

Aus dem Center for Cardiovascular Research  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Geschlechtsspezifische Expression der Peroxisom-  
Proliferator-aktivierten Rezeptoren  $\alpha$  und  $\gamma$  im Modell der  
salzinduzierten kardialen Hypertrophie**

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

vorgelegt der Medizinischen  
Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Susanne Fischer

aus Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Bedeutung des Bluthochdruckes und der Folgeerkrankungen in den Industrienationen</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Entstehung und Bedeutung der linksventrikulären Hypertrophie .....	2
1.1.2 Bedeutung der salzsensitiven Hypertonie.....	2
<b>1.2 Die Dahl-Ratte als Modell der salzsensitiven Hypertonie</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Peroxisomen-Proliferator aktivierte Rezeptoren</b> .....	<b>6</b>
1.3.1 PPAR $\alpha$ .....	7
1.3.2 PPAR $\gamma$ .....	7
1.3.3 Liganden .....	8
1.3.4 Endogene Liganden.....	8
1.3.5 Exogene Liganden .....	9
1.3.6 Ligandenabhängige Aktivierung des PPAR-Rezeptors.....	10
<b>1.4 PPAR-Zielgene</b> .....	<b>10</b>
1.4.1 Zielgene des Fettstoffwechsels.....	11
1.4.2 Weitere Zielgene.....	13
<b>1.5 Glukosetransporter</b> .....	<b>14</b>
<b>1.6 Wahl des Tiermodells und Relevanz des Themas</b> .....	<b>15</b>
<b>1.7 Zielsetzung</b> .....	<b>16</b>
<b>2 Material</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 Laborgeräte</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 Chemikalien</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4 Oligonukleotide</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5 Antikörper, Enzyme &amp; Marker</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6 Software</b> .....	<b>23</b>
<b>2.7 Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>24</b>
<b>3 Methoden</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Tiere und Haltung</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2 Proteine – Aufarbeitung und Analyse</b> .....	<b>25</b>
3.2.1 Proteinextraktion aus Myokardgewebe .....	25
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1972) mit dem ELISA-Plattenreader .....	26

3.2.3	Western Blot (Immunoblot) .....	26
3.2.4	Antikörper- Hybridisierung .....	29
3.2.5	„Stripping“-Protokoll .....	30
<b>3.3</b>	<b>RNA-Aufarbeitung und Analyse .....</b>	<b>30</b>
3.3.1	Isolierung der RNA aus Rattenmyokard.....	31
3.3.2	Konzentrationsbestimmung der RNA.....	31
3.3.3	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	32
3.3.4	Quantitative Real-time PCR.....	33
3.3.5	Auswertung.....	37
<b>3.4</b>	<b>Immunfluoreszenz .....</b>	<b>38</b>
3.4.1	Anfertigung der Kryoschnitte.....	38
3.4.2	Färbung der Kryoschnitte.....	38
3.4.3	Statistische Auswertung.....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der Tiere .....</b>	<b>40</b>
4.1.1	Herzhypertrophie in Abhängigkeit des Kochsalzgehaltes der Nahrung .....	41
4.1.2	Korrelation zwischen systolischem Blutdruck und Herzgewicht.....	41
4.1.3	Blutfette.....	42
<b>4.2</b>	<b>Peroxisome Proliferator Activated Receptor <math>\alpha</math> (PPAR<math>\alpha</math>) .....</b>	<b>46</b>
4.2.1	Diätabhängige Unterschiede der PPAR $\alpha$ -Expression auf Proteinebene....	46
<b>4.3</b>	<b>Peroxisome Proliferator Activated Receptor <math>\gamma</math> (PPAR<math>\gamma</math>) .....</b>	<b>47</b>
4.3.1	Geschlechtsabhängige Unterschiede in der PPAR $\gamma$ -Expression auf Proteinebene .....	47
4.3.2	Geschlechtsabhängige Unterschiede der PPAR $\gamma$ -Expression auf mRNA-Ebene .....	49
4.3.3	Immunhistochemischer Nachweis von PPAR $\gamma$ im Myokard.....	50
<b>4.4</b>	<b>Ausgewählte Zielgene des kardialen Energiestoffwechsels.....</b>	<b>51</b>
4.4.1	mRNA-Expression der Acyl-CoA-Oxidase (ACO).....	53
4.4.2	mRNA-Expression der Medium-Chain-Acyl-Dehydrogenase (MCAD).....	54
4.4.3	mRNA-Expression des Cluster of Differentiation 36 (CD36).....	55
4.4.4	mRNA-Expression von PGC1 $\alpha$ auf mRNA-Ebene.....	56
<b>4.5</b>	<b>Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 auf Proteinebene .....</b>	<b>57</b>
<b>4.6</b>	<b>mRNA-Expression der Cyclooxygenase 2 (COX2) als Zielgen der Inflammation .....</b>	<b>59</b>
<b>4.7</b>	<b>Myokardiale Fibrose unter Hochsalz-Diät .....</b>	<b>60</b>
4.7.1	mRNA-Expression des Connective tissue growth factor (CTGF).....	60
4.7.2	Fibrosefärbung mit Sirius Red und CAB (Chromotrop Anilinblau) .....	61
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1</b>	<b>Herzhypertrophie und Hochsalz-Diät.....</b>	<b>63</b>
<b>5.2</b>	<b>Analyse der Blutfette .....</b>	<b>64</b>
<b>5.3</b>	<b>Myokardiale Expression des Transkriptionsfaktors PPAR<math>\alpha</math>.....</b>	<b>65</b>
<b>5.4</b>	<b>Myokardiale Expression des Transkriptionsfaktors PPAR<math>\gamma</math> .....</b>	<b>66</b>
<b>5.5</b>	<b>Auswahl der Zielgene des Fettstoffwechsels.....</b>	<b>69</b>

5.5.1	Acyl-CoA-Oxidase (ACO) .....	69
5.5.2	Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase (MCAD) .....	70
5.5.3	Cluster of Differentiation 36 (CD36) .....	71
5.5.4	PPAR $\gamma$ -Kofaktor PGC1alpha .....	71
<b>5.6</b>	<b>Zusammenfassende Darstellung und Beurteilung der Zielgene des Fettstoffwechsels .....</b>	<b>73</b>
<b>5.7</b>	<b>Beeinflussung des Glukosestoffwechsels .....</b>	<b>73</b>
<b>5.8</b>	<b>Hypertrophieabhängige Inflammation .....</b>	<b>74</b>
<b>5.9</b>	<b>Myokardiale Fibrose .....</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>84</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>85</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>86</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensinogen-Converting-Enzyme
ACO	Acyl-CoA-Oxidase
AF	Activating Factor
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AT1R	Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor
BADGE	Bisphenol-A-diglycidyl-ether
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
BW	Body weight
CAB	Chromotrop Anilinblau
CCR	Center for Cardiovascular Research
CD36	Cluster-Of-Differentiation-36
CDDO	2-Cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic Acid
cDNA	complementary DNA
COX2	Cyclooxygenase-2
CTGF	Connective-Tissue-Growth-Factor
Cu	Kupfer
Dahl/S	salzsensitive Dahl-Ratte
Dahl/R	salzresistente Dahl-Ratte
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
ENaC	Epithelialer Natriumkanal / Epithelial Sodium Channel
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
GLUT1	Glukose-Transporter 1
GLUT4	Glukose-Transporter 4
h	Stunde

HCl	Hydrogenchlorid / Chlorwasserstoff
HDL	High-Density-Lipoprotein
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HODE	Hydroxyoctadecadienoinsäure
HS	Hochsalz-Diät/High-Salt Diet
HW	heart weight
IL-6	Interleukin-6
kDa	Kilo Dalton
L	Liter
LCFA	Long-Chain-Fatty-Acid
LDL	Low-Density-Lipoprotein
Lp	Lipoprotein
MAP	Mean Arterial Pressure
MCAD	Medium-Chain-Acyl-Dehydrogenase
MCFA	Medium-Chain-Fatty-Acid
min	Minute
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ND	Normal Diet
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-Cells
NR	Nuclear Receptor
NSAIDs	Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs
OVX	Ovariectomie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGC1 $\alpha$	PPAR $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$
15d-PGJ2	15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2
PIC	Proteinsaseinhibitorcocktail
PPAR $\alpha$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\alpha$
PPAR $\beta/\delta$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\beta/\delta$
PPAR $\gamma$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\gamma$
PPRE	PPAR-response-element
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
qRT-PCR	Real-Time quantitative PCR
RXR	Retinoid-X-Receptor
sec	Sekunde
SDR	Short-Chain-Dehydrogenases/reductases
SDS	Sodiumduodecylsulfat
SHR	Spontan-hypertensive Ratte
TAC	Transverse Aortic Constriction
TAG	Triacylglycerid
TBS-T	Tris-Buffered-Saline – Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	Transforming-Growth-Factor- $\beta$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
TZD	Thiazolidinedione
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells
WB	Western-Blot



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des PPAR-Gens.....	6
<b>Abb. 2:</b> Mechanismus der PPAR-Aktivierung.....	10
<b>Abb. 3:</b> Synthese der Prostaglandine.....	14
<b>Abb. 4:</b> Phasenschema einer PCR-Amplifikation.....	35
<b>Abb. 5:</b> Entwicklung der kardialen Hypertrophie unter HS-Diät.....	41
<b>Abb. 6:</b> Korrelation zwischen Blutdruck und kardialer Hypertrophie.....	42
<b>Abb. 7:</b> Auswertung der TAG-Werte.....	43
<b>Abb. 8:</b> Auswertung der Gesamt-Cholesterin-Werte.....	43
<b>Abb. 9:</b> Auswertung der LDL-Werte.....	44
<b>Abb. 10:</b> Auswertung der HDL-Werte.....	45
<b>Abb. 11:</b> Western-Blot PPAR $\alpha$ .....	46
<b>Abb. 12:</b> Western-Blot-Analyse der Expression von $\beta$ -Aktin als Referenz zu PPAR $\alpha$ .....	46
<b>Abb. 13:</b> Ergebnisse der Western-Blot-Analyse der PPAR $\alpha$ -Expression.....	47
<b>Abb. 14:</b> Western-Blot der PPAR $\gamma$ -Expression.....	48
<b>Abb. 15:</b> Western-Blot der $\beta$ -Aktin-Expression als Referenz zu PPAR $\gamma$ .....	48
<b>Abb. 16:</b> Western-Blot-Analyse der PPAR $\gamma$ -Expression in Kardiomyozyten männlicher und weiblicher Dahl/S-Ratten.....	49
<b>Abb. 17:</b> Geschlechtsabhängige Unterschiede der PPAR $\gamma$ -Expression auf mRNA-Ebene...	49
<b>Abb. 18:</b> Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der PPAR $\gamma$ -Expression.....	50
<b>Abb. 19:</b> Amplifikationskurven HPRT.....	51
<b>Abb. 20:</b> Amplifikationskurven CD36.....	52
<b>Abb. 21:</b> Dissoziationskurve der Standardwerte für HPRT.....	52
<b>Abb. 22:</b> Dissoziationskurve der Standardwerte für CD36.....	53
<b>Abb. 23:</b> Expression der ACO auf mRNA-Ebene.....	53
<b>Abb. 24:</b> Expression der MCAD auf mRNA-Ebene.....	54
<b>Abb. 25:</b> Expression des CD36 auf mRNA-Ebene.....	55
<b>Abb. 26:</b> Expression des PGC1 $\alpha$ auf mRNA-Ebene.....	56
<b>Abb. 27:</b> Ergebnisse der Western-Blot-Analyse der GLUT1-Expression.....	57
<b>Abb. 28:</b> Ergebnisse der Western-Blot-Analyse der GLUT4-Expression.....	58
<b>Abb. 29:</b> Expression der COX2 auf mRNA-Ebene.....	59
<b>Abb. 30:</b> CTGF-Expression auf mRNA-Ebene.....	60
<b>Abb. 31:</b> Mikroskopische Aufnahmen der Fibrosefärbung mit Sirius-Red.....	61
<b>Abb. 32:</b> Mikroskopische Aufnahmen der Fibrosefärbung mit CAB.....	62

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Ursachen des Bluthochdrucks.....	1
<b>Tabelle 2:</b> Auswahl endogener PPAR-Liganden.....	9
<b>Tabelle 3:</b> Auswahl exogener PPAR-Liganden.....	9
<b>Tabelle 4:</b> Auswahl der Untersuchten Zielgene von PPAR $\alpha$ und $\gamma$ .....	11
<b>Tabelle 5:</b> Laborgeräte.....	19
<b>Tabelle 6:</b> Chemikalien.....	20
<b>Tabelle 7:</b> Puffer und Lösungen.....	21
<b>Tabelle 8:</b> Oligonukleotide.....	22
<b>Tabelle 9:</b> Antikörper, Enzyme und Marker.....	23
<b>Tabelle 10:</b> Software.....	23
<b>Tabelle 11:</b> Verbrauchsmaterialien.....	24
<b>Tabelle 12:</b> Zusammensetzung der Trenngele.....	27
<b>Tabelle 13:</b> Zusammensetzung der Sammelgele.....	28
<b>Tabelle 14:</b> Primäre Antikörper.....	30
<b>Tabelle 15:</b> Sekundäre Antikörper.....	30
<b>Tabelle 16:</b> Zusammensetzung des Master-Mix.....	33
<b>Tabelle 17:</b> PCR-Bedingungen.....	33
<b>Tabelle 18:</b> Primerbedingungen.....	36
<b>Tabelle 19:</b> Master-Mix für HPRT.....	36
<b>Tabelle 20:</b> Reaktionsansatz für die Zielgene.....	37
<b>Tabelle 21:</b> PCR-Protokoll.....	37
<b>Tabelle 22:</b> Verdünnung der Antikörper.....	39
<b>Tabelle 23:</b> Aufteilung der Gruppen.....	40
<b>Tabelle 24:</b> Zusammenfassende Darstellung der Regulation der Zielgene.....	73

# **Geschlechtsspezifische Expression der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren $\alpha$ und $\gamma$ im Modell der salzinduzierten kardialen Hypertrophie**

Susanne Fischer, Berlin

## **Zusammenfassung**

Die klinische Relevanz der salzsensitiven Hypertonie ergibt sich aus der großen Anzahl der Betroffenen (ca. 50% der Bluthochdruckpatienten) und der ausgeprägten Manifestation von Endorganschäden.

Geschlechtsabhängige Unterschiede zugunsten weiblicher Individuen in der Entwicklung der kardialen Hypertrophie sind aus der Literatur bekannt.

Aufgrund der Schlüsselrolle der PPARs im kardialen Metabolismus erwarteten wir eine Entsprechung der bekannten geschlechtsspezifischen Unterschiede in der myokardialen PPAR-Expression.

Eine hypertrophieabhängige Regulation für PPAR $\alpha$  und für GLUT 4 im Rahmen der Stoffwechselumstellung ist bereits für andere Modelle bekannt und sollte im Modell der salzsensitiven Dahl-Ratte bestätigt werden.

Verwendet wurde linksventrikuläres Myokard männlicher und weiblicher salzsensitiver Dahl-Ratten nach einer 8-wöchigen Normaldiät (1% NaCl) bzw. Hochsalzdiät (4% NaCl) in Gruppen von je 8 Tieren. Zur Visualisierung der hypertrophieassoziierten Schädigung des Myokards wurden Gewebeschnitte zum Nachweis einer möglichen perivaskulären Fibrose angefertigt.

Verglichen mit der Kontrollgruppe konnte eine signifikante Herabregulation der PPAR $\alpha$ -Expression sowie eine paralleler Abfall der GLUT4-Expression im hypertrophen Myokard der Tiere unter Hochsalzdiät gezeigt werden. Es zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der PPAR $\alpha$ - oder GLUT4-Expression.

Im Vergleich zu den männlichen Tieren zeigte sich im Myokard der weiblichen eine signifikant geringere PPAR $\gamma$ -Expression. Eine diätabhängige Regulation der PPAR $\gamma$ -Expression konnte nicht nachgewiesen werden.

Von den untersuchten PPAR-Zielgenen wiesen der PPAR $\gamma$ -Cofaktor PGC1 $\alpha$  und die ACO in beiden Gruppen parallel zu PPAR $\gamma$  eine signifikant geringere mRNA-Expression in den weiblichen Tieren auf. Für die MCAD konnte auf mRNA-Ebene eine verminderte Expression in den männlichen Tieren gezeigt werden. Eine diätabhängige Regulation konnte für keines der untersuchten Zielgene nachgewiesen werden.

In den angefertigten histologischen Gewebeschnitten ließ sich ein deutlicher Trend zur vermehrten perivaskulären Fibrose erkennen.

Die Herabregulation von PPAR $\alpha$  im Rahmen der Stoffwechsellumstellung des hypertrophen Herzmuskels, sowie der parallele Abfall der GLUT4-Expression konnten unabhängig vom Geschlecht für die salzsensitive Dahl-Ratte bestätigt werden.

Die diätunabhängige Expression von PPAR $\gamma$  und den Zielgenen des Fettstoffwechsels könnte für eine fehlende Beteiligung von PPAR $\gamma$  an den hypertrophieassoziierten Stoffwechselveränderungen sprechen. Eine weitere Möglichkeit ist das Vorliegen eines zu frühen Stadiums der linksventrikulären Hypertrophie innerhalb des Studiendesigns.

Die signifikant geringere PPAR $\gamma$ -Expression im Myokard der weiblichen Dahl-Ratten gegenüber den männlichen Tieren unterstreicht die Annahme grundsätzlicher geschlechtsspezifischer Unterschiede im kardialen Energiestoffwechsel und bietet hinsichtlich des Einsatzes von PPAR-affektierenden Pharmacoons einen Ansatz für weiterführende Untersuchungen.

# **Sex-specific expression of Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor- $\alpha$ and $\gamma$ in a model of salt induced cardiac hypertrophy**

Susanne Fischer, Berlin

## **Abstract**

The clinical significance of salt-sensitive hypertension results from the great amount of people concerned (50% of patients with essential hypertension) and its strong manifestation of end organ damage. Genesis and development of myocardial hypertrophy (MH) and resulting heart failure show gender-related differences, i.e. a better metabolic situation in female patients.

Since PPARs are considered as key regulators of cardiac metabolism, we expected a gender-related myocardial PPAR expression.

A hypertrophy-related regulation for PPAR $\alpha$  and GLUT 4 expression within metabolic adaptation is already known in other models. The aim was to confirm this for the model of salt-sensitive Dahl rats.

We used left ventricular myocardium of male and female salt-sensitive Dahl rats after an 8-week regular diet (1% NaCl) as well as a high-salt diet (4% NaCl), each group consisting of 8 animals. To visualize the hypertrophy-associated myocardial damage, histological tissue sections were used to detect a possible perivascular fibrosis.

The myocardium of the high-salt diet groups showed in both sexes a down-regulation of the expression of PPAR $\alpha$  and an decreased expression of the glucose transporter GLUT 4. A sex-dependent regulation of the expression of PPAR $\alpha$  was not detected.

A significantly lower PPAR $\gamma$  expression could be observed in the myocardium of the female animals. A diet-dependent regulation of the expression of PPAR $\gamma$  was not detected. Of all observed PPAR target genes, the PPAR $\gamma$  cofactor PGC1 $\alpha$  and ACO in both groups showed a significantly lower mRNA expression in the female animals, coinciding with PPAR $\gamma$ -expression. A lower expression of MCAD at mRNA level was detected in the male animals. A diet-dependent regulation was not detected for any of the observed target genes.

The histological tissue sections revealed a clear trend towards increased perivascular fibrosis.

The down-regulation of PPAR $\alpha$  and the decrease of the expression of GLUT4 in the context of metabolic conversion in the hypertrophic heart muscle could be confirmed for the model of salt-sensitive Dahl rats.

Thus the diet-independent expression of PPAR $\gamma$  could be based on its lacking role in left ventricular hypertrophy. Or, within the experimental design it was too early to appear.

The significantly lower expression of PPAR $\gamma$  in the myocardium of the female Dahl-rats (compared to male ones) underlines the fundamental assumption of gender-related differences in cardiac energy metabolism and offers an approach for further investigation regarding the use of PPAR-affecting pharmacons.

# 1 Einleitung

## 1.1 Bedeutung des Bluthochdruckes und der Folgeerkrankungen in den Industrienationen

Bluthochdruck ist eine der häufigsten Ursachen eines vorzeitigen Todes. Etwa jeder dritte Mensch ist weltweit betroffen. Durch die verbesserte Therapie der letzten Jahre konnte in den Industrienationen eine Verbesserung erreicht werden. In den Entwicklungsländern ist hingegen ein Anstieg zu beobachten, hier sind bis zu 50% der Menschen betroffen<sup>1</sup>. Eine arterielle Hypertonie besteht, wenn mittels der Blutdruckmessung nach Riva-Rocci und Korotkoff der systolische Wert bei bzw. über 140 mmHg und der diastolische Wert bei bzw. über 90 mmHg liegen<sup>2</sup>. Ist die Hypertonie durch eine bestehende organische Grunderkrankung bedingt, liegt eine sekundäre Hypertonie vor. Kann keine zugrunde liegende Erkrankung festgestellt werden, wird von einer primären oder essentiellen Hypertonie gesprochen. Der Anteil der Patienten mit einer essentiellen Hypertonie beträgt ca. 90%<sup>3</sup>. Etwa 50% aller kardiovaskulären Ereignisse treten in Folge einer Hypertonie auf<sup>1</sup>.

Ursachen des Bluthochdrucks	
Primäre Hypertonie	90-95%
Nierenerkrankungen	3-5%
Medikamente	1%
Endokrinologische Erkrankungen	0,5%

**Tabelle 1: Ursachen des Bluthochdrucks.**

Quelle: "Leitfaden für Arzt-Patienten-Seminare" der Deutschen Hochdruckliga.

Als ursächlich für die essentielle Hypertonie wird ein multifaktorielles Geschehen diskutiert. Hierbei spielen die Erbanlagen des betroffenen Individuums und deren Interaktion mit anderen Risikofaktoren eine wichtige Rolle. Hierzu zählen u.a. Alter, männliches Geschlecht, Postmenopause, Kochsalzaufnahme, hohes Serumcholesterin, Insulinresistenz, Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, geringe körperliche Aktivität und Übergewicht<sup>4</sup>.

Bluthochdruck stellt einen Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar und ist die häufigste Ursache einer pathologischen kardialen Hypertrophie<sup>5</sup>.

### **1.1.1 Entstehung und Bedeutung der linksventrikulären Hypertrophie**

Die kardiale Hypertrophie, insbesondere die des linken Ventrikels, ist eine Hauptmanifestation der Endorganschäden im Rahmen einer arteriellen Hypertonie<sup>5</sup>. Die hypertonieinduzierte Drucküberlastung des linken Ventrikels führt zur Ausbildung einer ventrikulären Hypertrophie. Die Prävalenz der linksventrikulären Hypertrophie reicht von ca. 20% bei Patienten mit einem milden Bluthochdruck, bis zu 100% bei Patienten mit einer schweren Hypertonie<sup>4</sup>. Die Entwicklung der Hypertrophie ist initial eine Adaptation des Herzmuskels an die erhöhte Druckbelastung, wodurch die Herzfunktion zunächst konstant gehalten werden kann<sup>6</sup>. Die langfristige Drucküberlastung des linken Ventrikels führt jedoch zu einer funktionellen Verschlechterung und zu einem erhöhten Risiko für Herzrhythmusstörungen und einem Anstieg der kardiovaskulären Mortalität<sup>7</sup>. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass sich die Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie nicht immer proportional zur Höhe des Blutdruckes verhält<sup>8</sup>. So wurde ein erhöhter *cardiac-mass*-Index für normotensive Kinder und Erwachsene mit einem genetisch erhöhten Risiko für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie beschrieben<sup>9</sup>. Desweiteren sind eine Vielzahl weiterer Faktoren, wie beispielsweise neurohumorale Mechanismen, oxidativer Stress oder die genetische Prädisposition an der Pathogenese der linksventrikulären Hypertrophie beteiligt<sup>10</sup>.

Geschlechtsabhängige Unterschiede in Entwicklung, Verlauf und Ausprägung der kardialen Hypertrophie sind aus der Literatur bekannt. So konnte z.B. in einem Rattenmodell bereits sechs Wochen nach Aortenkonstriktion die Entwicklung einer dilatativen Hypertrophie und konsekutiven Herzinsuffizienz in männlichen Tieren beobachtet werden. Zum selben Zeitpunkt wiesen die weiblichen Tiere eine konzentrische Hypertrophie ohne Zeichen der Herzinsuffizienz auf<sup>11</sup>. In einem Mausmodell wurde nach Aortenkonstriktion die Entwicklung einer konzentrischen Herzhypertrophie in den weiblichen Tieren und einer exzentrischen Herzhypertrophie in den männlichen Tieren beobachtet<sup>12</sup>. In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass männliche Individuen eine stärkere Ausprägung der kardialen Hypertrophie aufwiesen als weibliche, auch unter Berücksichtigung des Körpergewichtes<sup>13</sup>.

### **1.1.2 Bedeutung der salzsensitiven Hypertonie**

Bluthochdruckpatienten weisen häufig weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren auf<sup>14</sup>. So lässt sich bei ca. 50% der Betroffenen eine Hypercholesterinämie und bei 20-40%



eine Hyperglykämie nachweisen. Die Anwesenheit mehrerer Risikofaktoren lässt das Risiko für hypertoniebedingte kardiovaskuläre Ereignisse massiv ansteigen<sup>2, 15</sup>.

Die salzsensitive Hypertonie ist ein relevanter Faktor bei der Behandlung des Bluthochdrucks, da sie besonders in den Industrienationen häufig auftritt. So sind beispielsweise 26% der normotensiven Bevölkerung salzsensitiv<sup>16</sup>. Unter den Bluthochdruckpatienten leiden bis zu 50% an einer salzsensitiven Hypertonie<sup>15, 17</sup>. Hierbei sind Patienten dunkler Hautfarbe häufiger betroffen als Weiße<sup>18</sup>. Bei Patienten mit essentieller Hypertonie gilt eine Salzsensitivität als unabhängiger kardialer Risikofaktor<sup>16</sup>. Auch blutdruckunabhängig konnte ein Zusammenhang zwischen Salzsensitivität und erhöhter Mortalität hergestellt werden<sup>16</sup>.

## **1.2 Die Dahl-Ratte als Modell der salzsensitiven Hypertonie**

In den 1950er Jahren untersuchten Meneely und Ball die Auswirkungen einer stark kochsalzhaltigen Diät auf den Blutdruck von Spargue-Dawley-Ratten. Einige der Ratten zeigten einen Anstieg des Blutdruckes, welcher eine lineare Abhängigkeit zu der aufgenommenen Menge an Kochsalz aufwies; andere Ratten zeigten keine Reaktion auf die HS-Diät<sup>19</sup>. Auch Lewis K. Dahl hatte sich bereits in den 1950er Jahren mit den Auswirkungen einer kochsalzhaltigen Ernährung beim Menschen beschäftigt und wandte sich Anfang der 1960er Jahre Untersuchungen an Ratten zu. Basierend auf den Arbeiten von Meneely und Ball gelang es Dahl, salzsensitive und salzresistente Spargue-Dawley-Ratten-Linien zunächst über drei Generationen zu selektieren<sup>20</sup>.

Unter der weiterführenden Arbeit von John Rapp erfolgte die Entwicklung der selektierten Linien durch Geschwisterverpaarung über 20 Generationen zu reinen Inzuchtstämmen, bei welchen von einer nahezu 100%-igen Homozygotie ausgegangen werden kann. Dies sind die heute gebräuchlichen salzsensitiven und salzresistenten Dahl-Stämme. Die salzresistenten Tiere weisen unabhängig vom Salzgehalt der Nahrung normale Blutdruckwerte zwischen 120 und 140 mmHg auf. Die salzsensitiven Dahl-Ratten entwickeln hingegen auch unter Normaldiät (0,4% NaCl) einen erhöhten Blutdruck von 170-180 mmHg, der unter HS-Diät (8% NaCl) auf Werte über 200 mmHg ansteigt<sup>21</sup>.

Die Dahl/S-Ratten und z.T. auch die Dahl/R-Ratten weisen jedoch noch weitere Störungen auf, die sich in salzabhängige und salzunabhängige Defekte aufteilen lassen.

Infolge einer salzreichen Diät und der damit einhergehenden massiven Hypertonie kommt es in den Nieren der salzsensitiven Dahl-Ratten zu einer ausgeprägten glomerulären Sklerose und Nekrosenbildung, zusätzlich wird die Plasmareninfreisetzung supprimiert<sup>22</sup>. Nach einer HS-Diät zeigte sich in den Nieren der salzsensitiven Dahl/S-Tiere zudem ein signifikanter Anstieg des renalen nukleären Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, sowie eine massive Infiltration mit Monozyten bzw. Makrophagen<sup>23</sup>. Kreuztransplantationsstudien mit Dahl/S- und Dahl/R-Tieren konnten zeigen, dass die Salzsensitivität über die Nieren vermittelt wird<sup>24</sup>. In einer aktuellen Arbeit zeigte sich eine Abschwächung der Salzsensitivität von Dahl-Ratten nach Transplantation mesenchymaler Stammzellen in das Nierenmark, was für eine renalen Stammzelldefekt als Ursache der Salzsensitivität hinweist<sup>25</sup>.

Der Blutdruckanstieg weist in diesem Modell einen Geschlechterunterschied auf. Bereits 1975 beschrieben Dahl *et al.* bei männlichen Dahl/S-Ratten einen schnelleren und massiveren Anstieg des Blutdruckes unter HS-Diät als bei den weiblichen Tieren desselben Stammes. Studien mit gonadektomierten Tieren beiderlei Geschlechts legen nahe, dass es sich um eine protektive Wirkung der weiblichen Sexualhormone handelte<sup>26</sup>.

In verschiedenen Arbeiten konnte die günstigere Hypertonieentwicklung als Östrogeneffekt bestätigt werden, da sich bei den Untersuchungen an ovariectomierten Tieren der Blutdruck ebenso wie bei den männlichen Tieren verhielt<sup>27</sup>. Erhielten die ovariectomierten (OVX-)Tiere hingegen  $\beta$ -Estradiol zeigte sich kein Blutdruckanstieg gegenüber den nicht operierten weiblichen Tieren<sup>28</sup>. Die Supprimierung des salzabhängigen und salzunabhängigen Blutdruckanstiegs wird in diesem Modell u. a. einer hormonell bedingten Verbesserung der Salzexkretion über die Nieren zugeschrieben<sup>29</sup>.

Im Vergleich zu den weiblichen Tieren wurde in den Nieren der männlichen Tiere der Dahl/R- und der Dahl/S-Stämme eine erhöhte Dichte der  $\alpha$ 2-Adrenorezeptoren nachgewiesen. Dies legt die Vermutung nahe, dass der beobachtete Geschlechtsunterschied in der Blutdruckentwicklung kein salzabhängiger Effekt ist, sondern dass der geringere Blutdruckanstieg Folge einer verminderten Sympathikusaktivität ist, welche auf der geringeren  $\alpha$ 2-Rezeptordichte in den Nieren beruht. Auch konnte gezeigt werden, dass die unterschiedliche Rezeptordichte keine Folge der geschlechtsspezifischen Unterschiede im Blutdruck ist, da diese Unterschiede auch bestehen, wenn der Blutdruck ausgeglichen ist<sup>30</sup>. Weiterführende

Studien zeigen, dass die Aktivierung der  $\alpha_2$ -Rezeptoren in der Niere die Reninfreisetzung hemmt und die Natriumresorption fördert<sup>31</sup>.

Obgleich die Hypertonie in diesem Modell nicht einer erhöhten Reninfreisetzung zuzuschreiben ist, ergab sich unter der Behandlung mit ACE-Hemmern oder Angiotensinogen-II-Rezeptor-Antagonisten eine Verbesserung der kardialen und renalen Funktion<sup>32</sup>. Konträr zu den geringen Plasmoreninwerten zeigten sich in den Dahl/S-Ratten massiv erhöhte Gewebs-Angiotensinogenwerte, zudem konnten durch die Behandlung mit ACE-Hemmern fibrotische Veränderungen vollständig und eine kardiale Hypertrophie teilweise verhindert werden<sup>33</sup>.

Oxidativer Stress führt in Dahl/S-Ratten zu einer deutlichen Stimulation der renalen Entzündung. Eine Therapie mit Antioxidantien (Vitamin C, Vitamin E) führt zu einer Abnahme der renalen Entzündungsreaktion und des Blutdruckes sowie zu einer Verbesserung der Nierenfunktion<sup>34</sup>.

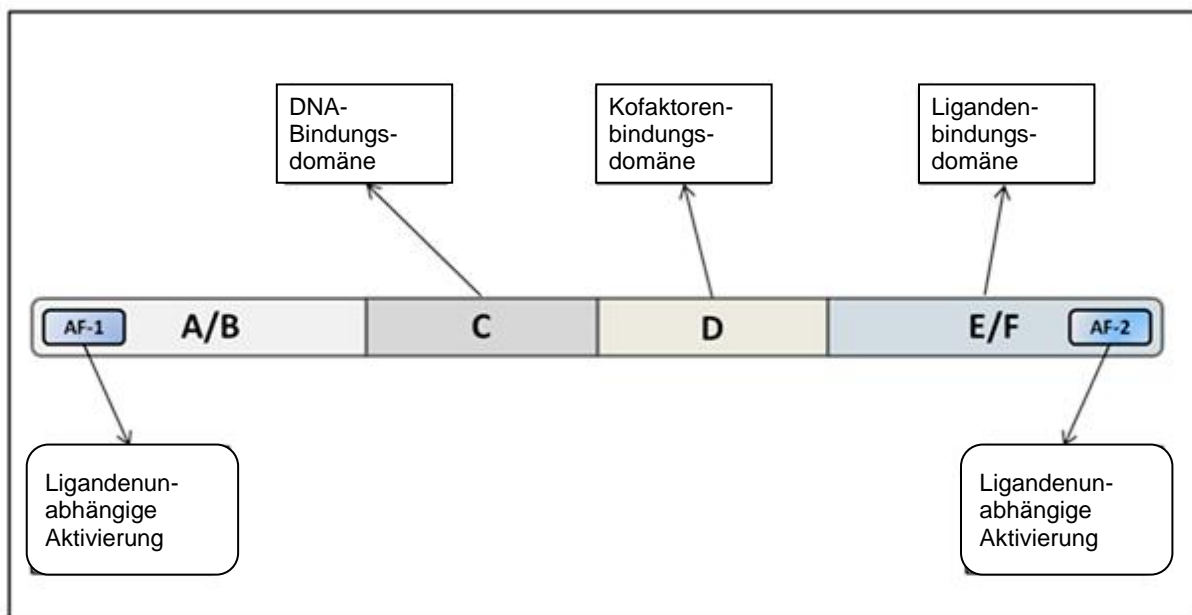
Unter salzreicher Diät entwickelt die Dahl/S-Ratte eine progrediente linksventrikuläre Hypertrophie, welche von einer kompensierten letztendlich in eine dekompensierte Herzinsuffizienz übergeht<sup>35</sup>. Bei der kardialen Hypertrophie in diesem Modell konnten geschlechtsspezifische Unterschiede nachgewiesen werden, so wurde bei den weiblichen Herzen eine ausgeprägte konzentrische Hypertrophie beobachtet, während die männlichen Herzen eine eher exzentrische Hypertrophie zeigten<sup>36</sup>.

Salzsensitive Dahl/S-Ratten haben im Vergleich zum Wildtyp, der Spargue-Dawley-Ratte (SDR) und zu den spontan-hypertensiven-Ratten (SHR) signifikant höhere Plasmainsulin- und Triglyceridwerte<sup>37, 38</sup>. Zusätzlich weisen sie eine erhöhte Insulinresistenz auf, welche diät- und blutdruckunabhängig ist und bereits vor einem Anstieg des Blutdrucks besteht<sup>39</sup>.

Neben der Bedeutsamkeit des Dahl-Modells für die Erforschung der salzsensitiven Hypertonie, deckt sich das Krankheitsbild der Dahl/S-Ratten partiell mit dem metabolischen Syndrom des Menschen. Das Metabolische Syndrom, auch als Syndrom-X bekannt, ist durch eine Symptom-Konstellation aus Insulinresistenz, Dyslipidämie, Adipositas und Bluthochdruck charakterisiert<sup>40</sup>. Die Dahl/S-Ratten weisen mit arteriellem Bluthochdruck, Insulinresistenz und Dyslipidämie, partiell ähnliche Symptome wie das humane Syndrom-X auf<sup>41</sup>. In der Humanmedizin hat sich der Einsatz bestimmter PPAR $\gamma$ -Agonisten, der sogenannten Thiazolidinediones, zur Behandlung des Syndrom-X als geeignet erwiesen<sup>42</sup>.

### 1.3 Peroxisomen-Proliferator aktivierte Rezeptoren

Die Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptoren (PPARs) wurden zum ersten Mal in den 1990er Jahren in Nagetieren beschrieben und nach ihrer Fähigkeit, bei Aktivierung die Proliferation von Peroxisomen zu induzieren, benannt<sup>43</sup>. Die PPARs sind Transkriptionsfaktoren, die zur Superfamilie der liganden-aktivierten Kernrezeptoren gehören<sup>43</sup> und die Gruppe C der Unterfamilie 1 (NR1C) der nukleären Hormonrezeptoren bilden. Als Transkriptionsfaktoren regulieren sie eine Vielzahl von Genen des Fettsäure- und Glukosestoffwechsels<sup>44, 45</sup>. Derzeit sind drei Isoformen bekannt, welche von unterschiedlichen Genen kodiert werden: PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2) und PPAR $\gamma$  (NR1C3)<sup>46</sup>. Alle Isoformen konnten, in unterschiedlicher Ausprägung, in Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Die einzelnen Isoformen werden jeweils durch ein eigenes Gen kodiert und weisen ein spezifisches Expressionsmuster auf. Alle drei PPAR-Isoformen zeigen funktionell und strukturell einen ähnlichen Aufbau<sup>47, 48</sup>.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des PPAR-Gens.**

Die N-terminale A/B-Domäne am Ende beinhaltet eine ligandenunabhängige Aktivierung (AF-1). C stellt die DNA-bindende Domäne dar. Die mit D gekennzeichnete Region fungiert als Bindungsdomäne für Kofaktoren. E/F bezeichnet die ligandenspezifische Domäne mit der darin enthaltenen AF-2-Region, welche ligandenabhängig die Aktivierung der Kofaktoren und Ablösung der Korepressoren fördert.

Abbildung verändert nach Kota BP et al.<sup>46</sup> und Barrera G et al.<sup>49</sup>.

Das PPAR $\gamma$ -Gen stellt eine Besonderheit dar, da es Promotersequenzen für drei Isoformen, PPAR $\gamma$ -1, PPAR $\gamma$ -2 und PPAR $\gamma$ -3 beinhaltet. Die RNA-Transkripte von PPAR $\gamma$ -1 und PPAR $\gamma$ -3 ergeben dabei PPAR $\gamma$ -1 als identisches Protein<sup>50</sup>. PPAR $\gamma$ -2

konnte bisher ausschließlich im Fettgewebe und in geringen Mengen in der Skelettmuskulatur nachgewiesen werden, PPAR $\gamma$ -1 wird hingegen ubiquitär exprimiert<sup>51, 52</sup>. Da für die vorliegende Arbeit Herzgewebe untersucht wurde, in welchem PPAR $\gamma$ -2 nicht exprimiert wird, steht die Bezeichnung PPAR $\gamma$  im Folgenden für PPAR $\gamma$ -1.

### 1.3.1 PPAR $\alpha$

PPAR $\alpha$  ist einer der primären Regulatoren des Fettsäuremetabolismus in Geweben mit hohen oxidativen Stoffwechselraten, wie dem Herzen, der Leber, der Niere, der Skelettmuskulatur und dem braunen Fettgewebe<sup>45, 53</sup>. Besonders hoch ist die Expression von PPAR $\alpha$  in Hepatozyten, Kardiomyozyten, Enterozyten und den Zellen der proximalen Nierentubuli<sup>54</sup>.

PPAR $\alpha$  reguliert eine Vielzahl von Zielgenen, welche an der Lipidaufnahme und der  $\beta$ -Oxidation beteiligt sind<sup>55</sup>. In Untersuchungen an PPAR $\alpha$ -defizienten Mäusen konnte eine massive Störung des Fettstoffwechsels mit intrazellulärer Lipidakkumulation und kardialer Lipotoxizität beobachtet werden. Bedingt durch die Störungen in der Fettsäureaufnahme und -oxydation zeigte sich ein Anstieg der Glukoseoxydation<sup>13, 56</sup>. Die Verringerung der kardialen Expression von PPAR $\alpha$  wird als essentiell für die Umstellung des kardialen Energiestoffwechsels in der hypertoniebedingten Herzhypertrophie erachtet<sup>57</sup>. Eine pharmakologisch induzierte PPAR $\alpha$ -Überexpression im ischämisch vorgeschädigten Herzmuskel führte zu einer irreversiblen Schädigung des Myokards<sup>58</sup>.

Unter der Therapie mit PPAR $\alpha$ -Agonisten konnten antiinflammatorische Effekte in vaskulären Zellen beobachtet werden, wie eine Inhibition der COX2 über eine Unterdrückung des NF-kB Signales. Zudem zeigte sich eine Reduktion der Plasmaspiegel von IL-6<sup>59</sup>. Bei der Therapie mit PPAR $\alpha$ -Agonisten steht die Behandlung der Dyslipidämie im Vordergrund. Die gebräuchlichsten PPAR $\alpha$ -Agonisten sind die Fibrate, sie werden vornehmlich zur Behandlung als Therapeutika eingesetzt, da sie zu einer deutlichen Senkung des TG- und VLDL-Spiegels sowie zu einem Anstieg des HDL-Spiegels führen und somit eine besonders positive Wirkung auf das kardiovaskuläre System haben<sup>60</sup>.

### 1.3.2 PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  konnte 1993 erstmals von Tontonoz *et al.* als Transkriptionsfaktor in Adipozyten identifiziert werden<sup>61</sup>. Obgleich PPAR $\gamma$  im Herzmuskel verglichen mit

PPAR $\alpha$  und PPAR $\beta/\delta$  gering exprimiert ist<sup>48</sup>, weisen verschiedenste Forschungsergebnisse auf eine Schlüsselrolle im kardiovaskulären Metabolismus hin.

In verschiedenen *knock-out*- und Geninaktivierungs-Modellen konnte der Einfluss von PPAR $\gamma$  auf die embryonale Herzentwicklung, Adipozytendifferenzierung<sup>62</sup>, die Leberfunktion und die Insulinresistenz<sup>42, 63</sup>, gezeigt werden. Die Bedeutung von PPAR $\gamma$  für die Hypertrophie und Inflammation im kardiovaskulären System wurde v.a. von den Effekten der PPAR $\gamma$ -Agonisten, insbesondere der Thiazolidinediones (TZD), abgeleitet. So zeigen sich unter der Behandlung mit TZDs antiinflammatorische und antifibrotische Effekte sowie eine günstige Beeinflussung der Artherosklerose, der vaskulären Inflammation und der Herzinsuffizienz<sup>64</sup>.

Eine Aktivierung von PPAR $\gamma$  mittels dem TZD Pioglitazone reduzierte im Mausmodell die Länge der Kardiomyozyten unabhängig vom Blutdruck<sup>65</sup>. Zudem wiesen Untersuchungen an PPAR $\gamma$ -*knock-out*-Modellen auf einen inhibierenden Einfluss einer erhöhten kardialen PPAR $\gamma$ -Expression auf die myokardiale Hypertrophie hin<sup>47</sup>.

### **1.3.3 Liganden**

Die Aktivierung der PPARs erfolgt über eine heterogene Gruppe von endogenen und exogenen Liganden<sup>66</sup>. Aktivierende PPAR-Liganden sind semiselektiv für die einzelnen PPAR-Subtypen. Die jeweilige Selektivität ist von der Konzentration des Liganden und dem Zelltyp abhängig.

In der vorliegenden Arbeit werden explizit die Isoformen PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  untersucht.

### **1.3.4 Endogene Liganden**

Die endogenen PPAR-Liganden sind vornehmlich ungesättigte Fettsäuren und deren Metabolite. Gesättigte Fettsäuren gelten generell als schwache PPAR-Liganden<sup>67</sup>. In der folgenden Tabelle sind ausgewählte endogene PPAR-Liganden, nach der PPAR-Isoform geordnet, aufgeführt, welche hauptsächlich von dem jeweiligen Liganden aktiviert werden.

PPAR $\alpha$	PPAR $\gamma$
Palmitinsäure	Linolensäure
Stearinsäure	Arachidonsäure
Palmitoleinsäure	15d-PGJ2
Oelsäure	9-Hode
Linolensäure	13-Hode
Archidonsäure	15-HETE
Eikosapentaensäure	

**Tabelle 2: Auswahl endogener PPAR-Liganden.**

Die Liganden sind nach den PPAR-Isoformen geordnet, welche sie hauptsächlich aktivieren.  
Tabelle verändert nach Kota BP et al.<sup>46</sup>.

### 1.3.5 Exogene Liganden

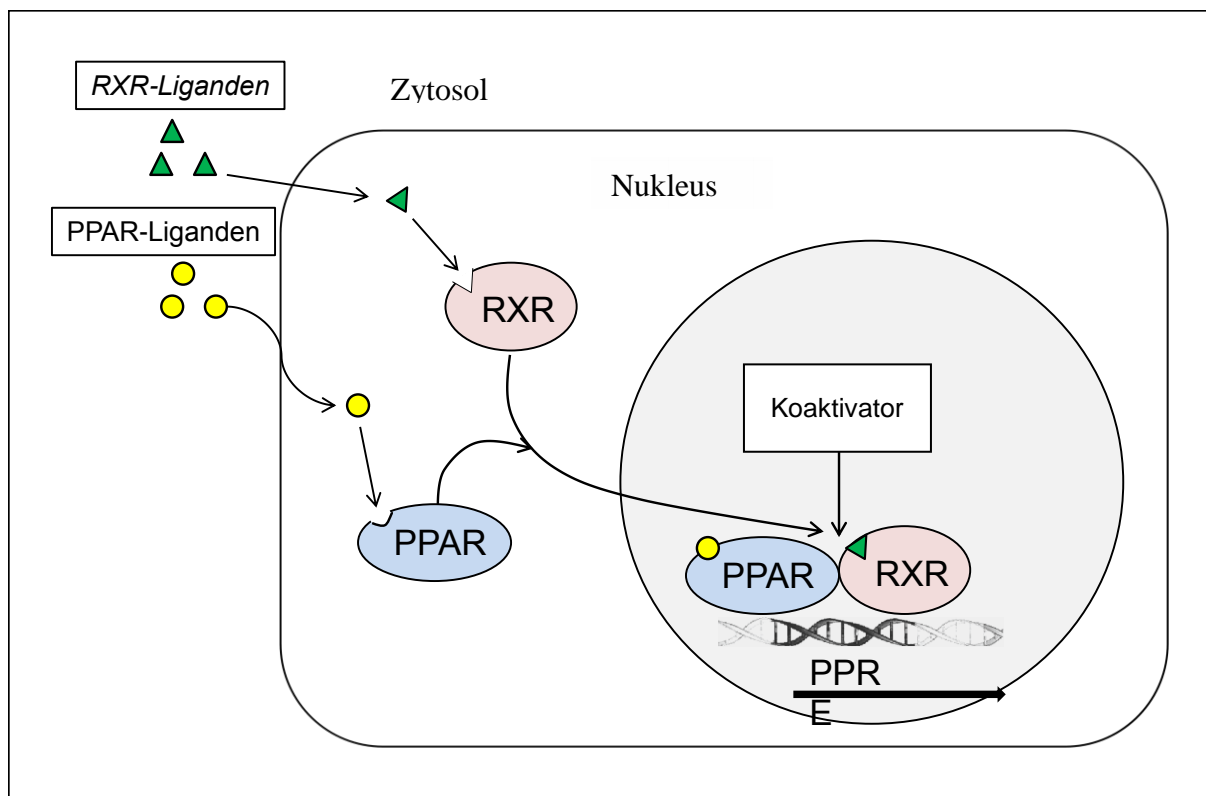
Synthetische PPAR-Liganden weisen pharmakologische Aktivitäten auf und werden daher u.a. als Therapeutika eingesetzt. Als bedeutendste Vertreter der PPAR $\alpha$ -Agonisten sind hierbei die Fibrate zu nennen, welche besonders positive Effekte in der Behandlung der Dyslipidämie zeigen<sup>60</sup>. Die wichtigsten therapeutisch eingesetzten PPAR $\gamma$ -Agonisten sind die Thiazolidinediones (TZD), welche als Insulinsensitizer erfolgreich zur Behandlung des Diabetes-mellitus-Typ-2 eingesetzt werden<sup>68</sup>. Auch verschiedene Wirkstoffe aus der Klasse der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAIDs), wie beispielsweise Ibuprofen, Indomethacin und Diclofenac können an PPAR $\gamma$  binden und in Abhängigkeit von der Konzentration als Agonisten bzw. Antagonisten wirken<sup>69, 70</sup>. In der folgenden Tabelle ist eine Auswahl verschiedener PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$ -Agonisten aufgeführt.

PPAR $\alpha$	PPAR $\gamma$
WY-14.643	TZDs
Clofibrate	JTT-501
Gemfibrozil	GW7845
Nafenopin	CDDO
Bezafibrat	BADGE (Antagonist)
Fenofibrat	LG-100641 (Antagonist)

**Tabelle 3: Auswahl exogener PPAR-Liganden.** Tabelle in Anlehnung an Kota BP et al.<sup>46</sup>

### 1.3.6 Ligandenabhängige Aktivierung des PPAR-Rezeptors

Als Folge der Aktivierung durch einen Liganden im Zytosol kommt es zu einer Dimerisierung von PPAR mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR), der Rekrutierung von Koaktivatoren und der Lösung von Korepressoren. Der so entstandene Multimolekül-Komplex, bestehend aus PPAR, PPAR-Ligand, RXR, RXR-Ligand und Koaktivatoren, bindet nun im Kern an das PPAR-response-element (PPRE) der DNA-Sequenz in der Promotorregion des Zielgens<sup>49</sup>.



**Abb. 2: Mechanismus der PPAR-Aktivierung.**

Die Aktivierung des PPAR-Rezeptors führt zu einer Translokation vom Zytosol in den Nucleus und einer Dimerisation mit dem ebenfalls ligandenaktivierten RX-Rezeptor. Dieser Molekülkomplex bindet anschließend gemeinsam mit einem Koaktivator an das PPRE und leitet so die Transkription des Zielgens ein. In Anlehnung an *Bishop-Bailey D<sup>71</sup>*, *Kota BP et al.<sup>46</sup>*, *Barrera G et al.<sup>49</sup>*.

## 1.4 PPAR-Zielgene

Die PPAR-Zielgene sind insbesondere an der Regulation des Fettsäure-, Glukose- und Entzündungsstoffwechsels beteiligt. Zusätzlich beeinflussen sie die zelluläre Differenzierung und das zelluläre Wachstum<sup>72</sup>.

Die vorliegende Arbeit untersucht eine Auswahl von PPAR-Zielgenen, welche repräsentativ für die charakteristischen, PPAR-beeinflussten Stoffwechselwege stehen.



Fettstoffwechsel	Glukosestoffwechsel	Inflammation	Fibrose
ACO	GLUT 1	COX2	CTGF
MCAD	GLUT 4		
CD 36			

**Tabelle 4: Auswahl der untersuchten Zielgene von PPAR $\alpha$  und  $\gamma$ .**

### 1.4.1 Zielgene des Fettstoffwechsels

Die Zielgene werden z.T. von unterschiedlichen PPAR-Subtypen reguliert. Sowohl PPAR $\alpha$  als auch PPAR $\gamma$  regulieren als Transkriptionsfaktoren die Zielgene CD36 und MCAD<sup>73</sup>, wobei die Substrate der entsprechenden Zielgene als Liganden für PPAR  $\alpha/\gamma$  dienen. Die Regulation der peroxisomalen ACO erfolgt sowohl über PPAR $\alpha$  als auch über PPAR $\gamma$ <sup>74</sup>.

#### 1.4.1.1 Acyl-CoA-Oxidase (ACO)

Im ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der peroxisomalen und mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation werden langkettige Fettsäure-Acyl-CoA Substrate zu trans-Enoyl-CoA oxidiert. Katalysiert wird diese Reaktion durch die peroxisomale Acyl-CoA-Oxidase (ACO), einem FAD-abhängigen Flavoprotein. Die ACO kommt in drei verschiedenen Isoformen vor, welche durch alternatives *Splicing* des entsprechenden Gens entstehen<sup>75</sup>.

Welcher der PPARs für die Regulation der ACO verantwortlich ist, wird in der Literatur unterschiedlich dargestellt. So konnte in einem Tiermodell für Druckbelastung des linken Ventrikels in der Maus tendenziell eine PPAR $\alpha$  abhängige Regulation der ACO gezeigt werden<sup>76</sup>. Andererseits wiesen die Enzyme der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation im Herzen bei PPAR $\alpha$ -*knock-out*-Mäusen keine Beeinflussung auf, ganz im Gegensatz zu denen der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation. Dieses Ergebnis spricht demnach gegen eine PPAR $\alpha$ -abhängige Regulation der ACO in der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation<sup>74</sup>.

#### 1.4.1.2 Medium-Chain-Acyl-Dehydrogenase (MCAD)

Die Medium-Chain-Acyl-Dehydrogenase (MCAD) ist ein Flavoenzym, welches den initialen Schritt des Abbaus von Fettsäuren mittlerer Länge im Rahmen der mitochondrialen Fettsäureoxidation katalysiert<sup>77</sup>.

Die Substrate der MCAD umfassen mittellange (6C-12C) Acyl-CoA-Thioester, welche per Diffusion in das Mitochondrium gelangen und aus der mitochondrialen Oxidation gesättigter und ungesättigter langer Fettsäuren hervorgehen oder der peroxysomalen Oxidation von langen Fettsäuren entstammen.

Die Expression der MCAD wird über das Substratangebot und den zellulären Energiebedarf reguliert, hier spielen die PPARs als Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle, wobei u.a. die Substrate der MCAD als PPAR-Liganden die Expression der MCAD via PPAR initiieren<sup>73</sup>. Insbesondere in Geweben mit hohem Energiebedarf wie der Herzmuskulatur, der Leber, der Skelettmuskulatur und den Nieren zeigt sich eine hohe Expression der MCAD. In Kardiomyozyten und Hepatozyten ist ein deutlicher Anstieg der MCAD-Expression im Zusammenhang mit dem postnatalen Anstieg der Fettsäureoxidation zu beobachten<sup>78</sup>. Ein Anstieg der MCAD-Expression wird ebenfalls während einer Fastenperiode beobachtet, wenn der zelluläre Energiebedarf hauptsächlich über die Fettsäureoxidation gedeckt wird<sup>79</sup>.

#### **1.4.1.3 Cluster of Differentiation 36 (CD36)**

Der Cluster-of-Differentiation-36-Rezeptor (CD36) zählt zu den Scavenger-Rezeptoren der Klasse B<sup>80</sup>. Das humane CD36-Protein hat eine Länge von 506 Aminosäuren und ist ein großes membranständiges Protein, welches aus zwei Transmembrandomänen und einer großen (403 Aminosäuren), stark glycolisierten, extrazellulären Schleife besteht<sup>81</sup>. 1993 wurde es von Endemann als Scavengerrezeptor identifiziert<sup>82</sup>. Es handelt sich um ein 88kDa großes Protein, welches u.a. oxidiertes LDL<sup>83</sup>, unmodifizierte Lipoproteine und langkettige Fettsäuren bindet. CD36 wird v.a. auf Monozyten und Makrophagen, aber auch auf Fett-, Herzmuskel- und Muskelzellen, sowie auf Thrombozyten, Brustdrüsenepithel und mikrovaskulärem Endothel exprimiert<sup>84</sup>.

Die Expression von CD36 wird u.a. über den Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  reguliert<sup>85</sup> und ist u.a. am Cholesterinmetabolismus beteiligt. TGF- $\beta$ 1 und IFN- $\gamma$  führen zu einer Herabregulation von CD36, wohingegen oxLDL via PPAR $\gamma$  zu einer Hochregulation von CD36 führen<sup>86, 87</sup>. Zudem spielt CD36 bei der Regulation der Angiogenese und dem Abbau apoptotischer Zellen eine Rolle. In Adipozyten, Muskelzellen und Herzmuskelzellen ist CD36 am Transport langkettiger Fettsäuren sowie an der Lipoprotein- und Lipidhomöostase beteiligt<sup>88</sup>.

## 1.4.2 Weitere Zielgene

### 1.4.2.1 PPAR $\gamma$ -Koaktivator 1 alpha (PGC1 $\alpha$ )

Ein Transkriptionskoaktivator ist definiert als ein Protein oder ein Proteinkomplex, welcher per Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor die Wahrscheinlichkeit eines Gens erhöht, transkribiert zu werden, ohne selbst an die DNA zu binden<sup>89</sup>.

Der PPAR-Koaktivator 1 alpha (PGC1 $\alpha$ ) ist ein Transkriptionskoaktivator, der mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren in diversen Stoffwechselprozessen interagiert. Hierzu gehören u.a. die Differenzierung des braunen Fettgewebes, die mitochondriale Biogenese, sowie der Fettsäure- und der Glukosestoffwechsel. PGC1 $\alpha$  kann als Koaktivator mit allen PPAR-Isoformen interagieren<sup>90, 91</sup>.

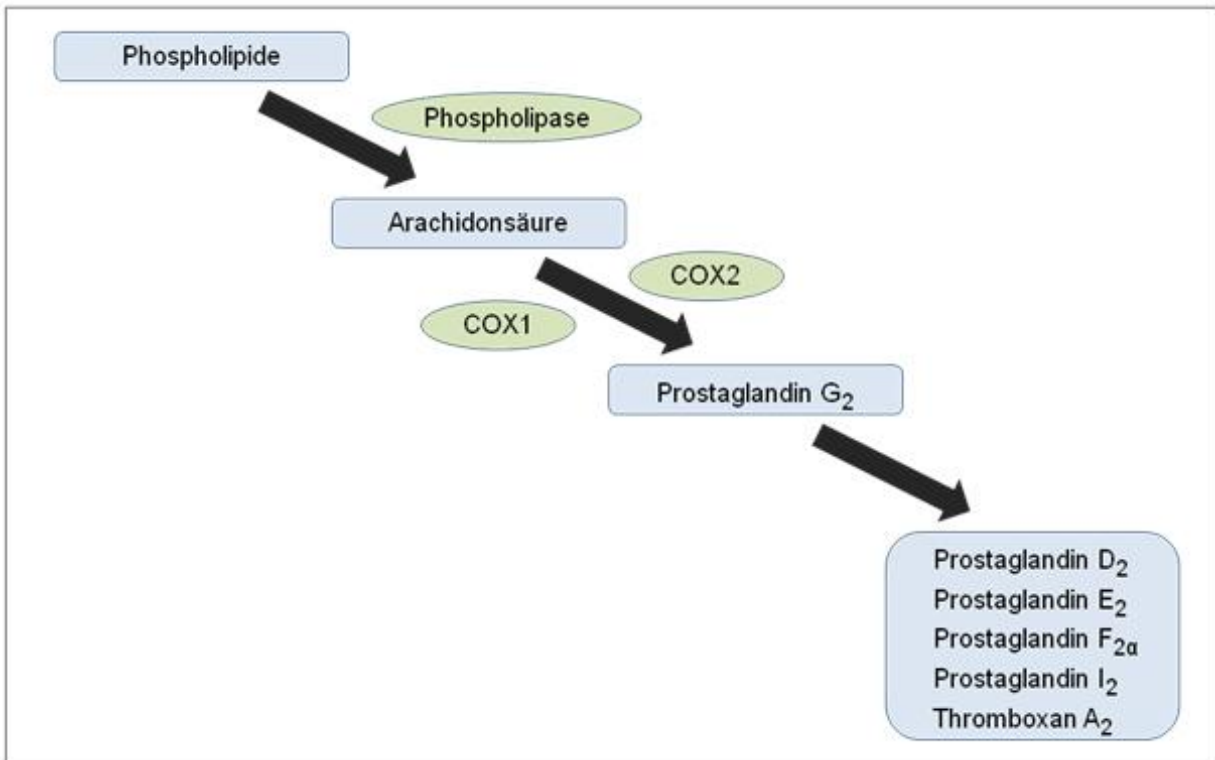
### 1.4.2.2 Connective tissue growth factor (CTGF)

Der *Connective tissue growth factor* (CTGF) ist ein cystinreiches Protein mit einem Gewicht von 36-38 kDa und wurde 1991 zum ersten Mal beschrieben<sup>92</sup>. Es ist im Rahmen regenerativer und fibrotischer Umbauvorgänge sowie während der Embryonalentwicklung nachweisbar<sup>93</sup>. In Zellkulturen konnte nachgewiesen werden, dass CTGF die Proliferation von Fibroblasten und die Produktion extrazellulärer Matrixproteine stimuliert<sup>94</sup>.

Die kardiale Fibrose spielt eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Entwicklung einer kardialen Dysfunktion, sowohl im Rahmen einer ischämischen Schädigung des Herzmuskels als auch im Rahmen einer hypertensiven kardialen Belastung<sup>95, 96</sup>. In der Literatur wird dem CTGF eine zentrale Rolle hinsichtlich der kardialen Fibroseentwicklung zugeschrieben<sup>97</sup>, wohingegen Untersuchungen an transgenen Mäusen und Ratten mit einer kardiomyozytenspezifischen CTGF-Überexpression gegen eine Induktion der kardialen Fibrose durch CTGF selbst sprechen<sup>96</sup>. Zudem ist bekannt, dass eine PPAR $\gamma$ -Aktivierung über verschiedene Stoffwechselwege zu einer Reduktion der CTGF-Expression führen kann<sup>98</sup>.

### 1.4.2.3 Cyclooxygenase-2 COX2

Die Cyclooxygenase-2 (COX2) ist ein intrazelluläres Protein, welches die Biosynthese von Arachidonsäure in Prostaglandin G2 (PGG2) katalysiert<sup>99</sup>. Mit Hilfe spezifischer Isomerasen werden aus Prostaglandin G2 die Prostaglandine PGE2, PGF2 $\alpha$ , PGD2, PGI2, sowie Thromboxan A2 synthetisiert<sup>99</sup>. Diese sind essentiell an der der Thrombozytenaggregation<sup>100</sup>, der Nierenfunktion und der Magenfunktion beteiligt<sup>101, 102</sup> und spielen des weiteren eine wesentliche Rolle in neoplastischen und entzündlichen Prozessen<sup>99</sup>.



**Abb. 3: Synthese der Prostaglandine.**

In Anlehnung an *Davies et al. 2002*<sup>103</sup>.

Es sind drei Isoformen der Cyclooxygenase bekannt, COX1, COX2 und COX-3<sup>104</sup>. Die COX1 ist in nahezu allen Geweben konstitutiv exprimiert<sup>99</sup>. Die COX2 wird in entzündlichen und neoplastischen Geweben über Zytokine, Onkogene und Wachstumsfaktoren induziert<sup>105</sup>.

PPAR $\gamma$ -Agonisten können zu einer Inhibierung der COX2-Expression u.a. in Endothelzellen führen<sup>106</sup>. PPAR $\alpha$ -Agonisten zeigen hingegen eine Inhibition der COX2 über eine Unterdrückung des NF- $\kappa$ B Signales in vaskulären Zellen<sup>59</sup>.

## 1.5 Glukosetransporter

Um eine Aussage über die Beeinflussung des kardialen Glukosestoffwechsels der Kardiomyozyten treffen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 untersucht. Da die Plasmamembran für Glukose impermeabel ist, sind spezielle Transportproteine erforderlich. Glukosetransporter konnten in allen Geweben identifiziert werden. Derzeit sind 14 unterschiedliche Glukosetransporter bekannt. Es handelt sich hierbei um transmembranständige Proteine, welche den Transport der Glukose über die Plasmamembran gewährleisten<sup>77</sup>. Für die basale Glukoseversorgung der Zelle sorgt

vornehmlich der insulinunabhängige Glukosetransporter GLUT1. GLUT1 ist ubiquitär exprimiert und kommt sowohl in fetalen als auch in adulten Geweben vor<sup>107</sup>.

In der Skelettmuskulatur, der Herzmuskulatur und dem Fettgewebe steht die Glukoseaufnahme unter hormoneller Kontrolle<sup>108</sup>. Der insulinabhängige Glukosetransporter GLUT4 kommt ausschließlich in diesen Geweben vor<sup>109</sup>. Er ist sowohl in der Plasmamembran als auch inaktiv in intrazellulären Vesikeln lokalisiert. Bei einem Anstieg des Plasmainsulinspiegels werden die intrazellulären GLUT4 in die Plasmamembran transloziert und können so eine enorme Steigerung der Glukoseaufnahme bewirken<sup>77, 110</sup>.

Zudem zeigt sich ein Steigerung der GLUT4-Expression in Herzmuskelzellen während der Hypertrophieentwicklung im Rahmen des Energiesubstratwechsels von Fettsäuren auf Glukose. Anstelle der Fettsäureoxidation, welche im gesunden Herzen hauptsächlich die Energieversorgung bestreitet, kann bei oxidativem Stress die Glukoseoxidation<sup>13, 111</sup>.

## **1.6 Wahl des Tiermodells und Relevanz des Themas**

Wie bereits oben beschrieben, weisen die Dahl/S-Ratten diverse Stoffwechselstörungen auf. Neben der salzabhängigen Hypertonie existieren auch salzunabhängige Störungen. Salzabhängig zeigen die Tiere massive Endorganschäden, auf zellulärer Ebene eine verstärkte Inflammation und erhöhten oxydativen Stress. Salzunabhängig wurden Dyslipidämie, zelluläre Insulinresistenz und Hyperinsulinämie beobachtet.

Bei allen genannten Stoffwechselstörungen können Verbindungen zu PPAR $\gamma$  hergestellt werden. PPAR $\gamma$  ist als Transkriptionsfaktor ein wichtiger Regulator der zellulären Inflammation<sup>64</sup>. Zudem schützt PPAR $\gamma$  Kardiomyozyten und andere Zelltypen vor oxydativem Stress. Die renale Salzabsorption über epitheliale Natriumkanäle (ENaC) in den Tubuluszellen ist PPAR $\gamma$ -reguliert<sup>112</sup>. Unter der Therapie mit PPAR $\gamma$ -Agonisten wurden eine Blutdrucksenkung, eine Verbesserung der vaskulären Funktion, eine Verbesserung der zellulären Insulinsensitivität, eine antiinflammatorische und antiproliferative Wirkung sowie Verminderung der artherosklerotischen Lipidakkumulation nachgewiesen<sup>113-115</sup>. Aufgrund der aufgeführten Zusammenhänge erscheint eine Verbindung zwischen den Stoffwechselstörungen des Dahl/S-Modells und der Funktion des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  naheliegend.

Die Bedeutung von PPAR $\gamma$  im Herzmuskel ist derzeit nur unzureichend geklärt. Bisherige Publikationen hatten vornehmlich die Isoformen PPAR $\alpha$  und PPAR $\beta/d$  zum Thema. Da PPAR $\gamma$  im Herzmuskel, verglichen mit PPAR $\alpha$  und  $-\beta/-\delta$  nur gering exprimiert ist<sup>48</sup>, wurde PPAR $\gamma$  im kardialen Metabolismus eine untergeordnete Bedeutung beigemessen. Untersuchungen an PPAR $\gamma$ -*knock-out*-Modellen konnten hingegen die Bedeutung von PPAR $\gamma$  für die kardiale Hypertrophie und die zelluläre Inflammation hervorheben. So entwickelten PPAR $\gamma$ -*knock-out*-Mäuse im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen, unabhängig von exogenen Stressoren, eine wesentlich massivere und schneller voranschreitende Herzhypertrophie<sup>116</sup>. Zusätzlich konnte eine weitgehend positive Beeinflussung des Herzens der Dahl/S-Ratten unter der Therapie mit PPAR $\gamma$ -Agonisten gezeigt werden. So führte die Behandlung von Dahl/S-Tieren mit TZDs zu einer signifikanten Senkung des Blutdrucks und einer Reduktion der zirkulierenden Lipide<sup>117</sup>.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse erscheint die Betrachtung der kardialen PPAR $\gamma$ -Expressionen in dem gewählten Modell geeignet, um einen weiterführenden Beitrag zum Verständnis des Pathomechanismus der salzsensitiven Hypertonie, unter welcher ca. 50% der Bluthochdruckpatienten leiden<sup>15, 17</sup>, und deren kardialen Folgen zu leisten.

## 1.7 Zielsetzung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gelten in den Industrienationen als häufigste Ursache eines vorzeitigen Todes. Als einer der entscheidenden Risikofaktoren wird hierbei die arterielle Hypertonie angesehen. Etwa 40% der unter arterieller Hypertonie leidenden Patienten weisen eine Salzsensitivität auf. Die betroffenen Patienten zeigen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer linksventrikulären Herzhypertrophie und einer kardialen Fibrose<sup>118, 119</sup>.

Die salzsensitive Dahl-Ratte ist als entsprechendes Tiermodell geeignet, da sie unter Hochsalzdiät ebenfalls eine arterielle Hypertonie entwickelt, welche zur Ausbildung einer linksventrikulären Hypertrophie führt.

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entwicklung der hypertonieassoziierten kardialen Hypertrophie zugunsten des weiblichen Geschlechts sind bereits aus der Literatur bekannt. Wie einleitend beschrieben haben PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  einen großen Einfluß auf den zellulären Energiestoffwechsel. Insbesondere PPAR $\gamma$  konnte

unter Stimulation ein protektiver Effekt auf die hypertonieassoziierte kardiale Hypertrophie zugeordnet werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, im Modell der salzsensitiven Dahl-Ratte die kardiale Expression der nuklearen Transkriptionsfaktoren PPAR $\alpha$  und  $\gamma$  im Rahmen der linksventrikulären Hypertrophie zu untersuchen. Hierzu sollen zunächst die bereits aus anderen Tiermodellen bekannten hypertrophieabhängigen Veränderungen der PPAR $\alpha$ -Expression sowie der damit gekoppelten Expression des Glukosetransporters GLUT4 im Rahmen des Substratwechsels für das Dahl-Modell bestätigt werden. Ferner soll die PPAR $\gamma$ -Expression auf geschlechts- bzw. hypertrophieabhängige Veränderungen untersucht und ergänzend ein möglicher Zusammenhang mit den bekannten geschlechtsabhängigen Unterschieden der linksventrikulären Hypertrophieentwicklung hergestellt werden. Zudem wird die Expression ausgewählter PPAR-regulierter Zielgene hinsichtlich der geschlechts- bzw. hypertrophieabhängigen Unterschiede überprüft.

#### **Arbeitsaufgaben:**

Im Detail wurden die folgenden Schritte im Rahmen der oben angeführten Zielsetzung durchgeführt:

- Analyse des Gesamtkollektivs hinsichtlich der kardialen Hypertrophie und der Blutfettwerte.
- Bestätigung der Herabregulation von PPAR $\alpha$ , im Rahmen der hypertrophieabhängigen Umstellung des kardialen Stoffwechsels, für das Dahl-Modell auf Proteinebene.
- Untersuchung der PPAR $\alpha$ -Expression hinsichtlich geschlechtsabhängiger Unterschiede auf Proteinebene.
- Untersuchung auf geschlechtsabhängige Unterschiede in der myocardialen PPAR $\gamma$ -Expression auf Protein- und mRNA-Ebene.
- Ermittlung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der geschlechtsabhängigen Ausprägung der linksventrikulären Hypertrophie und der myocardialen PPAR $\gamma$ -Expression.
- Beurteilung der Expression exemplarisch ausgewählter PPAR $\alpha$ - und PPAR $\gamma$ -Zielgene des Fettstoffwechsels, der Fibrose und der Inflammation bezüglich geschlechtsspezifischer und diätabhängiger Unterschiede auf mRNA-Ebene.

- Die PPAR $\alpha$ -induzierte Umstellung des Glukosestoffwechsels während der Entwicklung der kardialen Hypertrophie soll in der Dahl-Ratte auf Proteinebene bestätigt und hinsichtlich geschlechtsabhängiger Unterschiede analysiert werden.



## 2 Material

### 2.1 Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Abzug		Köttermann
Auto- Pipette	<i>Acu Jet</i>	Brand
Autoklav	<i>2540EL&amp; V150</i>	Systemec
Bioanalyser	<i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	Agilent Technologies, GER
Brutschrank	<i>GFL 3033</i>	GFL, GER
Digitalkamera	<i>DSC - S75</i>	Sony
Eismaschine	<i>AF200</i>	Scotsman Thermocycler
Elektrophoresekammern	<i>Horizon<sup>®</sup> 11-14</i>	GIBCO BRL, USA
Elektrophoresespannungsquellen	<i>EPS 200</i>	Pharmacia Biotech
Filmentwicklungsmaschine	<i>Curix60</i>	Agfa, GER
FastPrep™ Gerät	<i>FP 120- 230</i>	ThermoSavant
Fluoreszenzmikroskop	<i>CTRMIC, DMIRE2</i>	Leica
Heizblock	<i>TCR 100</i>	Roth
Inkubator	<i>Function Line</i>	Heraeus von Kendro, GER
Laborwaage	<i>Scout</i>	Ohaus, USA
PCR- Gradientencycler	<i>Master Cycler Gradient</i>	Eppendorf, GER
Microplate Spectrophometer (ELISA-Plattenreader)	<i>Benchmark Plus</i>	BIO-RAD, GER
Mikrowelle		Bosch
Photometer	<i>Genesis6</i>	Eppendorf
Pipetten		Eppendorf, Labsys, Pipetman
TAQ- Man	<i>ABI 7000</i>	Applied Biosystems
Thermoschüttler	<i>3033</i>	GFL
Thermoschüttler klein	<i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf
Schwenktisch	<i>Polymax 1040</i>	Heidolph, GER
Vortexer	<i>VF2</i>	Janke und Kunkel
Western Blot APPARaturen		BIO-RAD, GER
Zentrifugen	<i>5415C, 5417R</i>	Eppendorf
	<i>Megafuge 1.0R</i>	Kendro, USA
	<i>Mikro 22 R</i>	Hettich
	<i>Optima Max Ultrazentrifuge</i>	Beckmann Coulter, GER

**Tabelle 5: Laborgeräte**

## 2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad pro analysi.

<b>Substanz</b>	<b>Firma</b>
APS	Roth
Blocking Reagenz	Roth
BSA	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform	Roth
DAPI	Linaris
DEPC- H <sub>2</sub> O	Sigma
DTT	Promega
EDTA	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	Roth
Vectorshield-Mountingmedium	Linaris
HCl	Roth
Isopropanol	Roth
NaCl	Merck
NaOH	Merck
Nukleotide (dCTP, dUTP, dATP, dGTP)	Promega
PBS	PAA
PonceauS- Solution	Sigma
RNAzol/RNABee	Invitrogen
RotiphoreseGel 30/ Acrylamidmix	Roth
Roti- Load1 (4x)	Roth
SDS	Roth
Sudanschwarz	Sigma
SYBR <sup>®</sup> Green	Applied Biosystems
TEMED	Roth
Tween20 (Polysorbat)	Merck
Xylol	Roth

**Tabelle 6: Chemikalien**

## 2.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Elektrophoresepuffer 5x	15,1 g TRIS Base 94,0 g Glycin 50 ml 10 % SDS ad 1000 ml H <sub>2</sub> O (pH 8,3)
Glycin Stripping Puffer	1,876 g Glycin 100 ml 10 % SDS Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O (pH 2,0) HCl
PBS-T	1 PBS-Tablette auf 1000 ml H <sub>2</sub> O + 0,5% TWEEN 20
Protein-Extraktionspuffer (Protein-extraction double-detergent lysis buffer)	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 140 mM NaCl 1 mM EDTA 25 % Glycerol 0,5 % SDS 0,5 % Nonident P-40 5 mM DTT 0,5 mM PMSF 100 ng/ml Aprotinin 100 ng/ml Leupeptin 100 ng/ml Pepstatin
Ponceau-Färbelösung	0,1 % (w/v) Ponceau S 5,0 % (v/v) Essigsäure
TBS-T (5x)	12,1 g TRIS Base 40 g NaCl Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O (pH 7,6) + 0,1 % TWEEN 20
Transferpuffer (4x)	138,38 g Glycin 29,09 g TRIS Base (pH 8,8) Ad 2000 ml H <sub>2</sub> O

**Tabelle 7: Puffer und Lösungen**

## 2.4 Oligonukleotide

Alle Primerpaare wurden bei Thermo Scientific käuflich erworben. Alle verwendeten Primersequenzen waren intronüberspannend.

Zielgene	Primersequenz	Fragmentlänge
r PPAR $\gamma$	F 5'- TTC AGA AGT GCC TTG CTG TG -3' R 5'- TCA GCA GAC TCT GGG TTC AG -3'	190
r CD36	F 5'- CCT CTG ACA TTT GCA GGT CCA T -3' R 5'- AAA CAG TGG TTG TCT GGG TTC TG -3'	133
r CTGF	F 5'- GAG TCG TCT CTG CAT GGT CA -3' R 5'- GCA GCC AGA AAG CTC AAA CT -3'	140
r MCAD	F 5'- CAG ATT TTC GGA GGC TAT GGA TT -3' R 5'- ACG AGC TAT GAT CAG CCT CTG AA -3'	120
r ACO	F 5'- CCA TGG TTT TTG TGA GGT CCT T -3' R 5'- GTT CGC TTT GCT TGA TTT CAG A -3'	120
r PGC 1 $\alpha$	F 5'- GCA GTC GCA ACA TGC TCA -3' R 5'- GGG TCA TTT GGT GAC TCT GG -3'	104
r COX2	F 5'- CCA CCT CTG CGA TGC TCT TC -3' R 5'- CAT TCC CCA CGG TTT TGA CAT G -3'	112
r HPRT	F 5'- GTC AAC GGG GGA CAT AAA AG -3' R 5'- GCT TGA CCA AGG AAA GCA AA -3'	131
r $\beta$ -Actin	F 5'- CCG TGA AAA GAT GAC CCA GAT C -3' R 5'- TGG TAC GAC CAG AGG CAT ACA G -3'	101

**Tabelle 8: Oligonukleotide**

## 2.5 Antikörper, Enzyme & Marker

Antikörper	Firma
Anti-PPAR $\gamma$ (rabbit)	Santa Cruz
Anti-PPAR $\alpha$ (rabbit)	Santa Cruz
Anti-GLUT1 (rabbit)	Santa Cruz
Anti-GLUT4 (rabbit)	Santa Cruz
Anti- $\beta$ -Actin	Santa Cruz
Donkey-Anti-Rabbit	Santa Cruz
Anti-Vimentin	Oncogene
Anti PPAR $\gamma$	Santa Cruz
Anti-vWF-Antikörper	Dako
CY3 Fluoreszenzmarker	Danova
FITC Fluoreszenzmarker	Dianova, Jackson Immuno
BCA Protein Assay	Perbio/ Pierce
Reverse Transkriptase ("Superscript")	Invitrogen
Prestained Protein Ladder (10- 180 kDa)	Fermentas

**Tabelle 9: Antikörper, Enzyme und Marker**

## 2.6 Software

Software	Firma
ABI 7000	Applied Biosystems
Acrobat Reader 8 Professional	Adobe
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent
AlphaEaseFC	Adobe
BCA-Microplate Manager	BioRad
Endnote	Thomson ICI Research
Office 2007 (Word, Excel, Power Point)	Microsoft
Photoshop CS3	Adobe
SPSS for Windows 11.5.1	SPSS Inc
Sigma Plot	SYSTAT

**Tabelle 10: Software**

## 2.7 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Firma
Adhäsionsfolie	Applied Biosystems
Adhäsionsfolie	Roth
Deckgläser	Roth
Eppendorfreaktionsgefäße: 0,2 ml	Eppendorf
0,5 ml	
1,5 ml	
2,0 ml	
Zentrifugenröhrchen	TPP
3 MM Blotting-Papiere	Whatman
Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences
Objekträger	Menzel
Röntgenfilme	Kodak
96-Well-Platte mit Flachboden	Corning Incorporated
96-Well-Platte <i>"Micro Amp Optical"</i>	Applied Biosystems
Bioanalyser-Platten	Agilent
ECL	Amersham Biosciences / GE

**Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien**

## 3 Methoden

### 3.1 Tiere und Haltung

Das untersuchte linksventrikuläre Myokardgewebe von salzsensitiven männlichen und weiblichen Dahl-Ratten wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Professor Kreuz / Dr. Wendt (Charité Campus Benjamin Franklin) zur Verfügung gestellt. Die Versuchstiere wurden zu den üblichen tiermedizinischen Standardbedingungen im Tierstall der Charité Campus Benjamin Franklin gehalten. Die Hochsalzgruppen erhielten für 8 Wochen eine 4%ige NaCl-Diät, die Kontrollgruppen erhielten für denselben Zeitraum eine Normaldiät (1% NaCl). Die Organentnahme erfolgte im Alter von 14 Wochen. Haltung und Organentnahme wurden durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Kreuz/Wendt vorgenommen.

### 3.2 Proteine – Aufarbeitung und Analyse

#### 3.2.1 Proteinextraktion aus Myokardgewebe

Die Proteinextraktion erfolgte aus dem linksventrikulären Myokard der Dahl/S-Ratten. Bis zur Verarbeitung wurden die Gewebeproben bei -80°C gelagert. Unter Zuhilfenahme von flüssigem Stickstoff und Trockeneis wurden die Gewebeproben zerkleinert und je 60-80µg pro Probe in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen. Um zu verhindern, dass die zu extrahierenden Proteine während der Präparation abgebaut werden, wurden alle Schritte auf Eis und bei 4°C durchgeführt.

Für die Homogenisierung des Gewebes wurde aus Lysis Matrix D-Röhrchen die Hälfte der Kugeln entfernt und durch eine Ceramic Sphere ersetzt. Anschließend wurde das Gewebe unter Zugabe des 7-fachen Volumens an *Protein-extraction double-detergent lysis buffer* im FastPrep™-Gerät auf Stufe 4 zweimal für 20sec homogenisiert.

Pro 350 µl *Protein-extraction double-detergent Lysis Puffer* wurden 25 µl Proteinaseinhibitor Cocktail zugesetzt.

Anschließend wurde das Homogenat mit 1 µl SDS (10%) pro 100 µl Lysis-Puffer versetzt. Nach kurzer Durchmischung blieben die Proben zum Lysieren für 20min auf Eis. Danach wurde das Lysat in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C und 14000rpm für 10min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Von jeder Probe wurde ein

Aliquot von 20µl für die Proteinmessung verwendet. Die extrahierten Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

### **3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1972) mit dem ELISA-Plattenreader**

Das Prinzip des BCA- Proteinmessverfahrens beruht auf der sogenannten Biuret-Reaktion. Diese beschreibt die Komplexbildung von Proteinen mit  $\text{Cu}^{2+}$  in alkalischer Lösung. Bei dieser Reaktion wird das  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert, welches mit Bicinchinon-Säure einen violetten Farbstoff bildet.

Zur Messung des Proteingehaltes der Proben wurden diese zunächst im Doppelansatz auf eine 96-Well-Platte mit Flachboden aufgetragen. Für das genutzte Messverfahren wurde ein Albuminstandard (BSA, Pierce) in einer Konzentration von 0, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, und 2000µg/ml verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden je 20µl der 1:2 und 1:10 verdünnten Probe bzw. des Standards mit 300µl Farbstoffgemisch (Pierce-BCA Protein Assay Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1) versetzt. Abgedeckt mit einer Adhäsionsfolie wurden die Platten für 30min bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Doppelansatz mit reinem Lysis-Puffer. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anschließend im Microplate Spectrophometer (ELISA, Bio-Rad) bei einer Wellenlänge von 550nm. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe der ELISA- gekoppelten Software durch den Abgleich der Extinktion der Probe mit der Albuminstandardkurve und unter Berücksichtigung der Verdünnung berechnet.

### **3.2.3 Western Blot (Immunoblot)**

Beim Western-Blot-Verfahren werden Proteingemische mit Hilfe der SDS-PAGE in einer Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) und anschließend auf einen geeigneten Träger (z.B. Nitrocellulose-Membran) übertragen (eigentliches Blotten). Dies ermöglicht die Detektion bestimmter Proteine mit spezifischen Antikörpern.



Das Verfahren gliedert sich in folgende Abschnitte:

1. **SDS-PAGE**
2. **Blotting**
3. **Antikörperbindung**
4. **Detektion**

Mit Hilfe des SDS wurden die Proteine in Ihrer Primärstruktur gehalten (denaturiert). Durch die Gelelektrophorese wurden die Proteine nun nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die verwendeten Polyacrylamid-Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Zusammensetzung der Trenngele ist von der Größe der zu untersuchenden Proteine abhängig. In der vorliegenden Arbeit wurden 12,5%-ige Trenngele verwendet, die für alle detektierten Proteine geeignet waren.

Zusammensetzung der Trenngele:

<b>Reagenz</b>	<b>12,5% -iges Acrylamidgel</b>
30% Acrylamid Mix (Roth)	4 ml
1,5 M Tris HCl pH 8.8	2,5 ml
H <sub>2</sub> O (Millipore Wasser)	3.3 ml
10%SDS	100 µl
10% APS	100 µl
TEMED (Roth)	4 µl

**Tabelle 12: Zusammensetzung der Trenngele**

Die noch flüssigen Gele wurden mit Wasser bedeckt, um ihre Austrocknung zu verhindern. Nach 45min war die Polymerisation abgeschlossen. Nach dem Abgießen und Absaugen des Wassers mit Filterpapier wurden die Sammelgele auf die Trenngele gegossen.

### Zusammensetzung der Sammelgele:

Reagenz	5% -iges Sammelgel
H <sub>2</sub> O (Millipore)	3,4ml
30% Acrylamidmix	0,83ml
1,0 M Tris HCl (pH 6,8)	0,63ml
10% SDS	0,05ml
10% Ammoniumpersulfat	0,05ml
TEMED	0,005ml
Pyronin Y	0,005ml

**Tabelle 13: Zusammensetzung der Sammelgele**

Für die Herstellung der Geltaschen zum Einsetzen der Proteine wurde noch vor dem Gießen des Sammelgels ein Plastikkamm zwischen die Glasscheiben gesetzt. Um die Gele vollständig auspolymerisieren zu lassen, wurden sie anschließend in feuchte Tücher geschlagen und über Nacht im Kühlraum bei 4°C gelagert.

Die Proben wurden zunächst mit H<sub>2</sub>O auf gleiche Konzentrationen verdünnt. Nun wurde den Proben Gelladepuffer (*RotiLoad, Roth*) im Verhältnis 4:1 zugesetzt und im Anschluss erfolgte die Denaturierung für 5min bei 95°C. Nachfolgend wurden die Proben in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert. Abgesehen von der Denaturierung erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis. Pro Spur wurden 15µg Protein eingesetzt, da sich diese Menge bei den erstellten Eichgeraden als geeignet erwiesen hatte. Zusätzlich wurden auf jedem Gel 5µl eines Proteingrößenmarkers („*Prestained-Protein-Ladder*“) und eine Eichgerade aus gepoolten Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im Elektrophorese-Puffer bei konstanter Spannung von 100V, einer Stromstärke von 350- 400mA und einer Leistung von 400W für eine Stunde bei 4°C.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig aus den Kammern gelöst und für 10min in 1x Transferpuffer gewaschen. Währenddessen wurden auf die Gelgröße zugeschnittene Nitrocellulose-Membranen, 3mm Whatman-Papiere und Schwämme in demselben Puffer äquilibriert. Es wurde nun ein luftblasenfreies „Gel-Membran-Blot-Sandwich“ gebildet und in eine Elektro-Blot-Kammer eingesetzt, welche mit ca. 5L Transferpuffer aufgefüllt wurde. Das Blotten erfolgte für 1,5h bei 4°C und einer konstanten Spannung von 100V.

Nach dem Transfer wurde das Ergebnis durch Anfärben der Proteinbanden auf der Nitrocellulose-Membranen mit einer Ponceau-Rot Färbelösung überprüft.

Überschüssige Farbe wurde mit H<sub>2</sub>O entfernt. Die gefärbten Membranen wurden nun auf Whatman-Papier getrocknet, beschriftet und bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die benötigten 5L Transferpuffer wurde 1L 4x- Ansatz mit 1L Methanol versetzt und anschließend auf 5L mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

### **3.2.4 Antikörper- Hybridisierung**

Zunächst wurde die verwendete Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur unter sanftem Schütteln in fettfreier, 5%-iger Blocking Reagenz (Magermilch) gewaschen, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte eine Spülung der Membranen in TBS-T für 1 x 15min und 2 x 5min. Nachfolgend wurde die Membran mit dem Primär-Antikörper über Nacht im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Die Verdünnung des ersten Antikörpers (AK) erfolgte in 3%-iger Blockingmilch. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für jeweils 10min mit TBS-T gewaschen und im Anschluss mit dem zweiten, mit Peroxidase markierten Antikörper für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die nicht gebundenen AK wurden durch Wiederholung des Waschschrittes mit TBS-T entfernt. Nach kurzem Abtropfen der Membran wurden die entsprechenden Proteine mit Hilfe des Chemilumineszenzverfahrens detektiert. Dafür wurde die Membran für 3min dünn mit dem Detektionreagenz überschichtet. Durch die katalytische Umsetzung der Peroxidase des sekundären Antikörpers wurde eine Chemilumineszenz erzeugt. Nach Abtropfen der Membran wurde sie mit einem Röntgenfilm (Kodak) in eine Fotokassette gelegt. Nach 1 bis 20min Belichtungszeit konnte der Film mittels einer Entwicklungsmaschine (*Curix 60, AGFA*) entwickelt und somit die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Der entwickelte Röntgenfilm wurde nun eingescannt und anschließend mit Hilfe der AlphaEaseFC<sup>TM</sup>-Software, (Version 3.1.2 Alpha Innotech Corporation, USA) über Intensitätsanalyse ausgewertet.

Die weitere Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Excel-Office-Software.

### Verwendete Antikörper und deren Verdünnung:

Primär- Antikörper	Verdünnung	Verdünnungslösung
Anti- PPAR $\gamma$	1:400	3% -iges Blockingreagenz
Anti- PPAR $\alpha$	1:400	3% -iges Blockingreagenz
Anti GLUT1	1:200	TBS- T
Anti GLUT4	1:200	TBS- T

**Tabelle 14: Primäre Antikörper**

Für die Verdünnung des sekundären Antikörpers der PPAR $\alpha/\gamma$ - Antikörper wurde 5%-iges Blockingreagenz verwendet; für die Verdünnung von GLUT1/4 0,1%-iges TBS- T.

Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Verdünnungslösung
Donkey Anti Rabbit	1:25000	5%-iges Blockingreagenz
Donkey Anti Rabbit	1:25000	0,1%-iges TBS- T

**Tabelle 15: Sekundäre Antikörper**

### **3.2.5 „Stripping“-Protokoll**

Die verwendete Nitrozellulosemembran kann erneut verwendet werden, wenn sie vorher von den bereits gebundenen Antikörpern gereinigt wird. Hierzu wurden die Membranen für 30min bei 50°C in Glycin-„Stripping“-Puffer unter sanftem Schütteln im Heizofen inkubiert. Es folgten zwei Waschschr tte von je 30min in TBS-T-Puffer. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran mit der Ponceaufärbung kontrolliert.

## **3.3 RNA-Aufarbeitung und Analyse**

Da die RNA im Gegensatz zur DNA aufgrund einer zusätzlichen 2'Hydroxylgruppe der Ribose eine erhöhte Instabilität aufweist und aufgrund der Bedrohung durch allgegenwärtige RNAsen, sind bei ihrer Verarbeitung besondere Maßnahmen zu beachten. So wurde die Kontamination durch RNAsen möglichst vermieden, zudem wurden alle Arbeitsschritte rasch und auf Eis durchgeführt werden. Es wurde ausschließlich mit Diethylpyrocarbonat-(DEPC) behandeltes Wasser verwendet werden. DEPC bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine, z.B. Histidin, welches sich im katalytischen Zentrum vieler RNAsen befindet und diese somit inaktivieren kann. Die Arbeitsflächen wurde vor Beginn der Aufarbeitung mit RNase-Away gesäubert werden.

### 3.3.1 Isolierung der RNA aus Rattenmyokard

Die Homogenisierung der Proben erfolgte unter Verwendung von Lysis Matrix D-Röhrchen, aus denen die Hälfte der Kugeln entfernt und durch eine Ceramic Sphere Kugel ersetzt wurde. Nach Zugabe von je 600µl RNAzol B wurden die Proben im Fast Prep Gerät auf der Stufe 4 für zweimal 20sec homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von weiteren 400µl RNAzol B je Probe und deren Inkubation für 5min auf Eis. Nachfolgend wurden die Ansätze im Kühlraum (4°C) 30min mit Hilfe eines Vortexrüttlers durchmischt. Danach erfolgte die Überführung des gesamten Homogenats (ca. 1ml) in ein neues 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß.

Nach Zugabe von 0,2ml Chloroform pro 1ml Homogenat wurden die Proben exakt 2min mit Hilfe des Vortexrüttlers geschüttelt, dann für 5min auf Eis inkubiert und schließlich 10min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert, wodurch sich das Gemisch in 3 Phasen auftrennte. In der oberen wässrigen Phase war die RNA enthalten, die DNA befand sich in der unteren organischen und in der Interphase, während die Proteine in der organischen Phase verblieben. Anschließend erfolgte die Überführung der wässrigen Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß. Zur Fällung der RNA wurde jede Probe mit einem dem Probenvolumen (ca. 500µl) entsprechenden Anteil an Isopropanol versetzt, kurz mit dem Vortexrüttler durchmischt und über Nacht bei -20°C gefällt.

Die Proben wurden anschließend für 30min bei 4°C und 14000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 80%igem Ethanol gewaschen, um Salz und Isopropanolreste zu entfernen. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt. Nachfolgend wurde der Überstand abermals dekantiert und das Pellet an der Luft getrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde es anschließend in 25 – 50µl DEPC-Wasser aufgenommen.

### 3.3.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

#### Photometer

Zunächst wurde die RNA-Konzentration einiger Ansätze stichprobenartig im Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm bestimmt, um die erforderliche Verdünnung festzulegen. Als Referenz diente DEPC-Wasser, welches zum Lösen der RNA verwendet wurde.

Da eine Extinktion = 1 bei 260nm einer RNA-Konzentration von 40ng/µl entspricht, wurde die RNA-Konzentration wie folgt bestimmt:

$$\text{Konzentration [ng/µl]} = E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der RNA wurde ein Koeffizient aus dem Extinktionswert bei 260nm und dem bei 280nm gebildet. Liegt dieser Koeffizient zwischen 1,8 und 2,0 ist von einer guten Qualität des Isolates auszugehen. Ist der Koeffizient kleiner muss von einer Verunreinigung durch Proteine, genomische DNA und/oder aromatischen Substanzen ausgegangen werden.

#### Agilent Bioanalyzer

Nach der erforderlichen Verdünnung der Proben erfolgte die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung aller Proben mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Reagent Kits. Die Pipettierschritte wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt und im Anschluss erfolgte die Konzentrationsmessung im Agilent 2100 Bioanalyzer. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

#### **3.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

Die RT-PCR beinhaltet zwei molekularbiologische Methoden, die Reverse Transkription und die PCR-Amplifikation (*Powell et al.*). Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wird die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche dann als Template für quantitative PCR- Reaktionen verwendet wird.

Die RT-PCR wurde mit Hilfe des *High-Capacity-cDNA-Reverse-Transcription-Kits* nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Es erfolgte zunächst die Herstellung eines 2-fach konzentrierten Master-Mix´ in folgender Zusammensetzung:

Komponenten	Volumen [ $\mu$ l]
10x RT – Buffer	2
25x dNTP Mix	0,8
10x RT Random Primers	2
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1
RNase Inhibitor	1
H <sub>2</sub> O	3,2
Gesamtvolumen pro PCR – Ansatz	10

**Tabelle 16: Zusammensetzung des Master-Mix**

Abschließend wurden 10 $\mu$ l Master-Mix mit je 10 $\mu$ l der RNA-Proben in ein 0,2ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, gut gemischt und abzentrifugiert. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit DEPC-Wasser anstelle der RNA-Probe eingesetzt.

Nachfolgend wurde eine PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Bedingungen	
Schritt 1	25°C	10min
Schritt 2	37°C	120min
Schritt 3	85°C	5sec
Schritt 4	4°C	$\infty$

**Tabelle 17: PCR-Bedingungen**

Hierbei erfolgte zunächst eine Inkubation bei 25°C für 10min, dann bei 37°C für 120min und schließlich wurde die cDNA-Synthese bei 87°C gestoppt.

Die Reverse Transkription wurde je Probe drei Mal durchgeführt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde die entstandene cDNA bei -20°C gelagert.

### 3.3.4 Quantitative Real-time PCR

#### Grundprinzip der PCR

1984 entwickelten Kary Mullis *et al.* die Polymerase-Chain-Reaction als Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Für die Durchführung einer PCR sind abgesehen von der Zielsequenz folgende Komponenten erforderlich:

1. Ein Primerpaar (FW und RV), welches mit den flankierenden Sequenzen hybridisiert
2. dNTPs (alle vier Desoxyribonucleosidtriphosphate)
3. Eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*)

Ein PCR- Zyklus besteht aus:

1. Denaturierung: Bei 95°C werden die DNA- Doppelstränge voneinander getrennt.
2. Annealing: Anlagerung der Primer. Die Annealing-Temperatur wird durch die Primer vorgegeben und so hoch gewählt, dass unspezifische Bindungen der Primer an das Template vermieden werden. Sie liegt meist zwischen 50 und 65°C.
3. Elongation: Kettenverlängerung. Die Taq-Polymerase synthetisiert den Komplementärstrang unter Verbrauch von dNTPs.

Nach jedem Zyklus hat sich die Template DNA verdoppelt, die Menge steigt also exponentiell zur Basis 2 an.

Nach Durchlauf mehrerer Zyklen steigt die Menge des PCR-Produktes exponentiell an.

Bei der qRT-PCR handelt es sich um eine Methode zur Ermittlung der Transkriptionshäufigkeit bestimmter Gene.

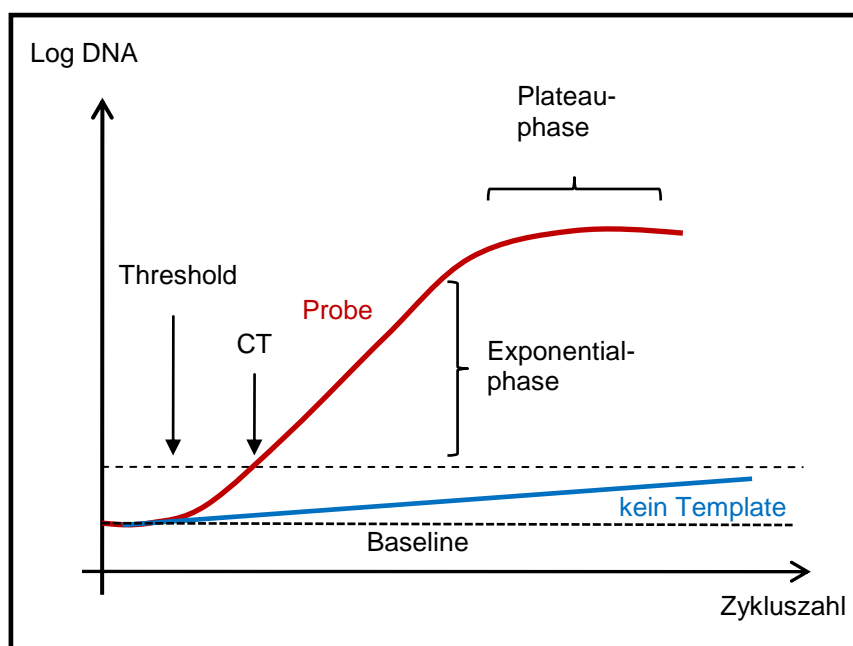
Diese Methode ermöglicht den kontinuierlichen Datengewinn während des PCR-Prozesses, im Gegensatz zur konventionellen PCR, welche nur die Akkumulation des Zielgens nach einer fixen Zyklusanzahl detektiert.

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte können entweder spezifische fluoreszenzmarkierte Sonden oder in die doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR- Green verwendet werden. Die Verwendung des SYBR-Green-Farbstoffes setzt einen hohen Reinheitsgrad der Probe voraus, da ansonsten mit falsch positiven Ergebnissen zu rechnen ist.

Durch Messung der Fluoreszenz bei einer bestimmten Wellenlänge kann das PCR-Produkt quantifiziert werden, da sich die Zunahme der Fluoreszenz proportional zur Zunahme des PCR-Produkts verhält. Die Messung der Fluoreszenz findet jeweils am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Aus der Zyklenzahl, bei welcher das Fluoreszenzsignal einen vorgegebenen Schwellenwert überschreitet, ergibt sich der Ct-Wert (*“threshold cycle”*). Die relative Menge des Gentranskripts ergibt sich aus dem Quotienten, aus dem Ct- Wert der Probe und dem Ct-Wert eines Referenzgens. Die gemessene Fluoreszenz wird graphisch als Kurve dargestellt, welche sich in drei Abschnitte gliedern lässt:



1. Die Baseline: Beschreibt die ersten Zyklen der PCR. Das Fluoreszenzsignal ist noch kleiner als das Hintergrundsignal und es sind keine nennenswerten Änderungen zu beobachten.
2. Die Exponential-Phase: Nach Überschreiten eines Schwellenwertes zeigt die Kurve einen exponentiellen Anstieg.
3. Die Plateauphase: Die Reaktionskomponenten sind verbraucht und es finden keine Reaktionen mehr statt.



**Abb. 4: Phasenschema einer PCR-Amplifikation**  
 In Anlehnung an [www.ionchannels.org](http://www.ionchannels.org) und das *Abi-User-Manual*

### Durchführung

Zunächst wurde das optimale Primerverhältnis (Primer-Matrix) ermittelt. Dazu wurden die Primer auf 5 pmol/µl verdünnt und anschließend in drei unabhängigen PCR-Ansätzen im Verhältnis 1:1, 1:3 und 3:1 (FW:RV) eingesetzt. Als Template wurden 25ng cDNA aus dem Probenpool verwendet. Die Analyse wurde im ABI PRISM 7000 TaqMan durchgeführt. Das jeweils optimale Primerverhältnis ergab sich schließlich aus dem Verlauf der Amplifikation und der Schmelzkurve, sowie aus der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Primerbedingungen:

Zielgen	Programm	Temperatur	Primerverhältnis F:R		Zykluszahl
R HPRT	2 Schritt	60°C	3:1 [µl]	5pmol/µl	40
R PPARγ	2 Schritt	60°C	1:1 [µl]	5pmol/µl	40
R CD36	2 Schritt	60°C	1:1 [µl]	5pmol/µl	40
R CTGF	3 Schritt	55°C	1:1 [µl]	5pmol/µl	35
R MCAD	2 Schritt	60°C	1:1 [µl]	5pmol/µl	40
R ACO	2 Schritt	65°C	1:1 [µl]	5pmol/µl	40
PGC 1α	2 Schritt	60°C	1:1 [µl]	5pmol/µl	40
COX2	2 Schritt	60°C	1:1 [µl]	5pmol/µl	40

**Tabelle 18: Primerbedingungen**

Für die Berechnung der relativen mRNA-Expression lief bei jedem PCR-Lauf folgende Eichgerade aus den gepoolten Proben im Doppelansatz mit: 25ng, 12,5ng, 6,25ng, 3,125ng, 1,563ng, 0,782ng, 0,391ng. Als Housekeeping-Gen (endogener Standard) wurde HPRT (*Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase*) gewählt und mitquantifiziert. Einige Durchläufe erfolgten auch mit β-Actin zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Housekeeping-Gens. Zur Auswertung wurde jedoch ausschließlich HPRT verwendet.

Die Detektion der Eichgerade für das Housekeeping-Gen wurde mit dem folgenden Reaktionansatz durchgeführt:

Master- Mix für HPRT Eichgeraden	Volumen [µl]
SYBR- Green- Mix	12,5
FW-Primer	3
RV-Primer	1
H <sub>2</sub> O	7,5
Gesamtvolumen	24

**Tabelle 19: Master-Mix für HPRT**

Es wurde je 1µl aus dem Probenpool der jeweiligen Konzentration eingesetzt.

Die Quantifizierung der Zielgene erfolgte nach folgendem Ansatz:

Reaktionsansatz für die Zielgene	Volumen [ $\mu$ l]
SYBR- Green- Mix	12,5
FW-Primer	1
RV-Primer	1
H <sub>2</sub> O	ad 24

**Tabelle 20: Reaktionsansatz für die Zielgene**

Die einzusetzende Templatmenge ergab sich aus der Analyse der entsprechenden Eichgerade. Die Primerverhältnisse variierten je nach den optimalen Bedingungen des entsprechenden Primers (s. *Materialteil Primerlisten*). Alle Proben wurden auf eine 96-Well-Platte auf Eis pipettiert. Die Auftragung der Proben erfolgte jeweils im Doppelansatz. Nachfolgend wurde die 96-Well-Platte kurz bei 4°C zentrifugiert.

Die Messungen erfolgten nach dem folgenden PCR- Protokoll:

Schritt	Bedingungen	
1. Denaturierung	95°C	5min
2. Denaturierung	95°C	15sec
3. Annealing	60°C	1min
4. Elongation	72°C	

**Tabelle 21: PCR-Protokoll**

Nach jedem PCR- Lauf wurde eine Dissoziationskurve ermittelt, indem die Amplifikate schrittweise von 60°C auf 95°C erhitzt wurden. Dabei kommt es zur Dissoziation der DNA- Doppelstränge und der Fluoreszenzfarbstoff wird wieder freigegeben. Der messbare Anstieg bei einer bestimmten Schmelztemperatur eines Amplifikats ist für jedes Zielgen unterschiedlich. Die Dissoziationskurve dient der Überprüfung der Spezifität der PCR- Reaktion. Die Höhe des *Peaks* der Dissoziationskurve gibt Auskunft über die Größe des gebildeten Produktes.

### 3.3.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Autobaseline und Auto-Ct-Funktion der ABI 7000- Software, indem durch einen Abgleich der Ct-Werte mit einem Standard Ct-Wert die relative Menge an DNA des jeweiligen Zielgens ermittelt wurde. Aus den Ct-Werten der Doppelansätze wurden mit der Excel-Office-Software die Mittelwerte

berechnet. Anschließend folgte die Rückrechnung auf die Menge. Die so ermittelten Werte für die einzelnen Proben wurden nun auf die entsprechenden Werte des Referenzgens bezogen und anschließend in den unterschiedlichen Gruppen miteinander verglichen.

### **3.4 Immunfluoreszenz**

#### Grundprinzip der Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine lichtmikroskopische Technik. Hierbei nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten antigenen Determinanten am histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Bei dieser Technik bindet, ähnlich wie beim Immunoblot, ein primärer Antikörper an die nachzuweisende Struktur. Diese spezifischen mono- oder polyklonalen Antikörper tragen selbst antigene Determinanten, an welche der Fluoreszenzmarker-gekoppelte Sekundärantikörper bindet. Über die Fluoreszenzmarker FITC und CY3 lassen sich die gesuchten Strukturen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen. Kofärbungen können mit unterschiedlichen Primärantikörpern und Fluoreszenzmarkern durchgeführt werden.

#### **3.4.1 Anfertigung der Kryoschnitte**

Die bereits vorbereiteten Kryo-Gewebeblöckchen stammten von der AG Prof. Kreuz aus der Charité Campus Benjamin Franklin. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei -80°C gelagert. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte am Kryostat, bei einer Schnittdicke von 5µm. Anschließend wurden die Schnitte auf silanbeschichteten Objektträgern getrocknet.

#### **3.4.2 Färbung der Kryoschnitte**

Zunächst wurden die Kryoschnitte für ca. 30min bei RT inkubiert, anschließend für 5min in kaltem Aceton fixiert und danach 30min luftgetrocknet. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit Hilfe von 3%igem BSA in PBS-T für ca. 1h in einer feuchten Kammer. Um das Blockingreagenz und die folgenden Lösungen auf dem Schnitt zu halten, wurde dieser mit einem Fettstift umrandet. Es folgte die Inkubation des primären Antikörpers, dazu wurden zunächst die AK-Verdünnungen in 1%igem BSA auf Eis angesetzt: 1:50, 1:100 und 1:200. Die Referenz (von-Willebrand-Faktor-AK) wurde auf 1:400 verdünnt, für die Negativkontrolle wurde nur 1%iges PBS-T verwendet. Die

Inkubation des primären Antikörpers erfolgte mit jeweils 200µl AK-Verdünnung für 1h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Anschließend wurden die Präparate 3 x 10min mit PBS-T 0,1% BSA gewaschen und erneut für 30min in 3%igem BSA PBS-T geblockt. Für die Inkubation des sekundären Antikörpers wurden folgende Verdünnungen angesetzt:

Primärer AK	Verdünnungs-faktor	Lösung	Sekundärer AK	Verdünnungs-faktor	Lösung
PPAR $\gamma$	1:50/100/200	1% BSA	FITC anti species	1:100	1% BSA
vWF	1:400	1% BSA	Cy3	1:100	1% BSA

**Tabelle 22: Verdünnung der Antikörper**

Für die Negativkontrolle wurden FITC und Cy3 im Verhältnis 1:1 und 1:50 gemischt. Die Verdünnungen wurden ebenfalls auf Eis angesetzt und die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 1h bei RT. Im Anschluß wurden die Schnitte 3 x 10min mit 0,1%igem BSA PBS-T gewaschen. Nachfolgend wurden die Schnitte für 1h mit Sudan Schwarz überschichtet (unspezifische Fluoreszenz) und nach kurzem Waschen mit DAPI (Verdünnung: 1:20000) für 1min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit Vecta-Shield Fluo-Eindeckmedium eingedeckt und mit handelsüblichem Nagellack versiegelt. Bis zur Auswertung am Mikroskop wurden die Präparate bei -20°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Proteinexpression und der Expressionswerte für die mRNA erfolgte mit der SPSS Software Version 11.5. Die Auswertung der Proteinexpressionswerte und der mRNA-Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Univarianzanalyse und des Anova-Tests mit Korrektur nach Bonferroni. Ein p-Wert von <0,05 wurde bei der Auswertung als statistisch signifikant bewertet.

## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren PPAR $\gamma$  und PPAR $\alpha$ , sowie die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  und einiger ausgewählter Zielgene in einem Modell für salzsensitive Hypertonie untersucht, um einen Beitrag zur weiteren Klärung des kardialen Energiestoffwechsels zu leisten.

Untersucht wurde linksventrikuläres Myokardgewebe von männlichen und weiblichen Dahl-Ratten nach achtwöchiger Hochsalz- bzw. Normaldiät.

Es wurden vier Gruppen mit je 8 Tieren untersucht, wobei die Gruppen folgendermaßen aufgeteilt waren:

Geschlecht	Stamm	Diät	NaCl-Gehalt
f	Dahl/S	Hochsalz-Diät	4,0 %
f	Dahl/S	Normaldiät	0,1 %
m	Dahl/S	Hochsalz-Diät	4,0 %
m	Dahl/S	Normaldiät	0,1 %

**Tabelle 23: Aufteilung der Gruppen**

Als Kontrollgruppe für die Hypertrophie diente die dem jeweiligen Geschlecht entsprechende Normaldiätgruppe. Die Organentnahme erfolgte bei allen Tieren nach der 14. Lebenswoche.

Die Untersuchungen der Proteinexpression erfolgte mit dem Western-Blot als semiquantitative Methode. Die Messungen der mRNA wurden mit Hilfe der qRT-PCR durchgeführt. Zur Identifikation der Lokalisation von PPAR $\gamma$  im kardialen Gewebe wurden Kryoschnitte des linken Ventrikels angefertigt und PPAR $\gamma$  in diesen mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht.

### 4.1 Charakterisierung der Tiere

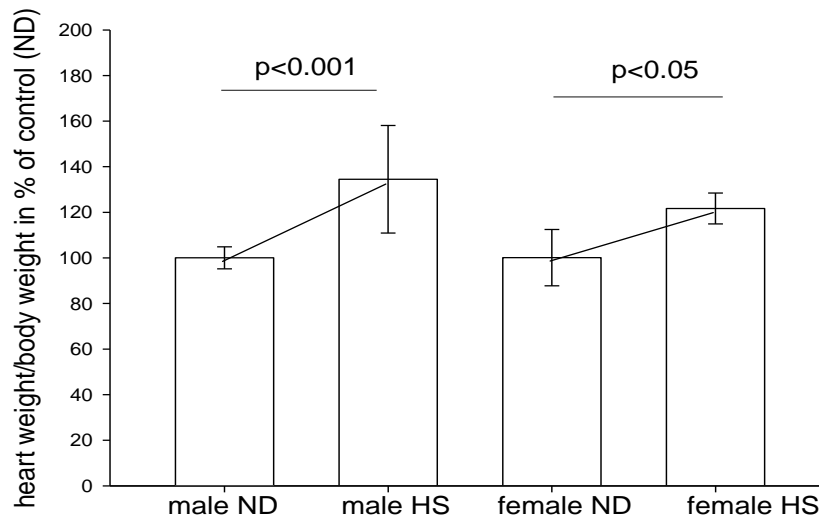
Zunächst wurden die von der AG Prof. Dr. Kreuz freundlicherweise zur Verfügung gestellten Daten zu Herzgewicht, Körpergewicht, Blutdruck und Blutfetten statistisch ausgewertet. Diese Daten beziehen sich auf ein größeres Kollektiv, aus welchem anschließend für die weiteren Untersuchungen 8 Tiere je Gruppe zufällig ausgewählt wurden.

#### 4.1.1 Herzhypertrophie in Abhängigkeit des Kochsalzgehaltes der Nahrung

Die Hypertrophieentwicklung unter salzreicher Diät zeigte sich in beiden Geschlechtern signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche eine Normaldiät erhielt. Im Vergleich zu den männlichen Tieren wiesen die weiblichen jedoch einen signifikant geringeren Anstieg in der Hypertrophie auf.

Das Herzgewicht wurde zur Normierung der Werte auf das jeweilige Körpergewicht bezogen, Heart Weight/ Body Weight-Quotient (HW/BW). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Univarianzanalyse und dem ANOVA-Test mit Korrektur nach Bonferroni.

Dargestellt ist der HW/BW-Quotient für die männlichen und weiblichen Tiere nach HS-Diät und die der jeweiligen Kontrollgruppe unter Normal-Diät:



**Abb. 5: Entwicklung der kardialen Hypertrophie unter HS-Diät.**

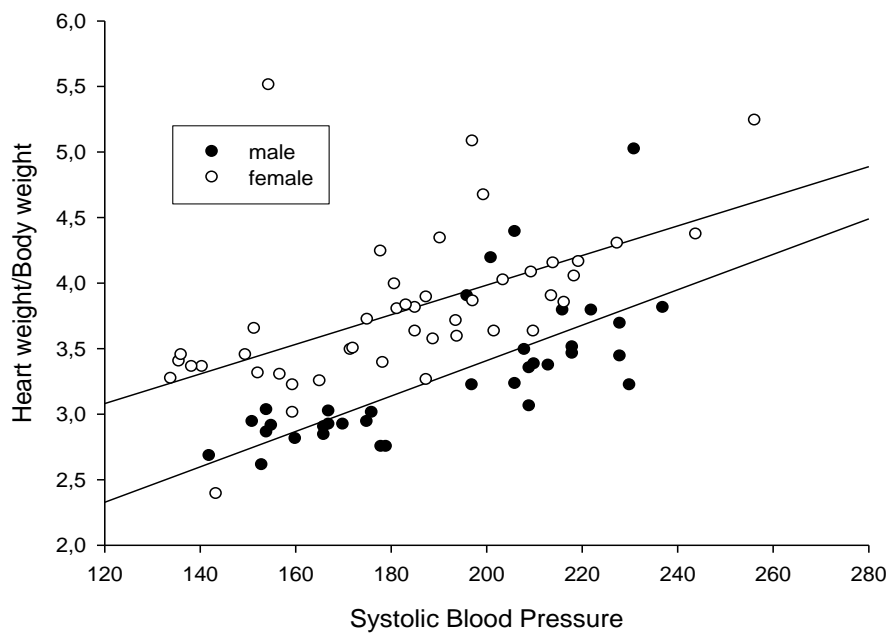
Der HW/BW-Quotient weist signifikante Unterschiede zwischen den HS-Gruppen und der jeweiligen ND-Kontrollgruppe auf. Zusätzlich zeigt sich ein geringerer Anstieg der Hypertrophieentwicklung bei den weiblichen Tieren ( $p<0.05$ ) im Vergleich zu den männlichen Tieren ( $p<0.001$ ). Die Ergebnisse wurden auf 100% normiert.

ND: Normaldiät; HS: Hochsalzdiät. Für jede untersuchte Gruppe sind die Standardabweichungen dargestellt.

#### 4.1.2 Korrelation zwischen systolischem Blutdruck und Herzgewicht

Die Analyse des systolischen Blutdruckes und der Herzgewichte weist eine weitgehende Korrelation der männlichen ( $R=0,723$ ) und der weiblichen Tiere ( $R=0,579$ ) auf, sowohl in den Hochsalz- als auch in den Kontrollgruppen. Die statistische Analyse der Korrelation erfolgte nach Pearsson.

Auffällig ist die größere Streuung der Werte der weiblichen Tiere bei Blutdruckanstieg.



**Abb. 6: Korrelation zwischen Blutdruck und kardialer Hypertrophie.**

Korrelationsanalyse für HW/BW und systolischen Blutdruck. Die Korrelation weist nur eine geringe Differenz zwischen den männlichen und den weiblichen Tieren ( $\sigma$ :  $R=0,723$ ;  $\rho$ :  $R=0,579$ ) auf.

Größere Streuung der Werte der weiblichen Tiere unter Blutdruckanstieg.

Die statistische Analyse erfolgte nach Pearsson.

### 4.1.3 Blutfette

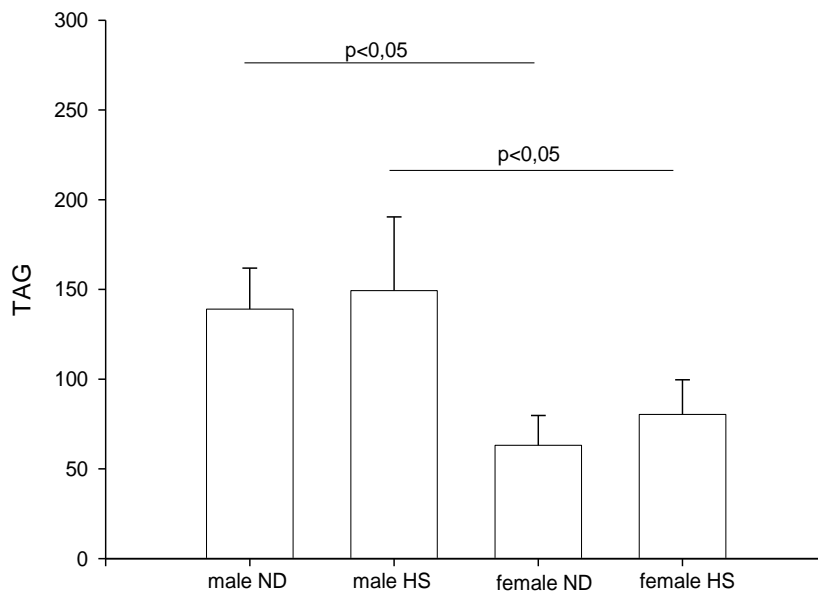
Die Blutfettwerte wurden von der AG-Prof Kreuzt in einem größeren Kollektiv gemessen und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die statistische Auswertung der Blutfettwerte ergab signifikant höhere Triacylglycerid-Werte (TAG) der männlichen Tiere im Vergleich zu den weiblichen. Die Unterschiede in der Diät zeigten keine Auswirkungen auf die Blutfettwerte.

#### 4.1.3.1 Auswertung der Triacylglycerid-Werte (TAG)

Die TAG-Blutwerte wurden statistisch mittels der Univarianzanalyse und des ANOVA-Tests mit Korrektur nach Bonferroni analysiert und in mg/dl angegeben. Verglichen mit den Werten der weiblichen Tiere wiesen die männlichen Tiere beider Gruppen signifikant höhere TAG-Werte auf. Eine diätabhängige Regulation war nicht nachweisbar.





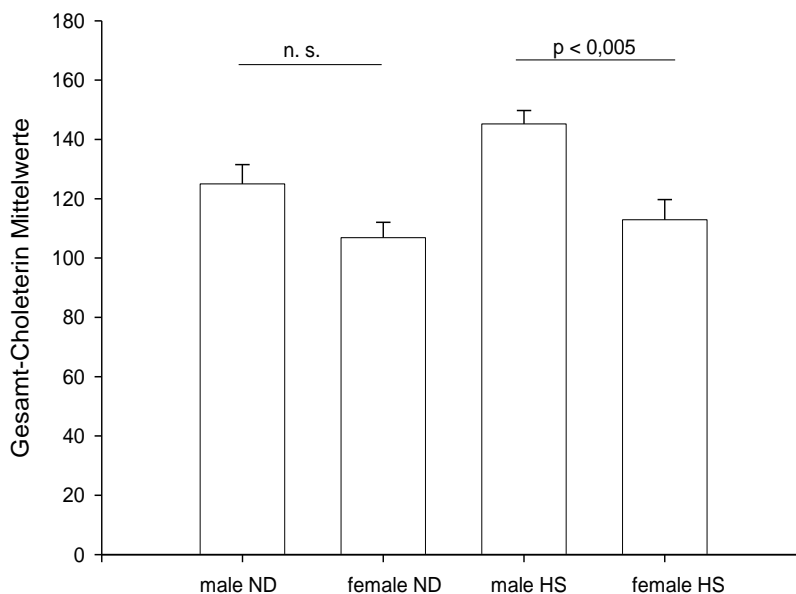
**Abb. 7: Auswertung der TAG-Werte.**

Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen TAG-Werte in mg/dl für die jeweilige Gruppe. Die männlichen Tiere wiesen, im Vergleich zu den weiblichen signifikant höhere Werte auf.

Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl); Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=8$

#### 4.1.3.2 Auswertung der Gesamt-Cholesterinwerte

Die Gesamt-Cholesterin-Blutwerte wurden statistisch mit der Univarianzanalyse und dem ANOVA-Test mit Korrektur nach Bonferroni ermittelt und in mg/dl angegeben. In den Hochsalzgruppen zeigen sich signifikant höhere Werte bei den männlichen Tieren im Vergleich zu den weiblichen. In den Gruppen unter Normaldiät zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

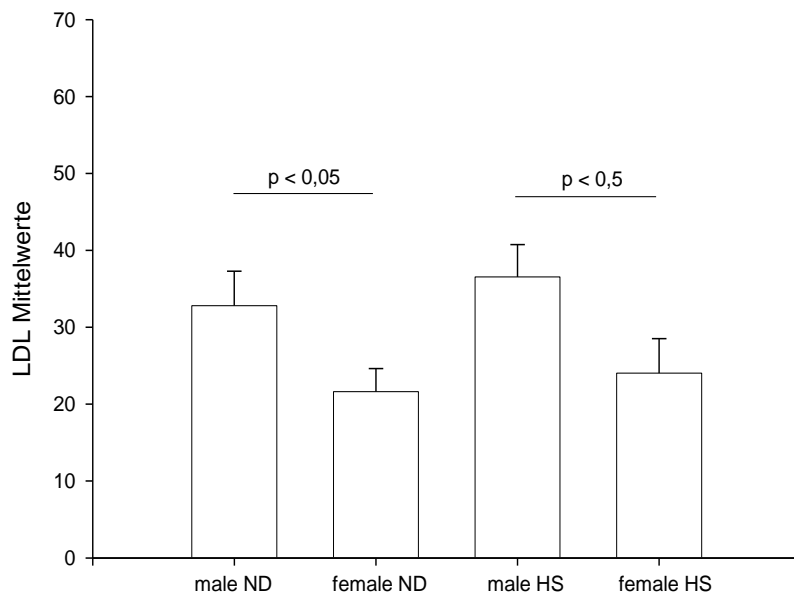


**Abb. 8: Auswertung der Gesamt-Cholesterin-Werte.**

Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Gesamt-Cholesterin-Werte in mg/dl für die jeweilige Gruppe. Die männlichen Tiere der HS-Gruppe wiesen, im Vergleich zu den weiblichen HS-Gruppe signifikant höhere Werte auf. Für jede untersuchte Gruppe sind die Standardabweichungen dargestellt.

#### 4.1.3.3 Auswertung der Low-Density-Lipoprotein-Werte (LDL)

Die LDL-Blutwerte wurden statistisch mittels der Univarianzanalyse und dem ANOVA-Test mit Korrektur nach Bonferroni analysiert und in mg/dl angegeben. Es zeigten sich in beiden Gruppen signifikant höhere LDL-Werte bei den männlichen Tieren gegenüber den weiblichen Tieren. Eine Diätabhängigkeit der Blutwerte ist nicht nachzuweisen.

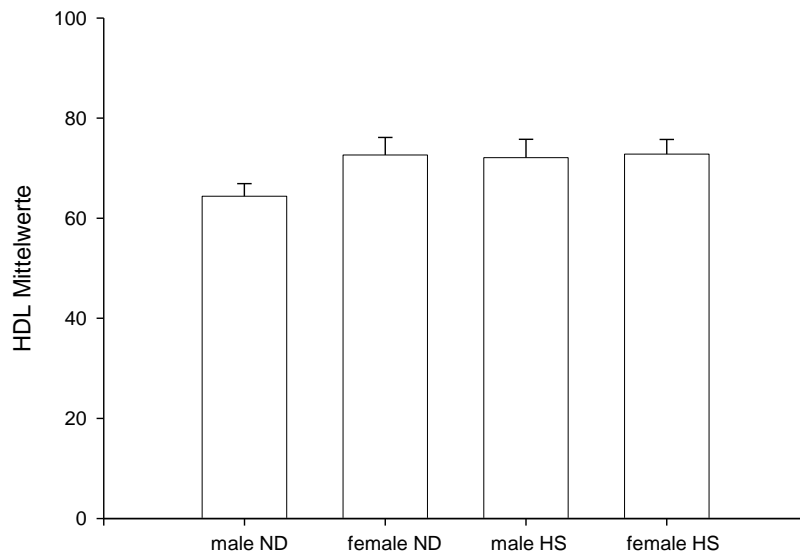


**Abb. 9: Auswertung der LDL-Werte.**

Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen LDL-Werte in mg/dl für die jeweilige Gruppe. Die männlichen Tiere weisen, im Vergleich zu den weiblichen, signifikant höhere Werte auf. Für jede untersuchte Gruppe wurden die Standardabweichungen dargestellt.

#### 4.1.3.4 Auswertung der High-Density Lipoproteine (HDL)

Die HDL-Blutwerte wurden statistisch mittels der Univarianzanalyse und dem ANOVA-Test mit Korrektur nach Bonferroni analysiert. Für die HDL-Blutwerte waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar.



**Abb. 10: Auswertung der HDL-Werte.**

Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen HDL-Werte für die jeweilige Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht nachweisbar.

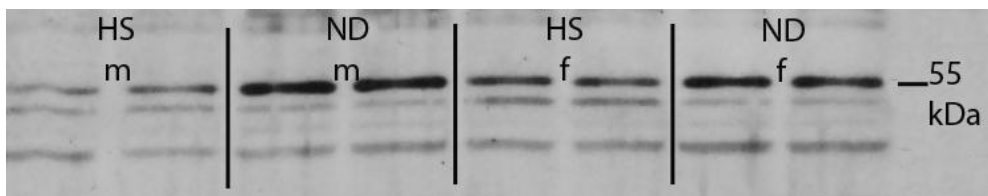
## 4.2 Peroxisome Proliferator Activated Receptor $\alpha$ (PPAR $\alpha$ )

Die Western-Blots wurden für jede Probe dreimal durchgeführt, um technische Ungenauigkeiten zu minimieren. Die Auftragung der Probe erfolgte für jeden Western-Blot im Doppelansatz. Alle Ergebnisse wurden auf  $\beta$ -Aktin als „house-keeping“ Gen bezogen.

### 4.2.1 Diätabhängige Unterschiede der PPAR $\alpha$ -Expression auf Proteinebene

Die PPAR $\alpha$ -Proteinexpression im Myokardgewebe der Dahl/S-Ratten zeigte diätabhängig signifikante Unterschiede. Expressionsunterschiede in Abhängigkeit vom Geschlecht wurden nicht nachgewiesen.

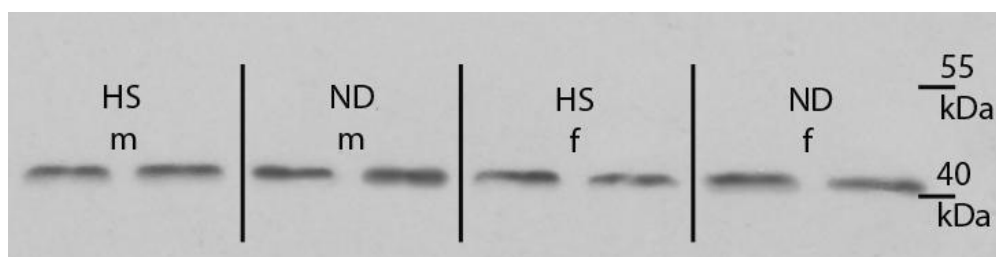
Exemplarische Darstellung je eines Western Blots für PPAR $\alpha$  und  $\beta$ -Aktin.



**Abb. 11: Western-Blot PPAR $\alpha$ .**

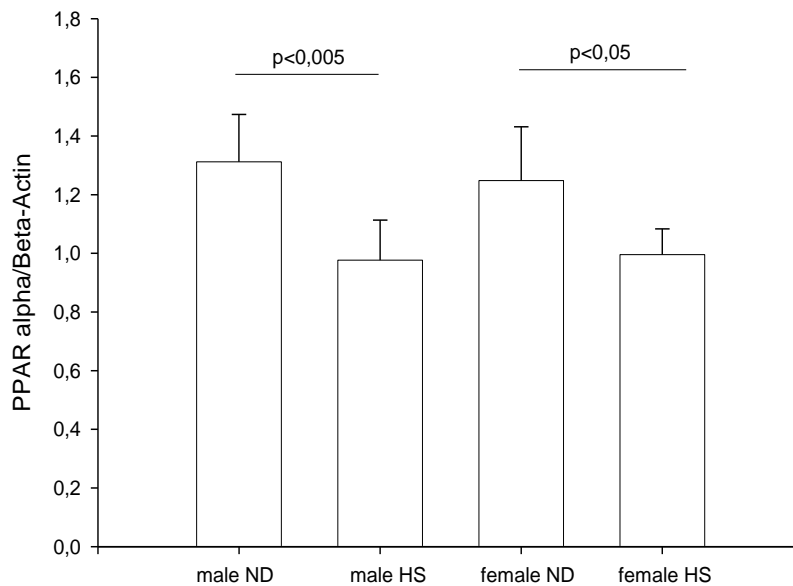
Proteingröße 55 kDa. 12%iges Acrylamidgel mit je 15 $\mu$ g Protein pro Spur. Entwicklungszeit:15 min. Alle Proben wurden im Doppelansatz aufgetragen. Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl);HS: Hochsalz- (4% NaCl)

Alle Werte wurden auf  $\beta$ -Aktin als Referenz bezogen.  $\beta$ -Aktin wurde für jede Probe, auf jeder Nitrocellulosemembran bestimmt. Bei allen verwendeten Proben zeigte sich eine  $\beta$ -Aktin-Expression:



**Abb. 12: Western-Blot-Analyse der Expression von  $\beta$ -Aktin als Referenz zu PPAR $\alpha$ .**

Proteingröße 43 kDa. 12%iges Acrylamidgel mit je 15 $\mu$ g pro Spur. Entwicklungszeit: 10 s. Alle Proben wurden im Doppelansatz aufgetragen. Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz-Diät (4% NaCl)



**Abb. 13: Ergebnisse der Western-Blot-Analyse der PPAR $\alpha$ -Expression.**

Die PPAR $\alpha$ -Proteinexpression zeigte ein signifikant geringeres Niveau in den hypertrophen Herzen. Geschlechtsunterschiede waren nicht nachweisbar.

Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl); Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=8$

### 4.3 Peroxisome Proliferator Activated Receptor $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )

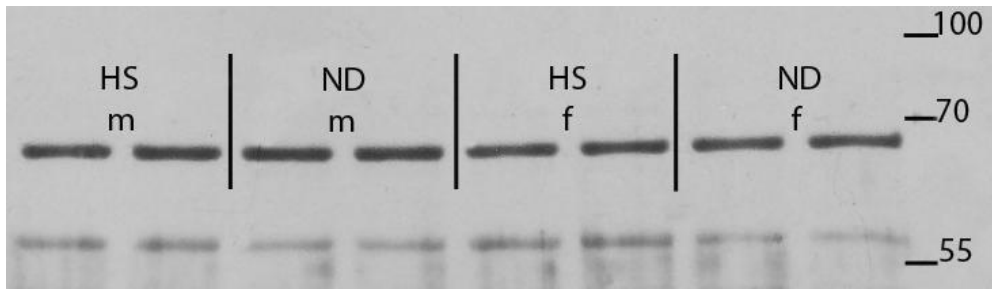
Sowohl die Western-Blots als auch die qRT-PCR wurden für jede Probe dreimal durchgeführt, um technische Ungenauigkeiten zu minimieren. Desweiteren wurden alle Proben bei jeder Messung im Doppelansatz aufgetragen. Zur weiteren Berechnung wurde zunächst der Mittelwert aus den Doppelansätzen der Einzelmessung gebildet und anschließend aus den Mittelwerten der drei Einzelmessungen der jeweilige Mittelwert gebildet.

#### 4.3.1 Geschlechtsabhängige Unterschiede in der PPAR $\gamma$ -Expression auf Proteinebene

Die Proteinexpression von PPAR $\gamma$  im Myokardgewebe zeigte geschlechtsabhängige, signifikante Unterschiede. Expressionsunterschiede in Abhängigkeit von der Hypertrophie wurden nicht nachgewiesen.

Alle Proben wurden im Doppelansatz aufgetragen. Auf jeder Nitrocellulosemembran befand sich zusätzlich zu den Proben eine Eichgerade aus dem Probenpool.

Dargestellt sind der Western Blot und die Auswertung der Ergebnisse:

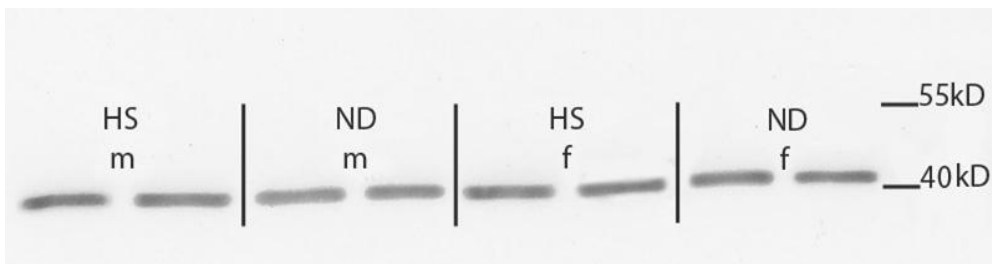


**Abb. 14: Western-Blot der PPAR $\gamma$ -Expression.**

Proteingröße 67 kDa. 12%iges Acrylamidgel mit je 15 $\mu$ g Protein pro Spur. Entwicklungszeit betrug 20 min. Alle Proben wurden im Doppelansatz aufgetragen.

Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl)

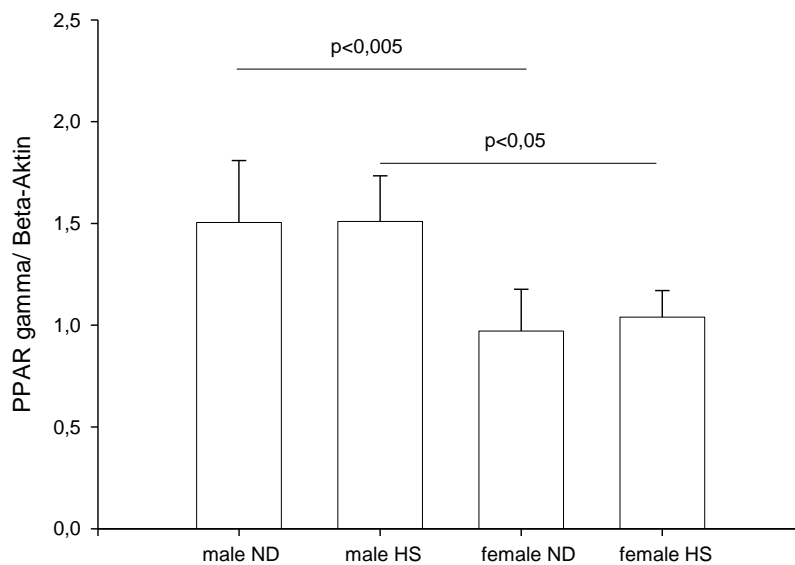
Alle Werte wurden auf  $\beta$ -Aktin als Referenz als Housekeeping-Gen bezogen.  $\beta$ -Aktin wurde für jede Probe, auf jeder Nitrocellulosemembran bestimmt. Bei allen verwendeten Proben zeigte sich eine gleichbleibende  $\beta$ -Aktin-Expression im Vergleich zu den entsprechenden PPAR $\gamma$ -Werten:



**Abb. 15: Western-Blot der  $\beta$ -Aktin-Expression als Referenz zu PPAR $\gamma$ .**

Proteingröße 43kDa. 12%iges Acrylamidgel mit je 15 $\mu$ g pro Spur. Entwicklungszeit: 10s. Alle Proben wurden im Doppelansatz aufgetragen.

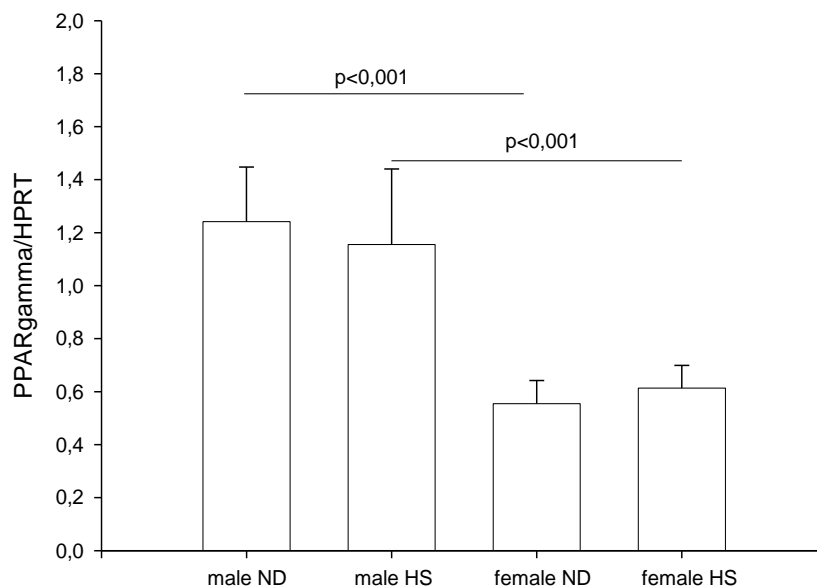
Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl)



**Abb. 16: Western-Blot-Analyse der PPAR $\gamma$ -Expression in Kardiomyozyten männlicher und weiblicher Dahl/S-Ratten.** Die männlichen Tiere wiesen in beiden Gruppen eine signifikant höhere PPAR $\gamma$ -Expression auf Proteinebene als die weiblichen auf. Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl); Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=8$

#### 4.3.2 Geschlechtsabhängige Unterschiede der PPAR $\gamma$ -Expression auf mRNA-Ebene

Die PPAR $\gamma$ -Expression auf mRNA-Ebene zeigte eine mit der Proteinexpression übereinstimmende geschlechtsabhängige, diätunabhängige Regulation. Dargestellt sind die Ergebnisse für die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  aus der qRT-PCR.

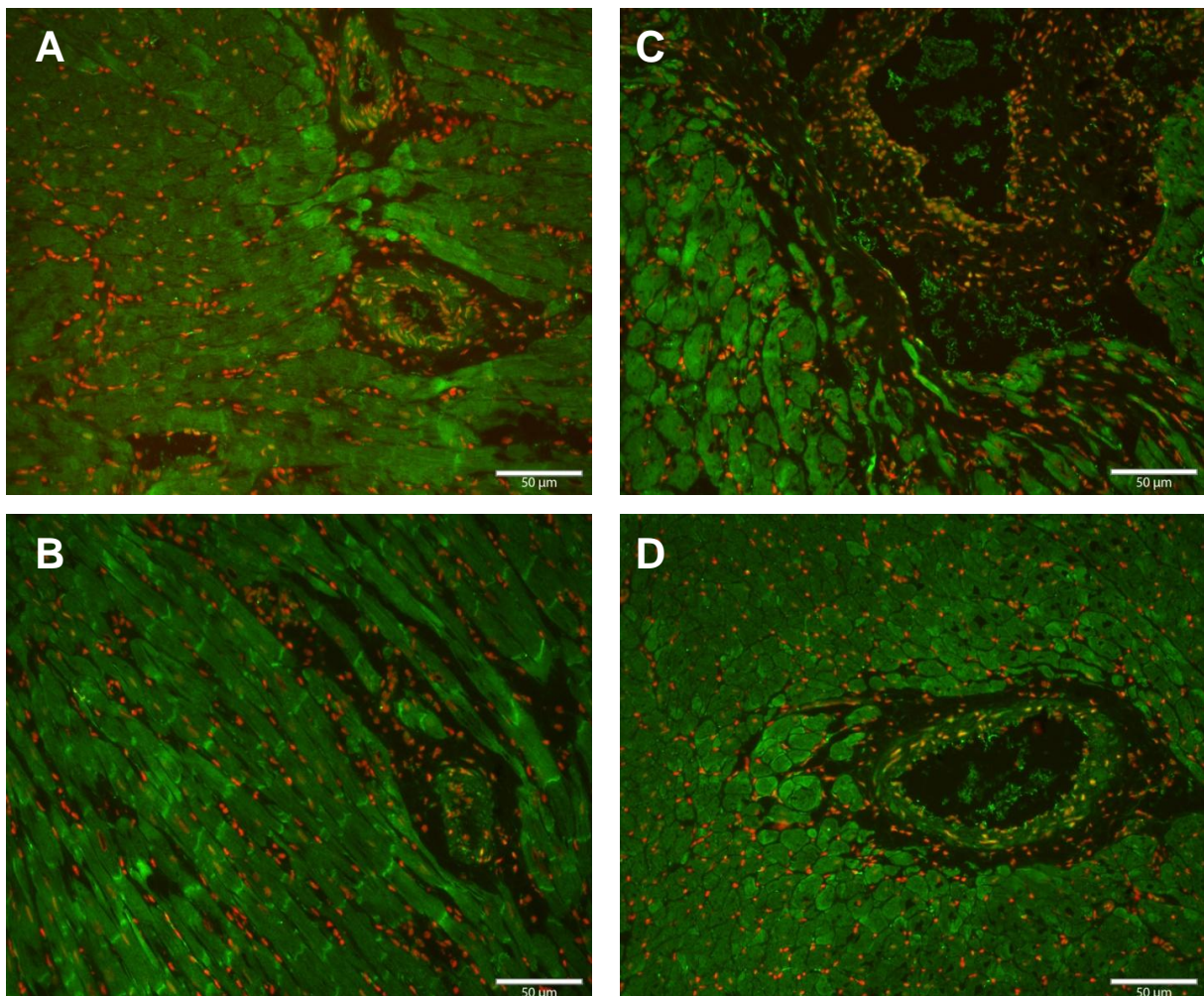


**Abb. 17: Geschlechtsabhängige Unterschiede in der PPAR $\gamma$ -Expression auf mRNA-Ebene.** Die Expression auf mRNA-Ebene zeigte für PPAR $\gamma$  einen geschlechtsabhängigen Unterschied. Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl); Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=8$ .

### 4.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von PPAR $\gamma$ im Myokard

Zur Lokalisation von PPAR $\gamma$  im Myokard der untersuchten Ratten wurden zunächst Paraffinschnitte (Dicke: 5 $\mu$ m) aus dem linken Ventrikel angefertigt und mit PPAR $\gamma$ -Antikörpern hybridisiert. Die Ergebnisse aus den Paraffinschnitten lieferten keine Ergebnisse, da keine lokalisierbare Anlagerung des Antikörpers stattfand. Daher wurden ebenfalls aus linksventrikulärem Gewebe anschließend Kryoschnitte angefertigt und mit dem PPAR $\gamma$ -Antikörper hybridisiert.

Die PPAR $\gamma$ -Expression konnte bei beiden Geschlechtern und unter beiden Diätformen sowohl in den Kardiomyozyten, in den Endothelzellen als auch in den VSMCs mikroskopisch nachgewiesen werden. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI.



**Abb. 18: Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der PPAR $\gamma$  -Expression**

Kryoschnitte des linksventrikulären Myokards von männlichen (A) und weiblichen (B) Dahl/S-Ratten unter Hochsalz-Diät (HS: 4 % NaCl) und männlichen (C) und weiblichen (D) Dahl/S-Ratten unter Normaldiät (ND: 0,1 % NaCl). Die PPAR $\gamma$ -Expression zeigte sich in den Kardiomyozyten, den VSMCs und den Endothelzellen in allen Gruppen.

Legende: grün: PPAR $\gamma$ ; rot: Kern. Vergrößerung: 40x.

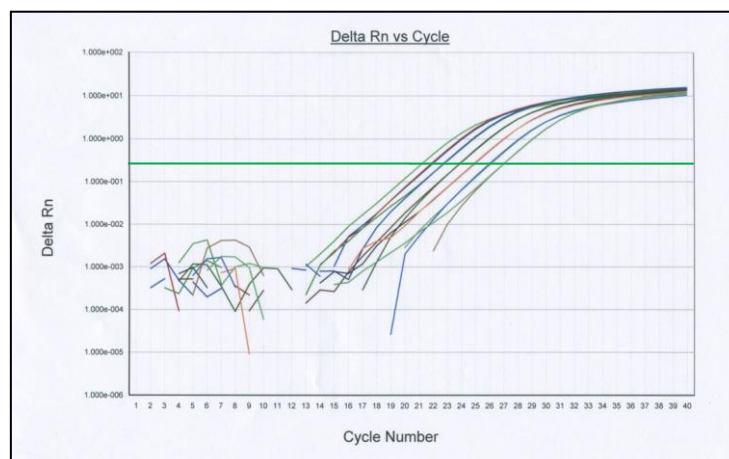


## 4.4 Ausgewählte Zielgene des kardialen Energiestoffwechsels

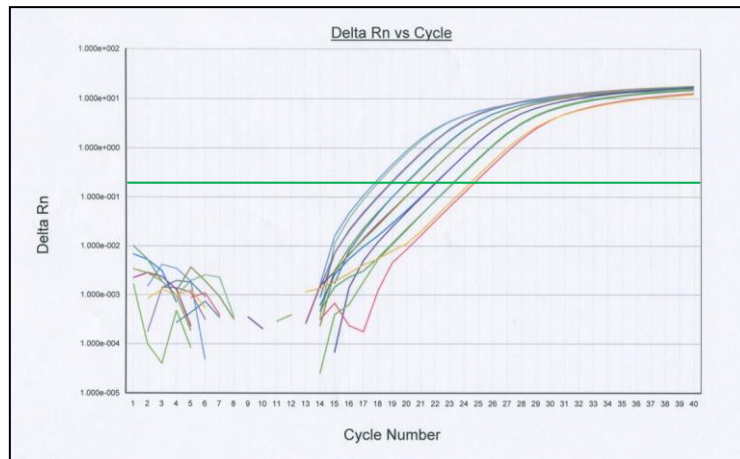
Die verwendete RNA wurde aus dem linkventrikulären Myokard der untersuchten Dahl/S-Ratten gewonnen und mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Jede Probe wurde im Doppelansatz aufgetragen. Die Messung aller Proben wurde insgesamt dreimal wiederholt und anschließend der Mittelwert aus den Einzelmessungen gebildet, um technische Ungenauigkeiten zu minimieren. Als „House-keeping“-Gen wurde HPRT gewählt, auf welches die Werte der untersuchten Gene bezogen wurden.

### Amplifikationskurven

Im Folgenden sind exemplarisch die Amplifikationskurven der Standardkurven des „House-keeping“-Gens HPRT und von CD36 dargestellt.



**Abb. 19: Amplifikationskurven HPRT.** Dargestellt sind die Amplifikationskurven der Standardwerte für den cDNA Probenpool mit dem HPRT Primerpaar. Der grüne horizontale Balken stellt den Schwellenwert dar, bei dem die „Auto-CT-Funktion“ der Abi 7000-Software die Werte der einzelnen Proben berechnet hat.

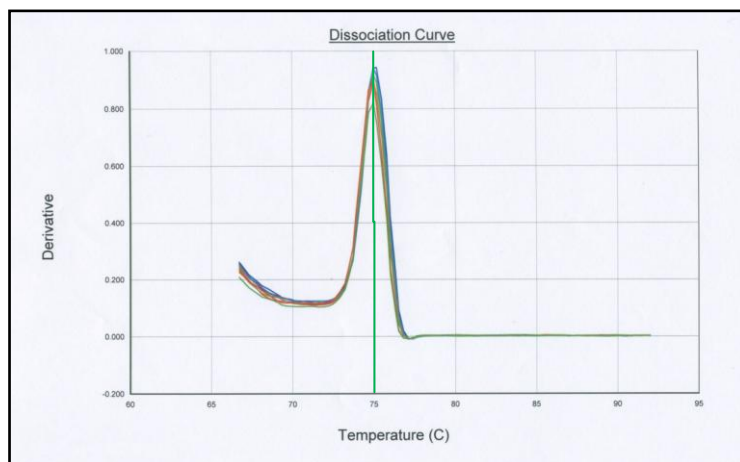


**Abb. 20: Amplifikationskurven CD36.** Dargestellt sind die Amplifikationskurven der Standardwerte für den cDNA Probenpool mit dem CD36 Primerpaar. Der grüne horizontale Balken stellt den Schwellenwert dar, bei dem die „Auto-CT-Funktion“ der Abi 7000-Software die Werte der einzelnen Proben berechnet hat.

### *Dissoziationskurven*

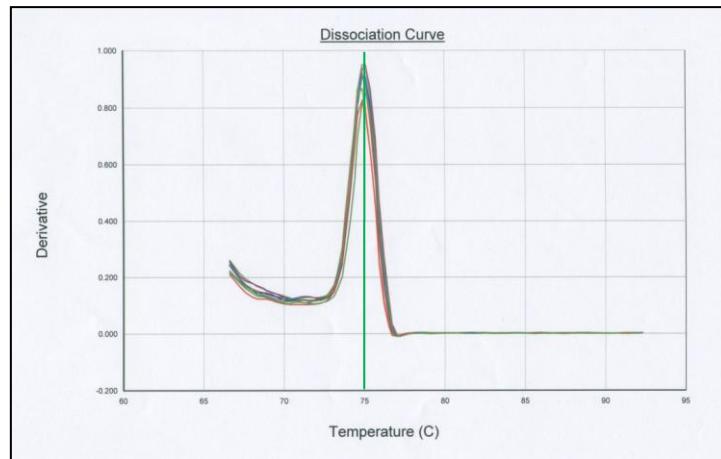
Die Bestimmung der Dissoziationskurven im Anschluss an eine qRT-PCR dienen der Spezifitätskontrolle der Primer, wie auch der internen Kontrolle.

Im Folgenden sind exemplarisch die Amplifikations- und Dissoziationskurven der PCR-Produkte für HPRT und CD36 dargestellt.



**Abb. 21: Dissoziationskurve der Standardwerte für HPRT.**

Dargestellt sind die Schmelzkurven der PCR-Produkte aus der Standardreihe. Die Spitze der Kurve markiert die genspezifische Schmelztemperatur.



**Abb. 22: Dissoziationskurve der Standardwerte für CD36.**

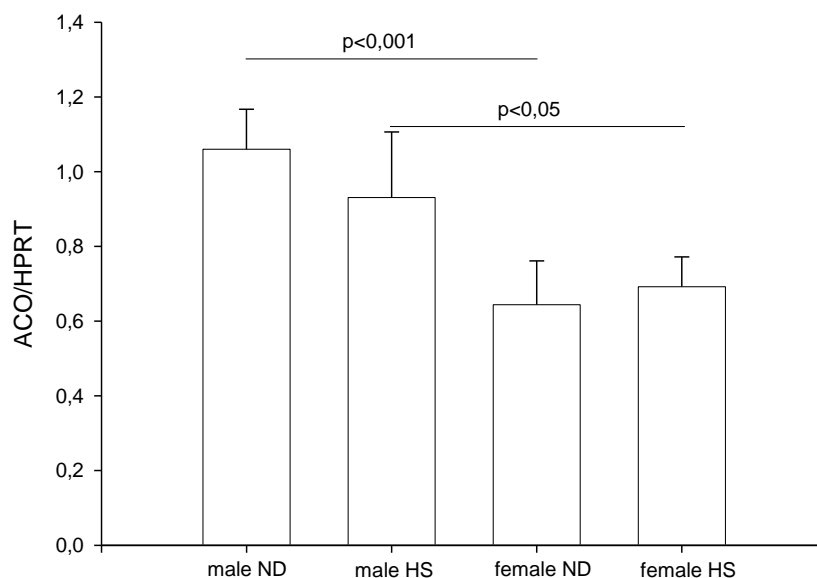
Dargestellt sind die Schmelzkurven der PCR-Produkte aus der Standardreihe. Die Spitze der Kurve markiert die genspezifische Schmelztemperatur.

#### 4.4.1 mRNA-Expression der Acyl-CoA-Oxidase (ACO)

Zur Einschätzung der Beeinflussung des peroxisomalen Lipidstoffwechsels durch die HS-Diät wurde die mRNA-Expression der Acyl-CoA-Oxidase (ACO) mit Hilfe der qRT-PCR untersucht.

Bei der Analyse der Ergebnisse zeigte sich eine geschlechtsabhängige aber diätunabhängige mRNA-Expression. Auch hier wiesen die männlichen Tiere beider Gruppen im Vergleich zu den weiblichen signifikant höhere Werte auf.

Dargestellt sind die Ergebnisse aus der qRT-PCR.



**Abb. 23: Expression der ACO auf mRNA-Ebene.**

Es zeigte sich eine signifikant höhere Expression der ACO-mRNA in den männlichen Tieren im Vergleich zu den weiblichen.

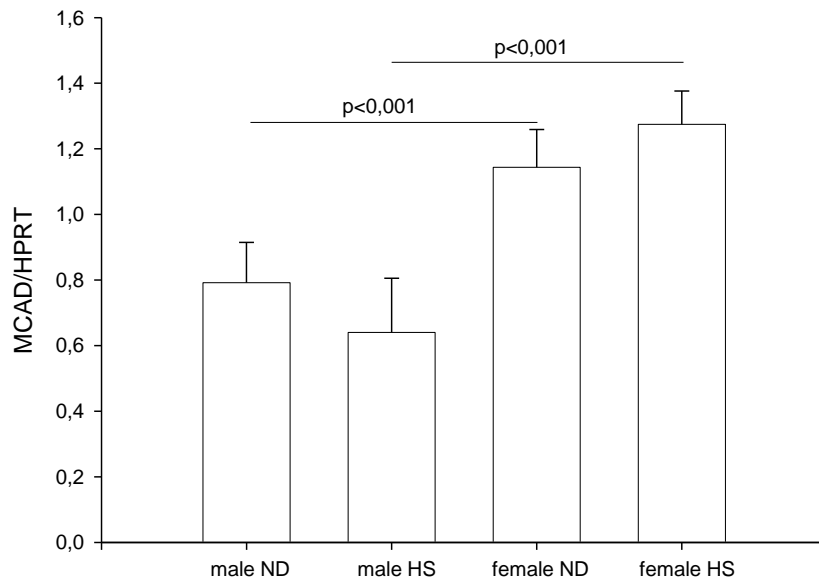
Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl); Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=8$ .

#### 4.4.2 mRNA-Expression der Medium-Chain-Acyl-Dehydrogenase (MCAD)

Um den Einfluss der HS-Diät auf den mitochondrialen Fettsäurestoffwechsel in den salzsensitiven Dahl-Ratten zu ermitteln, wurde die mRNA-Expression der MCAD ebenfalls mittels der qRT-PCR bestimmt.

Die Untersuchung der MCAD ergab eine diätunabhängige Regulation auf mRNA-Ebene. Hierbei wiesen die männlichen Tiere beider Diätgruppen im Vergleich zu den weiblichen eine signifikant geringere Expression der MCAD auf.

Dargestellt sind die Ergebnisse aus der qRT-PCR.



**Abb. 24: Expression der MCAD auf mRNA-Ebene.**

Die männlichen Tiere zeigen im Vergleich zu den weiblichen eine signifikant geringere MCAD-Expression auf mRNA-Ebene.

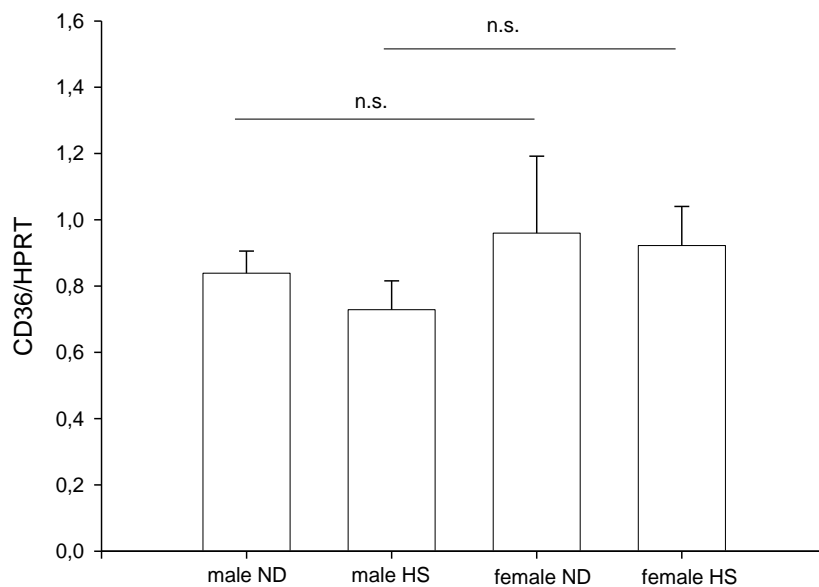
Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl); Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=8$ .

#### 4.4.3 mRNA-Expression des Cluster of Differentiation 36 (CD36)

Die mRNA-Expression von CD36 wurde als weiteres, in den Energiestoffwechsel der Herzmuskelzelle involviertes Zielgen von PPAR $\gamma$  bestimmt.

Die CD36- Expression auf mRNA-Ebene im Myokard der verwendeten Dahl/S-Ratten ließ keine Regulation erkennen.

Dargestellt sind die Ergebnisse aus der qRT-PCR.



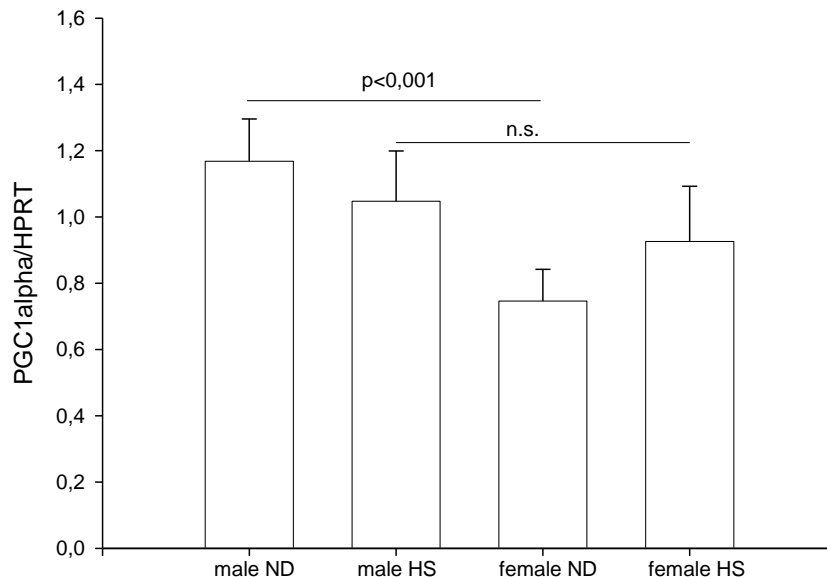
**Abb. 25: Expression des CD36 auf mRNA-Ebene.** Die CD36-mRNA-Expression wies keine signifikanten Unterschiede auf. Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl); Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=8$

#### 4.4.4 mRNA-Expression von PGC1 $\alpha$ auf mRNA-Ebene

Die mRNA-Expression des PPAR $\gamma$ -Kofaktors PGC1 $\alpha$  wurde mittels der qRT-PCR bestimmt.

Die PGC1 $\alpha$ -Expression zeigte in den ND-Gruppen bei den männlichen Tieren signifikant höhere Werte als bei den weiblichen. Tendentiell zeigte sich in den HS-Gruppen eine entsprechende Regulation, welche sich jedoch statistisch als nicht signifikant erwies.

Dargestellt sind die Ergebnisse aus der qRT-PCR.



**Abb. 26: Expression des PGC1 $\alpha$  auf mRNA-Ebene.**

Die Expression auf mRNA-Ebene wies für PGC1 $\alpha$  in den ND-Gruppen eine signifikant höhere Expression bei den männlichen im Vergleich zu den weiblichen Tieren auf. Der geschlechtsabhängige Unterschied in den HS-Gruppen erwies sich statistisch als nicht signifikant.

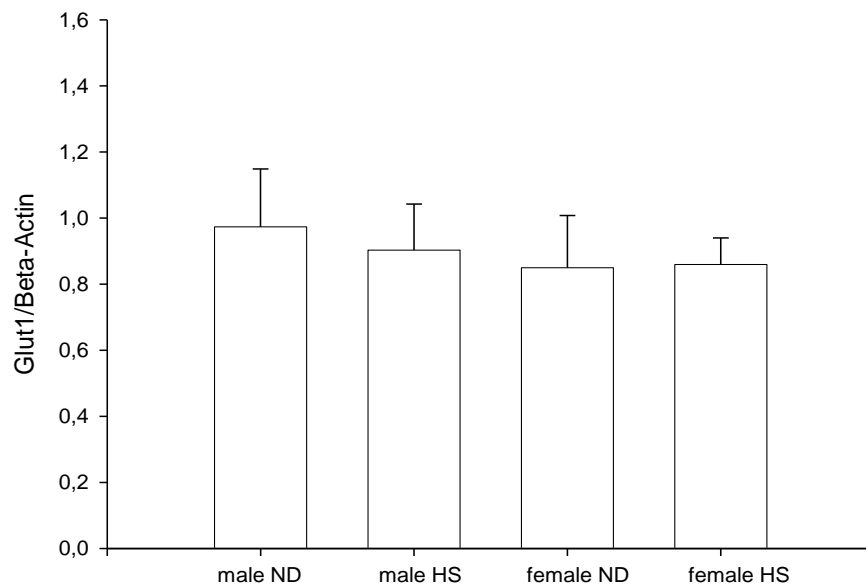
Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl); Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=8$ .

## 4.5 Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 auf Proteinebene

Um Veränderungen bzw. Unterschiede des Glukosestoffwechsels in den untersuchten Dahl/S-Ratten zu ermitteln, wurden mittels des Western-Blot-Verfahrens die Proteinexpressionen der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 ermittelt.

In den untersuchten Gruppen wurde keine Regulation des Glukosetransporters GLUT1 festgestellt.

Dargestellt sind die Ergebnisse GLUT1-Expression auf Proteinebene.

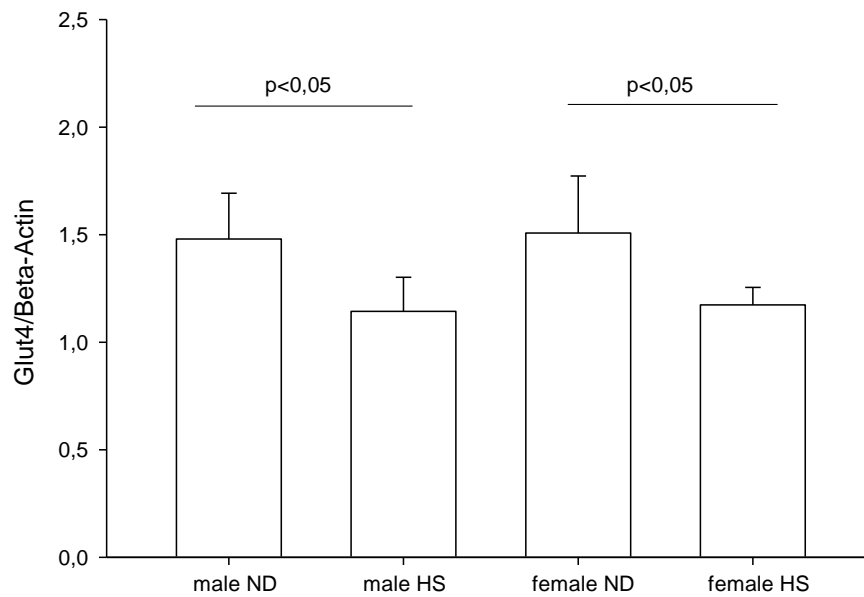


**Abb. 27: Ergebnisse der Western-Blot-Analyse der GLUT1-Expression.**

Die GLUT1-Proteinexpression zeigte keine signifikanten Veränderungen des Niveaus in den untersuchten Tieren.

Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl); Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=8$

Dargestellt sind die Ergebnisse GLUT4-Expression auf Proteinebene.



**Abb. 28: Ergebnisse der Western-Blot-Analyse der GLUT4-Expression.**

Die GLUT4-Proteinexpression zeigte eine signifikant geringere Expression in den hypertrophen Herzen. Geschlechtsunterschiede waren nicht nachweisbar.

Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl); Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=8$

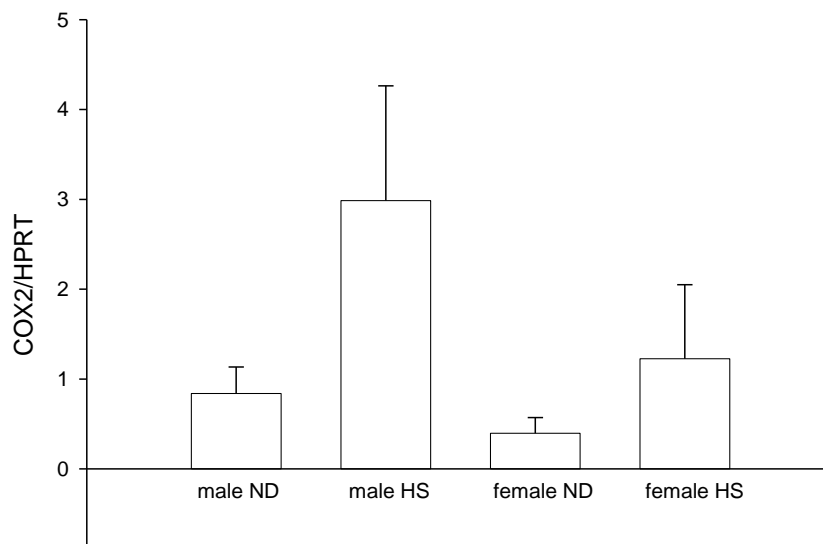
Die GLUT4-Expression zeigte in Abhängigkeit von der Diät eine verminderte mRNA-Expression in beiden Geschlechtern.



## 4.6 mRNA-Expression der Cyclooxygenase 2 (COX2) als Zielgen der Inflammation

Die Bestimmung der COX2-Expression der mRNA im Myokard der verwendeten Dahl/S-Ratten erfolgte ebenfalls mittels der qRT-PCR. Hierbei zeigten die Tiere unter HS-Diät eine tendentiell diätabhängige Regulation im Vergleich zu den jeweiligen ND-Gruppen. Da die Messung nur einmal durchgeführt wurde erfolgte keine statistische analyse und die Werte können nur als Tendenzen angesehen werden.

Dargestellt sind die Ergebnisse aus der qRT-PCR.



**Abb. 29: Expression der COX2 auf mRNA-Ebene.**

In den Hochsalgruppen (HS) zeigt sich tendentiell eine höhere Expression der COX2 im Vergleich zu den jeweiligen ND-Gruppen. Da die Messung nur einmal durchgeführt wurde können die Werte nur als Tendenzen angesehen werden.

Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl); Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=8$

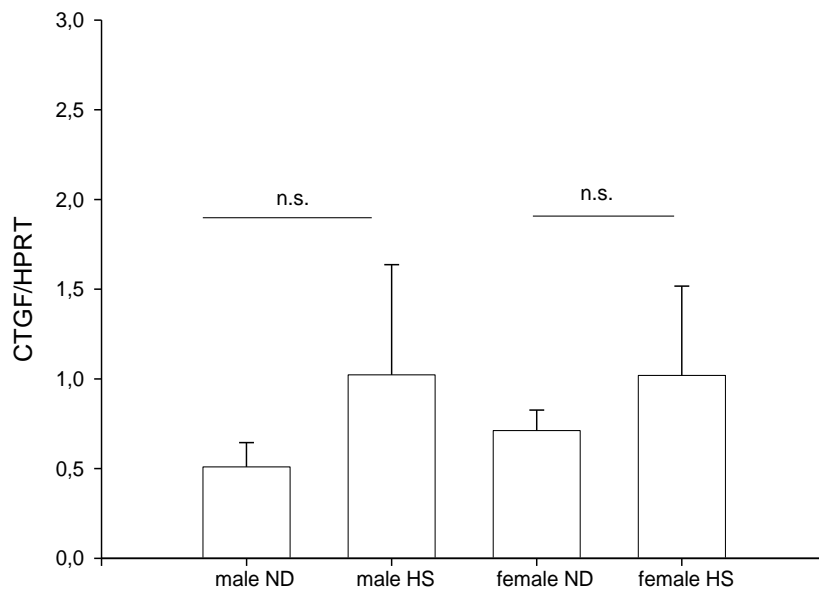
## 4.7 Myokardiale Fibrose unter Hochsalz-Diät

### 4.7.1 mRNA-Expression des Connective tissue growth factor (CTGF)

Als fibroseregulierender Faktor wurde die mRNA-Expression des Connective tissue growth factor (CTGF) ebenfalls mittels der qRT-PCR bestimmt.

Die CTGF-Expression auf mRNA-Ebene im Myokard der verwendeten Dahl/S-Ratten ließ keine signifikante Regulation erkennen. Tendenziell lässt sich jedoch ein Anstieg der CTGF-Expression unter HS-Diät erkennen, welcher aufgrund der großen Streuung in den Hochsalz-Gruppen nicht signifikant ist.

Dargestellt sind die Ergebnisse aus der qRT-PCR.



**Abb. 30: CTGF-Expression auf mRNA-Ebene.**

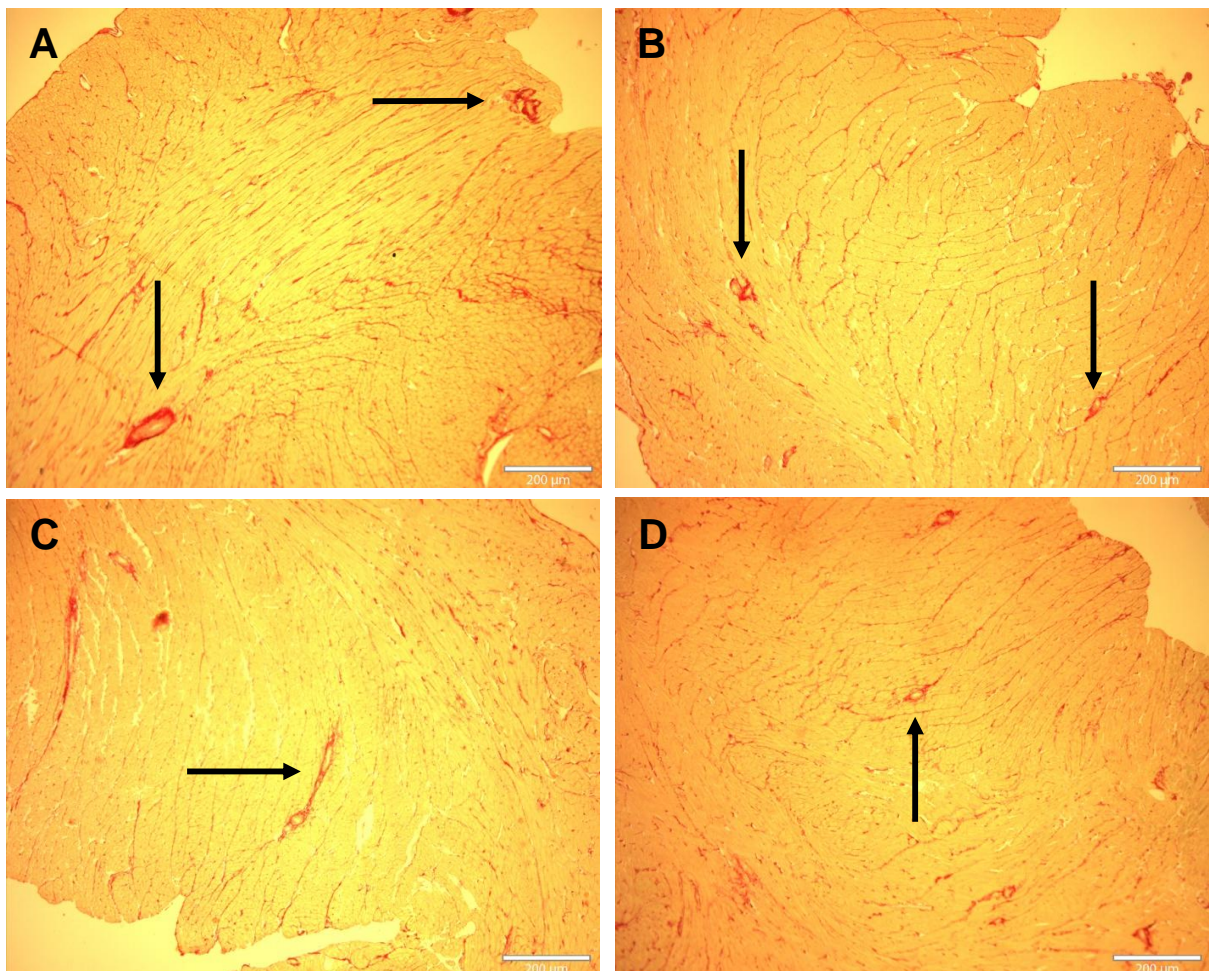
Die CTGF-mRNA-Expression wies keine signifikanten Unterschiede in der Expression auf, wobei tendenziell ein Anstieg in den Hochsalzgruppen beiderlei Geschlechts zu erkennen ist.

Gruppengröße  $n=8$ . ND: Normaldiät (0,1% NaCl); HS: Hochsalz- (4% NaCl); Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=8$

#### 4.7.2 Fibrosefärbung mit Sirius Red und CAB (Chromotrop Anilinblau)

Für die Fibrosefärbung mit Sirius Red wurden Kryoschnitte des linken Ventrikels der Dahl/S-Ratten verwendet, dargestellt wird je ein repräsentativer Gewebeschnitt der männlichen und der weiblichen Tiere unter Hochsalz- und Normaldiät.

In beiden Geschlechtern imponiert in der Sirius-Red-Färbung eine vermehrte perivaskuläre Fibrose unter HS-Diät. Zudem imponiert in den Hochsalzgruppen eine ausgeprägtere perivaskuläre Fibrose bei den männlichen Tieren im Vergleich zu den weiblichen.



**Abb. 31: Mikroskopische Aufnahmen der Fibrosefärbung mit Sirius-Red.**

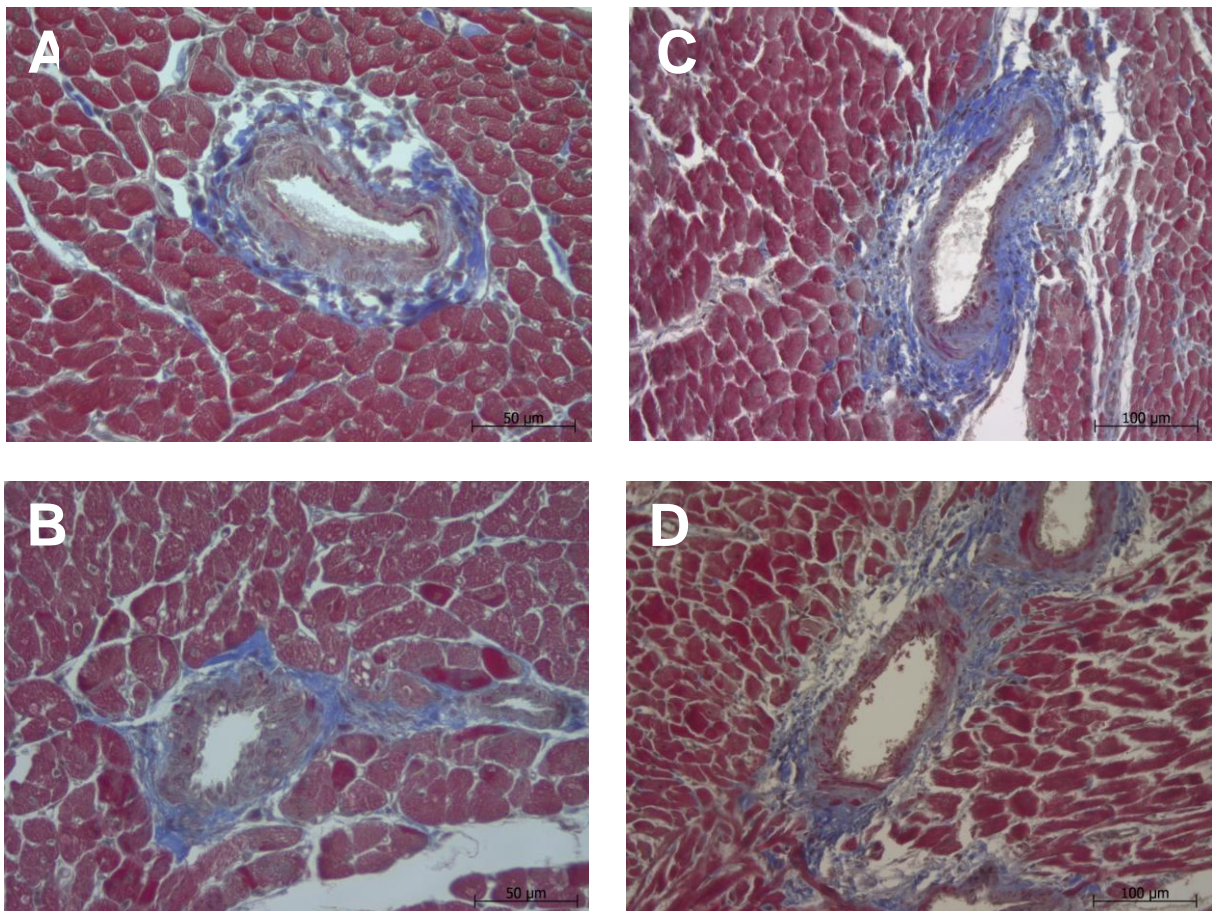
Kryoschnitte des linksventrikulären Myokards von männlichen (A) und weiblichen (B) Dahl/S-Ratten nach Hochsalz-Diät und von männlichen (C) und weiblichen (D) Ratten unter Normaldiät.

Insbesondere unter Hochsalz-Diät zeigten die männlichen Tiere eine tendentiell stärker ausgeprägte perivaskuläre Fibrose. Die interstitielle Fibrose imponiert nahezu identisch.

Legende: Fibrose: rot; Herzmuskulatur: gelb. Vergrößerung: 10x

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurde als zweites Verfahren die Darstellung der Fibrose mittels CAB-Färbung mit Anilin-Blau gewählt. Hier wurden ebenfalls Kryoschnitte des linken Ventrikels der Dahl-Ratten aus allen vier Untersuchungsgruppen verwendet.

In der CAB-Färbung lässt sich ebenfalls die tendentiell stärker ausgeprägte perivaskuläre Fibrose in den Gewebeschnitten der männlichen Tiere der Hochsalz-Gruppe im Vergleich zu den weiblichen Tieren erkennen.



**Abb. 32: Mikroskopische Aufnahmen der Fibrosefärbung mit CAB.**

Männliche (a) und weibliche (b) Dahl-HS-Ratten unter Hochsalz-Diät sowie männliche (c) und weibliche (d) Tiere unter Normaldiät. Insbesondere unter Hochsalz-Diät zeigten die männlichen Tiere eine tendentiell stärker ausgeprägte perivaskuläre Fibrose. Die interstitielle Fibrose wies keine Unterschiede in der Ausprägung zwischen den Geschlechtern oder den Diätgruppen auf.

*Legende: Fibrozyten: blau; Kardiomyozyten: rot. Vergrößerung: Male/Female ND: 40x; Male/Female HD: 20x.*

## 5 Diskussion

### 5.1 Herzhypertrophie und Hochsalz-Diät

Die in Abschnitt 3.1.1 dargelegte Analyse der Herzgewichte ergab eine deutliche Gewichtszunahme der Tiere unter HS-Diät im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Zusammenhang ist bekannt und wurde u.a. von Rapp *et al.*<sup>21</sup> und Inoko *et al.*<sup>35</sup> beschrieben. In der vorliegenden Studie erhielten die Tiere eine 4%ige NaCl-Diät. Häufiger werden Diäten mit 8%-NaCl-Gehalt verwendet, um einen schnelleren Blutdruckanstieg, eine rasch progrediente Herzinsuffizienz sowie massive Endorganschäden hervorzurufen<sup>120</sup>. Die 4%ige NaCl-Diät ermöglicht jedoch durch den langsameren Anstieg des Blutdrucks und die sich ebenfalls langsamer entwickelnden Endorganschäden eine längere Überlebenszeit der Tiere und damit eine genauere Evaluation der Anpassungsvorgänge des Energiestoffwechsels.

Aufgrund der Analyse der Herzgewichte kann davon ausgegangen werden, dass in der vorliegenden Arbeit auch unter der 4%-NaCl-Diät bereits eine kardiale Hypertrophie bei den Tieren der Hochsalzgruppen zum Zeitpunkt der Organentnahme vorlag. Zudem konnten auf Proteinexpressionsebene entsprechende Umstellungen des kardialen Stoffwechsels beobachtet werden (siehe 5.3 und 5.8).

Aus der Literatur ist bekannt, dass die salzsensitiven Dahl-Ratten auch unter salzarmer Diät eine Hypertonie entwickeln<sup>121</sup>. Allerdings ist die Hypertonie altersabhängig und bei drei Monate alten Tieren liegt der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) bei 119 mmHg<sup>121</sup>, was in diesem Modell als normotensiv gilt<sup>21</sup>. In der vorliegenden Arbeit können die Normaldiät-Gruppen als Kontrollgruppen verwendet werden, da zum Zeitpunkt der Organentnahme weder eine linksventrikuläre Hypertrophie noch ein erhöhter Blutdruck vorlagen.

Die höhere Streuung der Herzgewichte der weiblichen Tiere unter HS-Diät wird v.a. durch zwei Ausreisser hervorgerufen und ist somit nicht abschließend auswertbar. Die Analyse der Herzgewichte bezogen auf das Körpergewicht zeigte in den männlichen Tieren unter HS-Diät einen signifikant stärkeren Anstieg als in den weiblichen. Der Vergleich der Herzgewichte zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied, was an einer noch mäßigen Ausprägung der Hypertrophie zum Zeitpunkt der Organentnahme liegen könnte. In einem Maus-Modell konnte 2 Wochen nach TAC zunächst in beiden Geschlechtern eine vergleichbare linksventrikuläre Hypertrophie nachgewiesen werden, welche erst nach 6 Wochen

eine signifikant stärkere Ausbildung in den männlichen Tieren aufwies<sup>122</sup>.

In weiblichen Spontan-Hypertensiven-Ratten (SHR) konnte die geschlechtsabhängig unterschiedliche Hypertrophieentwicklung auf eine östrogenvermittelte verminderte arterielle Reaktivität auf vasoaktive Substanzen (z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und die damit vergesellschaftete Reduktion der oxidantieninduzierten Vasokonstriktion zurückgeführt werden<sup>123</sup>.

## 5.2 Analyse der Blutfette

Die statistische Analyse der Blutfette zeigte signifikant höhere TAG-Werte in den männlichen Tieren verglichen mit den weiblichen. Eine diätabhängige Regulation wurde nicht nachgewiesen.

Verglichen mit dem Wildtyp (Spargue-Dawley-Ratten) haben die salzsensitiven Dahl/S-Ratten wesentlich höhere Triacylglycerid-Plasmaspiegel. Als ursächlich hierfür wird ein Anstieg in der Triacylglycerid-Sekretion vermutet, dem eine geringere Kapazität zum Abbau gegenüber steht<sup>38</sup>. Hypertriglyceridämie gilt als ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen<sup>124</sup>.

Für männliche Dahl/S-Ratten sind erhöhte TAG-Werte im Vergleich zu anderen Rattenstämmen bekannt<sup>38</sup>. Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Geschlechterunterschied wurden von Wendt *et al.* Für die untersuchten Ratten bestätigt<sup>125</sup>.

Auch die Auswertung des Serumcholesterins zeigte geschlechtsabhängige Ergebnisse. Hier wiesen die männlichen Tiere unter HS-Diät signifikant höhere Werte als die weiblichen Tiere unter HS-Diät auf. Die ND-Gruppen zeigten tendenziell entsprechende Ergebnisse, welche jedoch keine Signifikanz aufwiesen. Entsprechende geschlechtsabhängige Unterschiede wurden von Wendt *et al.* für den untersuchten Rattenstamm bestätigt<sup>125</sup>.

Die LDL-Werte wiesen entsprechende geschlechtsspezifische Unterschiede auf. Die LDL-Konzentration im Plasma der weiblichen Tiere war signifikant geringer als in dem der männlichen. Dies ist für andere Modelle, beispielsweise für die Spontanhypertensive-Ratte (SHR), bekannt und ist mutmaßlich als Östrogen-Effekt zu werten<sup>123</sup>. Eine diätabhängige Regulation der LDL-Plasmaspiegel wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet und dies stützt die aus der Literatur bereits bekannte These, dass die geringere LDL-Konzentration weiblicher Individuen an den geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Blutdruckentwicklung nicht beteiligt

ist<sup>123, 126</sup>.

Die Auswertung der HDL-Werte wies keine Regulation in den untersuchten Gruppen auf. In einer Studie konnten Channa *et al.* einen Anstieg der HDL-Werte unter HS-Diät in der salzsensitiven Dahl-Ratte zeigen, wobei der prozentuale NaCl-Anteil der HS-Diät in besagter Studie, bei jeweils 8-wöchiger Diät, mit etwa 6% höher lag als in der vorliegenden Arbeit<sup>41</sup>.

### **5.3 Myokardiale Expression des Transkriptionsfaktors PPAR $\alpha$**

Auf Proteinebene konnte eine signifikante Verminderung der PPAR $\alpha$ -Expression in den Gewebeproben der Tiere unter HS-Diät nachgewiesen werden. Dies zeigte sich in beiden Geschlechtern. Ein Unterschied in der Proteinexpression zwischen männlichen und weiblichen Tieren konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

Die Analyse der PPAR $\alpha$ -Expression wurde nur auf Proteinebene durchgeführt, da sich die Ergebnisse aus der Western-Blot-Analyse mit denen bereits durchgeführter Studien decken<sup>57</sup>. Im Mausmodell konnte nach TAC eine signifikant geringere PPAR $\alpha$ -Genexpression nachgewiesen werden<sup>76</sup>.

Die PPAR $\alpha$ -regulierte Umstellung des bevorzugten Energiesubstrates von Fett zu Glukose wird als notwendige Veränderung zur Aufrechterhaltung der kardialen Leistungsfähigkeit im Rahmen einer fortschreitenden Hypertrophie gewertet<sup>57</sup>. In kardialem Gewebe von Spargue-Dawly-Ratten wurde, nach Aortenkonstriktion und konsekutiver Hypertrophieentwicklung, entsprechend eine regrediente PPAR $\alpha$ -Expression auf mRNA-Ebene beobachtet<sup>57</sup>. Weiterhin konnte bereits in anderen Studien nachgewiesen werden, dass bei Menschen mit linksventrikulärer Hypertrophie in Folge einer hypertensiven Erkrankung die PPAR $\alpha$ -Expression auf Proteinebene signifikant herabreguliert wird<sup>127</sup>. Die Verringerung der kardialen Expression von PPAR $\alpha$  wird als essentiell für die Umstellung des kardialen Energiestoffwechsels in der hypertoniebedingten Herzhypertrophie betrachtet<sup>57</sup>.

Obgleich die verminderte Expression von PPAR $\alpha$  auf Proteinebene bei beiden Geschlechtern gleich verläuft, zeigten die weiblichen Tiere in der vorliegenden Arbeit offenbar eine geringere gesundheitliche Beeinträchtigung (persönliche Mitteilung durch AG Prof. Kreuzt), welche sich auch in dem Anstieg der Herzgewichte und der Analyse der Serumcholesterinwerte widerspiegelte. Studien mit PPAR $\alpha$ -*knock-out*-Mäusen zeigten in diesem Zusammenhang eine intrazelluläre Akkumulation von Fetten in Herz und Leber sowie eine Hypoglykämie. Hierbei waren die Zeichen bei

den männlichen Tieren wesentlich ausgeprägter, was zu einer Letalität von 100% führte. Die Krankheitszeichen bei den weiblichen Tieren zeigten eine wesentlich geringere Ausprägung, hier betrug die Letalität nur 25%. Unter Behandlung mit  $\beta$ -Estradiol konnte die Letalität bei den männlichen Tieren deutlich gesenkt werden<sup>128</sup>. Eine vollständig fehlende PPAR $\alpha$ -Expression verursacht geschlechtsabhängig demnach deutlich unterschiedliche Folgezustände. Als Erklärung hierfür wird ein östrogenabhängiger Mechanismus diskutiert<sup>29, 128</sup>.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die bereits aus anderen Modellen bekannte Verminderung der PPAR $\alpha$ -Expression bei kardialer Hypertrophie auch in dem verwendeten Modell für salzsensitive Hypertonie mit konsekutiver linksventrikulärer Hypertrophie stattfindet.

#### **5.4 Myokardiale Expression des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$**

Die vorliegende Arbeit untersuchte die myokardiale PPAR $\gamma$ -Expression mit dem Ziel, diese hinsichtlich hypertrophieabhängiger und/oder geschlechtsspezifischer Unterschiede zu analysieren. Auf Protein- und mRNA-Ebene konnte eine signifikant höhere PPAR $\gamma$ -Expression in den Gewebeproben der männlichen Tiere unter HS- und ND-Diät nachgewiesen werden. Eine hypertrophieabhängige Expression wurde nicht nachgewiesen.

Der Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  wird als wichtiger Regulator des Energiestoffwechsels v.a. im Fettgewebe beschrieben. Hier reguliert er die Glukoseaufnahme und aktiviert die Triglyceridsynthese/-speicherung und beeinflusst somit den kardialen Energiestoffwechsel durch regulatorische Prozesse im extrakardialen Gewebe<sup>47</sup>. Von den PPAR-Isoformen wird PPAR $\gamma$  im Myokard am geringsten exprimiert und seine Bedeutung für den kardialen Energiestoffwechsel wird diskutiert<sup>48</sup>. Die fehlende diätabhängige Veränderung der PPAR $\gamma$ -Expression in der vorliegenden Arbeit spricht für eine fehlende Beteiligung des PPAR $\gamma$  an der hypertrophieassoziierten Stoffwechsellumstellung im hypertrophen Myokard. Zudem besteht die Möglichkeit, dass eine Anpassung der myokardialen PPAR $\gamma$ -Expression erst zu einem späteren Zeitpunkt der linksventrikulären Hypertrophieentwicklung eintritt, z.B. im Stadium der Dekompensation. Vorangegangene Arbeiten verweisen auf eine positive Beeinflussung der kardialen Hypertrophie durch die Aktivierung von PPAR $\gamma$ <sup>47, 65</sup>. Obwohl die myokardiale Expression von PPAR $\gamma$  in den meisten Modellen als vergleichsweise gering einzustufen ist, wurde in verschiedenen Studien



auf eine essentielle Bedeutung für den kardialen Stoffwechsel hingewiesen<sup>47</sup>. In Untersuchungen an kardiomyozytspezifischen PPAR $\gamma$ -*knock-out*-Mäusen zeigte sich beispielsweise eine rasch progrediente kardiale Hypertrophie, welche sich sowohl mit als auch ohne Vorliegen eines exogenen Risikofaktors entwickelte. Aufgrund dieser Ergebnisse wird PPAR $\gamma$  im Herzen u.a. eine hypertrophieinhibierende Wirkung zugeschrieben, welche vermutlich über eine Hemmung von NF- $\kappa$ B vermittelt wird<sup>116</sup>. Aus der Literatur ist bekannt, dass männliche salzsensitive Dahl/S-Ratten, im Vergleich zu männlichen salzresistenten Dahl/R-Ratten, eine signifikant geringere PPAR $\gamma$ -Expression aufweisen<sup>129</sup>. Dieser Umstand könnte auf einen Zusammenhang der verringerten PPAR $\gamma$ -Expression und der Salzsensitivität sowie der damit einhergehenden Problematik der Dahl/S-Ratten hinweisen. Es sind verschiedene Zusammenhänge bekannt, die für eine essentielle Beziehung zwischen der verminderten PPAR $\gamma$ -Expression der Dahl/S-Ratten und den weiteren Stoffwechselstörungen in diesem Modell sprechen: So weisen Dahl/S-Ratten zusätzlich zu der salzsensitiven Hypertonie und den daraus resultierenden Endorganschäden weitere Stoffwechselbesonderheiten wie Hypertonie, Dyslipidämie, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz auf<sup>37-39</sup>. Wie bereits einleitend erwähnt, spielt PPAR $\gamma$  in jedem der genannten Stoffwechselwege eine wichtige Rolle. Aufgrund dieser bekannten positiven Auswirkungen einer PPAR $\gamma$ -Aktivierung auf das kardiale System<sup>47, 64</sup> wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst eine erhöhte PPAR $\gamma$ -Expression/-Aktivierung in den weiblichen Tieren erwartet, da diese im Vergleich zu den männlichen Tieren einen günstigeren Verlauf hinsichtlich der kardialen Hypertrophie, der Hypertonie und der Blutfette aufwiesen. Entgegen dieser Erwartungen zeigten die Ergebnisse einen signifikanten, geschlechtsspezifischen Unterschied der PPAR-Expression sowohl auf Protein- auch auf mRNA-Ebene zugunsten der männlichen Tiere.

Im extrakardialen Gewebe aktiviert PPAR $\gamma$  die Triglyceridsynthese/-speicherung und ist somit ein Regulator der Lipidhomöostase<sup>47</sup>. Ergänzend wird vermutet, dass PPAR $\gamma$  ein Mediator der physiologischen Antwort auf eine erhöhte Lipidbelastung darstellt<sup>130</sup> wie sie im Blut der untersuchten männlichen Tiere vorlag.

Im Aortenklappengewebe von Schweinen mit Hypercholesterinämie konnte eine erhöhte Expression von PPAR $\gamma$  nachgewiesen werden, welche hier als reaktiver Prozess mit protektivem Effekt hinsichtlich einer Aortensklerose gewertet wurde<sup>131</sup>. In Kardiomyozyten von Charles-River-Ratten wurde infolge der verstärkten Exposition

mit Fettsäuren eine Aktivierung der PPARs erreicht und sowohl eine erhöhte Fettsäureoxidation als auch eine Verminderung der Hypertrophie gezeigt<sup>132</sup>. Folglich könnte die erhöhte PPAR $\gamma$ -Expression/Aktivierung in den Herzen der männlichen Tiere einem, möglicherweise insuffizienten, kompensatorischen Effekt infolge der erhöhten Blutfettwerte entsprechen.

Gegenstand weiterer Studien sind die Auswirkungen der ligandengesteuerten Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch exogene Agonisten, meist TZDs. Der Therapie mit TZDs wird nicht nur eine deutliche Verbesserung der Insulinresistenz<sup>42</sup>, sondern auch eine positive direkte Wirkung auf das Myokard zugeschrieben<sup>133</sup>.

Auf geschlechtsabhängige Unterschiede in der Wirkung der TZDs wurde in anderen Untersuchungen hingewiesen<sup>134</sup>. Die vorliegenden Ergebnisse könnten auf eine unterschiedliche kardiale Wirkung der TZDs hinweisen und einen Ausgangspunkt für weitere Studien darstellen. Allgemein betrachtet könnte der beobachtete Geschlechtsunterschied in der kardialen Expression von PPAR $\gamma$  eine Anregung zur Entwicklung einer geschlechtsspezifisch optimierten Therapie des Metabolischen Syndroms bieten, da die Stoffwechselstörungen der gewählten Versuchstiere in Teilen denen des Metabolischen Syndroms entsprechen<sup>41</sup>, welches beim Menschen deutliche Bezüge zur Aktivität von PPAR $\gamma$  aufweist.

Die Analyse der Herzgewichte in der vorliegenden Arbeit zeigte einen stärkeren Anstieg der kardialen Hypertrophie bei den männlichen Tieren im Vergleich zu den weiblichen, so dass die vermehrte PPAR $\gamma$ -Expression/-aktivierung offenbar keinen suffizienten protektiven Effekt zeigt. Von einem Zusammenhang zwischen der PPAR $\gamma$ -Expression/-Aktivierung und der Hypertrophieentwicklung kann bei fehlender Beeinflussung der PPAR $\gamma$ -Expression unter HS-Diät nicht ausgegangen werden und die Ergebnisse müssen hier als diät-/hypertrophieunabhängige Effekte betrachtet werden.

Die bessere klinische Situation der weiblichen Tiere könnte für eine östrogenbeeinflusste Regulation des kardialen Energiestoffwechsels in den weiblichen Tieren sprechen. So konnte in einer Arbeit über salzinduzierte kardiale Hypertrophie ein protektiver Östrogeneffekt hinsichtlich der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie, welcher u.a. über eine Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems vermittelt wird, beobachtet werden<sup>135</sup>. Auch andere Arbeiten weisen auf eine geschlechtsabhängige Regulation des kardialen Energiestoffwechsels hin, so wurde in einem Mausmodell nach Aortenkonstriktion (TAC) gezeigt, dass sowohl das

weibliche Geschlecht als auch der Östrogenrezeptor- $\beta$  zu einer verlangsamten Entwicklung der Herzinsuffizienz führen. Zudem konnte dem weiblichen Geschlecht ein protektiver Effekt bezüglich der Entwicklung einer linksventrikulären Dilatation und Hypertrophie zugeordnet werden<sup>122, 12</sup>. Mehrere Studien zeigen auch eine Beeinflussung verschiedener Signalkaskaden durch geschlechtsspezifische Hormone, so konnte auch den PPARs und deren Kofaktor PGC-1 $\alpha$  eine Beeinflussung durch das Sexualhormon Östrogen nachgewiesen werden<sup>29, 136, 137</sup>.

## 5.5 Auswahl der Zielgene des Fettstoffwechsels

Der Energiebedarf des gesunden, adulten Herzens wird zu ca. 65% aus Fettsäuren, zu ca. 30% aus Glukose und zu ca. 5% aus Laktat gedeckt. Im hypertrophen Herzmuskel hingegen erfolgt ein Wechsel des bevorzugten Substrates von Fettsäuren zu Glukose<sup>138</sup>. Zur Überprüfung dieses Substratwechsels in den untersuchten Kardiomyozyten wurden die Acyl-CoA-Oxidase, die Medium-Chain-Acyl-Dehydrogenase, CD36 und der PPAR-Koaktivator PGC1 $\alpha$  ausgewählt. Hier wurde entsprechend der beobachteten PPAR $\alpha$ -Regulation auf Proteinebene eine verminderte Expression der untersuchten Zielgene auf mRNA-Ebene in den hypertrophierten Rattenherzen erwartet. Da ebenfalls eine Regulation der genannten Zielgene über PPAR $\gamma$  bekannt ist, sollten diese zusätzlich auf geschlechtsabhängige Unterschiede überprüft werden, wie sie in der PPAR $\gamma$ -Expression auf Proteinebene beobachtet wurden.

### 5.5.1 Acyl-CoA-Oxidase (ACO)

Der erste geschwindigkeitsbestimmende Schritt der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation wird durch die Acyl-CoA-Oxidase (ACO), einem FAD-abhängigem Flavoprotein, katalysiert. Hierbei werden langkettige Fettsäure-Acyl-CoA-Substrate zu trans-Enoyl-CoA oxidiert. Die ACO kommt in drei verschiedenen Isoformen vor, welche durch alternatives *Splicing* des entsprechenden Gens entstehen<sup>75</sup>.

Die Analyse der Ergebnisse zeigte eine geschlechtsabhängige aber diät- bzw. blutdruckunabhängige Regulation der mRNA-Expression. Auch hier wiesen die männlichen Tiere beider Gruppen im Vergleich zu den weiblichen signifikant höhere Werte auf. Im Gegensatz hierzu wurde in einem Maus-Modell nach TAC eine hypertrophieabhängig geringere Expression der ACO und weiterer mitochondrialer Gene in den männlichen Tieren beobachtet<sup>122</sup>. In den transgenen Mäusen der bereits

oben angeführten Arbeit über die kardiale PPAR $\gamma$ -Überexpression zeigte sich eine verstärkte ACO-Expression gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe, was für eine Beeinflussung der ACO durch PPAR $\gamma$  spricht<sup>139</sup>, welche auch in der vorliegenden Arbeit für den nachgewiesenen, die PPAR $\gamma$ -Expression parallelisierenden, Expressionsunterschied verantwortlich sein könnte.

Wie bereits einleitend angeführt, ist aus der Literatur sowohl eine Regulation der ACO über PPAR $\alpha$  als auch eine PPAR $\alpha$ -unabhängige Regulation bekannt<sup>76,74</sup>.

### **5.5.2 Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase (MCAD)**

Die MCAD katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation von mittellangkettigen Fettsäuren. Um den Einfluss der PPAR $\gamma$ -Aktivität auf den mitochondrialen Fettsäurestoffwechsel in den salzsensitiven Dahl-Ratten zu ermitteln, wurde die mRNA-Expression der MCAD ebenfalls mittels der qRT-PCR bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wiesen die männlichen Tiere beider Diätgruppen, im Vergleich zu den weiblichen, eine signifikant geringere Expression der MCAD auf. Diese Ergebnisse verhalten sich gegensätzlich zur PPAR $\gamma$ -Expression und geben einen Hinweis auf grundsätzliche, geschlechtsspezifische Unterschiede der myokardialen MCAD-Aktivität. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde die MCAD im Herzmuskel bisher v.a. als von PPAR $\alpha$  beeinflusstes Gen beschrieben. In einem Tiermodell für Druckbelastung des linken Ventrikels in der Maus (Aortenkonstriktion) zeigte die MCAD eine PPAR $\alpha$ -abhängige Regulation<sup>76</sup>. Auch Spargue-Dawley-Ratten mit erhöhter kardialer Druckbelastung aufgrund einer Aortenkonstriktion wiesen eine PPAR $\alpha$  entsprechende Regulation auf<sup>57</sup>. Diese Ergebnisse sind mit der Umstellung des bevorzugten Energiesubstrates von Fett auf Glukose im Rahmen der kardialen Hypertrophieentwicklung vereinbar. So wurde entsprechend der Literaturrecherche zumindest eine tendenzielle Verminderung der MCAD-Expression in den Tieren unter HS-Diät erwartet, welche jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Die beobachtete gleichbleibende Expression der MCAD, wie sie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, wird in der Literatur während der kompensierten kardialen Hypertrophie beschrieben, womit für eine Aufrechterhaltung des Fettstoffwechsels bei gleichzeitigem Anstieg des Glukosestoffwechsels im Rahmen des Substratwechsels gesorgt wird<sup>140</sup>. Weitere Arbeiten zeigen ergänzend, eine konstante Enzymaktivität der MCAD während der kompensierten kardialen Hypertrophie, während sie bei einer kardialen

Dekompensation deutlich abnimmt<sup>141</sup>.

Die fehlende Anpassung der Zielgene des Fettstoffwechsels an den Substratwechsel des kardialen Energiestoffwechsels in der vorliegenden Arbeit kann dahingehend gewertet werden, dass sich die untersuchten Tiere zum Zeitpunkt der Organentnahme noch im Stadium der kompensierten Herzhypertrophie befanden.

### **5.5.3 Cluster of Differentiation 36 (CD36)**

CD36 wurde als PPAR-Zielgen ausgewählt aufgrund seiner wichtigen Funktion im Bereich des Transportes langkettiger Fettsäuren und Lipoproteine, sowie der Beteiligung an der Aufrechterhaltung der zellulären Lipidhomöostase in den Kardiomyozyten. Es wurde eine Herabregulation der CD36-mRNA-Expression erwartet, da diese aus der Literatur im Rahmen der Hypertrophieentwicklung für andere Modelle bereits bekannt ist. Die verminderte CD36-Expression wird der hypertrophiebedingten Änderung des präferierten Energiesubstrates der Kardiomyozyten von Fett zu Glukose zugeordnet<sup>140</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Regulation in der CD36-Expression auf mRNA-Ebene beobachtet werden, weder hinsichtlich der Hypertrophie, noch in Abhängigkeit des Geschlechtes. In Anlehnung an die Ergebnisse der Literaturrecherche bezüglich der MCAD-Expression könnten diese Ergebnisse ebenfalls auf das Vorliegen einer kompensierten Herzhypertrophie zum Zeitpunkt der Organentnahme hinweisen.

### **5.5.4 PPAR $\gamma$ -Kofaktor PGC1 $\alpha$**

PGC1 $\alpha$  wurde als Zielgen ausgewählt aufgrund der hohen Expression<sup>142</sup> im Herzmuskel und seiner Rolle als Koaktivator von PPAR $\alpha$  bei der Kontrolle der Transkription der Enzyme der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation<sup>143</sup> sowie als bekannter ligandenabhängiger Kofaktor von PPAR $\gamma$ <sup>90</sup>.

Die PGC1 $\alpha$ -Expression zeigte in den ND-Gruppen bei den männlichen Tieren signifikant höhere Werte als bei den weiblichen. Tendenziell zeigte sich in den HS-Gruppen eine gleichgerichtete Regulation, welche sich jedoch statistisch als nicht signifikant erwies. Die Expression der PGC1 $\alpha$ -mRNA verhält sich somit entsprechend der PPAR $\gamma$ -Expression auf Proteinebene.

Aus der Literatur ist eine parallele Regulation von PPAR $\alpha$  und PGC1 $\alpha$  in der Herzhypertrophie im Rahmen der Umstellung des kardialen Energiestoffwechsels aus anderen Modellen bekannt<sup>143</sup>. Die demnach zu erwartende hypertrophieabhängig verminderte PGC1 $\alpha$ -Expression auf mRNA-Ebene konnte in

der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden, auch hier käme das Vorliegen einer kompensierten Herzinsuffizienz als mögliche Erklärung in Betracht. Die unterschiedliche Expression in den weiblichen und männlichen Tieren spricht für einen geschlechtsabhängigen Unterschied in der kardialen Enzymaktivität im untersuchten Modell, dies ist aus der vorliegenden Literatur bisher nicht bekannt.

## 5.6 Zusammenfassende Darstellung und Beurteilung der Zielgene des Fettstoffwechsels

Stoffwechselweg	Zielgene	Regulation (ND)	Regulation (HS)	ND vs. HS
Fettstoffwechsel	ACO	M > W	M > W	M = M / W = W
Fettstoffwechsel	MCAD	M < W	M < W	M = M / W = W
Fettstoffwechsel	CD 36	M = W	M = W	M = M / W = W

**Tabelle 24: Zusammenfassende Darstellung der Regulation der Zielgene:** Dargestellt sind die männlichen (M) und weiblichen (W) Tiere unter Normaldiät (ND) bzw. Hochsalz-Diät (HS).

Die Untersuchung der mRNA-Expressionen der unterschiedlichen Zielgene (ACO, MCAD, CD36) des Fettstoffwechsels zeigte im Gegensatz zur PPAR $\alpha$ -Expression keine blutdruck- bzw. diätabhängige Regulation. Dies widerspricht zunächst anderen Arbeiten in denen eine verminderte Expression der am Fettstoffwechsel beteiligten Enzyme beobachtet wurde<sup>57, 76</sup>.

Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz wäre das Vorliegen einer kompensierten Herzinsuffizienz zum Zeitpunkt der Organentnahme in Anlehnung an die oben angeführten Ergebnisse der Literaturrecherche bezüglich der MCAD, womit für die Aufrechterhaltung des Fettstoffwechsels bei gleichzeitigem Anstieg des Glukosestoffwechsels im Rahmen des Substratwechsels gesorgt wird<sup>140</sup>.

Die fehlende Regulation der Zielgene in der vorliegenden Arbeit könnte jedoch auch auf eine Entkopplung des PPAR $\alpha$ -gesteuerten, kardialen Substratwechsels im hypertrophen Herzen der Dahl/S-Ratte hinweisen, welche möglicherweise zu der besonders zügigen Entwicklung einer Herzinsuffizienz in diesem Modell führt. Zur Erhärtung dieser Hypothese bedarf es allerdings weiterführender Analysen.

## 5.7 Beeinflussung des Glukosestoffwechsels

Zur Einschätzung des Glukosestoffwechsels in den hypertrophen linken Ventrikeln wurde die Expression von GLUT1 und GLUT4 auf Proteinebene bestimmt. GLUT1 ließ keine Regulation erkennen. Eine gleichbleibende GLUT1-Expression in der kardialen Hypertrophie ist bereits aus anderen Arbeiten bekannt<sup>144</sup>.

GLUT4 hingegen zeigte einen signifikanten Abfall der Expression unter salzreicher Diät. Eine geschlechtsabhängige Regulation der GLUT4-Expression konnte nicht festgestellt werden. Die verminderte GLUT4-Expression ist für insulinresistente

Individuen aus der Literatur bekannt<sup>150</sup>. Die Substratumstellung des kardialen Metabolismus während der Hypertrophieentwicklung, wobei Anstelle der Fettsäureoxidation, welche im gesunden Herzen hauptsächlich die Energieversorgung bestreitet, auf Glukoseoxidation<sup>13, 111</sup> umgestellt wird findet hier offenbar nicht statt. Für diese Umstellung des kardialen Energiestoffwechsels wird die oben beschriebene Reduktion der PPAR $\alpha$ -Expression in der Hypertrophie verantwortlich gemacht<sup>57</sup>. In Untersuchungen an PPAR $\alpha$ -defizienten Mäusen konnte entsprechend eine Steigerung der GLUT4-Expression gezeigt werden<sup>145</sup>.

## 5.8 Hypertrophieabhängige Inflammation

Die COX2 wurde als PPAR-reguliertes Zielgen in Hinblick auf die Beteiligung der PPARs an inflammatorischen Prozessen gewählt.

Die Ergebnisse der COX2-mRNA-Expression weisen tendenziell eine hypertrophieabhängige und geschlechtsunabhängige Regulation auf. So zeigen die Ergebnisse eine höhere Expression der COX2 in den hypertrophierten Herzen, welche jedoch aufgrund der geringen Probenmenge statistisch nicht ausgewertet wurde.

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine erhöhte COX2-Expression zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophy führt<sup>146</sup>. In diesem Zusammenhang wurde in *Vascular Smooth Muscle Cells* (VSMC) nachgewiesen, dass eine Herabregulierung von PPAR $\alpha$  zur einer erhöhten Expression von Interleukin-6 und COX2 führt und umgekehrt eine erhöhte PPAR $\alpha$ -Expression eine verminderte Expression von Interleukin-6 und COX2 zur Folge hat<sup>59</sup>. Diese Ergebnisse stützen Untersuchungen an einem PPAR $\alpha$ -*knock-out*-Modell, in denen eine verstärkte inflammatorische Reaktion beobachtet wurde<sup>147</sup>. Jaimes *et al.* konnten in den Nieren salzsensitiver Dahl/S-Ratten unter salzreicher Diät eine deutliche Steigerung der COX2 beobachten<sup>148</sup>.

## 5.9 Myokardiale Fibrose

Die Bestimmung des CTGF wurde in Hinblick auf die Beteiligung der PPARs an fibrotischen Prozessen gewählt.

In der mRNA-Expression des fibroseregulierenden Faktors CTGF ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Auffällig war die wesentlich stärkere Abweichung der Einzelwerte in den HS-Gruppen mit z.T. deutlich erhöhten Werten



der männlichen Tiere unter HS-Diät, welche auf eine bereits z.T. verstärkte Fibrose infolge des erhöhten Blutdrucks zurückgeführt werden kann.

Die irreguläre Regulation der CTGF-Expression könnte für einen frühen Zeitpunkt der kardialen Hypertrophieentwicklung in der vorliegenden Arbeit sprechen.

Die histologischen Schnitte zeigten in beiden Geschlechtern unter HS-Diät eine Zunahme der perivaskulären Fibrose, welche bei den männlichen Tieren etwas stärker imponierte als bei den weiblichen. Die Ausprägung der interstitiellen Fibrose zeigte sich in beiden Geschlechtern weitgehend identisch. Eine quantitative Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte nicht.

Bereits in der Framingham-Heart-Studie konnte gezeigt werden, dass die Hypertonie ein wichtiger Risikofaktor für die Herzinsuffizienz ist. Unter anderem führt ein erhöhter Blutdruck im Herzmuskel zu einer perivaskulären und interstitiellen Kollagenanreicherung<sup>149</sup>. Die tendentiell verstärkte perivaskuläre Fibrose, welche in der vorliegenden Arbeit bei den männlichen Tieren unter HS-Diät beobachtet wurde, ist somit in erster Linie auf den höheren Blutdruck der männlichen Tiere zurückzuführen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. WHO launches the World Health Statistics 2012. *Euro Surveill.* 16 MAY 2012 2012;17(20).
2. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* Jul 2013 2013;34(28):2159-2219.
3. Classen M DV, Kochsiek W. *Innere Medizin*: Urban & Fischer Verlag München Jena; 2004.
4. Ruilope LM, Schmieder RE. Left ventricular hypertrophy and clinical outcomes in hypertensive patients. *Am J Hypertens.* May 2008;21(5):500-508.
5. Messerli FH, Williams B, Ritz E. Essential hypertension. *Lancet.* Aug 18 2007;370(9587):591-603.
6. Goffart S, von Kleist-Retzow JC, Wiesner RJ. Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy. *Cardiovasc Res.* Nov 1 2004;64(2):198-207.
7. Benjamin EJ, Levy D. Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality? *Am J Med Sci.* Mar 1999;317(3):168-175.
8. Cabassi A, Dancelli S, Pattoneri P, et al. Characterization of myocardial hypertrophy in prehypertensive spontaneously hypertensive rats: interaction between adrenergic and nitrosative pathways. *J Hypertens.* Aug 2007;25(8):1719-1730.
9. Cook BB, Treiber FA, Mensah G, et al. Family history of hypertension and left ventricular mass in youth: possible mediating parameters. *Am J Hypertens.* Apr 2001;14(4 Pt 1):351-356.
10. Fortuno MA, Ravassa S, Fortuno A, et al. Cardiomyocyte apoptotic cell death in arterial hypertension: mechanisms and potential management. *Hypertension.* Dec 1 2001;38(6):1406-1412.
11. Douglas PS, Katz SE, Weinberg EO, et al. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J Am Coll Cardiol.* Oct 1998;32(4):1118-1125.
12. Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, et al. Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Jun 2010 2010;298(6):R1597-1606.
13. de las Fuentes L, Herrero P, Peterson LR, et al. Myocardial fatty acid metabolism: independent predictor of left ventricular mass in hypertensive heart disease. *Hypertension.* Jan 2003;41(1):83-87.
14. de Gaetano G. Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Group of the Primary Prevention Project. *Lancet.* Jan 13 2001;357(9250):89-95.
15. Dahl LK. Possible role of salt intake in the development of essential hypertension. 1960. *Int J Epidemiol.* Oct 2005;34(5):967-972; discussion 972-964, 975-968.
16. Weinberger MH, Fineberg NS, Fineberg SE, et al. Salt sensitivity, pulse pressure, and death in normal and hypertensive humans. *Hypertension.* Feb 2001;37(2 Part 2):429-432.
17. Walter Siegenthaler BRA-V. *Klinische Pathophysiologie*: Georg Thieme Verlag; 2006.
18. Weinberger MH, Miller JZ, Luft FC, et al. Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance. *Hypertension.* Jun 1986;8(6 Pt 2):II127-134.
19. Meneely GR, Ball CO, Youmans JB. Chronic sodium chloride toxicity: the protective effect of added potassium chloride. *Ann Intern Med.* Aug 1957;47(2):263-273.

20. Dahl LK, Heine M, Tassinari L. Effects of chronic excess salt ingestion. Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension. *J Exp Med*. Jun 1 1962;115:1173-1190.
21. Rapp JP, Dene H. Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension*. May-Jun 1985;7(3 Pt 1):340-349.
22. Rapp JP, McPartland RP, Sustarsic DL. A qualitative difference in plasma renin activity in Dahl rats susceptible or resistant to salt-induced hypertension. *Biochem Genet*. Dec 1980;18(11-12):1087-1096.
23. Tian N, Gu JW, Jordan S, et al. Immune suppression prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb 2007;292(2):H1018-1025.
24. Churchill PC, Churchill MC, Bidani AK. Kidney cross transplants in Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Am J Physiol*. Jun 1992;262(6 Pt 2):H1809-1817.
25. Hu J, Zhu Q, Xia M, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells into the renal medulla attenuated salt-sensitive hypertension in Dahl S rat. *J Mol Med (Berl)*. Aug 19 2014.
26. Dahl LK, Knudsen KD, Ohanian EV, et al. Role of the gonads in hypertension-prone rats. *J Exp Med*. Sep 1 1975;142(3):748-759.
27. Hinojosa-Laborde C, Lange DL, Haywood JR. Role of female sex hormones in the development and reversal of dahl hypertension. *Hypertension*. Jan 2000;35(1 Pt 2):484-489.
28. Zheng W, Ji H, Maric C, et al. Effect of dietary sodium on estrogen regulation of blood pressure in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Apr 2008;294(4):H1508-1513.
29. Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, et al. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Clin Invest*. Sep 15 1998;102(6):1083-1091.
30. Gong G, Dobin A, Johnson ML, et al. Sexual dimorphism of renal alpha2-adrenergic receptor regulation in Dahl rats. *Hypertens Res*. Jun 1996;19(2):83-89.
31. Gesek FA. Stimulation of alpha 2-adrenergic receptors increases Na(+)-K(+)-ATPase activity in distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol*. Oct 1993;265(4 Pt 2):F561-568.
32. Sakata Y, Masuyama T, Yamamoto K, et al. Renin angiotensin system-dependent hypertrophy as a contributor to heart failure in hypertensive rats: different characteristics from renin angiotensin system-independent hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*. Jan 2001;37(1):293-299.
33. Liang B, Leenen FH. Prevention of salt induced hypertension and fibrosis by angiotensin converting enzyme inhibitors in Dahl S rats. *Br J Pharmacol*. Nov 2007;152(6):903-914.
34. Tian N, Moore RS, Braddy S, et al. Interactions between oxidative stress and inflammation in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Dec 2007;293(6):H3388-3395.
35. Inoko M, Kihara Y, Morii I, et al. Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol*. Dec 1994;267(6 Pt 2):H2471-2482.
36. Podesser BK, Jain M, Ngoy S, et al. Unveiling gender differences in demand ischemia: a study in a rat model of genetic hypertension. *Eur J Cardiothorac Surg*. Feb 2007;31(2):298-304.
37. Herrera VL, Didishvili T, Lopez LV, et al. Genome-wide scan identifies novel QTLs for cholesterol and LDL levels in F2[Dahl RxS]-intercross rats. *Circ Res*. Mar 5 2004;94(4):446-452.

38. Mondon CE, Plato PA, Dall'Aglio E, et al. Mechanism of hypertriglyceridemia in Dahl rats. *Hypertension*. Mar 1993;21(3):373-379.
39. Somova L, Channa ML. Glucose metabolism and insulin sensitivity in Dahl hypertensive rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. Jul-Aug 1999;21(6):421-425.
40. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. Dec 1988;37(12):1595-1607.
41. Channa ML, Somova L, Nadar A. Facets of the metabolic syndrome in Dahl hypertensive rats. *Cardiovasc J S Afr*. Mar-Apr 2004;15(2):61-63.
42. He W, Barak Y, Hevener A, et al. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 23 2003;100(26):15712-15717.
43. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. Oct 18 1990;347(6294):645-650.
44. Wahli W, Braissant O, Desvergne B. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chem Biol*. May 1995;2(5):261-266.
45. Fliegner D, Westermann D, Riad A, et al. Up-regulation of PPARgamma in myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*. Jan 2008;10(1):30-38.
46. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*. Feb 2005;51(2):85-94.
47. Huss JM, Kelly DP. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res*. Sep 17 2004;95(6):568-578.
48. Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res*. Mar 21 2003;92(5):518-524.
49. Barrera G, Toaldo C, Pizzimenti S, et al. The Role of PPAR Ligands in Controlling Growth-Related Gene Expression and their Interaction with Lipoperoxidation Products. *PPAR Res*. 2008;2008:524671.
50. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett*. Oct 30 1998;438(1-2):55-60.
51. Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, et al. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest*. Jun 1 1996;97(11):2553-2561.
52. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, et al. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*. May 15 1994;8(10):1224-1234.
53. Barger PM, Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med*. Aug 2000;10(6):238-245.
54. Braissant O, Fougelle F, Scotto C, et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. Jan 1996;137(1):354-366.
55. Lehman JJ, Kelly DP. Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Apr 2002;29(4):339-345.
56. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. Jun 1999;103(11):1489-1498.
57. Young ME, Laws FA, Goodwin GW, et al. Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart. *J Biol Chem*. Nov 30 2001;276(48):44390-44395.

58. Duerr GD, Heinemann JC, Arnoldi V, et al. Cardiomyocyte specific peroxisome proliferator-activated receptor-alpha overexpression leads to irreversible damage in ischemic murine heart. *Life Sci.* May 2 2014;102(2):88-97.
59. Staels B, Koenig W, Habib A, et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature.* Jun 25 1998;393(6687):790-793.
60. Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes.* Aug 2005;54(8):2460-2470.
61. Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, et al. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol.* Aug 1993;13(8):4753-4759.
62. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell.* Oct 1999;4(4):585-595.
63. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, et al. Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest.* Mar 2003;111(5):737-747.
64. Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension.* Oct 2003;42(4):664-668.
65. Hinrichs S, Heger J, Schreckenber R, et al. Controlling cardiomyocyte length: the role of renin and PPAR- $\gamma$ . *Cardiovasc Res.* Feb 1 2010;89(2):344-352.
66. Willson TM, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol.* Aug 1997;1(2):235-241.
67. Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, et al. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med.* Aug 2007;262(2):184-198.
68. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. *Cell.* Dec 16 2005;123(6):993-999.
69. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* Feb 7 1997;272(6):3406-3410.
70. Adamson DJ, Frew D, Tatoud R, et al. Diclofenac antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling. *Mol Pharmacol.* Jan 2002;61(1):7-12.
71. Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* Mar 2000;129(5):823-834.
72. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol.* Jul 2004;5(7):419-429.
73. Gulick T, Cresci S, Caira T, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 8 1994;91(23):11012-11016.
74. Watanabe K, Fujii H, Takahashi T, et al. Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha associated with age-dependent cardiac toxicity. *J Biol Chem.* Jul 21 2000;275(29):22293-22299.
75. Osumi T, Ishii N, Miyazawa S, et al. Isolation and structural characterization of the rat acyl-CoA oxidase gene. *J Biol Chem.* Jun 15 1987;262(17):8138-8143.
76. Barger PM, Brandt JM, Leone TC, et al. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. *J Clin Invest.* Jun 2000;105(12):1723-1730.
77. Löffler G, Petrides, Pedro E. *Biochemie und Pathobiochemie.* Vol 7. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2003.

78. Kelly DP, Gordon JI, Alpers R, et al. The tissue-specific expression and developmental regulation of two nuclear genes encoding rat mitochondrial proteins. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase and mitochondrial malate dehydrogenase. *J Biol Chem*. Nov 15 1989;264(32):18921-18925.
79. Nagao M, Parimoo B, Tanaka K. Developmental, nutritional, and hormonal regulation of tissue-specific expression of the genes encoding various acyl-CoA dehydrogenases and alpha-subunit of electron transfer flavoprotein in rat. *J Biol Chem*. Nov 15 1993;268(32):24114-24124.
80. Armesilla AL, Vega MA. Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *J Biol Chem*. Jul 22 1994;269(29):18985-18991.
81. Krieger M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest*. Sep 2001;108(6):793-797.
82. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, et al. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*. Jun 5 1993;268(16):11811-11816.
83. Dhaliwal BS, Steinbrecher UP. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta*. Aug 1999;286(1-2):191-205.
84. Calvo D, Gomez-Coronado D, Suarez Y, et al. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res*. Apr 1998;39(4):777-788.
85. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, et al. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. Apr 17 1998;93(2):229-240.
86. Nicholson AC, Han J, Febbraio M, et al. Role of CD36, the macrophage class B scavenger receptor, in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. Dec 2001;947:224-228.
87. Draude G, Lorenz RL. TGF-beta1 downregulates CD36 and scavenger receptor A but upregulates LOX-1 in human macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Apr 2000;278(4):H1042-1048.
88. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*. Sep 2001;108(6):785-791.
89. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*. Feb 2003;24(1):78-90.
90. Lowell BB. PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell*. Oct 29 1999;99(3):239-242.
91. van Raalte DH, Li M, Pritchard PH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. *Pharm Res*. Sep 2004;21(9):1531-1538.
92. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, et al. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol*. Sep 1991;114(6):1285-1294.
93. Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev*. Sep 1997;8(3):171-179.
94. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, et al. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol*. Sep 1996;107(3):404-411.
95. Rossi MA. Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. *J Hypertens*. Jul 1998;16(7):1031-1041.

96. Panek AN, Posch MG, Alenina N, et al. Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertrophy and protection against pressure overload. *PLoS One*. 2009;4(8):e6743.
97. Koitabashi N, Arai M, Kogure S, et al. Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis. *Hypertension*. May 2007;49(5):1120-1127.
98. Zhang GY, Cheng T, Zheng MH, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits transforming growth factor-beta1 induction of connective tissue growth factor and extracellular matrix in hypertrophic scar fibroblasts in vitro. *Arch Dermatol Res*. Aug 2009;301(7):515-522.
99. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*. Dec 27 1996;271(52):33157-33160.
100. Buerkle MA, Lehrer S, Sohn HY, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles in vivo. *Circulation*. Oct 5 2004;110(14):2053-2059.
101. Kennedy CR, Zhang Y, Brandon S, et al. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nat Med*. Feb 1999;5(2):217-220.
102. Bjarnason I, Thjodleifsson B. Gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: the effect of nimesulide compared with naproxen on the human gastrointestinal tract. *Rheumatology (Oxford)*. May 1999;38 Suppl 1:24-32.
103. Davies G, Martin LA, Sacks N, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention. *Ann Oncol*. May 2002;13(5):669-678.
104. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 15 2002;99(21):13926-13931.
105. Goulet JL, Pace AJ, Key ML, et al. E-prostanoid-3 receptors mediate the proinflammatory actions of prostaglandin E2 in acute cutaneous inflammation. *J Immunol*. Jul 15 2004;173(2):1321-1326.
106. Scoditti E, Massaro M, Carluccio MA, et al. PPAR{gamma} agonists inhibit angiogenesis by suppressing PKC{alpha}- and CREB-mediated COX-2 expression in the human endothelium. *Cardiovasc Res*. Jan 19, 2010 2010.
107. Abel ED. Glucose transport in the heart. *Front Biosci*. Jan 1 2004;9:201-215.
108. Schwenk RW, Luiken JJ, Bonen A, et al. Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. *Cardiovasc Res*. Jul 15 2008;79(2):249-258.
109. Miura S, Kai Y, Ono M, et al. Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha down-regulates GLUT4 mRNA in skeletal muscles. *J Biol Chem*. Aug 15 2003;278(33):31385-31390.
110. Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, et al. Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1 1991;88(17):7815-7819.
111. Huss JM, Kelly DP. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest*. Mar 2005;115(3):547-555.
112. Guan Y, Hao C, Cha DR, et al. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med*. Aug 2005;11(8):861-866.
113. Colca JR, McDonald WG, Kletzien RF. Mitochondrial target of thiazolidinediones. *Diabetes Obes Metab*. Apr 29 2014.

114. Ryan MJ, Didion SP, Mathur S, et al. PPAR( $\gamma$ ) agonist rosiglitazone improves vascular function and lowers blood pressure in hypertensive transgenic mice. *Hypertension*. Mar 2004;43(3):661-666.
115. Anderson JL, Keeley MC, Smith SC, et al. Rosiglitazone modulates pigeon atherosclerotic lipid accumulation and gene expression in vitro. *Poult Sci*. Jun 2014;93(6):1368-1374.
116. Duan SZ, Ivashchenko CY, Russell MW, et al. Cardiomyocyte-specific knockout and agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  both induce cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res*. Aug 19 2005;97(4):372-379.
117. Bolten CW, Payne MA, McDonald WG, et al. Thiazolidinediones inhibit the progression of established hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. *Diab Vasc Dis Res*. Jun 2007;4(2):117-123.
118. Siegel AK, Planert M, Rademacher S, et al. Genetic loci contribute to the progression of vascular and cardiac hypertrophy in salt-sensitive spontaneous hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jul 1 2003;23(7):1211-1217.
119. Bihorac A, Tezcan H, Ozener C, et al. Association between salt sensitivity and target organ damage in essential hypertension. *Am J Hypertens*. Aug 2000;13(8):864-872.
120. Kobayashi N, Nakano S, Mori Y, et al. Benidipine inhibits expression of ET-1 and TGF- $\beta$ 1 in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertens Res*. May 2001;24(3):241-250.
121. Hinojosa-Laborde C, Craig T, Zheng W, et al. Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. Oct 2004;44(4):405-409.
122. Witt H, Schubert C, Jaekel J, et al. Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. *J Mol Med (Berl)*. Sep 2008;86(9):1013-1024.
123. Packer CS, Pelaez NJ, Johnson TC. Gender dichotomy in reactivity to the vasoactive oxidant hydrogen peroxide in spontaneously hypertensive rats. *J Genet Specif Med*. May-Jun 2002;5(3):17-23.
124. Cullen P. Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor. *Am J Cardiol*. Nov 1 2000;86(9):943-949.
125. Wendt N, Schulz A, Qadri F, et al. Genetic analysis of salt-sensitive hypertension in Dahl rats reveals a link between cardiac fibrosis and high cholesterol. *Cardiovasc Res*. Oct 22 2008.
126. Williams CM. Lipid metabolism in women. *Proc Nutr Soc*. Feb 2004;63(1):153-160.
127. Goikoetxea MJ, Beaumont J, Gonzalez A, et al. Altered cardiac expression of peroxisome proliferator-activated receptor-isoforms in patients with hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res*. Mar 1 2006;69(4):899-907.
128. Djouadi F, Weinheimer CJ, Kelly DP. The role of PPAR  $\alpha$  as a "lipostat" transcription factor. *Adv Exp Med Biol*. 1999;466:211-220.
129. Kobayashi N, Ohno T, Yoshida K, et al. Cardioprotective mechanism of telmisartan via PPAR- $\gamma$ -eNOS pathway in dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Am J Hypertens*. May 2008;21(5):576-581.
130. Ferre P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*. Feb 2004;53 Suppl 1:S43-50.
131. Guerraty MA, Grant GR, Karanian JW, et al. Hypercholesterolemia induces side-specific phenotypic changes and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  pathway activation in swine aortic valve endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Feb 2010;30(2):225-231.
132. Pellieux C, Montessuit C, Papageorgiou I, et al. Inactivation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ , and  $\gamma$  mediate distinct facets of hypertrophic transformation of adult cardiac myocytes. *Pflugers Arch*. Dec 2007;455(3):443-454.



133. Abou Daya K, Abu Daya H, Nasser Eddine M, et al. Effects of rosiglitazone (PPAR gamma agonist) on the myocardium in non-hypertensive diabetic rats. *J Diabetes*. Feb 18 2014.
134. Fujita Y, Yamada Y, Kusama M, et al. Sex differences in the pharmacokinetics of pioglitazone in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. Sep 2003;136(1):85-94.
135. Sangaralingham SJ, Tse MY, Pang SC. Estrogen delays the progression of salt-induced cardiac hypertrophy by influencing the renin-angiotensin system in heterozygous proANP gene-disrupted mice. *Mol Cell Biochem*. Dec 2007;306(1-2):221-230.
136. Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. May 2006;5(5):425-438.
137. Murphy E, Steenbergen C. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. Aug 1 2007;75(3):478-486.
138. van Bilsen M, van der Vusse GJ, Reneman RS. Transcriptional regulation of metabolic processes: implications for cardiac metabolism. *Pflugers Arch*. Dec 1998;437(1):2-14.
139. Son NH, Park TS, Yamashita H, et al. Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice. *J Clin Invest*. Oct 2007;117(10):2791-2801.
140. Yamashita H, Bharadwaj KG, Ikeda S, et al. Cardiac metabolic compensation to hypertension requires lipoprotein lipase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Sep 2008;295(3):E705-713.
141. Sack MN, Rader TA, Park S, et al. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation*. Dec 1 1996;94(11):2837-2842.
142. Lin J, Puigserver P, Donovan J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem*. Jan 18 2002;277(3):1645-1648.
143. Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol*. Mar 2000;20(5):1868-1876.
144. Taegtmeier H, Wilson CR, Razeghi P, et al. Metabolic energetics and genetics in the heart. *Ann N Y Acad Sci*. Jun 2005;1047:208-218.
145. Finck BN. The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease. *Cardiovasc Res*. Jan 15 2007;73(2):269-277.
146. Streicher JM, Kamei K, Ishikawa TO, et al. Compensatory hypertrophy induced by ventricular cardiomyocyte-specific COX-2 expression in mice. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 2010;49(1):88-94.
147. Devchand PR, Keller H, Peters JM, et al. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*. Nov 7 1996;384(6604):39-43.
148. Jaimes EA, Zhou MS, Pearse DD, et al. Upregulation of cortical COX-2 in salt-sensitive hypertension: role of angiotensin II and reactive oxygen species. *Am J Physiol Renal Physiol*. Feb 2008;294(2):F385-392.
149. Schwartzkopff B, Motz W, Frenzel H, et al. Structural and functional alterations of the intramyocardial coronary arterioles in patients with arterial hypertension. *Circulation*. Sep 1993;88(3):993-1003.
150. Verma S, Dumont AS, McNeill JH, et al. Myocardial insulin resistance in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. Jan 14 1999;73(2):269-277.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Susanne Fischer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Geschlechtsspezifische Expression der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren  $\alpha$  und  $\gamma$  im Modell der salzinduzierten kardialen Hypertrophie“ 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](http://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.

08. April 2015

Susanne Fischer

### **Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Susanne Fischer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: E. Becher, S.Fischer, N. Wendt, R. Kreutz, V. Regitz-Zagrosek, “Sex-specific expression of Peroxisome-Proliferator-Activated- Receptor-  $\gamma$  in a model of salt induced cardiac hypertrophy”, Posterbeitrag zur 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V., 2008

Beitrag (bitte kurz ausführen): Vorstellung von Teilergebnissen der vorliegenden Dissertation.

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

Susanne Fischer

## **Lebenslauf**

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

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Frau Professor Dr. Vera Regitz-Zagrosek für die Betreuung und die Möglichkeit, diese Thematik in ihrem Labor bearbeiten zu können.

Des Weiteren bin ich Frau Dr. Eva Becher zu tiefem Dank verpflichtet, die mir bei der experimentellen Arbeit inhaltlich wie praktisch als Betreuerin zur Seite stand und der Arbeitsgruppe Professor Kreutz / Dr. Wendt (Charité Campus Benjamin Franklin) für die Zurverfügungstellung der Gewebeproben. Den anderen Mitgliedern der AG-Regitz danke ich für die vielen hilfreichen Anregungen, insbesondere Herrn Dr. Hugo Sanchez sowie Frau Jenny Thomas, Frau Anja Angelov, Frau Britta Hannack, Frau Hang Pham und Frau Dr. Daniela Fliegner die mir an vielen Stellen mit praktischen Ratschlägen geholfen haben.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Henning Witt, Herrn Pascal Edelmann, Herrn Maximilian Springer und Herrn M. Jerry, die mich bei der inhaltlichen Diskussion und der schriftlichen Umsetzung unterstützten.

Aus meinem persönlichen Umfeld möchte ich mich besonders bei Herrn Lukas Fischer für die moralische Unterstützung bedanken.