein, warum die Weibchen mit Rapamycin-Intervention als einzige Versuchsgruppe unter DOCA-Salz eine Dilatation der Ventrikel entwickelten. Ähnliche Verhältnisse konnten auch schon bei Untersuchungen über die Rolle des ER β in der weiblichen Kardioprotektion beobachtet werden, bei denen ER β -defiziente Weibchen ebenfalls mit einer Ventrikeldilatation und relativer Erhöhung der Kollagen III-Transkription reagierten [85, 111]. Eine funktionelle Verbindung zwischen dem ER β und dem mTOR-Signalweg könnte also vermutet werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass allein durch die Analyse der Genexpression nicht sicher auf das tatsächliche Verhältnis der beiden Kollagenisoformen in der ECM geschlossen werden kann. Konsequenterweise müssten dafür auch proteinbiochemische Methoden zur exakteren Bestimmung des Proteingehaltes an Kollagen I u. III durchgeführt werden. Darüber hinaus bieten sich auch Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung der profibrotischen TGF- β -Kaskade oder fibroblastischer Markerproteine wie Vimentin und S100A4 für die exaktere Charakterisierung der Fibrose an.

Für die Beurteilung des kardialen Remodelings sind nicht nur molekularbiologische Veränderungen in der Aktivierung von Signalwegen in Kardiomyzyten und Fibroblasten entscheidend. Von großer Wichtigkeit sind ebenso strukturelle und morphologische Veränderungen der Herzgeometrie, da mit ihnen das Risiko für eine kardiale Dysfunktion und damit einhergehend das Mortalitätsrisiko steigt. Es kann zusammengefasst werden, dass die männlichen Versuchstiere vom Rapamycineinfluss profitierten. Rapamycin führte unter DOCA-Salz verglichen mit den Vehikel-Kontrollen zu einer Abschwächung sowohl der MH als auch der Fibrose und zur Ausprägung der prognostisch günstigeren konzentrischen Hypertrophieform. Die weiblichen Rapamycin-Tiere hingegen entwickelten eine deutlich ausgeprägtere Fibrose als ihre Vehikel-Kontrollgruppen. Unter DOCA-Salz zeigten diese Tiere eine deutlich stärkere MH als unter Placebo und präsentierten einen prognostisch ungünstigen, dilatativen Phänotypen. Funktionell konnte ein beginnender Verlust der Pumpleistung beobachtet werden, was bei längerer Versuchsdauer in eine kardiale Dysfunktion übergehen könnte. Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass ein intakter mTOR-Signalweg eine wichtige Rolle für die weibliche Kardioprotektion spielt. Weiterhin sind Unterschiede in der mTOR-Aktivierung zwischen den Geschlechtern denkbar, welche die Unterschiede im Effekt der Rapamycin-Intervention begründen könnten. Eine ausführlichere Analyse der mTOR-Aktivierung folgt in den nächsten Kapiteln.

4.5 Die kardiale Signaltransduktion

4.5.1 Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Der wesentliche Vorgang bei der MH ist die Zunahme der Herzmasse über die Vergrößerung individueller Kardiomyozyten. Dies betrifft als gemeinsames Merkmal sowohl die physiologische als auch die pathologische Form. Während die physiologische MH ohne nachteilige strukturelle Veränderungen des Herzgewebes sowie mit einer normalen bis verbesserten Herzfunktion einhergeht, so ist die pathologische Form durch die Ausbildung einer Fibrose und einer kardialen Dysfunktion gekennzeichnet. Da Kardiomyozyten postmitotische Zellen sind, kann eine Vergrößerung des Herzmuskels nur über eine zelluläre Hypertrophie individueller Kardiomyozyten realisiert werden. Hierfür ist die Steigerung der intrazellulären Proteinsynthese notwendig, was über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg reguliert wird. Die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges erfolgt typischerweise über die Bindung von IGF-1 und anderer Wachstumsfaktoren an RTKs wie dem IGF-1-Rezeptor. IGF-1 steuert in der individuellen Wachstumsphase die Organgröße und wird ebenso in der Folge von Ausdauertraining vermehrt synthetisiert und freigesetzt [125]. Die Beteiligung des IGF-1-Rezeptors an der Vermittlung der physiologischen MH ist bereits umfangreich beschrieben [44, 46]. Die zentrale und namensgebende Kinase dieses Signalweges ist das mTOR-Molekül, welches in Abhängigkeit von den mit ihm assoziierten Proteinen zwei unterschiedliche Komplexe bildet: mTORC1 und mTORC2. In Verbindung mit dem strukturbildenden Protein Raptor bildet mTOR den mTORC1. Dessen Aktivierung erfolgt durch AKT, die wiederum PI3K-abhängig durch Phosphorylierung an Thr308 stimuliert wird. Zu den Funktionen von mTORC1 zählen unter anderem die Hemmung der Autophagie sowie die Initiation der Proteinsynthese durch die Aktivierung entsprechender Kinasen [126, 127]. Ein direktes Zielprotein ist die p70S6-Kinase, weshalb anhand ihres Phosphorylierungsgrades auf die mTORC1-Aktivität geschlossen werden kann. Das Wissen über die mTORC2 vermittelten Mechanismen ist bisweilen begrenzt. Eine bedeutende Funktion von mTORC2 scheint die Phosphorylierung von AKT an der AS Ser473 zu sein, wodurch die Aktivität von AKT gesteigert und das Spektrum der Substrate erweitert wird [48, 60]. Über diesen Mechanismus werden dem mTORC2 anti-apoptotische sowie proliferative Effekte zugeschrieben. In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass AKT eine zentrale Schnittstelle im mTOR-Signaling ist und gleichzeitig die Rolle eines Regulators und Effektormoleküls einnimmt. Wie bereits im Kapitel 1.5.2 beschrieben, ist AKT essenziell für die Vermittlung der physiologischen MH.

Zur Quantifizierung der mTORC1-Aktivität wurde der Phosphorylierungsstatus der p70S6-Kinase bestimmt (siehe Abb. 3.18). Rapamycin blockierte als mTORC1-Inhibitor in beiden Geschlechtern erwartungsgemäß die Phosphorylierung der p70S6-Kinase, was im Umkehrschluss den ausreichenden Effekt der durchgeführten Rapamycin-Intervention bestätigt. Bei den Vehikel-Tieren

konnte im Grundzustand eine leicht höhere mTORC1-Grundaktivität der Weibchen im Vergleich zu den Männchen beobachtet werden. Die DOCA-Salz Behandlung führte bei den Männchen ohne den Rapamycin-Einfluss zu einer Erhöhung der Phosphorylierung der p70S6-Kinase, wohingegen diese bei den Weibchen unverändert blieb. Die Quantifizierung der mTORC2-Aktivität erfolgte anhand des Phosphorylierungsstatus von AKT an Ser473 (siehe Abb. 3.19). Die Weibchen zeigten ohne den Rapamycin-Einfluss im Gegensatz zu den Männchen eine hohe konsekutive mTORC2-Aktivität. Rapamycin blockierte bei den weiblichen Versuchstieren sowohl mTORC1 als auch mTORC2. Bei den Männchen hingegen, die als Ausgangswert eine niedrige konsekutive AKT-Phosphorylierung an Ser473 aufwiesen, wurde infolge der Rapamycin-Intervention ein Anstieg der mTORC2-Aktivität beobachtet.

Die herausragende Erkenntnis der vorliegenden Studie ist die Tatsache, dass eine mTOR-Blockade mit Rapamycin unter normotensiven Bedingungen zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der kardialen Anpassungsreaktion auf den DOCA-Salz Stimulus führt. Auf funktioneller und morphologischer Ebene profitierten nur die männlichen Versuchstiere von der Rapamycin-Intervention. Es konnte eine Abmilderung der MH und Fibrose bei diesen Tieren beobachtet werden, die auf molekularer Ebene mit einer Erniedrigung der mTORC1-Aktivität bei gleichzeitiger Aktivitätserhöhung des mTORC2 einherging. Im Kontrast dazu reagierten die weiblichen Versuchstiere auf den Rapamycin-Einfluss mit der Ausbildung einer maladaptiven MH, die durch eine Erniedrigung sowohl der mTORC1- als auch mTORC2-Aktivität gekennzeichnet war. Die Ergebnisse aus den Studien an den männlichen Mäusen der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen. Ebenfalls in männlichen Mäusen konnte durch die Applikation von Rapamycin die Ausbildung einer druckinduzierten MH abgemildert bzw. sogar eine bereits manifestierte MH wieder reduziert werden [80, 81]. Auch in der Situation einer urämischen Kardiomyopathie vermittelt Rapamycin vergleichbar positive Effekte [128]. Diese Beobachtungen bleiben jedoch nicht nur auf den Tierversuch beschränkt. Auch in der klinischen Situation konnte durch die Behandlung von herztransplantierten Patienten mit Sirolimus, dem klinisch verwendeten Rapamycin-Derivat, eine Verbesserung im Bezug auf das linksventrikuläre Remodeling und der kardialen Funktion erreicht werden [82]. Rapamycin gilt als selektiver mTORC1-Inhibitor, weshalb die Autoren dieser Studien die Abmilderung der MH über die Blockierung der mTORC1-vermittelten Proteinsynthese erklärten. Vermutlich führt die Bindung von Rapamycin an den mTORC1 zu einer Störung der strukturellen Integrität des Komplexes und führt zu einer verminderten Kinaseaktivität [71]. Untersuchungen zur Funktionalität des mTORC2 wurden in diesen Studien leider nicht durchgeführt. Auch im vorliegenden Versuch konnte gemessen an der Phosphorylierung der p70S6-Kinase eine deutliche Erniedrigung der mTORC1-Aktivität durch die Rapamycin-Intervention induziert werden. Bei den männlichen Versuchstieren ging diese mit einer verstärkten Phosphorylierung von AKT an Ser473 einher, was für eine Zunahme der mTORC2-Aktivität spricht. Übereinstimmende Beobachtungen wurden bereits zuvor an den selben Mäusen wie im vorliegenden Versuch gemacht, wenn auch in einem anderen Modell der Herzhypertrophie.

Die Tiere besaßen eine herzspezifische Deletion des Raptor-Gens [129]. Ein intaktes Raptor-Protein ist entscheidend für die mTORC1-Aktivität, da beim Fehlen von Raptor eine funktionelle Komplexbildung des mTORC1 nicht möglich ist. Nach der Induzierung des „knock outs“ waren diese Mäuse nicht mehr in der Lage eine hypertrophe kardiale Adaption in der Folge einer Druckbelastung zu entwickeln. Entscheidend in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass auch diese Mäuse auf die Blockierung des mTORC1 mit einem Anstieg der mTORC2-Aktivität reagierten [129]. Auch in einem Mausmodell mit Verengung des pulmonalen Ausflusstraktes konnte unter der Applikation von Rapamycin eine Aktivitätssteigerung des mTORC2 beobachtet werden [130]. Eine mögliche Erklärung der mTORC2-Aktivierung unter Rapamycin könnte die Hemmung von mTORC1-vermittelten negativen Feedback-Mechanismen sein, wie sie auch in der Krebstherapie eine Rolle spielen [131]. Normalerweise führt eine Aktivierung des mTORC1 über einen negativen Feedbackmechanismus zur Hemmung der PI3K-abhängigen AKT-Phosphorylierung, was wiederum einen regulativen Einfluss auf mTORC2 hat [132]. Einen weiteren direkten, regulativen Einfluss hat mTORC1 auf die mTORC2-Aktivität über die p70S6-Kinase. Aktiviert durch mTORC1 ist diese in der Lage Rictor zu phosphorylieren [132]. Durch diese Konformationsänderung verliert Rictor die Eigenschaft an mTOR zu binden und macht dadurch eine funktionelle Komplexbildung des mTORC2 unmöglich. Durch den Einfluss von Rapamycin und die damit einhergehende mTORC1-Blockierung entfallen diese hemmenden Signale, was die Aktivitätssteigerung des mTORC2 in unseren männlichen Versuchstieren erklären kann. Einen Überblick über die negativen Feedback-Mechanismen des mTORC1 gibt die Abb. 4.1. Alle im laufenden Kapitel genannten Studien konzentrierten sich jedoch nicht auf geschlechtsspezifische Unterschiede einer Behandlung mit Rapamycin. Die genannten Tierstudien wurden allesamt an männlichen Versuchstieren durchgeführt. Der Effekt von Rapamycin auf das weibliche Geschlecht und dessen mTORC2-Aktivierung sind in diesem Zusammenhang nicht untersucht worden. Belibi et al. konnten jedoch unter einer anderen Fragestellung Ratten in einem Modell der polyzystischen Nierenerkrankung geschlechtsspezifische Unterschiede im Effekt einer Rapamycinbehandlung beobachten [133]. Analog zur vorliegenden Arbeit wurden in der genannten Studie protektive Effekte des Rapamycins nur bei den männlichen Versuchstieren beobachtet. Die Zystengröße blieb in weiblichen Mäusen von der Rapamycin-Behandlung unbeeinflusst [133]. Im Kontrast zu unseren Ergebnissen blockierte Rapamycin jedoch in den Nieren der männlichen Versuchstiere dieser Studie auch die mTORC2-Aktivität, wohingegen bei den Weibchen keine mTORC2-Inhibition beobachtet wurde. Allerdings wurden in der genannten Studie deutlich höhere Rapamycindosen verwendet, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Die Erkenntnis des vorliegenden Versuches, dass relativ niedrige Konzentrationen von Rapamycin in weiblichen Mäusen mit einer Inhibition sowohl von mTORC1 als auch mTORC2 einhergeht ist neu und bislang nicht beschrieben worden. Auch die Tatsache, dass eine Rapamycin-Behandlung im Kontext des normotensiven DOCA-Salz Modells zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der kardialen Adaptation führt, ist bislang noch nicht beschrieben worden. Übereinstimmend zu anderen Untersuchungen wird jedoch deutlich, dass Rapamycin als selektiver mTORC1-Inhibitor zu einer effektiven Blockierung des mTORC1 führt. Über die Hemmung der Proteinbiosynthese und

der Zellproliferation konnte zumindest in den männlichen Versuchsgruppen eine Reduzierung der MH und der kardialen Fibrose beobachtet werden. Die Wirkung von Rapamycin auf den mTORC2 bleibt jedoch kontrovers diskutiert. Auch wenn Rapamycin pharmakodynamisch als selektiver Inhibitor des mTORC1 gilt, so konnte beobachtet werden, dass sowohl eine lange Therapiedauer [73] als auch eine hohe Dosierung [134] zu einer Beeinflussung der mTORC2-Aktivität führen kann. In der vorliegenden Studie wurden bewusst niedrige Dosierungen gewählt, die mit Serumspiegeln um 4ng/ml in etwa der klinischen Situation einer Langzeitimmunsuppression mit einem mTOR-Inhibitor entsprechen. Damit werden konzentrationsbedingte Einflüsse von Rapamycin auf die mTORC2-Aktivität relativ unwahrscheinlich. Ein Einfluss von geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Pharmakokinetik konnte durch die Messung der Rapamycin-Serumspiegel ebenfalls ausgeschlossen werden, da beide Geschlechter gleiche systemische Konzentrationen aufwiesen (siehe Abb. 3.8).

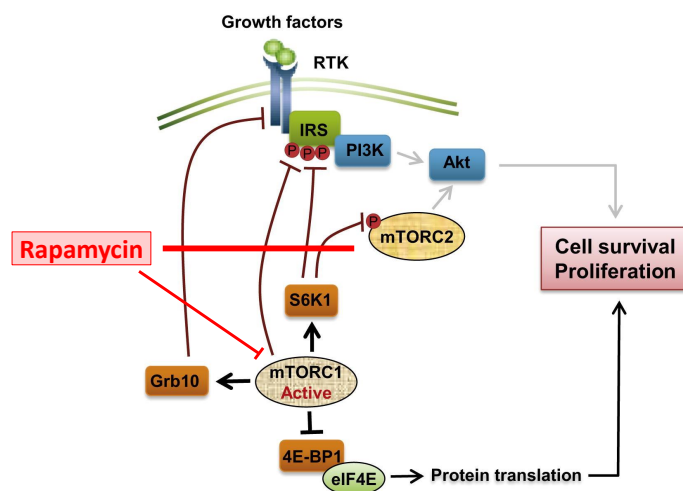


Abb. 4.1 Negative Feedback-Mechanismen des mTORC1 (modifiziert nach [132])

Die beiden mTOR-Komplexe mTORC1 und mTORC2 nehmen eine Schlüsselrolle in der Regulation der Protein- u. Lipidsynthese, der Mitochondrienfunktion, des Energiehaushaltes und Zellüberlebens ein [48]. Neben der bereits erwähnten Aktivierung des mTORC1 unter dem Einfluss von Stimuli der physiologischen MH wurde auch eine Steigerung der mTORC1-Aktivität unter dem Einfluss von Stimuli beschrieben, die eine maladaptive MH vermitteln. Es ist bekannt, dass Katecholamine [135] und auch Ang II [136], beides Vermittler der pathologischen MH, zu einem erhöhten mTORC1-Aktivitätsniveau führen können. Im Gegensatz zur physiologischen MH findet die mTORC1 Aktivierung unter pathologischen Bedingungen nicht über AKT, sondern unter Beteiligung des ERK-Signalweges statt [137]. Weiterhin münden auch biomechanische Stimuli in eine gesteigerte mTORC1-Aktivität, sodass der Komplex mechanische, biochemische und metabolische Signale vereint und in der Vermittlung der druckinduzierten MH eine tragende Rolle spielt [118].

Vor diesem Hintergrund kann erklärt werden, dass bei den männlichen Versuchstieren ein aktivierter mTORC1 unter DOCA-Salz und Vehikel mit einer maladaptiven, konzentrischen MH assoziiert war. Die Zunahme der Hypertrophie unter DOCA-Salz bei den Männchen war im Gegensatz zu den Weibchen mit einer erkennbaren mTORC1-Aktivitätserhöhung vergesellschaftet. Dieser Umstand war mit niedrigen mTORC2-Aktivitäten bei den Männchen kombiniert. Im Gegensatz zu den Männchen wiesen die Weibchen der Vehikelgruppen hohe konsekutive Aktivitäten von sowohl mTORC1 als auch mTORC2 auf. In Anbetracht der Tatsache, dass die Weibchen unter Placebo und DOCA-Salz eine deutlich mildere MH entwickelten als ihre männliche Vergleichsgruppe, könnte vermutet werden, dass die hohe Grundaktivität beider mTOR-Komplexe eine wesentliche Rolle in der relativen weiblichen Kardioprotektion spielt. Beide Komplexe sind „downstream“-Signale der PI3K vermittelten Signaltransduktion, die als Vermittler der adaptiven MH gilt. Ein Erklärungsansatz bietet die Lokalisation von AKT. Bei weiblichen Mäusen im gebärfähigen Alter konnte im Vergleich zu altersentsprechenden Männchen eine vermehrt nukleäre Lokalisation der Kinase nachgewiesen werden [138]. Daraus erwuchs die Annahme, dass eine nukleäre Lokalisation von AKT ein entscheidender Mechanismus in der Vermittlung der weiblichen kardiovaskulären Protektion sein könnte [138]. Die Voraussetzung für ein im Zellkern befindliches AKT ist dessen volle Kinaseaktivität, also sowohl die PI3K-abhängige Phosphorylierung an Thr308 als auch die mTORC2-abhängige Phosphorylierung an Ser472 [139, 140]. Die weiblichen Versuchstiere der Vehikelgruppen waren die einzige Versuchsgruppe der vorliegenden Studie mit hoher konsekutiver Aktivität von sowohl mTORC1 als auch mTORC2. Dadurch wird die Annahme, dass die volle Kinaseaktivität von AKT wichtig für die relative weibliche Kardioprotektion ist, nochmalig bekräftigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, dass die pharmakologische Blockade von mTOR mit Rapamycin mit den protektiven Mechanismen der weiblichen Mäuse interferiert und diese störend beeinflusst. Insbesondere eine hohe mTORC2-Aktivität scheint einen positiven Einfluss auf die kardiale Adaptation unter DOCA-Salz zu besitzen, da auch bei männlichen Mäusen die Abmilderung der MH unter Rapamycin mit einer Erhöhung der mTORC2-Aktivität assoziiert ist. Neben der Reduzierung der Proteinbiosynthese durch die Rapamycin vermittelte mTORC1-Blockade könnten demnach auch mTORC2 vermittelte Mechanismen für den positiven Rapamycineffekt in den männlichen Versuchsgruppen eine Rolle spielen. Da jedoch zu wenig über die mTORC2-Regulation bekannt ist, kann man über den Einfluss von Rapamycin auf den mTORC2 zum jetzigen Zeitpunkt nur spekulieren. Bekannt ist, dass der mTORC2 über die Aktivierung von PKC α das Aktin-Zytoskelett verändert und somit Einfluss auf die Zellform u. -funktion nimmt [48]. Ein intaktes Aktin-Zytoskelett ist für die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten essentiell. In einer Studie an Ratten konnte durch Shende et al. gezeigt werden, dass die Aufrechterhaltung der Kontraktilität von Kardiomyozyten unter einer Druckbelastung von einer intakten mTORC2-Signaltransduktion abhängig ist [141]. Das funktionelle Ausschalten des mTORC2 ging bei diesen Tieren mit einer signifikanten Reduktion der EF und einem dilatativen Kardiophänotypen einher. Neben der Beeinflussung der Kontraktilität nimmt der mTORC2 auch Einfluss auf den Zellmetabolismus und die Energiebereitstellung, was die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen unter Stress

ebenfalls positiv beeinflusst [142]. Weiterhin nimmt der mTORC2 über die Phosphorylierung der SGK1 Einfluss auf den Zellzyklus. Über die Inaktivierung des pro-apoptotischen Moleküls „forkhead box O1/3a (FoxO1/3a)“ geht eine hohe mTORC2-Aktivität mit einer verminderten Apoptose-Rate einher. In Kombination mit einer effizienten Energiebereitstellung wird also das Zellüberleben positiv beeinflusst. Im Rahmen von pathologischen Stresssituationen ist der mTORC2 also in der Lage, einen positiven Einfluss auf das Überleben der Kardiomyozyten zu nehmen, was letztendlich auch das kardiale Remodeling positiv beeinflussen kann. In der Zukunft könnten weitere Studien den Fokus vermehrt auf die isolierte Betrachtung der beiden mTOR-Komplexe legen und sowohl „upstream“ als auch „downstream“-Proteine beider Komplexe im Zusammenhang mit dem DOCA-Salz Modell untersuchen.

4.5.2 Der ERK1/2- u. p38- Signalweg

Die beiden Signalproteine p38 und ERK1/2 gehören zur Gruppe eines komplexen Netzwerks von Signaltransduktionskaskaden, die unter dem Begriff mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) zusammengefasst werden. Es handelt sich um dreifach abgestufte, kanonische Signalwege, die aufgrund ihrer mannigfaltigen Aktivierungsmöglichkeiten eine zentrale Rolle für die Zellentwicklung, das Zellüberleben sowie für die Stressantwort einnehmen. Eine Gruppe der Effektormoleküle, die über die MAPK-Signalkaskaden aktiviert werden, sind die so genannten extracellular signal-regulated kinases (ERKs). Die zwei Vertreter dieser Gruppe ERK1 und ERK2 sind zwei strukturähnliche Kinasen mit einer Homologie von 83%, die zu einem Großteil ebenfalls identische biologische Funktionen ausführen. Deshalb werden sie funktionell zu einem Enzym ERK1/2 zusammengefasst oder aufgrund ihrer Größe von 44 bzw. 42 kiloDalton (kDa) auch als p44/42MAPK bezeichnet. Die Aktivierung von ERK1/2 erfolgt durch die doppelte Phosphorylierung der Aminosäuren Threonin 202 und Tyrosin 204 (Thr202/Tyr204) innerhalb der Proteinsequenz und wird in erster Linie durch das Einwirken von Wachstumsfaktoren vermittelt [143].

Der ERK1/2-Signalweg ist von genereller Bedeutung für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung, spielt aber auch eine wichtige Rolle für weitere zelluläre Prozesse wie die Apoptose und die Stressantwort. Schon im Jahre 1995 konnte ein Einfluss der ERK-Kaskade auf die Genexpression unter hypertrophen Stimuli nachgewiesen werden [144]. Später konnte auch im Tierversuch an Mäusen gezeigt werden, dass eine chronische ERK1/2-Aktivierung zu einer kompensierten, konzentrischen Hypertrophie des Herzens mit gesteigerter Pumpfunktion führt [145]. Mechanistisch besteht eine direkte Verbindung zwischen ERK1/2 und der Cn/NFAT-Signalkaskade, die für die Expression von Hypertrophie-vermittelnden Genen verantwortlich ist [146]. In späteren Versuchen konnte auch *in vivo* bestätigt werden, dass die ERK1/2-induzierte Hypertrophie von der Cn/NFAT-Aktivität abhängig ist [147]. In unserer Studie wiesen die Männchen und Weibchen konsekutiv

vergleichbare ERK1/2-Aktivitäten auf. Unterschiede ergaben sich zwischen den Interventionsgruppen. Während bei den Männchen der Einfluss des Rapamycins zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung von ERK1/2 führte, so konnte bei den Weibchen unter Rapamycin ein signifikanter Abfall der ERK1/2-Aktivität im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen gemessen werden (siehe Abb. 3.20). Zunächst unterstreicht diese Beobachtung die zentrale Hypothese dieser Arbeit, dass die kardiale Anpassungsreaktion unter dem DOCA-Salz-Stimulus zwischen den Geschlechtern unterschiedlichen Regulierungsmechanismen unterliegt. Eine genaue Interpretation dieser Ergebnisse ist aufgrund der vielen Zielmoleküle von ERK1/2 schwierig und zu dem nicht Gegenstand dieser Arbeit. Von entscheidender Bedeutung für den kardialen Phänotypen ist zudem nicht allein die Kinaseaktivität von ERK1/2, sondern auch dessen subzelluläre Lokalisation.

Lorenz et al. konnten in einer Arbeit eine Autophosphorylierung von ERK1/2 an der Stelle Thr188 beobachten, wenn ERK1/2 eine Interaktion mit einem G_q-Protein eingeht [148]. Diese führte ohne die Kinaseaktivität an sich zu beeinflussen zu einer Translokation von ERK1/2 in den Zellkern, wodurch Hypertrophie assoziierte Gene aktiviert werden können. Wie schon erwähnt, führt die alleinige Aktivierung von ERK1/2 zu einer kompensierten MH mit Steigerung der Pumpleistung und ohne pathologische Beeinträchtigungen [145]. Bei Lorenz et al. reagierten transgene Mäuse mit einer Mutation an der Thr188-Phosphorylierungsstelle von ERK1/2 auf eine Drucküberladung mit der Ausbildung einer starken MH mit kontraktile Dysfunktion. Gleichzeitig konnte eine Translokation vom ERK1/2-Molekül nach intranukleär nachgewiesen werden. Demnach scheint die nukleäre Lokalisation von ERK1/2 einen negativen Einfluss auf die kardiale Adaptation auf eine Druckbelastung auszuüben und die Ausbildung einer dekompenzierten MH zu begünstigen. Anhand von spezifischen Antikörpern gegen Phospho-ERK1/2 konnte in der vorliegenden Studie die subzelluläre Lokalisation des Proteins mit Hilfe von immunhistochemischen Färbemethoden sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 3.21). Bezüglich der Lokalisation von p-ERK1/2 zeigten sich Geschlechtsunterschiede. Bei den Vehikel-Gruppen wiesen die männlichen Tiere eine überwiegend nukleäre Lokalisation des Proteins auf, wohingegen die p-ERK1/2 bei den Weibchen eher zytosolisch lokalisiert war. Durch die Rapamycin-Intervention kehrten sich die Verhältnisse um. Männliche Tiere zeigten unter Rapamycin nun eine zytosolische Lokalisation von pERK1/2. Bei den Weibchen verlagerte sich die Lokalisation des Proteins nach intranukleär. Unter morphologischen Aspekten war die Verlagerung von p-ERK1/2 in den Zellkern bei den Weibchen mit der Ausbildung eines dilatativen Kardiophänotypen vergesellschaftet, der mit einem verstärkten fibrotischen Umbau die Kriterien einer maladaptiven MH erfüllt. Unter Applikation der Vehikel-Substanz entwickelten die Weibchen die am geringsten ausgeprägte MH aller Versuchsgruppen. Die zytosolische Lokalisation von pERK1/2 war bei diesen Tieren mit einer konzentrischen Morphologie und geringer Fibrose verbunden. Auch bei den Männchen war die zytosolische Lokalisation der pERK1/2, die hier allerdings in den Rapamycin-Gruppen nachgewiesen wurde, mit einer Abschwächung der hypertrophen kardialen Adaptation unter DOCA-Salz verbunden. Die Ergebnisse der Immunhistologie sind also

mit dem von Lorenz et al. beschriebenen Mechanismus in Einklang zu bringen, wonach eine nukleäre Translokation von pERK1/2 zu einer maladaptiven MH führt. Umgekehrt kann die zytosolische Lokalisation des Proteins als möglicher Mechanismus einer relativen Kardioprotektion angesehen werden. Es wird deutlich, dass zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren Unterschiede in der Signaltransduktion zu bestehen scheinen und das Zusammenspiel mit anderen Signalwegen eine große Rolle spielt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass unabhängig von der Behandlung bereits basal zwischen den Geschlechtern eine unterschiedliche Regulation der an der MH beteiligten Signaltransduktionswege besteht. In einer vorangegangenen Studie im gleichen Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass die MH unter DOCA+Salz bei den Männchen eher über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade vermittelt wird [112]. Die Weibchen zeigten in der genannten Arbeit signifikant niedrigere Aktivitäten der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade. In der vorliegenden Arbeit wiesen die Männchen der Vehikel-Kontrollgruppe vorwiegend eine nukleäre Lokalisation von ERK auf. Durch intranukleär lokalisiertes ERK kann aktiviertes Calcineurin im Zellkern akkumuliert werden, wodurch letztendlich NFAT dephosphoryliert wird und als Transkriptionsfaktor die Genexpression prohypertropher Gene regulieren kann. Die erhaltenen Ergebnisse könnten also eine mögliche Erklärung für die stärkere Ausprägung der MH unter DOCA-Salz bei männlichen Mäusen liefern.

Die p38 ist eine andere MAPK, die im Gegensatz zu ERK1/2 eher einen antihypertrophen Effekt besitzt. Durch die Phosphorylierung von NFAT ist sie in der Lage, dessen Translokation in den Zellkern zu verhindern und so die Aktivität von NFAT als prohypertrophen Transkriptionsfaktor herabzusetzen [149] (siehe auch Kap.1.5.1). Die p38-MAPK dient somit als Negativ-Regulator des pro-hypertrophen Cn/NFAT-Signalweges. Über den Phosphorylierungsstatus konnte die Aktivität der p38 mittels Western-Blot untersucht werden (siehe Abb.3.22). Sowohl männliche als auch weibliche Versuchstiere wiesen konsekutiv vergleichbare Aktivitäten der p38 auf. Durch die Rapamycin-Intervention konnte bei den Männchen ein signifikanter Anstieg des Phosphorylierungsgrades der p38 verzeichnet werden, wohingegen es bei den Weibchen zu einem Abfall kam. Ohne die eingehende Untersuchung des Cn/NFAT-Signalweges bleibt eine Interpretation dieser Ergebnisse rein spekulativ. Letztendlich ergeben sich jedoch Hinweise darauf, dass durch die mTOR-Inhibition mit Rapamycin in den männlichen Versuchsgruppen protektive Signalwege in Gang gesetzt werden, die eine mögliche MH abmildern. In der Auswertung der Herzmorphologie konnte dies auch in den Ergebnissen der vorliegenden Studie nachvollzogen werden. Bei den Weibchen scheinen diese protektiven Mechanismen durch die Rapamycin-Intervention eher negativ beeinflusst zu werden, was sich in der Ausbildung einer maladaptiven MH widerspiegelt.

4.5.3 Der Einfluss von Östrogen auf den mTOR-Signalweg

Die Östrogene bilden die Familie der weiblichen Sexualhormone. Das Östradiol (E2) ist das potenteste und wichtigste Mitglied der Östrogene [150]. Als Vertreter der Steroidhormone sind Östrogene in der Lage als Transkriptionsfaktoren zu wirken und die Genexpression zu regulieren. Sie vermitteln ihre Effekte auf genomischer Ebene mit einer Verzögerung von wenigen Stunden [151, 152]. Detektiert wird E2 über intrazellulär lokalisierte Rezeptoren, von denen der ER α und ER β die am besten untersuchten Vertreter darstellen und zur Familie der nukleären Rezeptoren gezählt werden [153]. Bei beiden Rezeptoren handelt es sich jedoch nicht um Isoformen, sondern vielmehr unterschiedliche Proteine mit separaten Genloci [150]. Dennoch besitzen ihre Domänen eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit [153]. Es gibt Hinweise darauf, dass Östrogene neben ihren genomischen Effekten zusätzlich in der Lage sind intrazelluläre Signalwege direkt zu beeinflussen [154]. Diese beiden Varianten der Signaltransduktionen scheinen unabhängig voneinander abzufließen [150]. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Tatsache, dass von beiden Rezeptorsubtypen verschiedene Splicevarianten existieren [153]. Östrogenrezeptoren werden von einer Vielzahl an Geweben im menschlichen Organismus exprimiert. Neben seiner Rolle als Sexualhormon wurden zahlreiche weitere biologische Effekte der Östrogene auf das kardiovaskuläre, immunologische oder Nervensystem sowie auf den Bewegungsapparat beschrieben [153]. Auch Kardiomyozyten besitzen funktionelle Formen der beiden ER-Subtypen [155]. Der ER α ist überwiegend nukleär lokalisiert, während der ER β überwiegend zytoplasmatisch bzw. perinukleär zu finden ist [156]. Dem Östrogen werden kardioprotektive Eigenschaften zugeschrieben. Im Hinblick auf die MH konnte im Tiermodell ein antihypertropher Effekt von E2 vermittelt durch den ER β nachgewiesen werden [157]. In einer klinischen Studie konnte bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eine ER α abhängige Abmilderung der Progredienz der Erkrankung in eine HI beobachtet werden [158]. Die zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen des antihypertropen Effekts der Östrogene ist noch nicht vollends erforscht. Es ist bekannt, dass sowohl der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg als auch die MAPK durch E2 aktiviert werden können [14, 159]. Durch die Interaktion von PI3K mit E2 ist ebenfalls eine Aktivierung von ERK1/2 möglich [151]. Im Gegenzug scheinen jedoch aktiviertes ERK1/2 aber auch IGF1 in der Lage zu sein über eine Phosphorylierung von ER α eine ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung herbeizuführen [160, 161]. Auch im Herz von Mäusen werden die beiden Östrogenrezeptoren ER α und ER β exprimiert [162] und kommen daher für die Vermittlung dieser nicht-genomischen Effekte in Frage.

Das enge Zusammenspiel zwischen E2 und dem PI3K/AKT/mTOR - Signalweg bzw. deren gegenseitige Aktivierung scheint für die weibliche Kardioprotektion eine wichtige Rolle zu spielen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen darauf schließen, dass eine Intervention mit Rapamycin dieses Gleichgewicht stört und so einen negativen Einfluss auf die weibliche Kardioprotektion ausübt. Die weiblichen Tiere unserer Versuchsreihe reagierten auf die Rapamycin-Intervention mit einer verminderten Expression des ER β , was in direktem Zusammenhang zu dem beobachteten

maladaptiven Phänotypen in diesen Tieren stehen könnte (Kap.3.6.6). Die Expression des ER α blieb hingegen unverändert. Ein interessanter Fakt in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass in Zelllinien für das Mamma-Karzinom gezeigt werden konnte, dass die antiproliferativen Effekte von Rapamycin abhängig von einem intakten ER α -Signaling sind [163]. Über die Mechanismen des ER β -Signalings ist noch deutlich weniger bekannt als über jenes des ER α [164]. In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ER β -defiziente weibliche Mäuse unter DOCA-Salz ein maladaptives Remodeling mit stärkerer Fibrose und einen größeren Abfall der Herzfunktion entwickelten als ihre Wildtyp-Vergleichsgruppe. Interessanterweise konnte bei diesen Tieren keine erhöhte Aktivierung von maladaptiven Signalkaskaden, wie z.B. Calcineurin/NFAT verzeichnet werden [84, 85]. Lediglich bei den weiblichen Tieren ging die ER β -Depletion allerdings gleichzeitig mit einer Aktivitätsminderung sowohl des MTORC1 als auch des MTORC2 einher [165] und hatte damit genau die selben Effekte auf die mTOR-Aktivität, die wir auch in der vorliegenden Studie durch die Rapamycin-Intervention beobachten konnten. Einhergehend mit diesen vergleichbaren Effekten auf molekularer Ebene, konnte bei den weiblichen Versuchstieren beider Studien eine ähnliche Auswirkung der Interventionen auf den kardialen Phänotypen beobachtet werden. Sowohl der ER β -Knockout als auch die pharmakologische mTOR-Blockade mit Rapamycin ging bei den weiblichen Versuchstieren mit einer vermehrten kardialen Fibrose und einer Ventrikeldilatation verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe einher [85, 165]. Diese Beobachtung unterstreicht die Schlüsselrolle eines intakten Gleichgewichts zwischen den Signaltransduktionen von ER β , mTORC1 und mTORC2 für die intrinsische Kardioprotektion des weiblichen Geschlechts. Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen E2 und Rapamycin mit Einfluss auf die mTORC2-Aktivität lieferte eine Studie an weiblichen Kardiomyozyten [166]. In der genannten Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die mTORC2-Aktivität weiblicher Kardiomyozyten unter einer mTOR-Blockade mit Rapamycin und ohne Einfluss von E2 intakt ist. Erst unter Kostimulation mit E2 führte Rapamycin zu einer Blockade des mTORC2, wie sie auch im vorliegenden Versuch in den Herzen der weiblichen Mäuse unter Rapamycin zu beobachten war. Diese Beobachtung führt zur Annahme, dass Östrogene Einfluss auf die Sensitivität des mTORC2 gegenüber Rapamycin nehmen. Als Folge der mTORC2-Blockade durch Rapamycin und E2 verloren die weiblichen Kardiomyozyten der genannten Studie ihre Fähigkeit zur adaptiven Hypertrophie auf einen IGF1-Stimulus, wie er in der adaptiven MH eine Rolle spielt [166]. Interessanterweise führte die Kostimulation mit E2 und IGF-1 zu einem Anstieg der mTORC2-Aktivität in diesen Zellen [166]. Auch im vorliegenden Versuch konnten in den weiblichen Herzen der Vehikel-Gruppen eine hohe intrinsische mTORC2-Aktivität gemessen werden. Es liegt also die Vermutung nahe, dass die Mechanismen der weiblichen Kardioprotektion durch den mTORC2 vermittelt werden und dass der negative Effekt der Rapamycinbehandlung für die weiblichen Versuchstiere durch eine E2-vermittelte Sensitivitätsänderung des mTORC2 gegenüber Rapamycin begründet ist.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise darauf, dass eine pharmakologische mTOR-Inhibition mit Rapamycin im Kontext des renokardialen Syndroms zu geschlechtsspezifischen Unterschieden der kardialen Anpassungsreaktion führt. Unter den Bedingungen des normotensiven DOCA-Salz Modells der Maus konnte durch die Applikation von Rapamycin in männlichen Versuchsgruppen eine Abmilderung der Myokardhypertrophie und des kardialen Remodelings verzeichnet werden. Bei den Weibchen hingegen führte die Rapamycinintervention zu einer maladaptiven MH mit Ventrikeldilatation, gesteigerter Fibrose und tendenziell höheren Herzgewichten. Auf molekularer Ebene ging die mTOR-Blockade mit Rapamycin in den weiblichen Herzen mit einer Inhibition von sowohl mTORC1 als auch mTORC2 einher, während die Aktivität des mTORC2 bei den männlichen Versuchstieren nicht reduziert wurde. Ferner liefern die Ergebnisse der vorliegenden Studie Hinweise darauf, dass der Einfluss von Östrogen zu einer geschlechtsspezifischen Aktivierung der mTOR-Signaltransduktion führt. Eine Schlüsselrolle scheint dabei vor allem die unterschiedliche Aktivierung des mTORC2 zu spielen. Ein intaktes Gleichgewicht vom Östrogen- und mTOR-Signaling scheint für die weibliche Kardioprotektion von enormer Wichtigkeit zu sein.

Die vorliegende Studie bildet eine gängige Situation des klinischen Alltags ab. Viele Patienten werden nach einer Nierentransplantation zur immunsuppressiven Therapie mit einem mTOR-Inhibitor behandelt. Auch nach erfolgreicher Nierentransplantation leiden diese Patienten an einer chronischen NI und können damit ein renokardiales Syndrom ausbilden. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Anlass zu der Annahme, dass sich eine Immunsuppression mit einem mTOR-Inhibitor bei prämenopausalen Frauen nachteilig auf das kardiale Outcome auswirken könnte. Es wäre daher interessant im Rahmen von klinischen Studien zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse des vorliegenden Versuches auch in der klinischen Anwendung nachvollziehen lassen. Daraus könnten sich geschlechtsspezifische Behandlungsstrategien bezüglich der Immunsuppressiven Therapie nach NTx ableiten lassen.

Weiterhin lassen sich anhand der vorliegenden Ergebnisse Hinweise ableiten, dass unter Beteiligung des ER β unterschiedliche zelluläre Regulationsmechanismen der beiden mTOR-Komplexe mTORC1 und mTORC2 existieren. Im weiblichen Geschlecht scheinen über den ER β kardioprotektive Mechanismen aktiviert zu werden, die eine Aktivitätssteigerung des mTORC2 zur Folge haben. Ein funktionelles Ausschalten des ER β durch einen ER β -Knockout führt nur bei weiblichen Mäusen zu einem maladaptiven kardialen Remodeling. Im vorliegenden Versuch konnte in den weiblichen Versuchsgruppen mit Rapamycinbehandlung eine verminderte Proteinexpression des ERbeta beobachtet werden, die ebenfalls mit einem maladaptiven Remodeling vergesellschaftet war. In den männlichen Versuchsgruppen hingegen waren diese Zusammenhänge nicht zu beobachten. Wie bereits erwähnt gilt Rapamycin vorwiegend als Inhibitor des mTORC1, eine Interaktion

mit dem mTORC2 kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Für die exakt separate Betrachtung der beiden mTOR-Komplexe wäre ein genetischer Ansatz denkbar. So existieren beispielsweise Mauslinien, in denen die Gene für die beiden mTORC-bildenden Proteine Raptor und Rictor kardiomyozytenspezifisch ausgeschaltet werden können. Unter einem derartigen Versuchsdesign wäre eine noch genauere Beurteilung zur Bedeutung von mTORC1 und mTORC2 für die kardiale Adaptation unter pathologischen Bedingungen möglich. Mit den gewonnenen Erkenntnissen könnten selektive mTOR-Antagonisten bzw. -Agonisten entwickelt werden, die unter geschlechtsspezifischen Gesichtspunkten eine Modulation der an der kardialen Adaptation beteiligten Signalwege ermöglichen. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wären vor allem mTORC2-gerichtete Therapiestrategien von Interesse, die individualisiert für das weibliche und männliche Geschlecht entwickelt werden könnten.

Auch in der Onkologie gibt es bereits etablierte Behandlungsstrategien, die spezifisch auf das mTOR-Molekül bzw. den ER abzielen. Anhand der vorliegenden Ergebnisse wären auch in diesem Zusammenhang geschlechtsspezifische Unterschiede in der kardialen Adaptation unter der Krebstherapie denkbar. In der Zukunft könnte eine erhöhte Aufmerksamkeit gegenüber kardiovaskulären Pathologien bei diesen Patienten neue Erkenntnisse liefern.

Die kardioprotektive Wirkung der Östrogene ist bereits seit längerem bekannt. Nach der Menopause kommt es bei Frauen zu einem drastischen Anstieg der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen, wodurch ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen und den sinkenden Östrogenspiegeln erkennbar wird. Vor diesem Hintergrund entstand die Idee der Hormonersatztherapie, die das kardiovaskuläre Risiko dieser Patientengruppe senken sollte. Allerdings bleibt dieser Therapieansatz vor allem wegen dem erhöhten Risiko für das Auftreten von Brustkrebs kontrovers diskutiert. Die vorliegenden Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine mTOR-Blockade mit Rapamycin in der Situation des renokardialen Syndroms nur für Frauen in ihren reproduktiven Jahren nachteilig für das kardiovaskuläre Outcome sein könnte. Der nachteilige Effekt des Rapamycins scheint zumindest teilweise durch eine Beeinflussung des Östrogen-Signalings bedingt zu sein. Durch den Wegfall der protektiven Wirkung des Östrogens nach der Menopause ergibt sich eine völlig andere Ausgangslage im Bezug auf die Signaltransduktion in der myokardialen Hypertrophie. Vor diesem Hintergrund wäre eine Wiederholung des Versuches an Mäusen nach Ovariectomie interessant. Ein anderer Ansatz für die Hormonersatztherapie könnte in der Entwicklung von selektiven ER β -Agonisten liegen. Die vorliegende Arbeit bzw. vorangegangene Studien [85] geben berechtigten Grund zu der Annahme, dass die kardioprotektive Wirkung der Östrogene durch den ER β vermittelt wird. Es wäre interessant zu überprüfen, ob selektive ER β -Agonisten in der Lage sind die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse nach der Menopause signifikant zu senken und welche Auswirkung diese auf das Risiko gynäkologischer Malignomerkrankungen besitzen.

Literatur

1. Silbiger S und Neugarten J. Gender and human chronic renal disease. *Gend Med* 2008;5 Suppl A:S3–S10.
2. Iseki K, Iseki C, Ikemiya Y und Fukiyama K. Risk of developing end-stage renal disease in a cohort of mass screening. *Kidney Int* 1996;49:800–805.
3. Neugarten J, Acharya A und Silbiger SR. Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:319–329.
4. Carrero JJ. Gender differences in chronic kidney disease: underpinnings and therapeutic implications. *Kidney Blood Press Res* 2010;33:383–392.
5. Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC, Deckers JW, Linker DT, Hofman A und Grobbee DE. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 1999;20:447–455.
6. Hayward CS, Kelly RP und Collins P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovasc Res* 2000;46:28–49.
7. Regitz-Zagrosek V und Seeland U. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Wien Med Wochenschr* 2011;161:109116.
8. Du XJ, Fang L und Kiriazis H. Sex dimorphism in cardiac pathophysiology: experimental findings, hormonal mechanisms, and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther* 2006;111:434–475.
9. Regitz-Zagrosek V, Brokat S und Tschope C. Role of gender in heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Prog Cardiovasc Dis* 2007;49:241–251.
10. Cleland JGF, Swedberg K, Follath F et al. The EuroHeart Failure survey programme– a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J* 2003;24:442–463.
11. de Simone G, Devereux RB, Daniels SR und Meyer RA. Gender differences in left ventricular growth. *Hypertension* 1995;26:979–983.
12. Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gambert SR und Anversa P. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1068–1079.
13. Iseki K. Gender differences in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2008;74:415–417.
14. Murphy E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circ Res* 2011;109:687–696.
15. Ciana P, Raviscioni M, Mussi P, Vegeto E, Que I, Parker MG, Lowik C und Maggi A. In vivo imaging of transcriptionally active estrogen receptors. *Nat Med* 2003;9:82–86.
16. Kaushik M, Sontineni SP und Hunter C. Cardiovascular disease and androgens: a review. *Int J Cardiol* 2010;142:8–14.
17. Ronco C, Chionh CY, Haapio M, Anavekar NS, House A und Bellomo R. The cardiorenal syndrome. *Blood Purif* 2009;27:114–126.

18. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G und Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 2003;41:1–12.
19. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE und Hsu Cy. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004;351:1296–1305.
20. Johnson DW, Craven AM und Isbel NM. Modification of cardiovascular risk in hemodialysis patients: an evidence-based review. *Hemodial Int* 2007;11:1–14.
21. URL: <http://www.sharinginhealth.ca/renal/renal.html>.
22. Patel BM und Mehta AA. Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases. *Eur J Pharmacol* 2012;697:1–12.
23. Nicholls MG und Robertson JJ. The renin-angiotensin system in the year 2000. *J Hum Hypertens* 2000;14:649–666.
24. Fuller PJ und Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension* 2005;46:1227–1235.
25. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EAG, Polly ML und McMahon EG. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 2003;63:1791–1800.
26. Young M, Fullerton M, Dilley R und Funder J. Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 1994;93:2578–2583.
27. Brilla CG und Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992;120:893–901.
28. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J und Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709–717.
29. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M, EPAMIHFE und Investigators SS. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309–1321.
30. Yemane H, Busauskas M, Burris SK und Knuepfer MM. Neurohumoral mechanisms in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension in rats. *Exp Physiol* 2010;95:51–55.
31. Titze J, Bauer K, Schafflhuber M, Dietsch P, Lang R, Schwind KH, Luft FC, Eckardt KU und Hilgers KF. Internal sodium balance in DOCA-salt rats: a body composition study. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F793–F802.
32. Abrams JM und Osborn JW. A role for benzamil-sensitive proteins of the central nervous system in the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35:687–694.
33. Schenk J und McNeill JH. The pathogenesis of DOCA-salt hypertension. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1992;27:161–170.
34. Reid JL, Zivin JA und Kopin IJ. Central and peripheral adrenergic mechanisms in the development of deoxycorticosterone-saline hypertension in rats. *Circ Res* 1975;37:569–579.
35. O'Donoghue TL und Brooks VL. Deoxycorticosterone acetate-salt rats: hypertension and sympathoexcitation driven by increased NaCl levels. *Hypertension* 2006;47:680–685.

36. Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M und Field LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol* 1996;271:H2183–H2189.
37. Diwan A und Dorn 2nd GW. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)* 2007;22:56–64.
38. Rutschow S, Li J, Schultheiss HP und Pauschinger M. Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. *Cardiovasc Res* 2006;69:646–656.
39. Vatner SF. Reduced subendocardial myocardial perfusion as one mechanism for congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1988;62:94E–98E.
40. Hein S, Arnon E, Kostin S, Schönburg M, Elsässer A, Polyakova V, Bauer EP, Klövekorn WP und Schaper J. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 2003;107:984–991.
41. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB und Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990;322:1561–1566.
42. Fagard RH. Impact of different sports and training on cardiac structure and function. *Cardiol Clin* 1997;15:397–412.
43. Maron BJ und Pelliccia A. The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation* 2006;114:1633–1644.
44. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L und McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* 2010;128:191–227.
45. Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA und Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H8–H16.
46. Heineke J und Molkenin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006;7:589–600.
47. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P und Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994;78:35–43.
48. Laplante M und Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149:274–293.
49. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P und Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110:163–175.
50. Wang L, Harris TE, Roth RA und Lawrence Jr JC. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem* 2007;282:20036–20044.
51. Inoki K, Ouyang H, Li Y und Guan KL. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;69:79–100.
52. Inoki K, Li Y, Xu T und Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 2003;17:1829–1834.

53. Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN und Sonenberg N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 1996;15:658–664.
54. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP und Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 2005;123:569–580.
55. Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N und Avruch J. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol* 1998;8:69–81.
56. Schaeffer V und Abrass CK. Mechanisms and control of protein translation in the kidney. *Am J Nephrol* 2010;31:189–201.
57. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P und Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004;14:1296–1302.
58. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W und Hall MN. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 2011;144:757–768.
59. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A und Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 2004;6:1122–1128.
60. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM und Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005;307:1098–1101.
61. Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM und Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:449–471.
62. Foster FM, Traer CJ, Abraham SM und Fry MJ. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci* 2003;116:3037–3040.
63. Haslam RJ, Koide HB und Hemmings BA. Pleckstrin domain homology. *Nature* 1993;363:309–310.
64. Marte BM und Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 1997;22:355–358.
65. Andjelković M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM und Hemmings BA. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997;272:31515–31524.
66. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P und Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996;15:6541–6551.
67. Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, Condorelli G und Ellingsen O. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol* 2008;214:316–321.
68. DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M und Muslin AJ. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 2006;113:2097–2104.

69. Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofe S, Ito M, Liao R, Colucci WS und Walsh K. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:2108–2118.
70. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS und Schreiber SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994;369:756–758.
71. Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM und Kang SA. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol Cell* 2010;38:768–774.
72. Brown EJ, Beal PA, Keith CT, Chen J, Shin TB und Schreiber SL. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 1995;377:441–446.
73. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL und Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006;22:159–168.
74. Webster AC, Lee VWS, Chapman JR und Craig JC. Target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression of kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Transplantation* 2006;81:1234–1248.
75. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CLS, O’Connell PJ, Allen RDM und Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349:2326–2333.
76. Knoll GA, Kokolo MB, Mallick R et al. Effect of sirolimus on malignancy and survival after kidney transplantation: systematic review and meta-analysis of individual patient data. *BMJ* 2014;349:g6679.
77. Hariharan S, McBride MA, Cherikh WS, Tolleris CB, Bresnahan BA und Johnson CP. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. *Kidney Int* 2002;62:311–318.
78. Terada N, Lucas JJ, Szepesi A, Franklin RA, Domenico J und Gelfand EW. Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. *J Cell Physiol* 1993;154:7–15.
79. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003;35:7S–14S.
80. Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ und Izumo S. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 2003;107:1664–1670.
81. McMullen JR, Sherwood MC, Tarnavski O, Zhang L, Dorfman AL, Shioi T und Izumo S. Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation* 2004;109:3050–3055.
82. Kushwaha SS, Raichlin E, Sheinin Y, Kremers WK, Chandrasekaran K, Brunn GJ und Platt JL. Sirolimus affects cardiomyocytes to reduce left ventricular mass in heart transplant recipients. *Eur Heart J* 2008;29:2742–2750.
83. Yanes LL, Sartori-Valinotti JC und Reckelhoff JF. Sex steroids and renal disease: lessons from animal studies. *Hypertension* 2008;51:976–981.
84. Karatas A, Hegner B, de Windt LJ, Luft FC, Schubert C, Gross V, Akashi YJ, Gürgen D, Kintscher U, da Costa Goncalves AC, Regitz-Zagrosek V und Dragun D. Deoxycorticosterone acetate-salt mice exhibit blood pressure-independent sexual dimorphism. *Hypertension* 2008;51:1177–1183.

85. Gürgen D, Hegner B, Kusch A, Catar R, Chaykovska L, Hoff U, Gross V, Slowinski T, da Costa Goncalves AC, Kintscher U, Gustafsson Jk, Luft FC und Dragun D. Estrogen receptor-beta signals left ventricular hypertrophy sex differences in normotensive deoxycorticosterone acetate-salt mice. *Hypertension* 2011;57:648–654.
86. Sun Zj und Zhang Ze. Historic perspectives and recent advances in major animal models of hypertension. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26:295–301.
87. Selye H, Hall CE und Rowley EM. Malignant Hypertension Produced by Treatment with Desoxycorticosterone Acetate and Sodium Chloride. *Can Med Assoc J* 1943;49:88–92.
88. Titze J, Luft FC, Bauer K, Dietsch P, Lang R, Veelken R, Wagner H, Eckardt KU und Hilgers KF. Extrarenal Na⁺ balance, volume, and blood pressure homeostasis in intact and ovariectomized deoxycorticosterone-acetate salt rats. *Hypertension* 2006;47:1101–1107.
89. Fujita T und Sato Y. Changes in renal and central noradrenergic activity with potassium in DOCA-salt rats. *Am J Physiol* 1984;246:F670–F675.
90. Wang Q, Domenighetti AA, Pedrazzini T und Burnier M. Potassium supplementation reduces cardiac and renal hypertrophy independent of blood pressure in DOCA/salt mice. *Hypertension* 2005;46:547–554.
91. Lundeen G, Manohar M und Parks C. Systemic distribution of blood flow in swine while awake and during 1.0 and 1.5 MAC isoflurane anesthesia with or without 50oxide. *Anesth Analg* 1983;62:499–512.
92. Lerman J, Oyston JP, Gallagher TM, Miyasaka K, Volgyesi GA und Burrows FA. The minimum alveolar concentration (MAC) and hemodynamic effects of halothane, isoflurane, and sevoflurane in newborn swine. *Anesthesiology* 1990;73:717–721.
93. Tank AW und Lee Wong D. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr Physiol* 2015;5:1–15.
94. de Champlain J, Bouvier M und Drolet G. Abnormal regulation of the sympathoadrenal system in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1987;65:1605–1614.
95. Katholi RE, Naftilan AJ und Oparil S. Importance of renal sympathetic tone in the development of DOCA-salt hypertension in the rat. *Hypertension* 1980;2:266–273.
96. Evans JM, Ziegler MG, Patwardhan AR, Ott JB, Kim CS, Leonelli FM und Knapp CF. Gender differences in autonomic cardiovascular regulation: spectral, hormonal, and hemodynamic indexes. *J Appl Physiol* (1985) 2001;91:2611–2618.
97. Convertino VA. Gender differences in autonomic functions associated with blood pressure regulation. *Am J Physiol* 1998;275:R1909–R1920.
98. Saleh MC, Connell BJ und Saleh TM. Autonomic and cardiovascular reflex responses to central estrogen injection in ovariectomized female rats. *Brain Res* 2000;879:105–114.
99. Schroeder C, Adams F, Boschmann M, Tank J, Haertter S, Diedrich A, Biaggioni I, Luft FC und Jordan J. Phenotypical evidence for a gender difference in cardiac norepinephrine transporter function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R851–R856.
100. Ludwig DA, Vernikos J, Wade CE und Convertino VA. Blood pressure changes during orthostatic stress: evidence of gender differences in neuroeffector distribution. *Aviat Space Environ Med* 2001;72:892–898.

101. Lyson T, Ermel LD, Belshaw PJ, Alberg DG, Schreiber SL und Victor RG. Cyclosporine- and FK506-induced sympathetic activation correlates with calcineurin-mediated inhibition of T-cell signaling. *Circ Res* 1993;73:596–602.
102. Zhang W und Victor RG. Calcineurin inhibitors cause renal afferent activation in rats: a novel mechanism of cyclosporine-induced hypertension. *Am J Hypertens* 2000;13:999–1004.
103. Sabbatini M, Sansone G, Uccello F, De Nicola L, Nappi F und Andreucci VE. Acute effects of rapamycin on glomerular dynamics: a micropuncture study in the rat. *Transplantation* 2000;69:1946–1990.
104. Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Fallgren B und Bennett T. Regional haemodynamic effects of cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus in conscious rats. *Br J Pharmacol* 2004;141:634–643.
105. Kempf T, Drexler H und Wollert KC. [Pathophysiology of heart failure]. *Internist (Berl)* 2007;48:899–908.
106. Anversa P, Ricci R und Olivetti G. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J Am Coll Cardiol* 1986;7:1140–1149.
107. Berk BC, Fujiwara K und Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* 2007;117:568–575.
108. Manabe I, Shindo T und Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2002;91:1103–1113.
109. Baudino TA, Carver W, Giles W und Borg TK. Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H1015–H1026.
110. Pedram A, Razandi M, Lubahn D, Liu J, Vannan M und Levin ER. Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin. *Endocrinology* 2008;149:3361–3369.
111. Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, Lubahn D und Levin ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol* 2010;24:2152–2165.
112. Kararigas G, Dworatzek E, Petrov G, Summer H, Schulze TM, Baczkowski I, Knosalla C, Golz S, Hetzer R und Regitz-Zagrosek V. Sex-dependent regulation of fibrosis and inflammation in human left ventricular remodeling under pressure overload. *Eur J Heart Fail* 2014;16:1160–1167.
113. Ong CT, Khoo YT, Mukhopadhyay A, Do DV, Lim IJ, Aalami O und Phan TT. mTOR as a potential therapeutic target for treatment of keloids and excessive scars. *Exp Dermatol* 2007;16:394–404.
114. Yu SY, Liu L, Li P und Li J. Rapamycin inhibits the mTOR/p70S6K pathway and attenuates cardiac fibrosis in adriamycin-induced dilated cardiomyopathy. *Thorac Cardiovasc Surg* 2013;61:223–228.
115. Hiemann NE, Wellnhofer E, Lehmkuhl HB, Knosalla C, Hetzer R und Meyer R. Everolimus prevents endomyocardial remodeling after heart transplantation. *Transplantation* 2011;92:1165–1172.
116. Gao XM, Wong G, Wang B, Kiriazis H, Moore XL, Su YD, Dart A und Du XJ. Inhibition of mTOR reduces chronic pressure-overload cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Hypertens* 2006;24:1663–1670.

117. Buss SJ, Muenz S, Riffel JH, Malekar P, Hagenmueller M, Weiss CS, Bea F, Bekeredjian R, Schinke-Braun M, Izumo S, Katus HA und Hardt SE. Beneficial effects of Mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2435–2446.
118. Sciarretta S, Volpe M und Sadoshima J. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circ Res* 2014;114:549–564.
119. Lajoie C, El-Helou V, Proulx C, Clément R, Gosselin H und Calderone A. Infarct size is increased in female post-MI rats treated with rapamycin. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87:460–470.
120. Pugh CW und Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003;9:677–684.
121. Li W, Petrimpol M, Molle KD, Hall MN, Battegay EJ und Humar R. Hypoxia-induced endothelial proliferation requires both mTORC1 and mTORC2. *Circ Res* 2007;100:79–87.
122. Jugdutt BI. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003;3:1–30.
123. Kwak HB. Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart. *J Exerc Rehabil* 2013;9:338–347.
124. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Li J, Schwimbeck PL, Noutsias M und Schultheiss HP. [Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]. *Herz* 2002;27:677–682.
125. Neri Serneri GG, Boddi M, Modesti PA, Cecioni I, Coppo M, Padeletti L, Michelucci A, Collella A und Galanti G. Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. *Circ Res* 2001;89:977–982.
126. Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E und Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 2002;16:1472–1487.
127. Noda T und Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 1998;273:3963–3966.
128. Siedlecki AM, Jin X und Muslin AJ. Uremic cardiac hypertrophy is reversed by rapamycin but not by lowering of blood pressure. *Kidney Int* 2009;75:800–808.
129. Shende P, Plaisance I, Morandi C, Pellieux C, Berthonneche C, Zorzato F, Krishnan J, Lerch R, Hall MN, Rüegg MA, Pedrazzini T und Brink M. Cardiac raptor ablation impairs adaptive hypertrophy, alters metabolic gene expression, and causes heart failure in mice. *Circulation* 2011;123:1073–1082.
130. Harston RK, McKillop JC, Moschella PC, Van Laer A, Quinones LS, Baicu CF, Balasubramanian S, Zile MR und Kuppaswamy D. Rapamycin treatment augments both protein ubiquitination and Akt activation in pressure-overloaded rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300:H1696–H1706.
131. Efeyan A und Sabatini DM. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:169–176.
132. Li J, Kim SG und Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab* 2014;19:373–379.

133. Belibi F, Ravichandran K, Zafar I, He Z und Edelstein CL. mTORC1/2 and rapamycin in female Han:SPRD rats with polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300:F236–F244.
134. Zeng Z, Sarbassov DD, Samudio IJ, Yee KWL, Munsell MF, Ellen Jackson C, Giles FJ, Sabatini DM, Andreeff M und Konopleva M. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* 2007;109:3509–3512.
135. Simm A, Schlüter K, Diez C, Piper HM und Hoppe J. Activation of p70(S6) kinase by beta-adrenoceptor agonists on adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:2059–2067.
136. Sadoshima J und Izumo S. Rapamycin selectively inhibits angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro. Potential role of 70-kD S6 kinase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 1995;77:1040–1052.
137. Wang L, Gout I und Proud CG. Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2001;276:32670–32677.
138. Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Shiraishi I, Setchell KD, Schaefer E, Kajstura J, Anversa P und Sussman MA. Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res* 2001;88:1020–1027.
139. Alessi DR, Pearce LR und García-Martínez JM. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Sci Signal* 2009;2:pe27.
140. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ und Sabatini DM. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* 2006;11:859–871.
141. Shende P, Xu L, Morandi C, Pentassuglia L, Heim P, Lebboukh S, Berthonneche C, Pedrazzini T, Kaufmann BA, Hall MN, Rüegg MA und Brink M. Cardiac mTOR complex 2 preserves ventricular function in pressure-overload hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2016;109:103–114.
142. Shimobayashi M und Hall MN. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:155–162.
143. Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:2707–2719.
144. Gillespie-Brown J, Fuller SJ, Bogoyevitch MA, Cowley S und Sugden PH. The mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 stimulates a pattern of gene expression typical of the hypertrophic phenotype in rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1995;270:28092–28096.
145. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN und Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 2000;19:6341–6350.
146. Zou Y, Yao A, Zhu W, Kudoh S, Hiroi Y, Shimoyama M, Uozumi H, Kohmoto O, Takahashi T, Shibasaki F, Nagai R, Yazaki Y und Komuro I. Isoproterenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. *Circulation* 2001;104:102–108.

147. Sanna B, Bueno OF, Dai YS, Wilkins BJ und Molkenin JD. Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol* 2005;25:865–878.
148. Lorenz K, Schmitt JP, Schmitteckert EM und Lohse MJ. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2009;15:75–83.
149. Yang TTC, Xiong Q, Enslin H, Davis RJ und Chow CW. Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 2002;22:3892–3904.
150. Cheskis BJ, Greger JG, Nagpal S und Freedman LP. Signaling by estrogens. *J Cell Physiol* 2007;213:610–617.
151. Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, Grohe C, Meyer R und Doevendans PA. Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovasc Res* 2002;53:709–719.
152. Kelly und Wagner. Estrogen Modulation of G-protein-coupled Receptors. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:369–374.
153. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M und Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007;87:905–931.
154. Pedram A, Razandi M und Levin ER. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* 2006;20:1996–2009.
155. Grohé C, Kahlert S, Löbber K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H und Neyses L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett* 1997;416:107–112.
156. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M und Levin ER. Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. *J Biol Chem* 2005;280:26339–26348.
157. Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, Myers P, Demianenko T, Mao L, Rockman HA, Korach KS und Murphy E. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H469–H476.
158. Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, Ehler E, Huber O, Martus P, Weiske J, Pregla R, Hetzer R und Regitz-Zagrosek V. Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J* 2006;20:926–934.
159. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, Baur J, Celestin F, Chen X, Michael A, Haq S, Nuedling S, Grohe C, Force T, Mendelsohn ME und Karas RH. 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ Res* 2004;95:692–699.
160. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D und Chambon P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995;270:1491–1494.

161. Wu CH, Liu JY, Wu JP, Hsieh YH, Liu CJ, Hwang JM, Lee SD, Chen LM, Chang MH, Kuo WW, Shyu JC, Tsai JH und Huang CY. 17beta-estradiol reduces cardiac hypertrophy mediated through the up-regulation of PI3K/Akt and the suppression of calcineurin/NF-AT3 signaling pathways in rats. *Life Sci* 2005;78:347–356.
162. Lizotte E, Grandy SA, Tremblay A, Allen BG und Fiset C. Expression, distribution and regulation of sex steroid hormone receptors in mouse heart. *Cell Physiol Biochem* 2009;23:75–86.
163. Hall BA, Kim TY, Skor MN und Conzen SD. Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) activation in breast cancer: requirement for mTORC1 activity associates with ER-alpha expression. *Breast Cancer Res Treat* 2012;135:469–479.
164. Nilsson S, Koehler KF und Gustafsson Jk. Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:778–792.
165. Gürgen D, Kusch A, Klewitz R, Hoff U, Catar R, Hegner B, Kintscher U, Luft FC und Dragun D. Sex-specific mTOR signaling determines sexual dimorphism in myocardial adaptation in normotensive DOCA-salt model. *Hypertension* 2013;61:730–736.
166. Kusch A, Schmidt M, Gürgen D, Postpieszala D, Catar R, Hegner B, Davidson MM, Mahmoodzadeh S und Dragun D. 17β-Estradiol regulates mTORC2 sensitivity to rapamycin in adaptive cardiac remodeling. *PLoS One* 2015;10:e0123385.

Anhang

Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien	Hersteller	Katalog Nr.
2-Propanol, Isopropanol	Carl Roth	CP41.4
Aceton	Carl Roth	9372.1
Acrylamid 37,5:1, Rotiphorese® Gel	Carl Roth	3029.1
Agarose	Serva	11404
Albumin Fraktion V, BSA	Carl Roth	8076.2
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich	A9164
Aqua Poly Mount	Polysciences Inc	18606
BICIN	Carl Roth	9162.3
Bis-Tris	AppliChem	A1025
Borsäure	Roth	5935
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	B6131
Direkt Rot 80	Fluka	43665
Essigsäure	Carl Roth	7332.1
Ethanol (absolut)	Carl Roth	9065.1
Ethanol (MEK, vergällt)	Herbeta Arzneimittel	70, 80, 96, 99%
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth	8040.2
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth	3054.3
Glycerin	Carl Roth	3783.2
Glycin	Serva	23390
Igepal CA-630	Sigma Aldrich	I3021
Isol-RNALysis Reagenz	5Prime	2302700
Kaliumchlorid	Merck	104.936
Kaliumhydroxid	Merck	105.033
Kalziumcarbonat	Roth	6230.1
Kalziumchlorid	Roth	A119.1
Magermilchpulver	AppliChem	A0830
Methanol	Carl Roth	4627.2
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	AppliChem	A1076
Natriumchlorid	Carl Roth	3957.1
Natriumdihydrogensulfit Lsg.	Carl Roth	2371.1

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth	CN30.2
Natriumfluorid	Fluka	71518
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich	6771.1
Phenol	Carl Roth	38.1
Paraformaldehyd	Sigma	158127
Pikrinsäure Lsg. 1,2%	Sigma Aldrich	P6744_16A
Ponceau Red S	Carl Roth	5938.2
Salzsäure (37%), rauchend	Carl Roth	9277.1
β-Glycerophosphat	AppliChem	A2253
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich	87689
Tris	Carl Roth	4855.3
Tween 20	Appllichem	A7564

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Katalog-Nr.
Aluminiumfolie	Carl Roth	1770.1
Elektrodengel Spectra 360	Parker	Ref ₁ 2 – 08
Enthaarungscreme	Veet	Sensitive 125ml
Gefrierreaktionsgefäße 1,0 ml	Sarstedt	72.377
Gefrierreaktionsgefäße 1,6 ml	Sarstedt	72.380
Injektionsnadeln (steril)	Becton Dickinson	300 400
Injektionsnadeln (steril)	Becton Dickinson	301 300
Injektionsnadeln (steril)	Becton Dickinson	302 200
Injektionsspritzen 1, 10 und 15 ml	Becton Dickinson	300 1/47
Kapillargefäße (Blutentnahme)	Kabe Labortechnik	6K150SE
Mersilene Nahtmaterial	Ethicon	RH697H
6/0 USP Seide Nahtmaterial	Resorba	1HF
Operationsbesteck, diverse	Fine Science	Tools diverse
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging	PM-999
Pasteurpipetten	Brand	7477_15
Pipettenspitzen 0,5-10 µl	Sarstedt	701.130
Pipettenspitzen 10-200 µl	Sarstedt	70.760.002
Pipettenspitzen 10-200 µl	Carl Roth	Y4119.1
Pipettenspitzen 200-1000 µl	Sarstedt	70.762.100
Pipettenspitzen 1-5 ml	Gilson	F161571
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Sarstedt	72.706, 72.695
Röntgenfilme CL-Xposure™ Film	ThermoScientific	34089
serologische Pipetten 1, 5, 10 und 25ml (steril)	Becton Dickinson Labware	35.75_25/_43_51
Skalpell (einmal, steril)	Feather (Japan)	02.001.30.010

Transfermembran BioTrace™ NT (Nitrocellulose 0,2 µm)	Pall Corporation (FL, USA)	P/N 66485
Transfermembran (PVDF 0,45 µm)	St Cruz	PV4HY000GL
Ultraschallgel, Sonogel®	Sonogel	3010
Verbandsmaterial, Durapore™ (Kompressen, Klebeband usw.)	3M	1538-0
Verpackungsfolie (Saran)	Dow Chemical Company	710903
Wattestäbchen RotiLab	Carl Roth	EH111.1
Zentrifugenröhrchen 15 ml	BectonDickson Labware	352070
Zentrifugenröhrchen 50 ml	BectonDickson Labware	352096
Medikamente	Hersteller	Katalog-Nr.
Ampuwa	Fresenius KABI	16-01-FAM10
Deoxycorticosterone acetat (DOCA)	Innovative Research of America (IRA)	SM-121 75mg/60Tage
Hydralazin	Sigma Aldrich	H1753
Isofluran, Forenen®	Abbott	B506
Isotonische NaCl 0,9%	Fresenius KABI	7152-3
Nahtmaterial Seide	Resorba	USP 6-0
Nahtmaterial Polyester	Ethicon	USP 6-0
Rapamycin	LC Laboratories	R-5000
Sprühpflaster	Johnson&Johnson	8710N
Tramadol (Tramal)	1A Pharma GmbH	Z.Nr.: 1-24618
Lidocain-Gel 2,0%, Xylocain®	AstraZeneca	8.456

Puffer, Lösungen und Stocks

Puffer, Lösungen, Reaktionseinheiten	Zusammensetzung	Endkonzentration
Ammoniumpersulfatlösung (10%)	1 g APS ad 10 ml dH2O	10%
20x Tris-buffered salin (TBS) aus Ampuwa, pH 7,6-8,0	Tris (Pufferan) NaCl	50 mM 150 mM
1x TBS-0.1% Tween (TBS-T)/Ampuwa	aus 20x TBS 1ml/l Tween	1x 0,1%

Puffer, Lösungen und Stocks

1x Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,3	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	9 mM
	KH ₂ PO ₄	2,3 mM
10x TBE	Tris (Pufferan)	0,89 M
	Borsäure	0,89 M
	EDTA	20 mM
Transfer-Puffer	BICIN	25 mM
	Bis-Tris	25 mM
	EDTA, pH 8,0	1 mM
	MeOH	20%
MOPS-Puffer	MOPS	250 mM
	Tris (Pufferan)	250 mM
	EDTA, pH 8,0	5 mM
	SDS	0,5%
5x Laemmli Puffer	Tris-HCl	250 mM, pH 7,5
	DTT	500 mM
	Glycerol	30%
	SDS	5%
	Bromphenolblau	0,25%
Magermilchblocklösung	100ml Magermilchpulver	5%
	BSA	1%
	1x TBS-T	94 ml
Stripping-Puffer	Glycin	25 mM
	SDS	3,5 mM
	H ₂ SO ₄ bis pH 2,0	
3,5x Gelpuffer	bis-Tris	1,25 M
	HCl bis pH 6,5-6,8	
Marker für Elektrophorese	Applichem A8889 prestained 10-245 kDa	2-5 Pl pro Gel

Fermentas Pageruler Plus
prestained 10-250 kDa

RIPA-Lysepuffer	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	Igepal-C630	1%
	SDS	0,1%

10x Zitratpuffer	Zitronensäure pH 6,0 mit NaOH	0,1 M
------------------	----------------------------------	-------

BioRad DC™ Protein Assay	Lösung A	500-0113
	Lösung S	500-0114
	Lösung B	500-0115

Isol-RNALysis Reagenz	5Prime	2302700
-----------------------	--------	---------

DNA-Isolation aus Gewebe	Invitek	Invisorb Spin Tissue Mini Kit
--------------------------	---------	----------------------------------

Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit	Finnzymes	F-140X
-------------------------------------	-----------	--------

Inhibitoren	Stocklösung	Endkonzentration
β-Glycerophosphat	1 M Stocklösung	10 mM
Natriumfluorid	500 mM Stocklösung	10 mM
Natriumorthovanadat	100 mM Stocklösung	1 mM
Natriumpyrophosphat	100 mM Stocklösung	1 mM
Proteaseinhibitor „komplett“	25x Stocklösung	1x

Detektionsreagenzien	Hersteller	Katalog-Nr.
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific	32209
SuperSignal West Pico	Thermo Scientific	34087
SuperSignal West Dura	Thermo Scientific	34076

PCR-Komponenten	Hersteller	Katalog-Nr
DNA-Polymerase, AmpliTaq®	Applied Biosystems	MO9946
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	Promega	U120-124B
MgCl ₂ (20 mM)	Applied Biosystems	MO8472

Laborgerätschaften

10x PCR Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCL pH=8,3)	Applied Biosystems	MO8805
Reverse Transkriptase (MuLV)	Applied Biosystems	M11093

Histologie	Hersteller	Katalog-Nr
AEC-Färbelösung	DAKO	K3169
Amplifikationsreagenz	DAKO	K1500
Antikörperverdünnungslösung	DAKO	S3032
Avidin/Biotin Reagenz	Vecta Shield	SP-2001
DeckgläserStandard	Menzel Gläser	BB020020A1
DAB Chromogen	DAKO	K1500
Entellan Eindeckmedium	Merck	107961.0500
Hämalaun-Färbelösung	Merck	109249.0500
Objektträger SuperFrost Ultra®	Menzel Gläser	J3800AMNZ
PAS-Färbelösung	Merck	101646.0001
Peroxidase Blockierungslösung	DAKO	S2001
Protein Blockierungslösung	DAKO	K1500
RotiClear®, Xylolersatz	Carl Roth	A538.5
Roti®Histofix, 4% PFA	Carl Roth	P087.3
RotiMount®, Eindeckmedium	Carl Roth	HP68.1
Signalverstärkung CSA-Kit	DAKO	K1500
Streptavidin-Biotin-Komplex	DAKO	K1500

Laborgerätschaften

Geräte	Hersteller	Katalogbezeichnung
Kombigeräte		
Kühl/Gefrierschrank	Liebherr	Comfort „no frost“
Kühl/Gefrierschrank	Liebherr	Premium Kombi
Kühl/Gefrierschrank	Liebherr	Profi line (+ 4°C/-20°C)
Tiefkühlgeräte (- 20°C)		
Gefrierschrank	Liebherr	Premium „no frost“
Tiefkühlgeräte (- 80°C)		
Gefrierschrank	New Brunswick	Ultra Low Freezer
Gefrierschrank	Heraeus	Hera freeze
Analysenwaagen		
Feinwaage	Ohaus	Discovery DV 214 CM
Feinwaage	Mettler Toledo	AE 260 Delta Range

Laborwaage	Sartorius	Universal U 5000 D
Zentrifugen		
Multifuge 15-R	Heraeus	Multifuge 15-R
Kühlzentrifuge Mikro200R	Hettich	Typ 2405
Kühlzentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5403
Ultrazentrifuge	Sorvall	Ultra Pro 80
Mischgeräte		
Minishaker (Vortexer)	IKA Labortechnik	MS1
Rütteltisch Titramax	Heidolph	Titramax 100
Schwenktisch	Heidolph	Polymax 1040 T
Taumelrollenmischer	Marienfeld, Karl Hecht	RM 5-40
Rollmischer	VWR	VWR® Tube Rotator
Netzgeräte		
1000 mA	Biometra	PowerPack P25T
Power Source 300 V	VWR	TYP 300 Volt
Power Supply 2.0 P System	BioRad	Modell 200/2.0
Elektrophoresekammer		
Proteinelektrophorese	BioRad	Mini Protean 4Cell
Proteinelektrophorese	BioStep	TV 400
Transferkammer	InvitroGen	X Cell II Blot Module
Transferkammer	BioRad	Transblot Cell
RNA-Elektrophorese	VWR	AGT-2
Cycler		
Peltier Thermal PTC-200	MJ Research	PTC-200
Thermal Cycler PX2	Electron Corporation	PX2
Real Time PCR	Roche	Light Cycler II
PCR System	Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time
Pipettierhilfen		
Einkanalpipetten 0,5 – 1000 µl	Eppendorf	research
Einkanalpipetten 10 – 5000 µl	Gilson	pipetMan
Mehrkanalpipette	Brand	Transferpette®-8E
Mehrkanalpipette	VWR	613-5256
pH-Messung		
pH-Elektrode Ag/AgCl	VWR	4002-789
pH-Messgerät	VWR	SymbHony SB 70P
pH-Lösungen 4,7,10	Orion	910_104/_107_110
Detektionsgeräte/zubehör		
Röntgenfilmentwicklung	Protec®	Protec Compact ²
UV-Detektion	Syngene Bio Imaging	Gene Flash

Antikörper

Blotdetektionseinheit	Syngene Bio Imaging	G-Box XL 1.4
X-ray film HypercasseteTM	Amersham	RPN 12642
Mikroskope		
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss	Axio Imager A1
Kamera	Carl Zeiss	Axiocam HR
Mikroskop	Carl Zeiss	Axiovert CFL
Kamera	Canon	PowerShotA640

Antikörper

Antikörper	kDa	Verdünnung	Spezie	Hersteller
Primärantikörper für Western Blot				
AKT	60	1:1000	Kaninchen	CST 9272
α -Tubulin	53	1:6000	Maus	Sigma T9026
GAP-DH	38	1:50 000	Maus	hytest
mTOR	289	1:1000	Kaninchen	CST 2972
p38 MAPK	40	1:1000	Kaninchen	CST 9212
P70, S6K1, P70-S6	70	1:1000	Kaninchen	CST 9202
phospho AKT ^{S473}	60	1:1000	Kaninchen	CST 4060S
phospho AKT ^{T308}	60	1:1000	Kaninchen	CST 9275S
phospho p38 ^{T180/Y182}	43	1:1000	Kaninchen	CST 4511
phospho-P70 ^{T389}	73	1:1000	Kaninchen	CST 9205S
phospho-P70 ^{T421/S424}	73	1:1000	Kaninchen	CST9204S
Raptor	150	1:1000	Kaninchen	CST 2280
Rictor	200	1:1000	Kaninchen	CST 2114
Sekundärantikörper für Western Blot				
anti-rabbit IgG, HRPO konj.		1:25 000	Esel	Dianova 711-035-152
anti-mouse IgG, HRPO konj.		1:25 000	Esel	Dianova 715-035-151
Primärantikörper für Immunhistochemie				
pAkt(Ser473)		1:1000	Kaninchen	CST 4060S
pERK(Th240/Tyr242)		1:3000	Kaninchen	CST 4377
Sekundärantikörper für Immunhistochemie				
anti-rabbit IgG, HRPO konj.		1:7500	Ziege	Calbiochem DC03L
anti-rat IgG, HRPO konj.		1:7500	Esel	Amersham NXA931

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dennis Gürgen für die ausgezeichnete Betreuung und die allzeit kollegiale und lehrreiche Zusammenarbeit. Lieber Dennis, ich danke Dir sehr für Dein in mich gesetztes Vertrauen und die geduldige Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten. Ohne Dein vermitteltes Wissen und Deine große Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Arbeit hätte ich die große Hürde der Promotion nicht nehmen können.

Einen großen Dank möchte ich auch Frau Prof. Duska Dragun für die Bereitstellung des Themas und die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe aussprechen. Ohne Sie wäre die Realisierung des Projekts nicht möglich gewesen. Die verbrachte Zeit war mir Lehre und Freude zugleich und persönlich eine große Bereicherung.

Ein besonderes Danke geht auch an das ganze Laborteam für die wunderbare Zusammenarbeit, von der ich zu jedem Zeitpunkt profitieren durfte. Es war mir eine Freude Teil Eures Teams zu sein. Ich danke Euch für die herzliche Aufnahme in die Gruppe und eine stets freundliche, kollegiale Atmosphäre. An dieser Stelle möchte ich besonders Fr. Dr. Theres Schaub und Fr. Dr. Angelika Kusch erwähnen. Liebe Theres, ich danke Dir für die vielen angenehmen Gespräche an langen Labortagen und die vielen praktischen Tipps, die Du mir verraten hast, wenn die Versuche mal wieder nicht so recht funktionieren wollten. Und Dir Liebe Angelika, danke ich für dein stets offenes Ohr bei Problemen und das Einbringen all Deines Wissens und Deiner Erfahrung in unser Projekt.

Die letzten Worte meiner Arbeit gebühren den wichtigsten Menschen, meiner Familie. Ich danke Euch von Herzen, dass Ihr immer da seid und mich in allen Lebenslagen begleitet. Ihr habt mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin. Euch Allen gebührt ein großer Anteil und ohne Eure Unterstützung hätte ich diesen Weg nicht gehen können. Danke, für Euren Glauben in mich.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Robin Klewitz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Geschlechtsspezifische myokardiale Adaptation unter mTOR-Inhibition mit Rapamycin im normotensiven DOCA-Salz Hypertrophiemodell der Maus“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Unterschrift:

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Robin Klewitz hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Gürgen, D.; Kusch, A.; Klewitz, R.; Hoff, U.; Catar, R.; Hegner, B.; Kintscher, U.; Luft, F. C. Dragun, D., Sex-specific mTOR signaling determines sexual dimorphism in myocardial adaptation in normotensive DOCA-salt model., Hypertension, 2013

Beitrag im Einzelnen: Robin Klewitz assistierte bei den operativen Maßnahmen des Tierversuches. Darüberhinaus war er an der Datenerhebung beteiligt, insbesondere für die labortechnischen Methoden wie Western Blots, Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR und Histologische Auswertungen der kardialen Gewebsschnitte. In Teilen hat er auch zur statistischen Auswertung der Signaltransduktion und Histologischen Ergebnisse beigetragen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin:

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin:

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Gürgen, D.; Kusch, A.; **Klewitz**, R.; Hoff, U.; Catar, R.; Hegner, B.; Kintscher, U.; Luft, F. C. Dragun, D. Sex-specific mTOR signaling determines sexual dimorphism in myocardial adaptation in normotensive DOCA-salt model. *Hypertension* 2013, 61, 730-736.

Journal-Impact 2013: 6,50