

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und internistische Intensiv-  
medizin, Campus Virchow Klinikum und dem  
Center for Cardiovascular Research der  
Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# Sexuelle Dimorphismen bei Blutdruck unabhängigen Mechanismen des DOCA-Salz induzierten kardio- renalen Schadens der Maus

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Aysun Karatas

aus Istanbul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. D. Dragun

2. Priv.-Doz. Dr. med. D. Müller

3. Priv.-Doz. Dr. med. N. Hiemann

Datum der Promotion: 15.01.2010

Meinem Mann Soner und meinen Söhnen Baran und Merdan ...

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	5
1.1	Sexuelle Dimorphismen in myokardialer Morphologie und Funktion beim Menschen .....	5
1.2	Arterielle Hypertonie .....	1
1.2.1	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) .....	3
1.2.2	Die Mineralokortikoide Deoxykortikosteroneacetat (DOCA) und Aldosteron .....	4
1.2.3	Mineralokortikoidexzess im Tiermodell .....	6
1.3	Myokardhypertrophie .....	7
1.3.1	Natriuretische Peptide ANP und BNP .....	9
1.3.2	Inflammation .....	9
1.3.3	Fibrose .....	10
1.3.3.1	TGF- $\beta$ .....	10
1.3.3.2	Kollagene Typ I und Typ III .....	10
1.3.4	Proliferation Ki67 .....	11
1.4	Signaltransduktion .....	12
1.4.1	Proteinphosphatase Calcineurin .....	12
1.4.2	Nuclear Factor of Activated T-cells .....	14
1.4.3	Modulatory Calcineurin Inhibitor Protein-1 .....	15
1.4.4	Calcineurin-NFAT-Signaltransduktionsweg im Herzen .....	15
1.5	Zielsetzung .....	17
2	Material und Methoden .....	18
2.1	Geräte und Materialien .....	18
2.1.1	Materialien für die Tierhaltung .....	18
2.1.2	Geräte und Materialien für die In-vivo-Eingriffe .....	18
2.1.3	Chemikalien für die In-vivo-Eingriffe .....	19
2.1.4	Geräte und Materialien für Ex-vivo-Untersuchungen .....	19
2.1.5	Chemikalien für die Ex-vivo-Untersuchungen .....	21
2.1.6	Kits .....	23
2.2	Methoden .....	24
2.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	24
2.2.2	Gruppeneinteilung und Versuchsdurchführung .....	24
2.2.3	In-vivo-Eingriffe .....	25
2.2.3.1	Anästhesie .....	25
2.2.3.2	Uninephrektomie .....	26
2.2.3.3	Pellet-Implantation .....	26
2.2.3.4	Medikation .....	26
2.2.3.5	Metabolische Käfige .....	27
2.2.4	Echokardiographie .....	27
2.2.5	Hämodynamik .....	28
2.2.5.1	Invasive Blutdruck- und Herzfrequenzmessung mittels Millar-Katheter .....	28

2.2.5.2	Telemetrische Blutdruck- und Herzfrequenzmessung mittels Telemetrie.....	29
2.2.6	Blut- und Organentnahme.....	30
2.2.7	Histologie.....	30
2.2.7.1	Paraffineinbettung und Schnitttechnik.....	30
2.2.7.2	Färbemethoden.....	30
2.2.7.3	Bestimmung der Myozyten- und Tubulusgröße.....	31
2.2.7.4	Immunhistologie.....	31
2.2.8	Genexpressionsanalyse.....	32
2.2.8.1	RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung.....	32
2.2.8.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.2.8.3	Reverse Transkription.....	34
2.2.8.4	Primer-Design.....	34
2.2.8.5	Light Cycler Realtime PCR.....	35
2.2.8.5	Quantifizierung mit der delta-delta-CT-Methode.....	36
2.2.9	Immunpräzipitation und Westernblotanalyse.....	37
2.2.9.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	37
2.2.9.2	Immunpräzipitation von Proteinen.....	38
2.2.9.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
2.2.9.4	Western-Blot-Analysen.....	39
2.2.9.5	Stripping und Reprobing.....	39
2.2.10	Statistik.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Physiologische Effekte von Mineralokortikoidexzess und Salzbelastung.....	41
3.1.1	Diurese.....	41
3.1.2	Kalium im Urin.....	42
3.1.3	Kalium im Serum.....	43
3.2	Hämodynamik.....	44
3.2.1	Blutdruck- und Herzfrequenzmessung mittels Millar-Katheter.....	44
3.2.2	Blutdruck- und Herzfrequenzmessung mittels Telemetrie.....	46
3.3	Myokardhypertrophie.....	48
3.3.1	Echokardiographische Auswertung.....	48
3.3.2	Herzgewicht /Körpergewicht-Ratio.....	49
3.3.3	Kardiomyozytenquerschnittsfläche.....	50
3.3.4	Fetales Genprogramm ANP/BNP.....	51
3.3.4.1	Genexpression ANP.....	51
3.3.4.2	Genexpression BNP.....	52
3.4	Gen- und Proteinexpression von Calcineurin.....	54
3.4.1	Genexpression von Calcineurin A $\beta$ .....	54
3.4.2	Genexpression von MCIP1.....	55
3.4.3	Phosphorylierungsgrad von NFATc2.....	56
3.5	Myokardiales Remodeling.....	57
3.5.1	Histologie.....	57
3.5.2	Proliferation-Ki67 Herz.....	58
3.5.3	Inflammatorische Antwort im Herzen.....	60
3.5.4	Myokardiale Fibrose.....	61

---

3.5.4.1	Genexpression von TGF- $\beta$ Herz.....	61
3.5.4.2	Genexpression von Kollagen I Herz .....	61
3.6	Renale Hypertrophie.....	63
3.6.1	Nierengewicht/Körpergewicht-Ratio .....	63
3.6.2	Nierengewebsanalyse.....	64
3.6.3	Tubulusatrophie .....	65
3.8.4	Proliferation-Ki67 Niere .....	66
3.6.5	Inflammatorische Antwort in der Niere .....	68
3.6.6	Renale Fibrose.....	69
3.6.6.1	Genexpression von TGF- $\beta$ Niere.....	69
3.6.6.2	Genexpression von Kollagen I Niere .....	70
3.6.6.3	Genexpression von Kollagen III Niere .....	71
4	Diskussion.....	73
4.1.	Methodenkritik .....	73
4.1.1	Herzhypertrophie im Tiermodell .....	73
4.1.2	Potenzielle Fehlerquellen des eingesetzten Tiermodells .....	74
4.2	Diskussion der Versuchsergebnisse.....	75
5	Zusammenfassung.....	82
6	Literaturverzeichnis .....	84
7	Anhang.....	98
7.1	Abkürzungen und Symbole.....	98
7.2	Abbildungs-und Tabellenverzeichnis .....	101
7.2.1	Abbildungen .....	101
7.2.2	Tabellenverzeichnis .....	104
7.3	Danksagung .....	105
7.4	Lebenslauf .....	106
7.5	Publikationen .....	107
	Erklärung .....	108

# 1 Einleitung

## 1.1 Sexuelle Dimorphismen in myokardialer Morphologie und Funktion beim Menschen

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind in den westlichen Industrienationen die häufigste Todesursache sowohl bei Männern als auch bei Frauen. Allein in Deutschland starben im Jahr 2006 fast 360.000 Menschen an Krankheiten wie akutem Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, Hypertonie, ischämischer Herzkrankheit und Schlaganfall (Statistisches Bundesamt, 2007). Bisher galten die Erkrankungen des Herzens in erster Linie als „Männersache“, doch jüngste Statistiken belegen, dass kardiovaskuläre Erkrankungen bei Frauen häufiger zum Tod führen als bei den Männern. Laut Angaben des Statistischen Bundesamtes 2007 lag die Todesrate nach einem Myokardinfarkt bei Männern mit 35.631 höher als bei den Frauen mit 29.165, jedoch war die Sterblichkeit durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Frauen mit 209.375 deutlich höher als die der Männer mit 149.578. So genannte sexuelle Dimorphismen zwischen Frauen und Männern finden sich sowohl in physiologischen als auch in pathophysiologischen Kontext. Physiologischerweise haben erwachsene Männer zum Beispiel in allen Altersklassen nach Berücksichtigung von Körpergröße und Gewicht etwa 25–38% mehr linksventrikuläre Masse als Frauen im gleichen Alter, obwohl sich die Masse des linken Ventrikels zwischen Mädchen und Jungen vor der Pubertät kaum unterscheidet (de Simone G, 1995). Die Kardiomyozyten bei Frauen bleiben in Zahl und Volumen im Alter stabil, während bei Männern eine auffällige Verringerung der Myozytenzahl und eine Volumenzunahme der Zellen festzustellen sind (Olivetti G, 1995). In pathophysiologischem Kontext können sexuelle Dimorphismen zu einem unterschiedlichen Verlauf von Krankheiten und Wirkung von Medikamenten bei verschiedenen Formen von Herz- und Nierenerkrankungen führen (Regitz-Zagrosek V, 2006; Silbiger SR 1995). Krumholz et al. konnten interessante geschlechtsspezifische Unterschiede bei Patienten mit isolierter systolischer Hypertonie sowie qualitative Unterschiede in der Entwicklung einer Herzhypertrophie feststellen. Bei den Frauen zeigte sich eine Zunahme der linksventrikulären Wanddicke ohne Ventrikeldilatation, bei Männern hingegen blieb die Wanddicke gleich und der Ventrikeldurchmesser vergrößerte sich (Krumholz HM, 1993). Diese und weitere Studien zeigen, dass Erkrankungen mit Druckbelastung des Herzens bei beiden

Geschlechtern zur kompensatorischen Zunahme der linksventrikulären Masse führen, jedoch die strukturellen Umbauvorgänge bei Frauen und Männern unterschiedlich ablaufen. Frauen zeigen bei gleichem Grad einer Aortenstenose eine bessere systolische Funktion des Herzmuskels, eine ausgeprägte konzentrische Hypertrophie sowie einen geringeren enddiastolischen Ventrikeldurchmesser als Männer (Aurigemma GP, 1995; Carrol JD, 1992). Bei Männern dagegen entwickeln sich nach chronischer Druckbelastung des Herzens eine schlechtere systolische und diastolische Funktion sowie eine vermehrte endokardiale Fibrose (Villari B, 1995). Der Hormonstatus verändert sich bei Männern und Frauen mit zunehmendem Alter gravierend und verläuft zum Teil konträr. Frauen entwickeln kardiovaskuläre Erkrankungen im Durchschnitt 10–15 Jahre später als Männer, zeitlich korrelierend mit dem Abfall des Östrogenspiegels und dem Beginn der Menopause (Regitz-Zagrosek V, 2007). Bei Frauen fällt der Östrogenspiegel nach der Menopause drastisch ab und die ovarielle Testosteronproduktion nimmt zu (Laughlin GA, 2000; Sluijmer AV, 1995), während die Testosteronproduktion bei Männern mit zunehmendem Alter stetig abnimmt (Hayward CS, 2001).

Eine mögliche Erklärung für die beobachteten sexuellen Dimorphismen kann der höhere Testosteron- bzw. niedrigere Östrogenspiegel bei Frauen nach den Wechseljahren sein. Bei Frauen vor der Menopause sind das Vorkommen von linksventrikulärer Hypertrophie sowie das Vorkommen von Nierenerkrankungen geringer als bei gleichaltrigen Männern (Agabiti-Rosei E, 2002; Neugarten J, 2000; Sangaralingham SJ, 2007). Jafar et al. beobachteten eine schnellere Progression von Nierenerkrankungen der Frauen nach der Menopause (Jafar TH, 2003). Es scheint, dass Östrogen in hohem Maße antiatherosklerotisch wirkt und auf diesem Wege den Erkrankungen der Blutgefäße, die letztlich zum Verschluss und zum Infarkt führen, vorbeugt (Karim R, 2007).

Die geschlechtsspezifischen Unterschiede bei physiologischen und pathophysiologischen Umbauprozessen des Herzens bei Männern und Frauen führen zu der Annahme, dass die Sexualhormone und deren Rezeptoren dabei eine zentrale Rolle spielen.

## 1.2 Arterielle Hypertonie

Die arterielle Hypertonie ist neben Adipositas, Diabetes mellitus und Rauchen einer der einflussreichsten Risikofaktoren für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

(Murray, 1997). In zahlreichen Studien wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Blutdruck und kardiovaskulären Erkrankungen dargestellt (Collins R, 1994). Bei der arteriellen Hypertonie kommt es durch die Unfähigkeit des Herzens, die geförderte Menge Blut dem erhöhten Bedarf des Organismus anzupassen, langfristig durch funktionelle und strukturelle Veränderungen zu erheblichen Endorganschäden und zur Manifestation von Folgeerkrankungen, insbesondere am Herzen, den Gefäßen und den Nieren (Collins R, 1994; Kelly TN, 1999). Während die Hypertonie im Kindesalter sehr selten ist, nimmt die Häufigkeit mit ansteigendem Alter deutlich zu. Die Prävalenz in der Altersgruppe der 55- bis 65-jährigen beträgt 20–30 %, in der Gruppe der 70- bis 80-jährigen sogar 50 % (Kreutz R, 2006). In 95 % der beobachteten Fälle lässt sich die Ursache der Hypertonie bislang nicht vollständig klären und wird daher als essenzielle, idiopathische oder auch primäre Hypertonie bezeichnet. Bei den verbleibenden 5 %, so genannte sekundäre Hypertonieformen, können vor allem renale und hormonelle Störungen wie chronische Nierenerkrankungen, Nierenarterienstenosen oder primärer Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom) zu einer pathologischen Erhöhung des Blutdruckes führen.

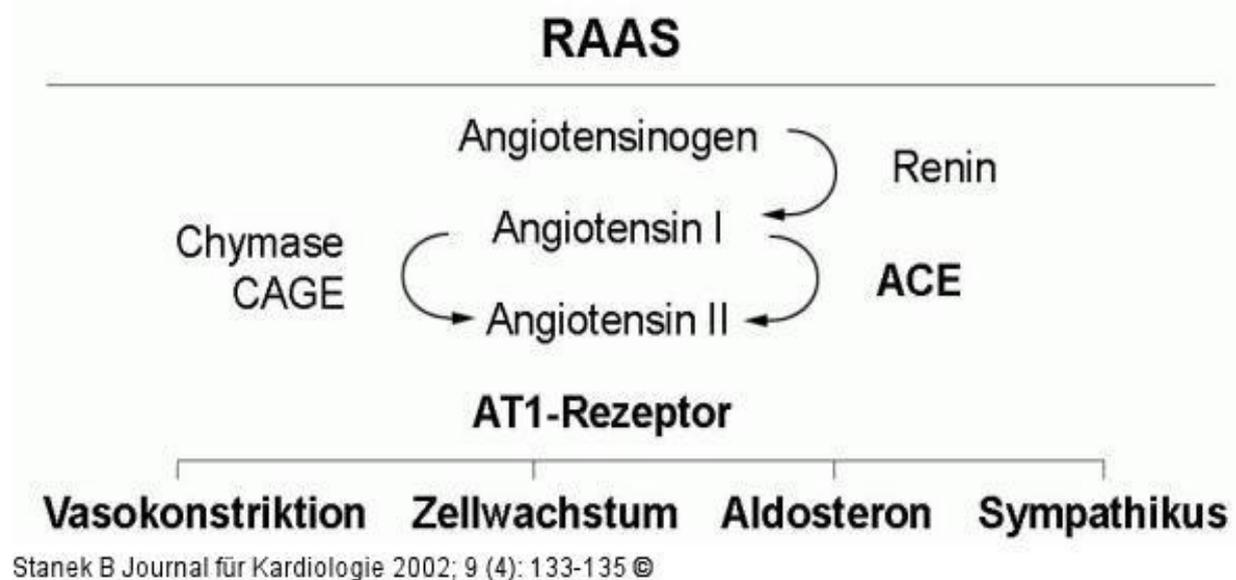
Gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO, 1999) ist die arterielle Hypertonie definiert als ein Blutdruck von systolisch über 139 mmHg oder diastolisch über 89 mmHg, da erst ab diesem Schwellenwert das kardiovaskuläre Risiko übermäßig ansteigt und eine Therapie sinnvoll ist. Doch in der Realität existieren solche Schwellenwerte nicht; es wurde ein kontinuierlicher Zusammenhang zwischen dem Blutdruck und dem Risiko von Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen sowie der Sterblichkeit schon im als normotensiv definierten Bereich nachgewiesen (Cutler JA, 1996; Schillaci G, 2000). Die Entwicklung der hypertensiven Endorganschäden wird nicht nur durch die Höhe des Blutdruckes bedingt, sondern zusätzlich von blutdruckunabhängigen genetischen Prädispositionen in deren Manifestation beeinflusst (Freedman BI, 2003; Kreutz R, 2002). Die pathogenetischen Mechanismen, die unabhängig vom Blutdruck im Einzelnen dafür verantwortlich sind, dass bestimmte, aber nicht alle Patienten mit Hypertonie Folgeerkrankungen wie die hypertensive Nephropathie oder eine linksventrikuläre Hypertrophie entwickeln, ist noch weitestgehend ungeklärt. Der Niere kommt bei der Entstehung der meisten Hypertonieformen eine Schlüsselposition zu. Einerseits kann Hypertonie zu einer Nierenschädigung führen, andererseits können renale Erkrankungen mit einer Erhöhung des Blutdruckes einhergehen. Patienten mit Niereninsuffizienz haben eine hohe Prävalenz für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Bei Beginn der Dialyse weisen 75 %

der Patienten eine linksventrikuläre Hypertrophie auf. Die linksventrikuläre Hypertrophie ist sowohl bei Hypertonikern als auch bei Niereninsuffizienten ein häufiger echokardiographischer Befund (Levin A, 1996; Levy D, 1990). Oft kann nicht unterschieden werden, ob eine arterielle Hypertonie sowohl zur Myokardhypertrophie als auch zur Nierenschädigung führte, oder ob arterielle Hypertonie und Hypertrophie des linken Ventrikels Folgen eines primären Nierenschadens sind. Zuerst die kardiale Vorerkrankung bestand oder sich diese erst unter dem zunehmenden Nierenversagen entwickelte. In der Niere finden sich Chemo- und Barorezeptoren, die bei Nierenerkrankungen stimuliert werden. Afferente, über die aufsteigenden Stränge im Rückenmark weitergeleitete Signale aktivieren im Hypothalamus Kreislaufzentren (Campese, 1995), wodurch die efferente Sympathikusaktivität gesteigert wird. Dies ist nicht nur wichtig im Hinblick auf den erhöhten Blutdruck. Die Sympathikusaktivität beschleunigt auch blutdruckunabhängig die Progression von Nierenerkrankungen (Orth SR, 2001). Bei Hypertonikern besteht initial ein erhöhter Sympathikotonus mit konsekutiver Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Die Folge ist ein systemischer Blutdruckanstieg und, durch die vermehrte Druckerbeit des Herzens, die Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie (Stefenelli T, 2000). Die gesteigerte Sympathikusaktivität ist wahrscheinlich auch für die gesteigerte kardiale Mortalität niereninsuffizienter Patienten mitverantwortlich.

### 1.2.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert den Tonus von Widerstandsgefäßen sowie den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt des Körpers und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Blutdruckregulation (Nicholls MG, 2000). Es ist sowohl bei der Entwicklung und Progression chronischer Nierenerkrankungen als auch von kardiovaskulären Krankheiten beteiligt (Brewster UC, 2004). Das Enzym Renin wird vorwiegend im juxtaglomerulären Apparat der Niere gebildet. Renin bewirkt eine Spaltung von Angiotensinogen, ein in der Leber gebildetes Glykopeptid. Es entsteht das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I. Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) spaltet hiervon zwei weitere Aminosäuren ab, wodurch das biologisch hochaktive Angiotensin II entsteht (Abbildung 1). Dem Angiotensin II kommt die größte Bedeutung als Schadensmediator im hormonellen System des Herzens und der Niere zu (Theuer J, 2002). Angiotensin II bewirkt als einer der stärksten endogenen Vasokonstriktoren

neben der Aufrechterhaltung des Blutdruckes durch Kontraktion von Widerstandsgefäßen außerdem über die Freisetzung von Aldosteron die Konstanthaltung des extrazellulären Volumens. Es besitzt darüber hinaus auch wachstumsstimulierende, proinflammatorische und profibrotische Eigenschaften und kann eine glomeruläre und tubuläre Entzündung induzieren (Ruggenenti P, 1998). Die Wirkung von Angiotensin II wird über zwei Rezeptoren vermittelt, den Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT1) und Typ 2 (AT2). Der ubiquitär Vorkommende AT1-Rezeptor vermittelt die klassischen Angiotensinwirkungen, wie z. B. an den Gefäßen Vasokonstriktion (koronar, renal, zerebral), Gefäß und Muskelfibrose und Hypertrophie der Kardiomyozyten und glatter Muskulatur. Der AT2-Rezeptor kommt im Herzen, Nebenniere, Endothel und im Keimgewebe vor, scheint gegensätzlich zu wirken und vermittelt beispielsweise Vasodilatation, Induktion der Apoptose, Hemmung der Angiogenese und antiproliferative Effekte (Cooper ME, 2001).



*Abb. 1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS); CAGE: Chymostatin-sensitives Angiotensin-II bildendes Enzym; ACE: Angiotensin-Konversions Enzym; AT1: Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1*

### 1.2.2 Die Mineralkortikoide Desoxykortikosteronacetat (DOCA) und Aldosteron

Aldosteron wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde synthetisiert, indem Cholesterin über Pregnenolon und Progesteron zu 11-Desoxykortikosteron (DOCA) umgewandelt wird, welches wiederum zu 18-Hydroxykortikosteron und schließlich mit-

tels der Aldosteron-Synthase CYP11B2 zu Aldosteron metabolisiert wird. Entdeckt wurden Aldosteron und die Faktoren, welche für seine Sekretion verantwortlich sind, um 1959 (Davis, 1962). In der Niere führt Aldosteron zu einer gesteigerten tubulären Rückresorption von Natrium und Wasser und im Gegenzug zur Sekretion von Kalium und Wasserstoffionen. Der Angriffspunkt von Aldosteron sind die Epithelzellen des distalen Tubulus sowie die Hauptzellen des Sammelrohrs als Ort des Natrium-Kalium-Austauschs. Die Wirkungsübertragung erfolgt dabei über intrazelluläre Mineralcorticoidrezeptoren (MR) (Funder JW, 2004; Fuller PJ, 2005). Der MR, welcher der Superfamilie der Steroidhormonrezeptoren angehört, ist ein nukleärer Rezeptor, der sich im ungebundenen Zustand im Zytoplasma befindet. Nach Bindung von Aldosteron beobachtet man die Translokation des Aldosteron-MR-Komplexes in den Zellkern, wo er in Form eines Transkriptionsfaktors die Genexpression moduliert und somit Einfluss auf die Biosynthese verschiedener Proteine nimmt (Rogerson FM, 2004). Eine pathologisch verstärkte MR-Aktivierung, wie z. B. beim primären Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom), führt über eine Aktivierung von Genen zu einer verstärkten Natrium-Wasserresorption und damit zur Entwicklung eines Bluthochdrucks.

Neben dieser genomischen Signalübermittlung sind jedoch in den letzten Jahren auch vermehrt nicht-genomische Effekte von Aldosteron beobachtet worden, die sich nicht mit dem Einfluss auf die Gentranskription erklären lassen. Diese Effekte sind innerhalb von 10 Minuten nachweisbar und treten damit wesentlich schneller als die klassischen genomischen Aldosteron-Wirkungen auf. So wurde der hemmende Einfluss von physiologischen Aldosteron-Konzentrationen auf den Natriumaustausch in Erythrozyten schon vor 40 Jahren von Spach und Streeten beschrieben (Spach C, 1964). Aufgrund des fehlenden Zellkerns der Erythrozyten konnte dieser Aldosteron-Effekt nicht genomisch vermittelt sein. Weiter zeigte eine Studie an gesunden Männern, dass die Injektion von Aldosteron innerhalb von 5 min den systemischen Gefäßwiderstand und das Herzminutenvolumen verändert, wobei das sehr kurze Zeitintervall gegen einen genomischen Effekt spricht (Schmidt BM, 1999). Die Frage, ob die nicht-genomische Wirkung von Aldosteron durch Bindung am MR vermittelt wird oder ob ein zweiter, bisher unbekannter Rezeptor für Aldosteron existiert, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden (Boldyreff B, 2003). Es ist aber sicher, dass diese nicht-genomischen Effekte von Aldosteron mit den üblichen MR-Blockern wie Spironolakton gehemmt werden können (Barbato JC, 2002). Aldosteron spielt auch eine bedeutende Rolle in der Entwicklung kardiovaskulärer Schäden (Pitt B, 2003), die über das durch die beschriebenen Effekte

auf die Regulation des Salzhaushaltes und des Blutdrucks zu erwartenden Maß hinaus gehenhinausgehen. Bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus wurde beispielsweise eine Korrelation zwischen linksventrikulärem Massenindex und Plasmaaldosteronspiegel nachgewiesen (Tanabe A, 1997), welche als weitgehend blutdruckunabhängig beschrieben wird (Sato A, 1999). Aldosteron bewirkt im Zusammenhang mit einer exzessiven Salzzufuhr bei Ratten eine kardiale Hypertrophie und kardiale Fibrose unabhängig vom Blutdruck (Brilla CG, 1992; Young M, 1995). Greene et al. beobachteten einen direkten Zusammenhang zwischen Hyperaldosteronismus und Glomerulosklerose in der Niere von Ratten (Greene EL, 1996). Auch in anderen Bluthochdruck-Modellen mit der klassischen Mineralkortikoid-Salz-Behandlung konnte neben der systemischen Hypertonie auch ein substantieller glomerulärer Schaden beobachtet werde (Dworkin LD, 1984).

Aldosteron zählt somit unter pathophysiologischen Bedingungen zu den schädigenden Komponenten des RAAS sowohl am Herzen als auch an der Niere (Weber KT, 2001; Greene EL, 1996). Die Mechanismen, über die der schädigende Einfluss von Aldosteron vermittelt wird, sind noch weitestgehend ungeklärt. Diese Wirkungen reflektieren zum Beispiel möglicherweise einen über nicht-klassische Rezeptoren auf kardialen Myofibroblasten vermittelten direkten Effekt von Aldosteron auf die Kollagensynthese (Modena MG, 2001; Rossi GP, 2001).

### 1.2.3 Mineralkortikoidexzess im Tiermodell

Tierexperimentelle Modelle der arteriellen Hypertonie spiegeln in ihrer Pathophysiologie die unterschiedlichen Formen der Hypertonie des Menschen nur zu einem bestimmten Grad wider. Es werden Einblicke in prinzipielle Aspekte der Pathogenese der jeweiligen Erkrankungen gewährt, was für die Suche nach neuartigen Behandlungsmöglichkeiten genutzt werden kann. Eine der bekanntesten endokrin bedingten experimentellen Hochdruckformen ist der durch das zu den Mineralkortikoiden zählende Steroidhormon Desoxykortikosteron (DOCA) hervorgerufene Hochdruck. Es handelt sich hierbei um eine kochsalzinduzierte Hochdruckform, da bei salzarmer Ernährung die DOCA-Behandlung alleine nicht zur Hypertonie führt. Das DOCA-Salz-Modell zur Induktion einer Hypertonie bei Ratten wurde bereits 1943 von Selye et al. beschrieben (Selye H, 1943). Es wurde später von der Ratte auf die Maus übertragen und ist mittlerweile ein etabliertes, vielfach verwendetes Bluthochdruck-Modell. DOCA hat im Zusammenhang

mit einer einprozentigen Kochsalzlösung, die den Tieren statt Leitungswasser zu trinken gegeben wird, eine natrium- und volumenreternierende Wirkung. Über negative Feedbackregulation wird die Ausschüttung von Renin gehemmt. Dies unterscheidet das DOCA-Salz-Modell von typischen renalen Hypertonieformen, bei denen es sekundär aufgrund einer vermehrten Reninproduktion zu einer Erhöhung des Aldosteronspiegels kommt. Als Teil der mineralkortikoidartigen Wirkung von DOCA kommt es zu einer erheblichen renalen Kaliumausscheidung, die eine Hypokalämie zur Folge hat. Zusätzlich begünstigt eine unilaterale Nephrektomie aufgrund der resultierenden verminderten Nephronzahl trotz initialer Hyperfiltration die vermehrte Retention von Natrium und Wasser, so dass es zum Anstieg des Extrazellulärvolumens kommt (Titze J, 2006). Dies führt zu einem Anstieg des Blutdruckes innerhalb von wenigen Wochen. Wesentlich für die Entstehung und Aufrechterhaltung des DOCA-induzierten arteriellen Hochdruckes ist jedoch außerdem die Steigerung des Sympatikonus durch vermehrte Ausschüttung und verminderte Inaktivierung des sympathischen Neurotransmitters Noradrenalin (Rascher W, 1981). Dies zeigte sich beispielsweise daran, dass die Lanzeitbehandlung mit DOCA und Salz zu einem konstant erhöhten arteriellen Blutdruck führte, auch wenn die Salzzufuhr eingestellt wurde. Andererseits ist der Mineralkortikoidexzess auch ohne erhöhten Blutdruck ein erheblicher pathogener Stimulus. So konnte in früheren Studien an Mäusen gezeigt werden, dass eine salzreiche Ernährung in Kombination mit einem Mineralkortikoid selbst bei normalen Blutdruckwerten eine kardiale und renale Hypertrophie sowie eine schwere kardiale Dysfunktion auslöst.

### 1.3 Myokardhypertrophie

Die Myokardhypertrophie ist im klinischen Sprachgebrauch definiert als eine Volumen- und Gewichtszunahme des Herzens als eine Reaktion auf sowohl pathologische als auch physiologische Stimuli. Die pathologisch-anatomische Definition der Myokardhypertrophie ist eine Größenzunahme der Kardiomyozyten ohne Zunahme der Zellzahl. (MacLellan WR, 2000). Prinzipiell ist die Myokardhypertrophie ein adaptiver Mechanismus, mit welchem das Herz auf Stimuli reagiert, die eine höhere Arbeitsleistung des Herzens einfordern. Hierzu gehören einerseits physiologische Reize wie Wachstum, Schwangerschaft und körperliches Training und andererseits pathologische Stimuli wie eine länger andauernde hämodynamische Belastung durch pathologische Aktivierung des Sympathikus, des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Packer M, 1988), wie

sie beispielsweise bei arterieller Hypertonie, Aortenklappenstenose oder Volumenüberladung zu finden sind. Die myokardiale Hypertrophie ist eine generische Antwort des Myokards, die in verschiedenen Stadien kardiovaskulärer Schäden wie Hypertonie, Myokardinfarkt oder Kardiomyopathien genetischer, viraler oder metabolischer Ursache entstehen kann (Fiedler B, 2004). Dieser adaptive Mechanismus kann in einen maladaptiven Mechanismus mit ventrikulärer Dilatation, kontraktile Dysfunktion und Herzinfarkt übergehen (Frey N, 2003). Auf molekularer Ebene wird die kardiomyozytäre Hypertrophie kontrolliert durch Rezeptoren von Wachstumsfaktoren und mechanischen Stresssensoren, die gemeinsam ein interzelluläres Netzwerk von Proteinkinasen, Phospholipidkinasen und Proteinphosphatasen aktivieren, die das Hypertrophiesignal an den Zellkern weiterleiten (Molkentin JD, 2001; Hunter JJ, 1999). Dies führt zur Expression von so genannten „immediate-early genes“, zur Reexpression fötaler Gene, zu einer gesteigerten Proteinsynthese sowie einer Vervielfachung und verstärkten Organisation der Sarkomere. Bei den reexprimierten fötalen Genen unterscheidet man zwischen solchen, die kontraktile Proteine kodieren und solchen, die nicht-kontraktile Proteine kodieren. Zu den letzteren gehören ANP (atrial natriuretic peptide) und BNP (brain natriuretic peptide). Beiden wird eine antihypertrophische Wirkung zugeschrieben (Burnett JC, 2006). Während der Dekompensation des hypertrophierten Myokards kommt es zu einem Umbauprozess, der als „Remodeling“ bezeichnet wird (Anversa P, 1997). Der Remodelingprozess hängt von Umbauvorgängen der Myokardzellen und der extrazellulären Matrix ab (Buckberg GD, 2004). Die linksventrikuläre Hypertrophie wird je nach Art der Umbauvorgänge entweder als exzentrisches oder konzentrisches Remodeling charakterisiert, wobei eine konzentrische Hypertrophie auch in die exzentrische übergehen kann. Die konzentrische Hypertrophie ist durch eine Verdickung der ventrikulären Wand auf Kosten des Kammervolumens gekennzeichnet, als Folge einer arteriellen Hypertonie oder einer Aortenklappenstenose (Lorell BH, 2000). Die exzentrische Hypertrophie ist gekennzeichnet durch eine Vergrößerung der ventrikulären Wandstärke und des Herzkammervolumens, typischerweise bedingt durch eine erhöhte Volumenbelastung. Die linksventrikuläre Hypertrophie ist ein wichtiger und eigenständiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität, auch wenn die Hypertrophie ohne Hypertonie abläuft (Vakili BA, 2001; Brown DW, 2000). Bei der salzsensitiven Hypertonie kommt es in verstärktem Maße zu einer Hypertrophie und Dysfunktion des linken Ventrikels, auch unabhängig von der Blutdruckhöhe (Lindpaintner K, 1985).

### 1.3.1 Natriuretische Peptide ANP und BNP

ANP (Synonym ANF (*atrial natriuretic factor*)) wird im adulten normalen Herzen fast ausschließlich von den Kardiomyozyten des Atriums synthetisiert. BNP wurde ursprünglich aus Hirnhomogenaten vom Schwein isoliert. Es wird konstitutiv im Atrium und im Ventrikel exprimiert. Zahlreiche neuroendokrine und mechanische Reize führen zur Synthese und Ausschüttung von ANP und BNP (de Nicola L, 1997). Beispielsweise führt eine Volumenbelastung wie im DOCA-Salz-Modell zur Dehnung der Kardiomyozyten und wirkt damit als Stimulus zur Ausschüttung von ANP und BNP. Sie wirken natriuretisch, diuretisch, vasodilatatorisch und hemmend auf die Reninfreisetzung in den Nieren (Espiner EA, 1994; Ruskoaho H, 1992). Diese Effekte resultieren in einer Reduktion des Plasmavolumens und in einer Senkung des Blutdrucks, Erst bei fortgeschrittener Hypertrophie mit Fibrose ist auch ein BNP-mRNA-Anstieg zu beobachten (Levin ER, 1998; Mair J, 2001; Kelly R, 2001). Beide natriuretischen Peptide sind an der Reduzierung der Fibrosierung des Herzmuskels durch direkte Beeinflussung kardialer Fibroblasten beteiligt, was als antiproliferative und somit organprotektive Wirkung gedeutet werden kann (Cao L, 1995; Levin ER, 1998; Mair J, 2001; Kelly R, 2001) BNP erwies sich als sehr guter Marker zur Erkennung einer symptomlosen linksventrikulären Dysfunktion und zur Identifizierung von Patienten mit vermindertem linksventrikulärem Ejektionsvolumen (Hammerer-Lercher A, 2001a; 2001b). Bei Herzversagen ist eine Erhöhung um mehr als das 100-fache möglich ist. Erhöhte Werte finden sich neben anderen Erkrankungen mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion auch bei chronischem Nierenversagen und hypertrophischer Kardiomyopathie (Cataliotti A, 2001; de Bold AJ, 2001).

### 1.3.2 Inflammation

Nach einem akuten Myokardinfarkt induziert das proinflammatorische Zytokin Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1 (MCP-1, CCL2) die Infiltration und Aktivierung von Entzündungszellen wie Makrophagen und Leukozyten (Weber KS, 1999). Auch bei Patienten mit Herzversagen wurde eine gesteigerte Expression spezifischer Chemokine beobachtet (Aukrust P, 1998). MCP-1 ist in der Lage, durch parakrine Effekte die Induktion von anderen Zytokinen wie dem Fibrose fördernden TGF- $\beta$  zu vermitteln (Gharaee-Kermani M, 1996). Somit kommt MCP-1 eine besondere Rolle bei der Steuerung von inflammatorischen und fibrotischen Prozessen im Rahmen kardialer Pathologien wie dem akuten Myokardinfarkt und letztendlich den Remodelingsprozessen im Herzen zu.

Auch bei entzündlichen Erkrankungen der Niere sind Zytokine von großer Bedeutung (Proost P, 1996; Schlöndorff D, 1997). So wird die Infiltration der Niere mit Makrophagen durch die renale Produktion von MCP-1 verursacht (Grandaliano G, 1997; Segerer S, 2000).

### 1.3.3 Fibrose

Während auch im gesunden Herzen Fibroblasten über die Synthese von Matrixproteinen ein bindegewebiges Gerüst für die Kardiomyozyten bereitstellen, ist kardiale Fibrose definiert als eine überschießende Proliferation von interstitiellen Fibroblasten und Biosynthese von Komponenten der Extrazellulärmatrix. Dies ist Bestandteil des so genannten Remodelings, womit man die Umbauprozesse des Herzgewebes bezeichnet, die nach verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen auftreten.

#### 1.3.3.1 *TGF- $\beta$*

Der transformierende Wachstumsfaktor (TGF- $\beta$ ) gehört zu einer großen Familie von Zytokinen-ähnlicher Struktur, die wichtige Funktionen bei der Regulation von Differenzierung, Zellwachstum und Produktion extrazellulärer Matrix ausüben. Es besitzt drei aktive Isoformen,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3, wobei die Isoformen  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 höhere Aktivitäten besitzen als  $\beta$ 3 (Sporn MB, 1990). TGF- $\beta$  stimuliert im Rahmen der Gewebereparatur sowohl die Proliferation von Fibroblasten als auch die Sezernierung extrazellulärer Matrixproteine und wirkt damit profibrotisch (Border WA, 1992). Mehrere experimentelle Arbeiten haben gezeigt, dass TGF- $\beta$  an kardialer Muskelbildung und Muskeldifferenzierung beteiligt ist (Dickson MC, 1993). Bei einer Vielzahl von Herzerkrankungen wie Myokardinfarkt oder maladaptiver Myokardhypertrophie wirkt TGF- $\beta$  als wichtiger Mediator des Remodelings (Takahasi N, 1994), indem es die Expression von Kollagen Typ I und III in humanen kardialen Fibroblasten auf transkriptioneller Ebene heraufreguliert (Eghbali M, 1991) und so entscheidend zur Myokardfibrose beiträgt. In der Niere wird TGF- $\beta$  bei fibrosierenden Erkrankungen in den Glomeruli und hauptsächlich in den distalen Tubuli exprimiert.

#### 1.3.3.2 *Kollagene Typ I und Typ III*

Die Kollagene sind eine Familie sehr charakteristischer Faserproteine, die bei allen vielzelligen Organismen vorkommen. Sie gehören zu den extrazellulären Strukturproteinen,

die mit einem Anteil von 25 % der Gesamtproteine die am stärksten repräsentierte Klasse darstellen. Die vorherrschenden Kollagenvarianten sind sowohl im gesunden als auch im kranken Myokard Typ I und III (Weber KT, 1988; Chapman D, 1990). Kollagen Typ I und III bilden Fasern mit typischer Tripelhelixstruktur, deren dichte Wicklung ausschlaggebend für die hohe Zugfestigkeit von Kollagenfasern ist. Kollagen Typ I erzeugt typische dicke, dicht gepackte Bündel und findet sich vor allem in Haut, wo es diffus in der Dermis lokalisiert ist, Faserknorpel, Faszien und Sehnen. Es ist im gesamten menschlichen Körper die vorherrschende Kollagen-Art und hauptsächlich für die mechanische Gewebelastbarkeit verantwortlich. Auch Kollagen Typ III gehört zu den fibrillären Kollagen, bildet aber feinere Fibrillen, die netzartig angeordnet sind, und als Bestandteil des sogenannten retikulären Bindegewebes in Faszien, Gefäßwänden und den lymphatischen Organen vorkommen. Es besitzt deutlich weniger mechanische Stabilität als Kollagen I und bestimmt die Gewebeelastizität (Lamparter S, 2000). Ein funktionierendes Kollagennetzwerk im Myokard ist die Voraussetzung für die Erhaltung der Gewebearchitektur und der Funktionsfähigkeit. Es determiniert die Dehnbarkeit und Steifheit des Myokards. Im physiologischen Zustand verhindert seine Gewebefestigkeit, eine Dilatation und Ruptur der Herzwände (Cleutjens JP, 2002). Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix stehen physiologischerweise in einem Gleichgewicht. Verschiebt sich dieses Verhältnis, so werden die normalen Umbauprozesse gestört und es kommt zur Kollagen-Akkumulation. So konnte gezeigt werden, dass es bei humaner Aortenstenose zu einer Hochregulation des Renin-Angiotensin-Systems und der Kollagene Typ I und III kommt (Fielitz J, 2001). Durch diese Anhäufung von Kollagen in Form einer reaktiven oder reparativen Fibrose erhöht sich die Gewebesteifheit und verhindert letztlich die Dehnung des Myokards in der Diastole (Cleutjens JP, 2002), was in der so genannten diastolischen Dysfunktion resultiert.

#### 1.3.4 Proliferation Ki67

Der Proliferationsmarker Ki67 ist ein nukleäres Protein, welches während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2 und Mitose) exprimiert wird. In der G0-Phase hingegen ist es nicht nachweisbar. Daher ist Ki67 ein exzellenter Marker für die Darstellung der so genannten „Wachstumsfraktion“ einer Zellpopulation (Scholzen T, 2000). Die Funktion von Ki67 ist noch weitestgehend unklar, es scheint aber, dass die Expression dieses Proteins eine absolute Voraussetzung für den reibungslosen Ablauf des Zelltei-

lungszyklus ist (Sasaki K, 1987; Scholzen T, 2000). Obwohl bislang bekannt war, dass das Herz ein ausdifferenziertes Organ ist konnte die Proliferation der Kardiomyozyten unter pathologischen Bedingungen beobachtet werden (MacLellan WR, 2000). Durch den Nachweis von Ki67, das ausschließlich in sich teilenden Zellen vorkommt, konnte eine Regenerationsfähigkeit der Myozyten angenommen werden (Anversa P, 1997).

## 1.4 Signaltransduktion

In den letzten Jahren ist eine Vielzahl molekularer Signalwege identifiziert worden, die bei der kardiomyozytären Hypertrophie die Regulation der zellulären Genexpression beeinflussen. So können unterschiedliche Stimuli verschiedene Wege der Signaltransduktion aktivieren. Meist werden allerdings mehrere Wege gleichzeitig aktiviert, sodass zahlreiche Überschneidungen auftreten. Dennoch lassen sich Signaltransduktionswege unterscheiden, die bevorzugt bei adaptiver bzw. maladaptiver Myokardhypertrophie aktiviert werden (Heineke J, 2006).

### 1.4.1 Proteinphosphatase Calcineurin

Calcium ist ein wichtiger Regulator für kardiale Kontraktilität, Wachstum und Genexpression (Frey N, 2000). Es kann als sog. „Second Messenger“ die Generierung von Signalen über den Calcineurin-Signalübertragungsweg einleiten.

Calcineurin, auch *Proteinphosphatase 2B* (PP2B) genannt, wurde 1979 erstmals von Klee et al. als Calmodulin bindendes Protein aus bovinem Hirn isoliert (Klee CB, 1979). Calcineurin ist eine Serin/Threonin-Phosphatase unter der Kontrolle von Calcium/Calmodulin und spielt eine entscheidende Rolle bei der Kopplung von  $Ca^{2+}$  - Signalen an zelluläre Antworten (Klee CB, 1998). Es kommt als phylogenetisch hoch konserviertes heterodimeres Enzym u. a. in Organen wie dem Herzen (Strack, 1996), den Nieren (Buttini M, 1995), T- und B-Lymphozyten (Kincaid RL, 1987) und Skelettmuskulatur (Manalan AS, 1984) zahlreicher eukaryotischer Lebewesen vor. Calcineurin besteht aus einer großen katalytischen Untereinheit A (58-59 kDa) und einer kleinen regulatorischen Untereinheit B (19-20 kDa), die Calcium bindet (Klee CB, 1979). Bei Säugetieren kodieren drei unabhängige Loci für die katalytische Untereinheit (CnA $\alpha$ , CnA $\beta$  und CnA $\gamma$ ), während 2 Loci für die regulatorische Untereinheit (CnB1 und CnB2)

codieren (Oka T, 2005). Diese reguliert zusammen mit Calmodulin die Aktivität der katalytischen Einheit. Neben der N-terminalen katalytischen Domäne/Phosphatase-Domäne besitzt Calcineurin noch weitere Domänen: B-Untereinheit bindende Helix, eine Calmodulin bindende Domäne und eine autoinhibitorische Domäne (Abbildung 2).

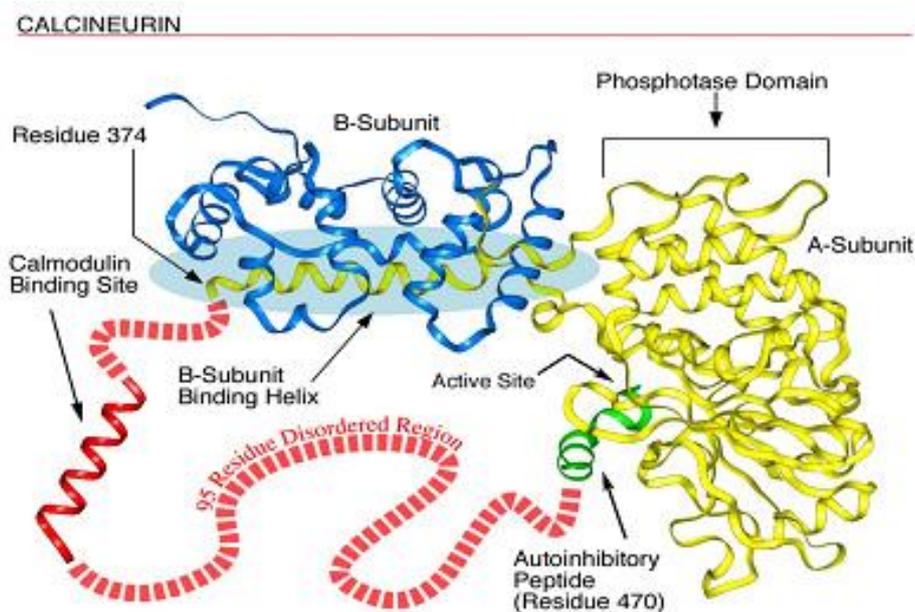


Abb. 2: Strukturelle Darstellung der katalytischen Calcineurin A-Untereinheit mit der Phosphatase-Domäne, regulatorischen Domäne mit Calcineurin B-Untereinheit, Calmodulin-Bindungsstelle und der autoinhibitorischen Domäne.

Calcineurin B besitzt vier „EF-Hand“  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Motive und bindet schon bei geringsten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen an Calcineurin A. Calcineurin B ist nicht für die Enzymaktivität notwendig, sondern dient als stabilisierendes strukturelles Element des Enzyms (Aitken A, 1984). Ist der Calcium-Spiegel in der Zelle niedrig, ist Calmodulin nicht an Calcineurin A/B-Komplex gebunden und die autoinhibitorische Domäne blockiert sterisch das aktive Zentrum der Phosphatase. Steigt aber die intrazelluläre Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$ , so bindet dieses an die „EF-Hand“  $\text{Ca}^{2+}$  bindenden Motive des Calmodulins. Dadurch werden Substrate in Abhängigkeit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dephosphoryliert, so dass ein Calciumsignal zu einer Änderung des Phosphorylierungsgrades von Proteinen oder Peptiden konvertiert werden kann (Cameron AM, 1995; Soncin F, 2000).

Die Expression der Isoformen CnA $\gamma$  und CnB2 ist zumeist auf das Hirn- und Hodenge- webe beschränkt, während sich CnA $\alpha$ , CnA $\beta$  und CnA $\gamma$  in vielen Geweben, inklusive dem Herzen, nachweisen lassen (Oka T, 2005). In-vivo- und Ex-vivo-Experimente er- gaben eine Hochregulierung der Calcineurin A $\beta$ -Isoform und nicht von Calcineurin A $\alpha$  infolge eines Hypertrophie induzierenden Stimulus. In hypertrophierten Herzen Erwach- sener wurde ein Anstieg von Calcineurin A auf Proteinebene nachgewiesen (Lim HW, 1999; Lim HW, 2000). CnA $\beta$  defiziente Mäuse zeigten eine 60- bis 80%ige Abnahme der Enzymaktivität im Herzen, die mit einer signifikanten Verschlechterung der durch Druckbelastung oder neuroendokrin stimulierten kardialen Hypertrophie einherging (Bueno OF, 2002). Außerdem sind zwei gut charakterisierte pharmakologische Inhibito- ren für Calcineurin bekannt: Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506). Es ist in zahlreichen Experimenten gezeigt worden, dass durch Applikation von CsA und FK506 die Hypertrophie des Herzens verhindert werden kann (Ding B, 1999).

#### 1.4.2 Nuclear Factor of Activated T-cells

Die NFATs („*nuclear factor of activated T-cells*“) gehören zu einer großen Familie von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren. Sie wurden erstmals aus den Zellkernen akti- vierter T-Lymphozyten isoliert, konnten aber mittlerweile auch in anderen Geweben und Zelltypen nachgewiesen werden (Molkentin JD, 1998; Ho AM, 1994). Sie spielen eine zentrale Rolle sowohl bei der Immunantwort (Northrop JP, 1994) als auch während Dif- ferenzierungs- und Entwicklungsvorgängen der Muskulatur und des Herzens (Lim HW, 2000). Mittlerweile sind fünf verschiedene NFATs mit ihren jeweiligen Isoformen be- kannt, wobei vier (NFATc1-c4) durch Calcineurin reguliert werden (Hogan PG, 2003). Bei transgenen Mäusen mit erhöhter Calcineurin Aktivität, gekreuzt mit Mäusen, bei denen das NFATc2 Gen ausgeschaltet wurde („Knock-Out“) eine deutliche Abnahme von Calcineurin induziertem kardialem Wachstum festgestellt. Bei den NFATc2 „Knock- Out“ Mäusen fehlte zudem auch ein durch Training beabsichtigter physiologischer Wachstum des Herzens. Bourajjaj et al. konnten somit zeigen, dass NFATc2 eine wich- tige Rolle beim pathologischen Umbau des Herzens spielt (Bourajjaj M, 2008).

### 1.4.3 Modulatory Calcineurin Inhibitor Protein-1

Die enzymatische Aktivität der Phosphatase Calcineurin wird durch das Modulatory Calcineurin Interacting Protein 1 (MCIP1) moduliert. Hierbei kann es in Abhängigkeit der Gesamtkonstellation zu einer Aktivierung oder Inhibierung von Calcineurin kommen (Shin SY, 2006). Das „Modulatory-Calcineurin-Inhibitor-Protein“ MCIP-1 ist ein natürlicher Inhibitor von Calcineurin. Als Down Syndrom Critical Region 1 Gen wurde MCIP-1 früher auch als (myocyte-enriched calcineurin interacting protein-1) bezeichnet (Rothermel B, 2000). MCIP-1 hemmt die Calcineurin Aktivität durch direkte Bindung an die „active site“ sowohl in In-vitro- als auch In-vivo-Versuchen, was zur Blockierung der NFAT-Aktivierung führt. Basierend auf diesen Beobachtungen ist anzunehmen, dass es sich hierbei um einen positiven Rückkopplungsmechanismus handelt, indem bei einem Anstieg des Calcineurin-Transkripts auch die Genexpression von MCIP1 hochreguliert und so eine übermäßige Dephosphorylierung von NFAT durch Calcineurin verhindert wird. Mäuse hingegen, bei denen das MCIP-1 Gen ausgeschaltet wurde, wiesen eine schwächere hypertrophe Antwort auf Druckbelastung auf (Sanna B, 2006). Dies weist auf eine eher modulierende Rolle von MCIP-1 auf die Calcineurinaktivität hin, die kontextabhängig aktivierend oder hemmend sein kann.

### 1.4.4 Calcineurin-NFAT-Signaltransduktionsweg im Herzen

Calcium aktiviert in Assoziation mit Calmodulin die Proteinphosphatase Calcineurin, die daraufhin das phosphorylierte NFATc2 (pNFATc2) dephosphoryliert (Graef IA, 2001). NFATc2 transloziert in den Zellkern, wo es an spezifische DNA Sequenzen bindet und so die Transkription Hypertrophie assoziierter Gene auslöst (McCaffrey PG, 1993). Als Gegenspieler von Calcineurin wirken Kinasen wie GSK3 $\beta$ , JNK oder p38, die NFATc2 wieder phosphorylieren und dadurch seine Translokation in den Zellkern verhindern. Calcineurin kann im Zellkern die Dephosphorylierung und somit die nukleäre Lokalisierung von NFAT aufrechterhalten (Abbildung 3). Die Calcineurinaktivität korreliert mit der Abnahme von phosphoryliertem NFATc2 und kann somit indirekt mit gegen pNFATc2 gerichteten phosphospezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Wegen der an die intrazelluläre Calciumkonzentration gekoppelten Phosphataseaktivität von Calcineurin ist die nukleäre NFATc2-Akkumulation vom Calciumeinstrom in die Zelle abhängig, der von verschiedenen Rezeptoren für hypertrophe Stimuli reguliert wird. Als Stressfaktoren kommen dabei physiologische Stimuli wie z. B. hohe Dauerbelastung („Sportlerherz“)

oder pathologische Stressoren wie die Hypertonie in Betracht (Hill JA, 2000). In Zellkulturen und Tiermodellen ließ sich mehrfach zeigen, dass die durch Stressfaktoren induzierte Hypertrophie des Herzens zu einer Zunahme der intrazellulären Aktivität von Calcineurin in den Kardiomyozyten führen kann (Molkentin JD, 1998; Eto Y, 2000).

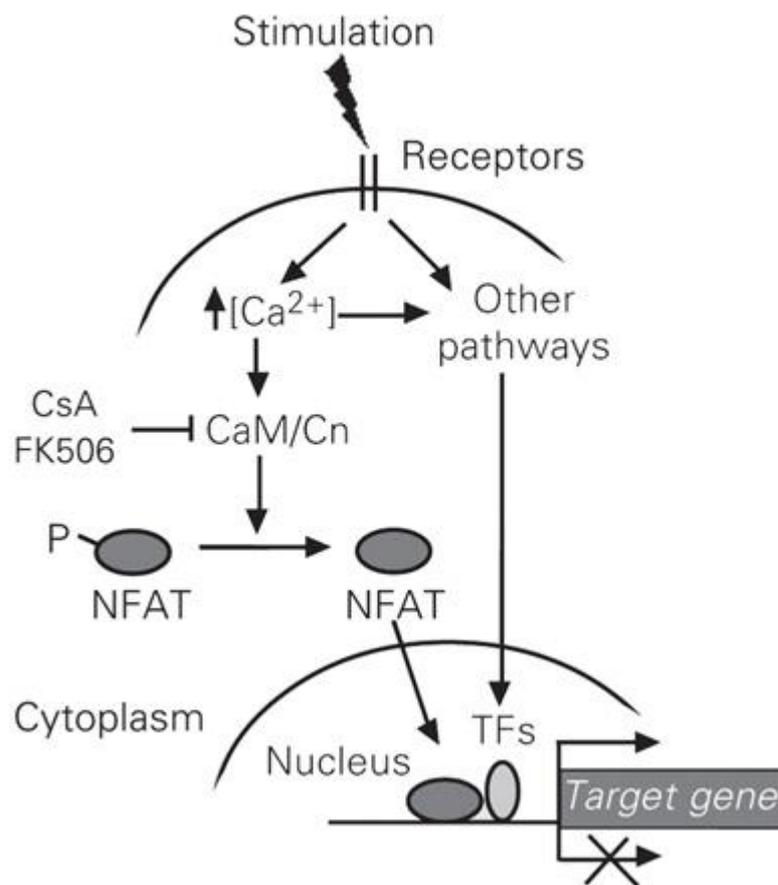


Abb. 3: Schematische Darstellung des Calcineurin- NFAT Transkriptionsweges.  $Ca^{2+}$  = Calcium; CaM = Calmodulin; Cn = Calcineurin; CsA = Cyclosporin A; NFAT = Nuclear Factor of Activated T cells; P = Phosphorylierung; TFs = Transkriptionsfaktoren.

## 1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollen tierexperimentell geschlechtsbezogene Unterschiede bei Mechanismen des blutdruckunabhängigen DOCA-Salz-induzierten kardialen und renalen Schadens der Maus auf morphologischer, funktioneller und molekularbiologischer Ebene untersucht werden.

In einem ersten Schritt sollte ein tierexperimentelles Modell etabliert werden, das die Situation in einem wichtigen Kollektiv von Patienten mit Myokardhypertrophie widerspiegelt: Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, die durch Mineralkortikoidexzess und Volumenüberladung gekennzeichnet sind. Hierfür erscheint das DOCA-Salz-Modell am geeignetsten. Durch eine pharmakologische Intervention mit dem Vasodilator „Hydralazin“ sollten die Effekte des Blutdruckanstiegs verhindert werden.

In einem zweiten Schritt sollten die generellen DOCA-Salz-induzierten blutdruckunabhängigen morphologischen, funktionellen und transkriptionellen Veränderungen des Herzens und der Niere in weiblichen und männlichen C57BL/6J Mäusen untersucht und auf geschlechtsspezifische Unterschiede hin verglichen werden. Außerdem sollte der für die maladaptive Myokardhypertrophie zentrale Calcineurin-Signaltransduktionsweg in Hinblick auf eine differenzielle Regulation in beiden Geschlechtern analysiert werden, um eine Erklärung auf molekularer Ebene für die möglicherweise beobachteten Unterschiede im Phänotyp liefern zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Materialien

#### 2.1.1 Materialien für die Tierhaltung

Altromin-Tiereinstreugranulat	Altromin GmbH und Co. KG, D-Lage-Lippe
Altromin Standardfutter für Maus	Altromin GmbH und Co. KG, D-Lage-Lippe
Käfige Makrolon, Typ III bzw. IV	Charles River Deutschland GmbH, D-Sulzfeld
Metabolische Käfige 3701M081	Techniplast, Buguggiate, Italien
Plastiktrinkstopfen	Techniplast, Buguggiate, Italien
Versuchstiere C57BL/6J Mäuse	Charles River Deutschland GmbH, D-Sulzfeld

#### 2.1.2 Geräte und Materialien für die In-vivo-Eingriffe

DOCA-Hormonpellets	Innovative Research of America, Sarasota, USA
Einwegspritze 1 ml	Becton Dickinson GmbH, D-Heidelberg
Einweghandschuhe	Kimberley-Clark, Rosswell, USA
Feinwaage Model Voyager	Ohaus, D-Giessen
Lochzange, Ohrmarkierung	Aeskulap, D-Baden-Württemberg
Millar-Kathetersystem	Mikro-Tip Pressure Katheter aus Nylon mit 1,4-French-Drucksensor; Millar Instruments Inc., Houston, USA
Minivent Typ 845	Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten, Operationsbesteck; Fine Science Tools, Inc., San Francisco, USA
Operationsmikroskop OpMi-191294	Zeiss, D-Oberkochen

OP-Tisch	Eigenanfertigung der Feinmechanischen Werkstatt des Center for Cardiovascular Research (CCR), Charité, D-Berlin,
Power Lab Data Acquisition System	ADInstruments, Castle Hill, Australien; dazugehörige Software: Chart4windows
Wundclips MikRon®	Becton Dickinson Primary Care Diagnostics, USA
Zentrifuge Model 5415R	Eppendorf AG, D-Hamburg

### 2.1.3. Chemikalien für die In-vivo-Eingriffe

Hydralazin	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen,
Isofluran	Abbott GmbH & Co. KG, D-Wiesbaden,
Sprühpflaster	Band-AiD, Johnson & Johnson

### 2.1.4. Geräte und Materialien für Ex-vivo-Untersuchungen

Automat für die Filmentwicklung	Kodak
Brutschrank, B 6120	Hereaus Instruments, D-Hanau
Cryo Tube™	Vials NUNC™ Brand Products, Dänemark
Deckgläser	Menzel-Gläser, D-Braunschweig
Einbettautomat Tissue Tec Vip	Miles Sc., Naperville, USA
Echokardiographie Gerät Vevo 770	VisualSonics Inc. Toronto, Canada
Elektrophoresekammern	Bio-Rad, D-München
Eppendorf Pipette	Eppendorf AG, D-Hamburg
Eppendorf Spitzen 0,5-20/ 50-1000 µL	Eppendorf AG, D-Hamburg
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, D-Hamburg

---

0,5/ 1,5/2,0 ml	Eppendorf AG, D-Hamburg
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
Feinwaage BA 610-OD2	Satorius AG, Deutschland
Ficoll-Lösung	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, D-Dassel
Homogenisator	Labortechnik, D-Mühlheim
Inkubator	Hereaus Instruments, D-Hanau
Kämme, Spacer für Polyacrylamidgele	Peq Lab, D-Erlangen
Magnetrührer mit Heizfunktion	Heidolph Instruments, D-Schwabach,
Megafuge	Hereaus Instruments, D-Hanau
Mikrowelle	Bosch, Deutschland
Light Cycler- Geräte	Roche, D-Mannheim
Light Cycler-Glaskapillare	Roche, D-Mannheim
Objektträger Super Frost Plus	Menzel-Gläser, D-Braunschweig,
Thermomixer	Eppendorf AG, D-Hamburg
Trio-Thermoblock	Biotron GmbH, D-Hilden
pH-Meter	Wissenschaftlich Technische Werkstätten, D-Weilheim
Photometer LFT	Labortechnik, D-Wasserburg
Powersupply Spannungsgerät	Hofer, Amstetten, Österreich
Rotationsmikrotom HM 355 S	Micron, D-Walldorf
Röntgenkassette	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK
Ultraschallgel	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
UV Transilluminator	Bio-Rad, D-Münster

Vortexer	Bio-Rad, D-Münster
Wärmeschrank	Hereaus Instruments, D-Hanau
Western-Blot Gelkammer	Bio-Rad, D-Münster
Zentifuge	Eppendorf AG, D-Hamburg

### 2.1.5. Chemikalien für die Ex-vivo-Untersuchungen

Acrylamid	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
APS (Amoniumpersulfate )	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
BSA (Bovine Serum Albumin)	BioLabs, D-Baden-Württemberg
Bis-Tris (2-bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)	AppliChem, D-Darmstadt
Bisacrylamid	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
Bradford	Biorad, D-Münster
Chloroform	Merck, D-Darmstadt
Chromogen Fast Red	DAKO Cytomation, D-Hamburg
DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)	Peroxidase Substrate Kit Vector Lab., USA
DEPC (DiethylenePyrocarbonate)	Fluka, Buchs, Schweiz
Eindeckmittel	Mounting Medium, DAKO, Dänemark
Eosin	Chroma, D-Münster
Ethanol	Merck, D-Darmstadt
EDTA (Ethylendiaminacetat)	AppliChem, D-Darmstadt
EGTA (Ethylenglycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-	

---

Tetraessigsäure	AppliChem, D-Darmstadt
FCS Fetales Kälber Serum	AppliChem, D-Darmsadt
Formalin	Merck, D-Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich Co.,D-Deisenhofen
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
Histowax Paraffin	Reichert-Jung, Deutschland
Isopropanol 30-70 %	Merck, D-Darmstadt
Laemmli-Probenpuffer	Bio-Rad, D-München
Magermilch	Merck, D-Darmstadt
Mayers Hämalaun-Lösung	Merck, D-Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> (Magnesium Chlorid)	Sigma-Aldrich Co.,D-Deisenhofen
Molekulargewichtsmarker	Sigma-Aldrich Co.,D-Deisenhofen
NaCl (Natrium Chlorid)	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumphosphat)	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen,
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
NaOH (Natriumhydroxid)	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
Nitrocellulose-Membran	Biorad, D-München
Paraffin	Roth, D-Karlsruhe
Paraformaldehyd 4%	Merck, D-Darmstadt
Precision Plus Protein™	Bio-Rad, D-München
Protein A/G Sepharosebeads	Santa Cruz, D-Heidelberg

---

Protease Inhibitor	Complete Mini EDTA free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, D-Mannheim
RNAse-Zap	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
Schiff'sches Reagenz	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
Sodium-n-dodecylsulfat (SDS)	Calbiochem, San Diego, USA
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth, D-Karlsruhe
Trans-Blot-Cell-Kammer	Bio-Rad, D-München
Tris Base	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen,
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen,
Trizol®-Reagenz	Invitrogen, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan (Tris Base)	Merck, D-Darmstadt
Triton X-100	Amresco, USA
Tween20	Merck, D-Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Co., D-Deisenhofen
Xylol	Roth, D-Karlsruhe

#### 2.1.6. Kits

RNA-PCR-Core-Kit	Applichem, D-Darmstadt
Light Cycler® Fast Start	Roche, D-Mannheim
Reaction Mix SYBR Green I	Roche, D-Mannheim
SuperSignal Pico-Kits	Pierce, Rockford, IL, United States
Entwicklerlösung	ECL Western Blotting Kit Reagenz, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere wurden 6 Wochen alte männliche und weibliche C57BL/6J-Mäuse mit einem Gewicht von  $20\text{g} \pm 2\text{g}$  verwendet.

Die Mäuse wurden in Makrolonkäfigen des Typs III bzw. IV, vor dem operativen Eingriff zu maximal fünf Tieren und nach dem Eingriff einzeln, auf Fasereinstreu gehalten. Die Raumtemperatur lag zwischen 19 und 24 °C und die Luftfeuchtigkeit wurde bei  $55\% \pm 5\%$  konstant gehalten. Das Beleuchtungsregime sorgte für einen zwölfstündigen Hell-dunkel-Rhythmus; in der Hellphase wurden ca. 60 Lux im Käfig erreicht. Wasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung.

Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung der zuständigen Behörden (Erlaubnis G 0289/05) und entsprechend den Richtlinien der American Physiological Society durchgeführt. Die Aufstallung der Mäuse sowie die Operationen und die Organentnahmen erfolgten in der tierexperimentellen Einrichtung im Center for Cardiovascular Research-CCR, Campus Charité Mitte, Hessische Str. 3–4, 10115 Berlin.

### 2.2.2 Gruppeneinteilung und Versuchsdurchführung

Zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs waren die männlichen und weiblichen Mäuse 6 Wochen  $\pm$  3 Tage alt. In jeder Gruppe wurden je 12 Tiere untersucht. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Gruppen findet sich in der Übersicht weiter unten. Männliche und weibliche C57BL/6J-Mäuse aller Gruppen wurden nach Einleitung einer Inhalationsnarkose linksseitig uninephrektomiert (Uni-Nx). Männlichen und weiblichen Mäusen, bei denen eine Erhöhung des Blutdrucks erzielt werden sollte, wurde ein 50-mg-DOCA-Pellet mit einer Freisetzungszeit von 45 Tagen implantiert. Das frei verfügbare Wasser aller Tiere wurde mit 1 % NaCl versetzt. Männlichen und weiblichen Mäusen, bei denen blutdruckunabhängige Effekte untersucht werden sollten erhielten zur Blutdrucksenkung 250 mg/L Hydralazin in das Trinkwasser (Scherrer-Crosbie, 2001). Da die Trinkmengen der einzelnen Tiere (Daten nicht gezeigt) von Tag zu Tag stark variierte, wurde nur die Urinausscheidung in 24 h am Ende des Versuches ermittelt. Drei Tage

vor Ende der 6 wöchigen Behandlungsdauer wurden alle Tiere, zur Messung physiologischer Parameter wie Diurese und Kalium Ausscheidung, in metabolische Käfige gesetzt. Die Echokardiographie erfolgte zwei Tage vor dem Versuchsende. Am Ende des Versuches nach 6 Wochen wurde der Blutdruck invasiv mittels eines Millar-Katheters an anästhesierten Tieren gemessen, anschliessend erfolgten Blut- und Organentnahmen. Zusätzlich wurde an zwei weiteren Gruppen von wachen, freilaufenden 5 männlichen und 5 weiblichen Mäusen der Blutdruck mittels Telemetrie-Sendern gemessen.

**Gruppe 1:** männliche C57BL/6J-Mäuse, Uni-Nx, 1% NaCl

**Gruppe 2:** weibliche C57BL/6J-Mäuse, Uni-Nx, 1% NaCl

**Gruppe 3:** männliche C57BL/6J-Mäuse, Uni-Nx, 1% NaCl, DOCA-Pellet

**Gruppe 4:** weibliche C57BL/6J-Mäuse, Uni-Nx, 1% NaCl, DOCA-Pellet

**Gruppe 5:** männliche C57BL/6J-Mäuse, Uni-Nx, DOCA-Pellet, 1% NaCl, Hydralazin

**Gruppe 6:** weibliche C57BL/6J-Mäuse, Uni-Nx, DOCA-Pellet, 1% NaCl, Hydralazin

**Gruppe 7:** Telemetrie-Tiere: 5 männliche C57BL/6J-Mäuse, Behandlung (Uni-Nx, DOCA-Pellet, 1% NaCl, Hydralazin) erfolgt nacheinander, nach jeder Behandlung wurde über einen bestimmten Zeitraum der Blutdruck mittels Telemetrie ermittelt

**Gruppe 8:** Telemetrie-Tiere: 5 weibliche C57BL/6J-Mäuse, Behandlung (Uni-Nx, DOCA-Pellet, 1% NaCl, Hydralazin) erfolgt nacheinander, nach jeder Behandlung wurde über einen bestimmten Zeitraum der Blutdruck mittels Telemetrie ermittelt

### 2.2.3 In-vivo-Eingriffe

#### 2.2.3.1 Anästhesie

Die Einleitung der Narkose erfolgte in einer Inhalationsbox mit 2 Vol.-% Isofluran und einem O<sub>2</sub>-Frischgasfluss von 1 l/min. Im Anschluss daran wurde das Tier auf einem temperierten Operationstisch (42°C) fixiert. Die Fortführung der Anästhesie erfolgte mit Hilfe eines Nasenkonus. Unter diesen Bedingungen wurden die operativen Eingriffe wie

Uninephrektomie und Pellet-Implantation sowie die hämodynamischen Messungen und die Echokardiographie durchgeführt.

#### 2.2.3.2 *Uninephrektomie*

Für die Uninephrektomie wurden die Tiere nach Einleitung der Narkose in Seitenlage auf dem Operationstisch fixiert und mithilfe des Nasenkonus anästhesiert. Nach Rasur und Desinfektion wurde ein 0,5 cm langer Hautschnitt durchgeführt, die Bauchhöhle in diesem Bereich durch einen ca. 0,3 cm langen Schnitt eröffnet und die linke Niere freigelegt. Die linke Nierenarterie und die linke Nierenvene wurden vorsichtig mit Mikropinzetten unter Zuhilfenahme von Wattetupferstäbchen freipräpariert und voneinander getrennt. Die kollateralen Gefäße, die Nebennierenarterien und die Arteriae spermaticae wurden mit 7-0-Seide doppelt ligiert und mittels einer Schere durchtrennt. Es folgten die Mobilisation des Ureters einschließlich des periuretalen Fettgewebes und das Durchtrennen desselben auf halber Strecke zwischen Niere und Blase. Die Niere wurde aus dem perirenal Fettgewebe herausgelöst. Die entnommenen Organe wurden zum späteren Vergleich konserviert, wie in einem der folgenden Abschnitte noch beschrieben wird.

#### 2.2.3.3 *Pellet-Implantation*

Männlichen und weiblichen Mäusen wurde subkutan ein 50-mg-Pellet, das sechs Wochen lang konstant DOCA freisetzt, im Bereich zwischen der rechten Schulter und dem Hals implantiert. Hierzu erfolgte während der Narkose ein ca. 0,6 cm langer Hautschnitt. Mit einer dünnen Pinzette wurde stumpf eine Tasche freipräpariert und das Pellet in diesem Bereich platziert. Im Anschluss wurde die Haut mit einem Wundklip verschlossen.

#### 2.2.3.4 *Medikation*

Als Trinkwasser wurde den Tieren aller Gruppen 1%-NaCl-Lösung gegeben. Zum Senken des Blutdruckes der entsprechenden Gruppen wurde das blutdrucksenkende Medikament Hydralazin in einer Konzentration von 250 mg/L in die 1%ige NaCl-Lösung gegeben.

### 2.2.3.5 *Metabolische Käfige*

Zur Überprüfung der Menge und der klinischchemischen Analyse des ausgeschiedenen Urins wurden die Tiere aller Gruppen am Ende des Versuchs einzeln in Stoffwechselkäfige gesetzt. Die Urinmengen der einzelnen Tiere wurden über 24 Stunden erfasst und die Konzentrationen von Natrium und Kalium bestimmt.

### 2.2.4 Echokardiographie

Die zweidimensionale transthorakale Echokardiographie ist eine nicht-invasive Untersuchungsmethode, die sich besonders für die morphologische und funktionelle Charakterisierung des kardialen Phänotyps eignet (Tannaka N, 1996).

Für die echokardiographischen Untersuchungen wurden die Mäuse mit einer Inhalationsnarkose mit 1,5%-Isofluran betäubt.

Anschließend wurden der ventrale und linksseitige Brustkorb sowie der craniale Bauchbereich vom Haarkleid befreit. Um die Bildqualität zu verbessern, wurde der rasierte Bereich mit einer Enthaarungscreme vollständig enthaart. Die betäubte Maus wurde in Rückenlage mit Hilfe von Klebestreifen an den Gliedmaßen auf einer zuvor auf 41°C geheizte Plexiglaswärmeplatte fixiert. Mit Kontaktgel benetzte EKG-Elektrodenplättchen wurden unter die beiden Vorderpfoten und die linke Hinterpfote geschoben und in die Fixation integriert. So konnte simultan mit der echokardiographischen Untersuchung ein Ein-Kanal-EKG aufgezeichnet werden. Anschließend wurde eine ca. 1,5 cm dicke Schicht Ultraschallgel auf die zu untersuchende Stelle aufgetragen. Ein kürzlich neu entwickeltes transthorakales Echokardiographie-System (Vevo 770; VisualSonics Inc. Toronto, Canada) wurde in dieser Studie eingesetzt.

Die Wärmeplatte wurde in einem Winkel von 15° gekippt, so dass die Maus in linker Seitenlage zum Liegen kam. Zunächst wurden mit einem 30-MHz-Linearschallkopf Längs- und Querachsenansichten des Herzens dargestellt. Hierbei wurden aus der Echokardiographie beim Menschen bekannte Standardeinstellungen (lange und kurze parasternale Achse) gewählt. Bei der Längsachsenansicht wurde der Schallkopf, vom linken Rippenbogen zur rechten Schulter weisend, leicht in das Gelkissen eingetaucht, ohne Druck auszuüben. In der bildlichen Darstellung lag die Aortenwurzel waagrecht im rechten Bildausschnitt. Bei geschlossener Aortenklappe erschien diese als Mittlerecho innerhalb der Aorta. Der linke Ventrikel schloss sich im Bild waagrecht nach links

weisend an. Weiterhin sichtbar waren das linke Atrium und Teile des rechten Ventrikels (s. Abb. 11, Kap. 3.3.1). Alle echokardiographischen Aufnahmen wurden ohne Kenntnis der Behandlung des jeweiligen Tieres analysiert.

## 2.2.5 Hämodynamik

### 2.2.5.1 *Invasive Blutdruck- und Herzfrequenzmessung mittels Millar-Katheter*

6 Wochen nach der DOCA-Pellet Implantation wurde eine invasive Messung des Blutdruckes und der kardialen Funktion mit Hilfe eines 1,4-Fr.-(French)-Millar-Katheters vorgenommen. Diese Methode bei geschlossenem Thorax wurde schon mehrfach beschrieben (Lorenz JN, 1997). Einleitend wurde das Versuchstier inhalativ mit 1,5%-Isofluran betäubt und unter fortwährender Narkose auf dem OP-Tisch fixiert. Auf dem Rücken liegend wurde dem Tier nach Benetzung der Brusthaare mit 70%-EtOH zur besseren Operabilität die Brust oberhalb des Sternums geöffnet. Der Schnitt betrug etwa 2 cm und war mittig gelegen. Es folgte die Freilegung der Arteria carotis etwa 5–10 mm im Gewebe. Das obere, freiliegende „Ende“ wurde mit Nahtmaterial abgebunden und nach schräg oben fixiert, jedoch nur so weit, dass das Gefäß nur leicht unter Spannung stand. Danach wurde das untere Ende mit einer Klemme belegt, so dass die A. carotis über einen Abschnitt von etwa 1–1,5 cm abgeklemmt war. Etwa zwei Drittel über der Klemme erfolgte nun ein Schnitt in die A. carotis, welcher das Gefäß etwa ein Drittel im Durchmesser öffnet, jedoch nicht zu weit, um es nicht reißen zu lassen, wiederum groß genug, um den Katheter einführen zu können. Nachfolgend wurde die Öffnung mithilfe einer Feinpinzette zur Einführung des Millar-Katheters gespreizt. Die Sonde wurde etwa 1 cm weit in die A. carotis geschoben, bis der Blutdruck entsprechend korrekt auf dem Monitor dargestellt wurde. Die Sonde durfte nicht zu nahe dem Herzen platziert werden, da sonst sowohl systolische als auch diastolische Werte aufgrund der Nähe zum Herzmuskel zu starken Schwankungen unterworfen gewesen wären und sowohl unerwünscht große als auch unregelmäßige Spitzen aufgetreten wären. Durch Anschluss des Millar-Katheters an ein Power Lab Data Acquisition System (ADInstruments) und mithilfe der dazugehörigen Software erfolgte die Aufzeichnung und Auswertung der Daten. Nach Aufzeichnung der Messparameter wurde der Millar-Katheter aus dem Gefäßsystem entfernt und eine abgestumpfte 26-G-Nadel mit 1-ml-Spritze zur Blutentnahme in die A. carotis eingeführt.

### 2.2.5.2 *Invasive Blutdruck- und Herzfrequenzmessung mittels Telemetrie*

Den Tieren (22g  $\pm$  2g) wurde zur telemetrischen Blutdruckmessung eine Sendeeinheit unter Inhalationsnarkose implantiert (Gross V, 2005). Der Sender wog 3,4 Gramm und wurde von den Tieren ohne Komplikationen toleriert. Die Einheit wurde vor der Operation kalibriert. Anschließend wurde unter aseptischen Bedingungen eine Laparotomie vorgenommen und die abdominale Aorta freigelegt. Hierfür wurden die Tiere am Bauch rasiert und anschließend mit Enthaarungscreme enthaart. Während und nach der OP befanden sich die Tiere auf einer Wärmplatte, zur Konstanthaltung der Körpertemperatur. Am Abdomen wurde ein ca. 2–3 cm langer Schnitt gesetzt, die Aorta vom Fett und umgebenden Gewebe freigelegt und von der Vena Cava separiert. Anschließend wurde die Aorta für die Dauer des Senderbefestigens mit einer Klammer versehen. Nach Punktion der Aorta wurde die Spitze des Katheters der Sendereinheit in das Gefäß eingebracht und mit Gewebekleber fixiert. Die Sendereinheit wurde ventral am Peritoneum mithilfe einiger Nähte verankert. Während der gesamten OP wurden die Organe mit erwärmter 0,9%-NaCl-Lösung gespült, um die Gewebe feucht zu halten. Nach Verifizierung der Funktionstüchtigkeit der Einheit wurde die abdominale Inzision geschlossen. Anschließend wurden die Tiere in Einzelkäfigen untergebracht. Nach einer Rekonvaleszenz- und Akklimatisierungsperiode von 7 Tagen wurde mit den Messungen begonnen. Die Daten wurden mittels Radiosignal vom Sender (in der Maus) an den Empfänger (unterhalb des Käfigs) gesendet und mittels Software (Dataquest A.R.T. systems 1.0) ausgewertet. Alle 5 Minuten wurden für 10 s die Daten aufgenommen. Die telemetrische Blutdruckmessung an wachen, sich frei bewegenden Tieren diente der Überprüfung der mittels Kathetermessung unter Anästhesie gewonnenen Blutdruckdaten. Während der ersten Phase konnten sich die Tiere an die implantierten Sender gewöhnen und von dem Eingriff erholen. Die Tiere bekamen 1% NaCl zu trinken. An Tag 14 wurden die Tiere uninephrektomiert, das DOCA-Pellet wurde implantiert und die Tiere bekamen weiterhin 1% NaCl als Trinkflüssigkeit. Diese Behandlung sollte dem Blutdruck der Tiere in Gruppe 3 und 4 (Kap. 2.2.2) entsprechen. Für die Dauer von 10 Tagen wurde der Blutdruckanstieg gemessen. Daraufhin erfolgte die Verabreichung des Vasodilators Hydralazin zur Senkung des Blutdruckes für die Dauer von weiteren 10 Tagen und wurde an Tag 33 beendet. Diese Behandlung sollte als Vergleich für die Blutdrucknormalisierung durch Hydralazin in den Gruppen 4 und 5 (Kap. 2.2.2) dienen.

## 2.2.6 Blut- und Organentnahme

Etwa 1,5 ml Blut wurden aus der A. carotis entnommen, was zum Tod des Tieres führte. Nach Zentrifugation der abgestandenen Blutprobe in einem 1,5-ml-Eppendorfgefäß für 10 min. bei 4°C und 3000 min<sup>-1</sup> wurde das überstehende Serum entnommen und für die Bestimmung von Natrium und Kalium verwendet.

Die Abdominal- und Thoraxhöhlen der Tiere wurden nach der invasiven Blutdruckmessung mit einem Medianschnitt eröffnet. Bei allen Tieren wurden die Herzen und die rechte Niere herauspräpariert. Die Gewichte der Herzen und Nieren wurden auf einer Feinwaage bestimmt. Die Herzen und Nieren wurden horizontal in zwei Hälften geschnitten. Eine Hälfte wurde in 4%iger gepufferter Paraformaldehydlösung für die konventionelle Histologie und die andere Hälfte in flüssigem Stickstoff für molekularbiologische Untersuchungen konserviert. Die Lagerung des Materials erfolgte bei -80°C.

## 2.2.7 Histologie

### 2.2.7.1 *Paraffineinbettung und Schnitttechnik*

Die in 4%iger Paraformaldehydlösung konservierten Organe wurden schrittweise dehydriert. Hierfür wurden sie nacheinander jeweils zwei Stunden erst in 70%igen und dann 90%igen Ethylalkohol gelegt. Anschließend kamen sie über Nacht in 96%igen und dann dreimal für zwei Stunden in 100%igen Ethylalkohol. Abschließend wurden sie noch zwei Mal für 20 Minuten in Xylol gegeben. Das dehydrierte Gewebe wurde zwei Stunden in weiches Paraffin gelegt und anschließend eingebettet.

Mit einem Rotationsmikrotom wurden von den Paraffinblöckchen Schnitte mit einer Dicke von 2–3 µm angefertigt. Diese wurden in einem handwarmen Wasserbad mit einem Pinsel gestreckt und danach auf einen beschichteten Objektträger aufgebracht. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Objektträger in einen Wärmeschrank (60°C) verbracht und dort ca. 30 min erhitzt.

### 2.2.7.2 *Färbemethoden*

Die PAS-Färbung ist eine histochemische Färbung, bei der insbesondere kohlenhydrathaltige Komponenten wie z. B. Glykoproteine, Muzine und Glykogen mithilfe von Perjodsäure und Schiff-Reagenz nachgewiesen werden können. Durch die im PAS-Reagens vorhandene Perjodsäure werden die freien Hydroxylgruppen der Saccharide

zu Aldehydgruppen oxidiert, die dann mit dem im Schiff-Reagens enthaltenen schwefelsauren Fuchsin rot-violette Komplexe bilden und so im histologischen Bild erscheinen. Die PAS-Färbung färbt Karboanhydrate und epitheliales Muzin lila-rot an, so dass sich hiermit besonders gut epitheliale- und andere Basalmembranen und Expansion der extrazellulären Matrix darstellen lassen.

#### 2.2.7.3 *Bestimmung der Myozyten- und Tubulusgröße*

Zur Bestimmung der Myozyten- und Tubulusgröße wurden Myozyten im Querschnitt und distale Tubuli im Durchmesser ausgesucht, die nahezu kreisförmig waren. Mithilfe eines Lichtmikroskops mit angeschlossener Kamera und Bildverarbeitungssystem wurden Bilder der Präparate angefertigt. Die auf dem jeweiligen zufällig ausgewählten Bildabschnitt vorliegenden Zellen ausgewertet. Zur Bestimmung der Kardiomyozytenquerschnittsfläche wurden pro Mausherzschnitt etwa 50 Kardiomyozyten in 10 zufällig ausgewählten Bildabschnitten und bei einer 40 fachen Vergrößerung in  $\mu\text{m}^2$  ausgemessen (Tamura, 1999). Die durchschnittliche Zellfläche pro Tier ermittelt und am Ende der Mittelwert für die jeweilige Gruppe wurde errechnet. Mittelwerte der Zellflächen der einzelnen Gruppen wurden miteinander verglichen. Die Bestimmung des distalen Tubulusdurchmessers erfolgte nach dem gleichen Schema. Auch hier wurden zunächst Mittelwerte der Tubulusdurchmesser für jedes Tier gebildet, die anschließend zu einem Mittelwert für die jeweilige Gruppe zusammengefasst wurden.

#### 2.2.7.4 *Immunhistologie*

Die in Paraffin eingebetteten Organe wurden immunhistochemisch untersucht. Es wurde die Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP) nach Cordell (1984) angewandt, die ursprünglich Mason und Mason (1978) entwickelt haben. Bei diesem Verfahren werden so genannte Brückenantikörper als sekundäre Antikörper verwendet. Dabei bindet eines der Fab-Fragmente des Brückenantikörpers an das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Das andere verbindet sich mit dem Fc-Fragment eines Immunkomplexes aus monoklonalem Antikörper und alkalischer Phosphatase. Dieser lösliche Immunkomplex wurde anschließend durch eine Enzymreaktion sichtbar gemacht. Die Auswertung der positiv gefärbten Zellen erfolgte ähnlich wie die Messung der Myozytenquerschnittsfläche. Es wurden die positiv gefärbten Zellen in jeweils 10

zufällig ausgewählten Bildabschnitten in den Herz oder Nierengeweben gezählt, addiert und der ermittelte Mittelwert für die jeweiligen Gruppen graphisch dargestellt.

Die Färbungen nach der APAAP-Methode erfolgten in einer Feuchtkammer auf einer Färbebank. Zuerst wurden die Präparate über dreißig Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit fetalem Kälberserum (FCS) inkubiert, um unspezifische Bindungen an das Gewebe zu verhindern. Nach Entfernen des überschüssigen Serums wurden die Gewebeschnitte mit 100 µl der in Antikörperverdünnungsmedium gelösten Primärantikörper eine Stunde lang bei RT inkubiert. Die optimale Antikörperkonzentration war zuvor durch zahlreiche Vorversuche ermittelt worden. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper folgten erst eine dreißigminütige Inkubation mit einem Kaninchen-anti-Maus IgG-Brückenantikörper und im Anschluss wiederum dreißig Minuten Inkubation mit dem APAAP-Komplex bei RT. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Präparate jeweils dreimal über fünf Minuten mit PBS-Pufferlösung gespült. Für ein besseres Färberegebnis wurde die Inkubation mit Brückenantikörper und APAAP-Komplex jeweils über eine Dauer von zehn Minuten wiederholt. Abschließend wurden die Präparate zur enzymatischen Darstellung der alkalischen Phosphatase mit Substrat-Chromogen Fast Red beträufelt, welches zuvor nach Angaben des Herstellers angesetzt wurde. Nach vorsichtiger Spülung mit TBS wurden sie mit Hämalaun gegengefärbt und schließlich unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die fertig gefärbten Präparate wurden mit wässrigem Eindeckmedium eingedeckt.

Bei jeder Färbung wurden obligatorisch sowohl Positivkontrollen (Primärantikörper gegen  $\alpha$ -Aktin) als auch Negativkontrollen (Waschpuffer oder Antikörperverdünnungsmedium ohne Primärantikörper) mitgeführt, um falsch negative bzw. falsch positive Reaktionen auszuschließen.

## 2.2.8 Genexpressionsanalyse

### 2.2.8.1 *RNA-Isolation aus dem linken Ventrikel des Herzens und der Niere und Konzentrationsbestimmung*

Die Isolation von RNA aus Mausgewebe wurde nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt.

Da die RNA sehr schnell durch den Kontakt mit den ubiquitär vorkommenden und RNA-Moleküle abbauenden RNAsen degradiert wird, wurde die Arbeitsfläche mit RNase-Zap vorbehandelt und ausschließlich autoklavierte Materialien verwendet.

Die RNA wurde mithilfe von zuvor auf Raumtemperatur gebrachtem TRIZOL<sup>®</sup>-Reagenz extrahiert. Das TRIZOL<sup>®</sup> bricht die Zellen auf, wobei Proteine, RNA und DNA erhalten bleiben. Die zuvor auf Trockeneis überführten Gewebe wurden in je 1 ml TRIZOL<sup>®</sup>-Reagenz gegeben. Mittels eines Ultrathurrax Homogenisators wurde die Mischung zu einer Suspension homogenisiert. Die Proben wurden ca. 5 min. bei RT stehen gelassen. Schwere Gewebsanteile wurden bei 5000 U/min über eine Dauer von 5 min. pelletiert. Zu den dekantierten Überständen wurde zur Phasentrennung 0,2ml Chloroform gegeben und die Mischung 30 s geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 14000U/min entstanden drei sichtbare Phasen. Die untere rote Phenol-Chloroform-Phase enthielt die Proteine, die Interphase die DNA und in der oberen farblosen wässrigen Phase war die RNA gelöst. Diese wurde abgenommen, zur Fällung der RNA mit 0,5ml Isopropanol versetzt und 10min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation bei 14000 U/min und 4 C über 5 min wurde die RNA in einem Pellet konzentriert. Dieses wurde mit 500 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend 5–10min im Heizblock bei 56 C getrocknet. Das RNA enthaltende Pellet wurde in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -80 °C über Nacht eingefroren. Erst am nächsten Tag wurde das Pellet nach 10 min Inkubation bei 56°C im Heizblock und anschließendem Vortexen gelöst. Die RNA-Menge wurde durch mindestens zweimalige Messung der optischen Dichte mit einem Spektralphotometer ermittelt. Dazu wurde 1µl der Probe mit 99µl DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Messwerte wurden gemittelt. Die photometrischen Messungen erfolgten bei den Wellenlängen A1=260 nm und A2=280 nm. Das Verhältnis, die so genannte Ratio, A1/A2 sollte zwischen 1,5 und 2,1 liegen. Abweichungen würden auf Protein- oder TRIZOL<sup>®</sup>-Verunreinigungen hinweisen.

#### 2.2.8.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Identifizierung und Trennung von DNA-Fragmenten bzw. Gesamt-RNA und beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Als Referenz für das Molekulargewicht diente ein DNA-Längenstandard (100 bp Marker), der zusammen mit den Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Dazu wurde 1%iges TAE Agarosegel luftblasen- und RNase-frei

gegossen. Kamm und Schlitten wurden hierzu kurz mit RNase-Zap inkubiert und danach kräftig mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült. Die Agarosekonzentration bestimmt die Porengröße des Gels und richtet sich nach der Anzahl der Basenpaare der zu untersuchenden Probe. Es wurden ein 1%iges Agarosegel hergestellt und mit 4 µL Ethidiumbromid versetzt. Danach wurde die Lösung in eine vorbereitete Gelkammer gegossen und bis zur vollständigen Erstarrung stehen gelassen. Anschließend wurde der Kamm entfernt. Die RNA-DEPC-Lösung wurde 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt, mit 8 µL Ladepuffer versetzt, homogenisiert und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V für ca. 30 min. Der hinzugefügte Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkalierte im RNA-Molekül und fluoreszierte unter UV-Licht (254nm). Auf diese Weise ließen sich bei intakter RNA eine 28S- und eine 18S-Bande sichtbar machen, die Rückschluss auf die Qualität der mRNA zuließen. Die Gele wurden unter UV-Licht analysiert und zur Dokumentation durch einen Gelfilter mit einer Sofortbildkamera fotografiert.

#### 2.2.8.3 *Reverse Transkription*

Mit dem RNA-PCR-Core-Kit wurde die reverse Transkription durchgeführt. Es wurden *Random Hexamere* verwendet, die zufällig an die im Ansatz vorhandenen RNA-Moleküle banden. Dies ermöglichte der RNA-abhängigen DNA-Polymerase (MuLV Reverse Transkriptase), an diesem Punkt anzusetzen und von dort die RNA in DNA umzuschreiben. Hierzu standen dem Enzym die im Reaktionsansatz vorhandenen Triphosphate (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) zur Verfügung. Das Enzym benötigte außerdem noch MgCl<sub>2</sub> als Kofaktor.

#### 2.2.8.4 *Primer-Design*

Für die Herstellung der Primer waren verschiedene Kriterien zu beachten. Die Primer-Sequenz sollte spezifisch für das gewünschte Zielgen sein und nicht mehr als vier gleiche aufeinanderfolgende Basenpaare enthalten, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen zu vermeiden. Die Länge der Primer umfasste ca. 20 Nukleotide mit einem Anteil von Cytosin zu Guanin von 40–60%. Die Schmelztemperatur sollte für Sense- und Antisense-Primer annähernd gleich sein. Es sollten inter- und intramolekulare Komplementarität vermieden werden. Ein bis zwei Guanin- oder Cytosin-Basen am 3'-Ende ermöglichen eine bessere Bindung und Elongation. Alle Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert.

Tab. 1: Primer Sequenz und Annealing Temperatur

Ziel Gene	Oligonukleotid Sequenzen		Annealing Temperatur
TGF – $\beta$ 1	Sense	5'-CTAATGGTGGACCGCAACAAC-3'	64° C
	Antisense	5'-CGGTTTCATGTCATGGATGGTG-3'	
MCP - 1	Sense	5'-CACTCACCTGCTGCTACTCATCA-3'	66°C
	Antisense	5'-GCTTGAGGTGGTTGTGGAAAAG-3'	
Koll. I	Sense	5'-GAGCGGAGAGTACTGGATCG-3'	61°C
	Antisense	5'-GTTCGGGCTGATGTACCAGT-3'	
Koll. III	Sense	5'-TGCCCACAGCCTTCTACACCT-3'	62°C
	Antisense	5'-CAGCCATTCTCCCACTCCAG-3'	
Calc. A - $\beta$	Sense	5'-GGATGTTGCCTAGTGGAGTGTTG-3'	65°C
	Antisense	5'-GGAGAGAATCCTCGTATTGCTTTT-3'	
MCIP - 1	Sense	5'-CCACACAAGCAATCAGGGAGC-3'	66°C
	Antisense	5'-GCTTGACTGAGAGAGCGAGTC-3'	
ANP	Sense	5'-TAGACCACCTGGAGGAGAAG-3'	61°C
	Antisense	5'-CCAATCCTGTCAATCCTACC-3'	
BNP	Sense	5'-ATCTCCTGAAGGTGCTGTCC-3'	62°C
	Antisense	5'-GTGCTGCCTTGAGACCGAAG-3'	
$\beta$ 2-Mikro globulin	Sense	5'-GAAATCCAAATGATGAAGAACG-3'	64°C
	Antisense	5'-CAAATGAATCTTCAGAGCATCATGT-3'	

### 2.2.8.5 Light Cycler Realtime PCR

Mit dem *Light Cycler* lassen sich sowohl quantitative als auch qualitative PCR-Analysen durchführen. Die *Light-Cycler*-Technologie bietet zwei Vorteile gegenüber der konventionellen PCR: zum einen eine zeitliche Verkürzung des PCR-Prozesses durch so genanntes „rapid thermal cycling“, zum anderen die Möglichkeit, die Amplifikation der Produkte während des eigentlichen PCR-Vorganges zu verfolgen. Das Prinzip beruht auf der Emission einer Fluoreszenz, welche von dem Reaktionsfarbstoff SYBR Green I

ausgesendet wird. SYBR Green I ist ein dsDNA-spezifischer Farbstoff, bei dem die Emission der Fluoreszenz durch Interaktion in doppelsträngige DNA verstärkt wird. Da die Fluoreszenzintensität von der vorhandenen Konzentration an dsDNA abhängig ist, verstärkt sich im Laufe des PCR-Prozesses die gemessene Signalintensität. Gemessen wird die Fluoreszenz, indem die Spitze der Kapillare mit gefiltertem Licht der Wellenlänge  $\lambda = 450\text{--}490\text{ nm}$  bestrahlt wird. Von hier aus wird auch das vom SYBR Green emittierte Licht aufgenommen. Nach jedem Amplifikationsschritt wird die Fluoreszenz bei einem vorgegebenen Temperaturplateau ermittelt. Ein am Light Cycler angeschlossener Computer zeichnet die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zahl der durchgeführten PCR-Zyklen auf und wandelt die so erhaltenen Daten in eine Grafik um. Das Programm bestand aus einem Denaturierungsschritt, vierzig Amplifikationsschritten und einer Schmelzkurvenanalyse. Wie auch bei der konventionellen PCR müssen zuvor die Bedingungen der Reaktionen optimiert werden. Hierbei spielen die Magnesiumchloridkonzentration sowie die Anlagerungstemperatur für das Primerpaar eine entscheidende Rolle. In Vorexperimenten wurden mit Verdünnungsreihen von Magnesiumchlorid und durch Veränderungen in der Annealingtemperatur die optimalen Messbedingungen ermittelt. Die Zeiten für die PCR-Programme richten sich nach der Fragmentlänge und dem eingesetzten Primerpaar. Man kann abschätzen, dass das hier verwendete Enzym eine Syntheserate von 25 bp pro Sekunde aufweist. Dementsprechend wurden die Kopierzeiten (Transkription) an die jeweiligen Fragmentlängen angepasst.

Der PCR-Ansatz wurde gründlich im Vortexer gemischt und je 18  $\mu\text{L}$  in die *Light Cycler*-Glaskapillare pipettiert. Anschließend wurde die cDNA hinzugefügt, die Kapillaren verschlossen und bei  $1000\text{ min}^{-1}$  zentrifugiert. Dadurch wird der *Master Mix* ausreichend mit cDNA durchmischt und gelangt durch die Zentrifugation in die tiefer gelegenen Teile der Kapillare. Die Kapillaren wurden in den Rotor des *Light Cycler*-Gerätes eingebracht und der Lauf gestartet.

#### 2.2.8.5 Quantifizierung mit der delta-delta-CT-Methode

Für jedes Zielgen wurde durch das Auswertungsprogramm die Zykluszahl ermittelt, bei der das SYBR Green Signal den Hintergrundwert übersteigt. Dieser so genannte CT-Wert wurde für jedes Zielgen auf den CT-Wert des Housekeeping-Gens  $\beta 2$ -Mikroglobulin derselben Probe durch Subtraktion normalisiert. Als Housekeeping-Gene bezeichnet man diejenigen Gene, die nicht reguliert sind, das heißt unabhängig von

intra- und extrazellulären Einflüssen in allen Zellen konstant exprimiert werden. Die quantitativen Verhältnisse der mRNA-Expression wurden in Relation zur Vergleichsgruppe (männlich gegen weiblich bzw. Uni-Nx+Salz gegen DOCA+Salz+Hydralazin) beurteilt.

### 2.2.9 Immunpräzipitation und Westernblotanalyse

Im aktiven Zustand dephosphoryliert Calcineurin in seiner Eigenschaft als Phosphatase den Transkriptionsfaktor NFATc2. Dadurch kann dieser in den Nucleus translozieren, wo er das hypertrophe Genprogramm aktiviert. Da in DOCA+Salz+Hydralazin-behandelten Männchen sowohl Calcineurin  $\text{A}\beta$  als auch sein Modulator MCIP1, der kontextabhängig sowohl inhibitorisch als auch aktivierend wirken kann, stärker exprimiert waren als in den Weibchen, wurde zur Einschätzung der tatsächlichen Aktivität von Calcineurin der Phosphorylierungsgrad des Calcineurintargets NFATc2 untersucht. Hierzu wurden nach Immunpräzipitation Western-Blot-Analysen mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen pNFATc2 erstellt.

Durch die Western-Blot-Analyse können Proteine gezielt in Gewebeextrakten nachgewiesen und quantifiziert werden (Sambrook E, 1989). Die Gewebeproben wurden zunächst mit Zell-Lysis-Puffer mit EDTA freiem Proteaseinhibitor versetzt und anschließend mit einem Ultrathurrax im Eisbad homogenisiert. Durch kurze Zentrifugation (1 min bei maximal  $14000 \text{ min}^{-1}$ ) wurden die nicht solubilisierbaren Gewebsbestandteile abgetrennt.

#### 2.2.9.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung wurde die kolorimetrische Methode nach Bradford verwendet (Bradford MM, 1976). Der Coomassie-Farbstoff kann mit unpolaren Proteinstrukturen interagieren und durch anionische Sulfonsäuregruppen kationische Aminosäuren binden. Dadurch kommt es zu einer Änderung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm. Da die Absorption bei 595 nm direkt proportional zur Proteinmenge ist, kann die Konzentration der Probe anhand von BSA Standards ermittelt werden. Die Variabilität der Farbreaktion macht bei jeder Proteinkonzentrationsbestimmung das Erstellen einer Eichgerade mit definierten Proteinmengen notwendig. Die eingesetzte Proteinkonzentration der Standards wird gegen die Absorption bei 595 nm aufgetragen und die Proteinkonzentration in den Pro-

ben mithilfe einer Regressionsgeraden bestimmt. Befand sich die Proteinkonzentration außerhalb der von den Standards, wurden die Proben entsprechend verdünnt.

### 2.2.9.2 Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus Mausgewebe dienen spezifische, an Protein A- oder/und Protein G-Sepharose gekoppelte Antikörper, mit denen eine so genannte Immunpräzipitation durchgeführt werden kann. Protein A und Protein G sind Membranproteine des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, die spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen zu binden vermögen. Durch die Bindung des Antikörpers an die Protein A-/G-Sepharose wird die Isolierung eines Immunkomplexes aus Antikörper und Zielprotein erleichtert (Chenais F, 1977). Zur Immunpräzipitation wurden 500 µg Proteinlösung mit 500 µl Lysispuffer mit Proteaseinhibitor und 20 µl Protein A-/G-Sepharose suspension vermischt und 2 h zur Vorreinigung bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 8000 min<sup>-1</sup> 3 min abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Dem Überstand wurden 10 µl monoklonaler anti-NFAT-c2-Antikörper zugegeben und ebenfalls für 2 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Zur Gewinnung der Immunkomplexe wurden nach der Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper 20 µl Protein A-/G-Sepharose Suspension zugegeben und nach 2 h bei 8000 min<sup>-1</sup> 3 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die pelletierten Immunpräzipitate dreimal mit eiskaltem Lysis-Puffer gewaschen und in 50 µl Lämmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE-Gel wurden die Proben für 5 min bei 95°C erhitzt und 5 min bei 14000 min<sup>-1</sup> abzentrifugiert, um den Immunkomplex von der Protein A-/G-Sepharose zu lösen.

### 2.2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli UK, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d. h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, sodass ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7–15%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Auf die Trenngele wurde im Anschluss ein 4%iges Sammelgel gegossen.

#### 2.2.9.4 *Western-Blot-Analysen*

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine in einem elektrischen Feld aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Western Blot), welche dann mit spezifischen Erstantikörpern inkubiert wurden. Mithilfe Peroxidase gekoppelter Zweitantikörper wurden die gebundenen Erstantikörper in dieser Arbeit über eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Eingeleitet wurde der Western Blot mittels Äquilibrierung von Gel, Nitrozellulose und Blotpapier in Transferpuffer. Darauf hin wurde das „Sandwich“ aus Schwamm, Blotpapier, Nitrozellulose, Gel, Blotpapier und Schwamm in die Blotkammer eingeschoben, wobei der Einschluss von Luftblasen vermieden wurde. Der Proteintransfer aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte in einer vollständig mit Transferpuffer gefüllten *Trans-Blot-Cell*-Kammer (Biorad) über Nacht bei 80 mA oder für 2 h bei 400 mA.

Sämtliche im Folgenden beschriebene Inkubationsschritte fanden unter leichtem Schwenken statt. Um die Proteinbindungskapazität der Membranen vollständig abzusättigen und damit eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden, wurde die Membran zunächst mit 5-%-BSA-Lösung für 1 h bei RT geblockt. Die anschließende Inkubation mit dem polyklonalen Kaninchen-Erstantikörper gegen pNFAT c2 erfolgte für 2,5 h bei RT. Nach viermaligem Waschen der Membran mit PBS-T für je 20 min erfolgte die einstündige Inkubation mit dem gegen Kaninchen-IgG gerichteten polyklonalen Antikörper vom Schwein. Anschließend wurde wieder, wie bereits oben beschrieben, gewaschen und die Bindung der Antikörper mit einer Chemiluminiszenzreaktion nachgewiesen. Dazu wurden die Lösungen des *SuperSignal Pico*-Kits (Pierce) oder des *ECL*-Kits (Amersham Pharmacia) verwendet. Die Lichtsignale wurden durch Exposition gegenüber einem Röntgenfilm für eine Sekunde bis zu 30 min detektiert.

#### 2.2.9.5 *Stripping und Reprobing*

Zum Nachweis einer gleichmäßigen Beladung der Membranen mit NFAT c2 Gesamtprotein wurden die Blotmembranen einer zweiten Antikörperfärbung unterzogen. Hierfür war zunächst die vollständige Entfernung der gebundenen Erst- und Zweitantikörper notwendig, was durch eine 40minütige Inkubation der Membran mit Stripping-Buffer bei 50 °C erreicht wurde. Daraufhin wurde die Membran mit PBS-T für eine Dauer von 5–

15 min, bei Raumtemperatur gewaschen, für eine Stunde in Blockpuffer inkubiert und anschließend mit dem gegen Gesamt-NFAT-c2 gerichteten Erstantikörper inkubiert.

#### 2.2.10 Statistik

Alle erfassten Daten wurden in eine Excel<sup>®</sup>-Tabelle (Microsoft) aufgenommen.

Sämtliche ermittelten Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung (SD) aufgeführt. Für die Analyse der Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Statistik wurde mit dem kommerziell erhältlichen Programm SPSS 12 für Windows durchgeführt. Aufgrund der kleinen Stichprobenzahl kann nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden, daher wurde anstelle des t-Testes der MWU-Test angewandt.

## 3 Ergebnisse

Um blutdruckunabhängige Geschlechtsunterschiede in der durch DOCA-Salz induzierten kardierenalen Hypertrophie darzustellen, wurden weibliche und männliche uninephrektomierte (Uni-Nx) DOCA+Salz+Hydralazin behandelte Mäuse mit ihren jeweiligen Uni-Nx+Salz-behandelten Kontrollgruppen nach sechs Wochen Versuchsdauer verglichen. Die jeweiligen Parameter werden als Säulendiagramme dargestellt, wobei die Werte männlicher Mäuse als schwarze Balken und die Werte weiblicher Mäuse als weiße Balken erscheinen.

### 3.1 Physiologische Effekte von Mineralortikoidexzess und Salzbelastung

#### 3.1.1 Diurese

In Abbildung 4 ist die Urinausscheidung in ml/24h von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

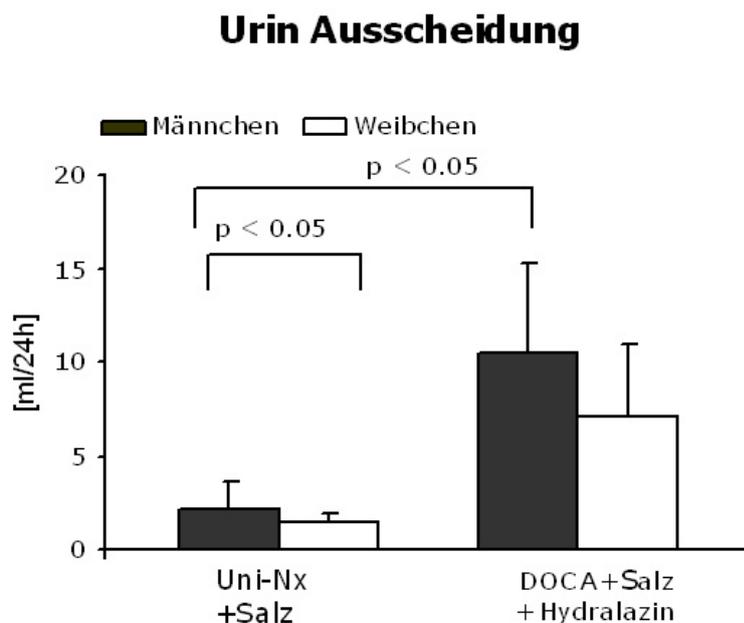


Abb. 4: Urinausscheidung in ml/24h bei Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Bei den Urinausscheidungen über 24 h der Uni-Nx+Salz Kontrollgruppen war ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Mäusen zu beobachten. Nach der DOCA+Salz+Hydralazin Behandlung zeigte sich ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Anstieg der Urin Ausscheidung bei beiden Geschlechtern, bei den Männchen von  $2,19 \pm 1,40$  ml/24h auf  $10,45 \pm 4,85$  ml/24h und den Weibchen von  $1,46 \pm 0,47$  ml/24h auf  $7,06 \pm 3,86$  ml/24h verglichen zu den jeweiligen Uni-Nx+Salz Kontrollgruppen. Die männlichen DOCA+Salz+Hydralazin Mäuse entwickelten eine größere Urinausscheidung nach 24 h als die Weibchen, doch es konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.

### 3.1.2 Kalium im Urin

In Abbildung 5 sind die Kaliumwerte im Urin von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

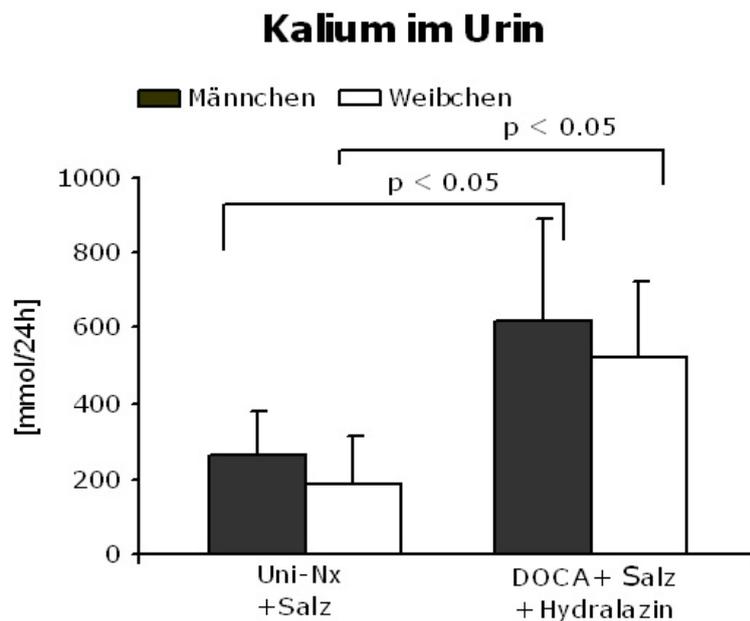


Abb. 5: Kalium-Exkretion in mmol/24h bei Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die im 24-Stunden-Urin gemessenen Kaliumwerte wiesen einen statistisch signifikanten ( $p < 0,05$ ) Anstieg bei beiden Geschlechtern auf. Bei den DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen stieg der Kalium Gehalt im 24h Urin von  $264,87 \pm 115,19$  auf

620,65 ± 273,89 mmol/ 24 h und den Weibchen von 186,06 ± 124,99 auf 526,21 ± 196,16 mmol/24 h, verglichen zu den Uni-Nx+Salz Kontrollen.

### 3.1.3 Kalium im Serum

In Abbildung 6 sind die Kaliumwerte im Serum in mmol/L von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

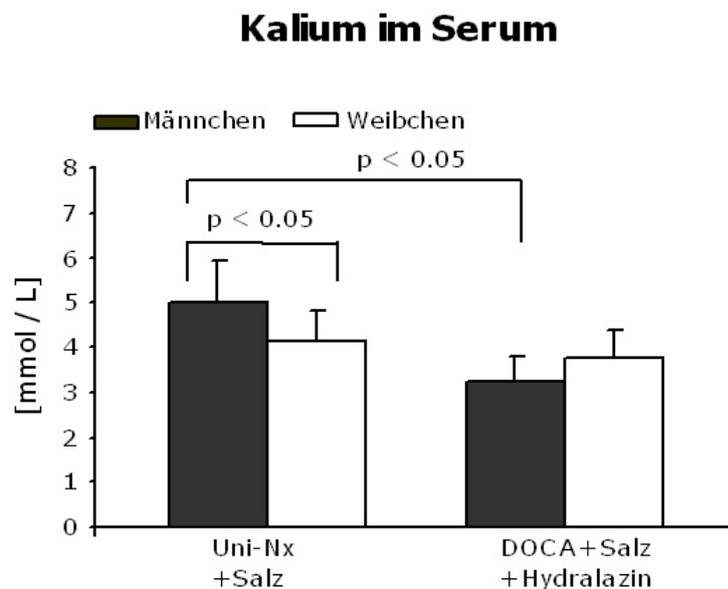


Abb. 6: Serum Kalium in Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte ± SD.

Die Serum-Kalium-Werte bei den Uni-Nx+Salz behandelten weiblichen Kontrollmäusen waren signifikant geringer als bei den Männchen. Bei den DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen war eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Abnahme der Kaliumwerte von  $5,01 \pm 0,91$  auf  $3,21 \pm 0,59$  mmol/L verglichen zu den Uni-Nx+Salz Kontrollen festzustellen. Die Weibchen wiesen bei einem Abfall von  $4,13 \pm 0,68$  auf  $3,78 \pm 0,60$  mmol/L verglichen zu den Uni-Nx+Salz Kontrollen keine statistische Signifikanz.

## 3.2 Hämodynamik

### 3.2.1 Blutdruck- und Herzfrequenzmessung mittels Millar-Katheter

Der durch invasive Blutdruckmessung mittels Millar-Katheter ermittelte MAD bei anästhesierten Uni-Nx+Salz Kontrollen, Uni-Nx+Salz+DOCA sowie DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen ist in Abbildung 7 dargestellt.

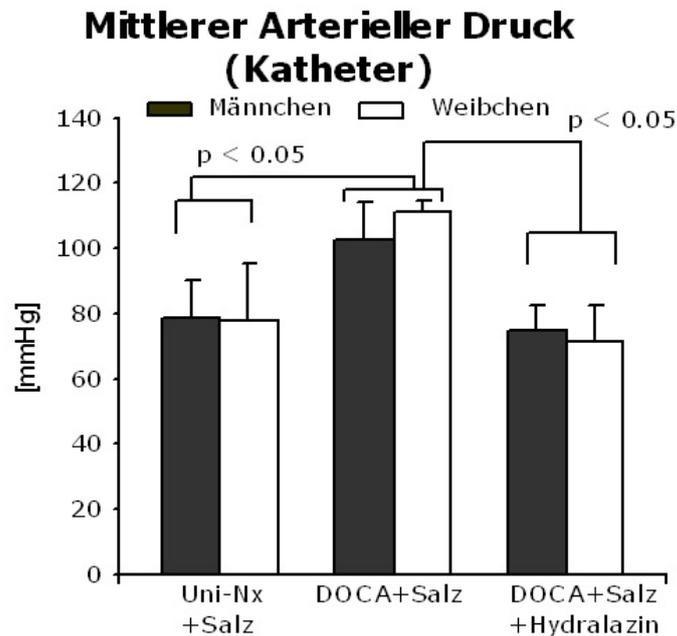


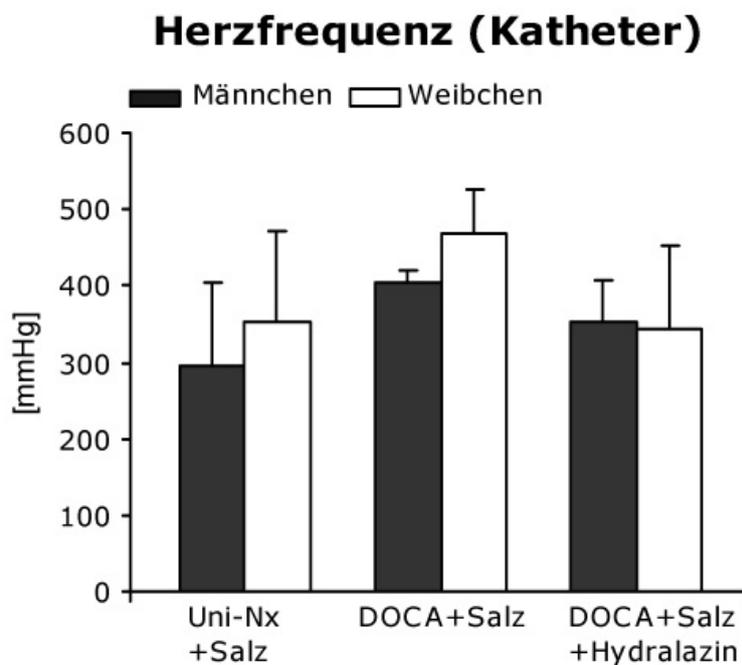
Abb. 7: Mittlerer arterieller Druck (MAD) gemessen mittels Millar Katheter in Uni-Nx+Salz, Uni-Nx+Salz + DOCA sowie DOCA+Salz+Hydralazin-behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Bei den Uni-Nx+Salz behandelten C57BL/6J Mäusen wurde ein MAD von  $78,99 \pm 11,26$  mmHg bei den Männchen und  $77,81 \pm 17,52$  mmHg bei den Weibchen nach sechs Wochen ohne geschlechtsspezifisch signifikante Unterschiede gemessen. Nach sechswöchiger Uni-Nx+Salz + DOCA Belastung wurde ein höherer Blutdruck mit  $102,84 \pm 10,99$  mmHg bei den Männchen und  $111,62 \pm 2,85$  mmHg bei den Weibchen verglichen zu den Uni-Nx+Salz behandelten Kontrollgruppen gemessen, der ebenfalls keine signifikanten Geschlechtsunterschiede aufwies. Bei den Uni-Nx+Salz + DOCA behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, denen das blutdrucksenkende Medikament Hydralazin (DOCA+Salz+Hydralazin) via Trinkflüssigkeit verabreicht wurde, konnte ein MAD bei den männlichen DOCA+Salz+Hydralazin Mäusen von  $74,34 \pm 8,26$  mmHg und

bei den weiblichen von  $71,17 \pm 6,02$  mmHg gemessen werden, der dem Blutdruck der Uni-Nx+Salz-behandelten Kontrollgruppe nahe kommt. Durch DOCA konnte der Blutdruck bei beiden Geschlechtern somit erfolgreich erhöht und mittels Hydralazin auf Normalwerte runterreguliert werden. Sowohl der Blutdruckanstieg als auch die Regulierung mittels Hydralazin verliefen geschlechtsunabhängig.

Die Herzfrequenzen in den jeweiligen Gruppen gemessen mit dem Millar-Katheter sind in Abbildung 8 dargestellt.



*Abb. 8: Herzfrequenz (BPM) gemessen mittels Millar-Katheter in Uni-Nx+Salz, Uni-Nx+Salz + DOCA sowie DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.*

*Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.*

Die ebenfalls mittels Millar-Katheter gemessene Herzfrequenz (BPM) war bei den Uni-Nx+Salz Weibchen mit  $352 \pm 118$  BPM etwas höher als bei den Männchen mit  $295 \pm 109$  BPM. Unter dem Einfluss von DOCA kam es bei beiden Geschlechtern zu einem Anstieg der Herzfrequenz. Die Herzfrequenz der DOCA+Salz behandelten Männchen wies mit einem Wert von  $402 \pm 16$  BPM einen verglichen zu den DOCA-Salz Weibchen, die einen Wert von  $469 \pm 58$  BPM aufwiesen einen geringeren Anstieg. Nach Hydralazin Gabe senkten sich die Werte bei den Männchen auf  $354 \pm 54$  BPM und den

Weibchen auf  $343 \pm 56$  BPM. Es wurden insgesamt keine statistisch Signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt.

### 3.2.2 Blutdruck- und Herzfrequenzmessung mittels Telemetrie

Die per Telemetrie erhaltenen 24-h-Mittelwerte des Blutdruckes sind in Abbildung 9 dargestellt.

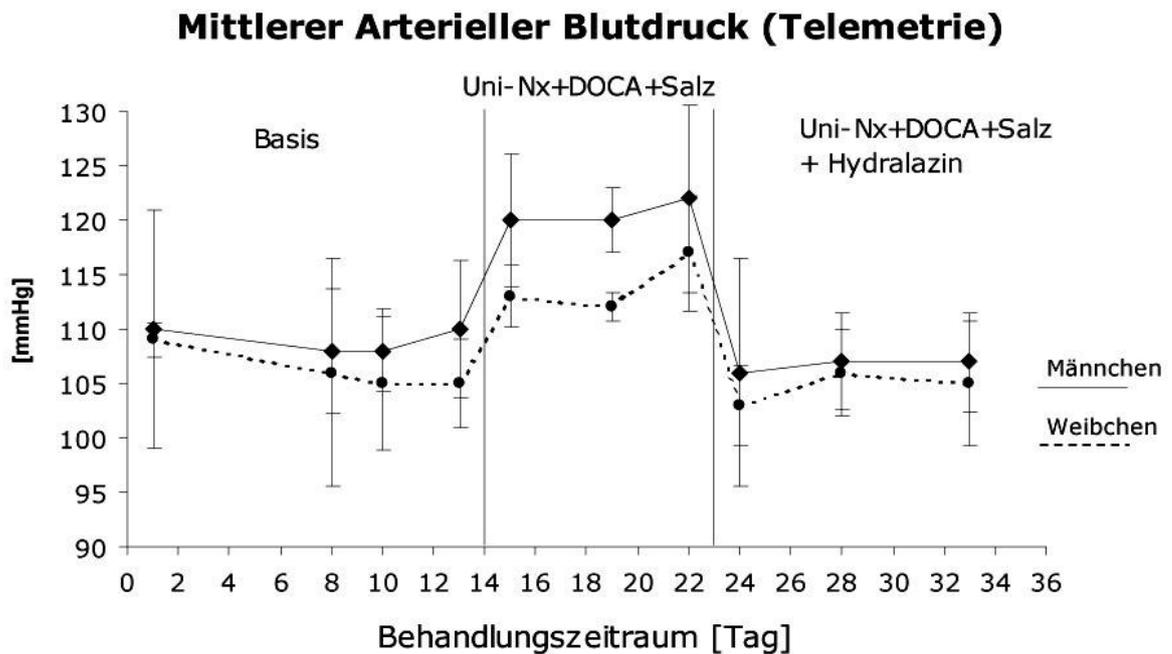


Abb. 9: Mittlerer arterieller Blutdruck (MABD) gemessen mittels Telemetrie in unbehandelten, Uni-Nx+Salz + DOCA sowie DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, während einer Versuchsdauer von 33 Tagen.

Insgesamt war der telemetrisch gemessene mittlere arterielle Blutdruck nach DOCA+Salz Behandlung bei wachen, freilaufenden Mäusen etwas höher, verglichen zu der Messung in anästhesierten Tieren (Kap. 3.2.1, Abb. 7). Alle Tiere entwickelten nach Uninephrektomie und Implantation der DOCA-Pellets unter Salzbelastung im Vergleich zur „Basis“ einen höheren mittleren arteriellen Blutdruck, wobei die Männchen zu höheren Werten tendierten. Nach der Zugabe von 250 mg/L Hydralazin in die Trinklösung wurde der Blutdruck bei beiden Geschlechtern gesenkt. Es konnte kein statistisch signifikanter Geschlechtsunterschied nach Blutdrucksenkung mit Hydralazin festgestellt werden.

In Abbildung 10 ist die telemetrisch gemessene Herzfrequenz in den jeweiligen Gruppen dargestellt.

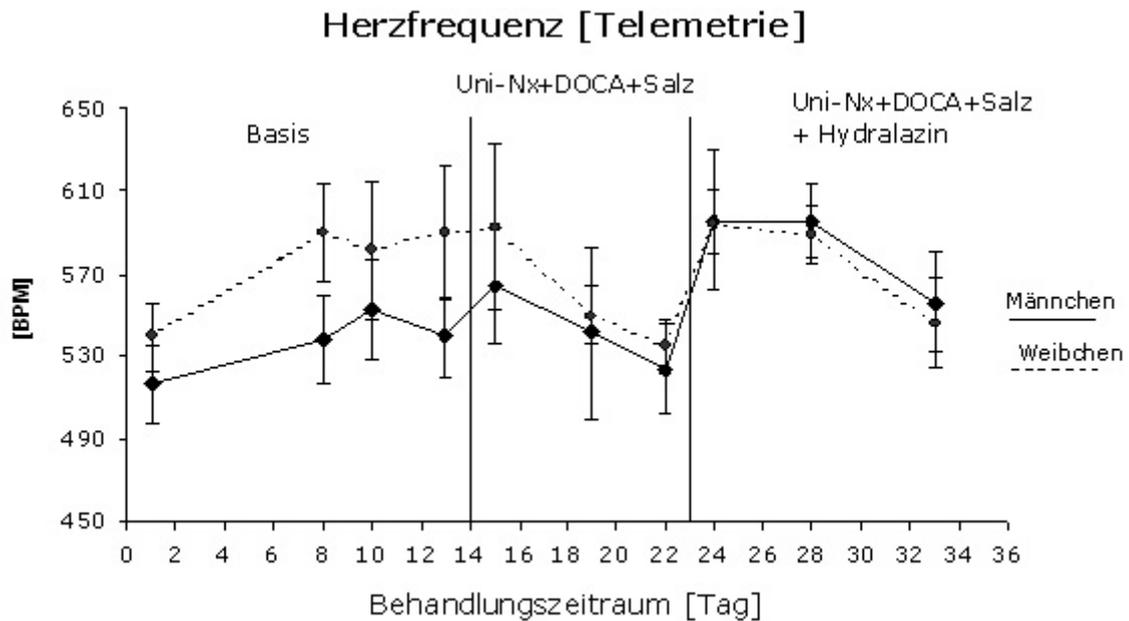


Abb. 10: Herzfrequenz gemessen mittels Telemetrie in unbehandelten, Uni-Nx+Salz + DOCA sowie DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, während einer Versuchsdauer von 33 Tagen.

Bereits am ersten Tag der telemetrischen Blutdruckmessung konnte bei den Weibchen eine höhere Herzfrequenz mit  $539 \pm 17,4$  BPM verglichen zu den Männchen mit  $516 \pm 18,7$  BPM gemessen werden. Nach weiteren sieben Tagen Adaptationszeit erreichte die Herzfrequenz der Weibchen Werte von  $590 \pm 24,3$  BPM verglichen zu den Männchen, die mit Werten von  $538 \pm 21,9$  BPM nur einen geringen Anstieg aufwiesen. Nach Uni-Nx+Salz+DOCA Behandlung kam es zu einer Verminderung der Herzfrequenz in beiden Geschlechtern auf  $535 \pm 13,9$  BPM bei den Weibchen und  $523 \pm 21,7$  BPM bei den Männchen. Nach 22 Tagen wurde mit der Blutdrucksenkung mittels Hydralazin begonnen. Es kam zu einem reflexartigen Anstieg der Herzfrequenz, bei den Weibchen auf  $589 \pm 13,7$  BPM und bei Männchen auf  $596 \pm 18,1$  BPM, was sich dann bis zum Tag 33 absenkte. Es konnte kein statistisch signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied nach Zugabe von Hydralazin festgestellt werden.

### 3.3 Myokardhypertrophie

#### 3.3.1 Echokardiographische Auswertung

In Abbildung 11 ist eine repräsentative Aufnahme eines 2D-Bildes einer parasternalen langen Achse des Herzens und das transthorakale M-Mode-Bild eines männlichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieres dargestellt.

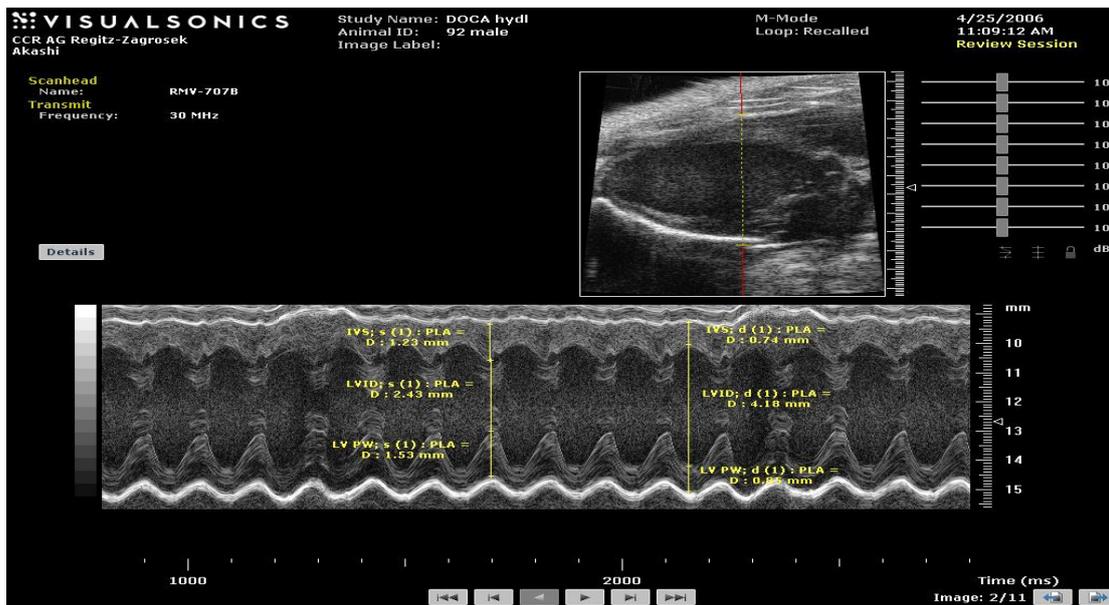


Abb. 11 Repräsentativer echokardiographischer M-Mode eines männlichen Herzens.

*IVSd* bezeichnet die interventrikuläre enddiastolische Septumdicke, *LVIDd* den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser, *LVPWd* die linksventrikuläre enddiastolische Hinterwandstärke, *IVSs* die interventrikuläre endsystolische Septumdicke, *LVIDs* den linksventrikulären endsystolischen Durchmesser, *LVPWs* die linksventrikuläre endsystolische Hinterwandstärke.

In Tabelle 2 sind die transthorakal gemessenen M-Mode-Werte des linken Ventrikels von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

Tab. 2: Echokardiographische M-Mode-Messungen vom linken Ventrikel in Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin-behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchsablaufes nach 6 Wochen.

Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. \*  $P \leq 0,05$ , †  $\leq 0,01$  versus Uni-Nx +Salz des gleichen Geschlechts.

	männliche Uni-Nx + Salz	männliche DOCA + Salz + Hydralazin	weibliche Uni-Nx + Salz	weibliche DOCA + Salz + Hydralazin
IVSs (mm)	0.96 $\pm$ 0.13	1.41 $\pm$ 0.27 *	1.05 $\pm$ 0.08	1.25 $\pm$ 0.24
IVSd (mm)	0.74 $\pm$ 0.09	0.85 $\pm$ 0.10 *	0.79 $\pm$ 0.05	0.80 $\pm$ 0.12
LVIDs (mm)	3.70 $\pm$ 0.20	2.62 $\pm$ 0.54 *	3.39 $\pm$ 0.18	2.65 $\pm$ 0.35 *
LVIDd (mm)	4.38 $\pm$ 0.18	4.22 $\pm$ 0.34	4.12 $\pm$ 0.12	4.15 $\pm$ 0.25
LVPWs (mm)	0.79 $\pm$ 0.10	1.29 $\pm$ 0.22†	0.92 $\pm$ 0.07	1.22 $\pm$ 0.26 *
LVPWd (mm)	0.67 $\pm$ 0.08	0.83 $\pm$ 0.07 *	0.72 $\pm$ 0.04	0.80 $\pm$ 0.14

Die Auswertung der M-Mode-Bilder aller Tiere ergab eine signifikante Vergrößerung des interventrikulären Septums und der linksventrikulären Hinterwand sowohl in der Systole als auch in der Diastole bei DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen. Die männlichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Mäuse entwickelten somit trotz der erfolgreichen Senkung des Blutdrucks eine stärker ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie als die weiblichen Mäuse.

### 3.3.2 Herzgewicht /Körpergewicht-Ratio

In Abbildung 12 ist der kardiale Hypertrophieindex (HG/KG) von Uni-Nx+Salz Kontrollen und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

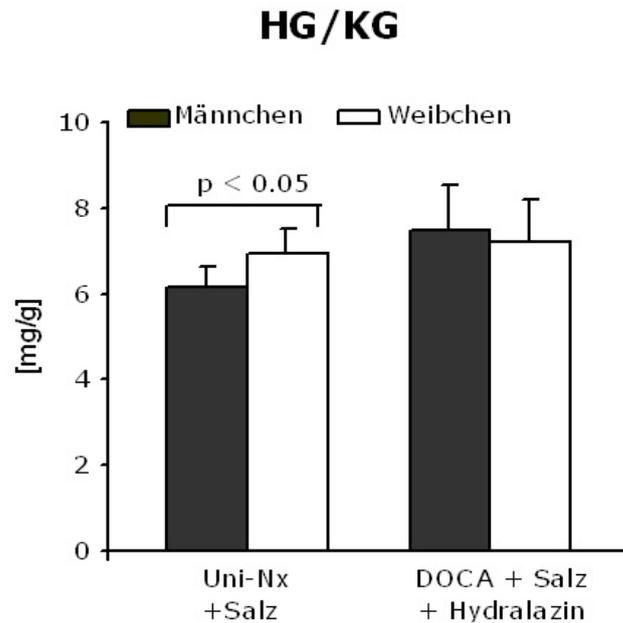


Abb. 12 Ratio von Herzgewicht und Körpergewicht (HG/KG) von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die HG/KG-Ratios waren bei den Uni-Nx+Salz Kontroll Weibchen bereits signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als bei den Männchen. Nach der DOCA+Salz+Hydralazin Behandlung zeigten die männlichen Mäuse einen statistisch nicht signifikanten Anstieg des HG/KG-Ratios von  $6,13 \pm 0,47$  auf  $7,46 \pm 1,06$  verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen. Die weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tiere wiesen einen leichten ebenfalls statistisch nicht signifikanten Anstieg von  $6,95 \pm 0,56$  auf  $7,21 \pm 1,0$  verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen.

### 3.3.3 Kardiomyozytenquerschnittsfläche

Die echokardiografisch gezeigte Myokardhypertrophie liess sich auch auf Ebene der einzelnen Zellen am histologischen Präparat nachweisen.

In Abbildung 13 sind die Kardiomyozytenquerschnittsflächen von 50 Myozyten in je 10 zufällig ausgewählten Bildabschnitten in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Mäusen dargestellt.

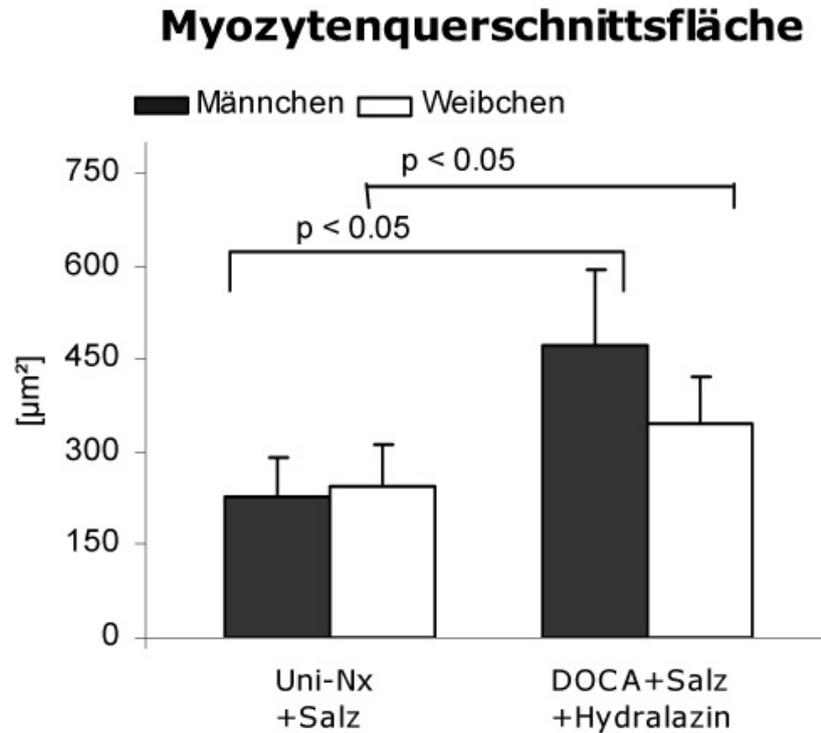


Abb. 13 Kardiomyozytenquerschnittsflächen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin-behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Pro Gruppe wurde die Querschnittsfläche von je 50 zufällig ausgewählten Zellen gemessen. Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die Zellen sowohl der DOCA+Salz+Hydralazin Männchen als auch der Weibchen waren verglichen zu den Uni-Nx+Salz Kontrollen vergrößert. Die Kardiomyozyten der DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen zeigten eine Vergrößerung verglichen zu den Uni-Nx+Salz Kontrollen von  $228,79 \pm 61 \mu\text{m}^2$  auf  $470,9 \pm 123 \mu\text{m}^2$  und die Weibchen von  $245,3 \pm 68 \mu\text{m}^2$  auf  $343,5 \pm 79 \mu\text{m}^2$ . Die Kardiomyozytenquerschnittsfläche war bei beiden Geschlechtern nach Hydralazin Behandlung statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) vergrößert, wobei die Männchen zu größeren Werten tendierten.

### 3.3.4 Fetales Genprogramm ANP/BNP

#### 3.3.4.1 Genexpression ANP

In Abbildung 14 ist die mRNA-Expression von ANP in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Mäusen dargestellt.

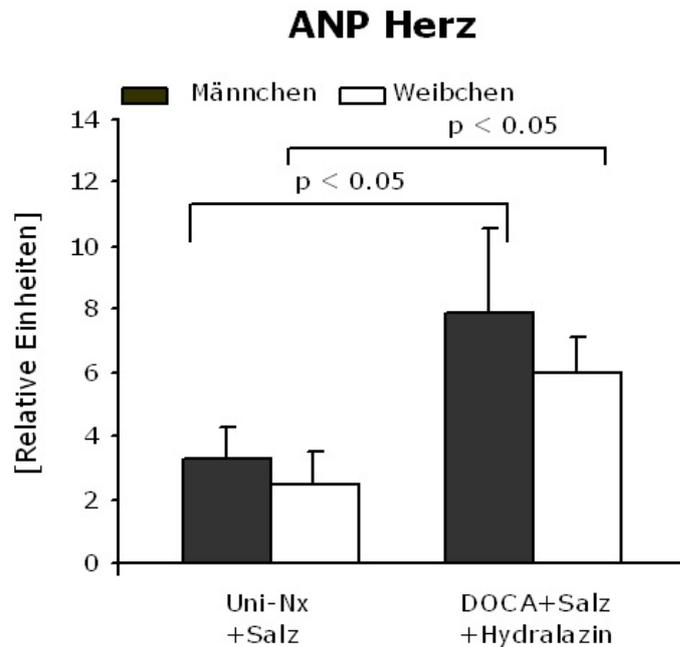


Abb. 14 ANP mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz-Kontrollen und DOCA+Salz+Hydralazin-behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die Expression von ANP war nach sechs Wochen DOCA+Salz+Hydralazin Behandlung bei beiden Geschlechtern signifikant ( $p < 0,05$ ) gestiegen. Die männlichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Mäuse tendierten zu einem stärkeren Anstieg von  $3,3 \pm 1,0$  auf  $7,9 \pm 2,7$  relative Einheiten verglichen zu den Uni-Nx+Salz Kontrollen und verglichen zu den DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Weibchen, die einen Anstieg von  $2,5 \pm 1,0$  auf  $6,0 \pm 1,0$  relative Einheiten aufwiesen.

#### 3.3.4.2 Genexpression BNP

In Abbildung 15 ist die mRNA-Expression von BNP von Uni-Nx+Salz Kontrollen und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

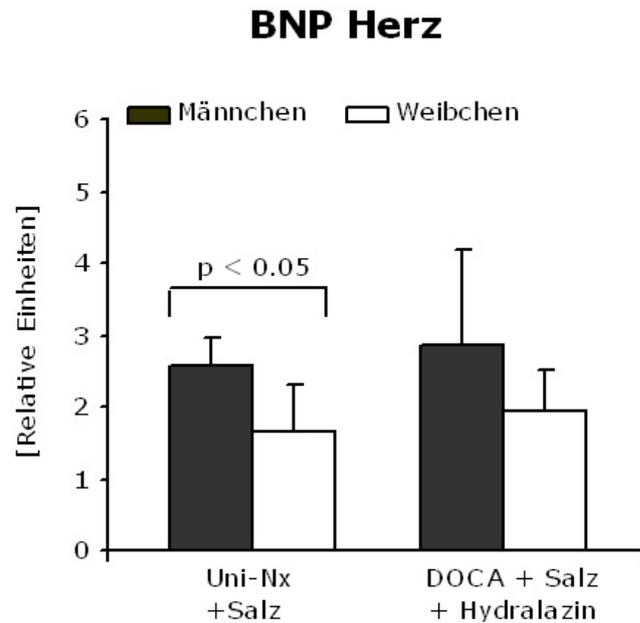


Abb. 15 BNP mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazinbehandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die Expression von BNP war bereits bei den Uni-Nx+Salz behandelten Mäusen geschlechtsspezifisch unterschiedlich. Die männlichen Uni-Nx+Salz Mäuse wiesen signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Werte verglichen zu den Weibchen auf. Insgesamt war ein leichter Anstieg sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren festzustellen. Bei den Männchen war ein Anstieg von  $2,58 \pm 0,38$  auf  $2,87 \pm 1,32$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen festzustellen. Die weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Mäuse zeigten einen Anstieg von  $1,64 \pm 0,66$  auf  $1,93 \pm 0,59$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen. Der Anstieg der BNP-Genexpression in Herzen sowohl männlicher als auch weiblicher DOCA+Salz+Hydralazin behandelter Mäuse erreichte keine statistische Signifikanz.

### 3.4 Gen- und Proteinexpression von Calcineurin

#### 3.4.1 Genexpression von Calcineurin A $\beta$

In Abbildung 16 ist die mRNA-Expression von Calcineurin A- $\beta$  in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

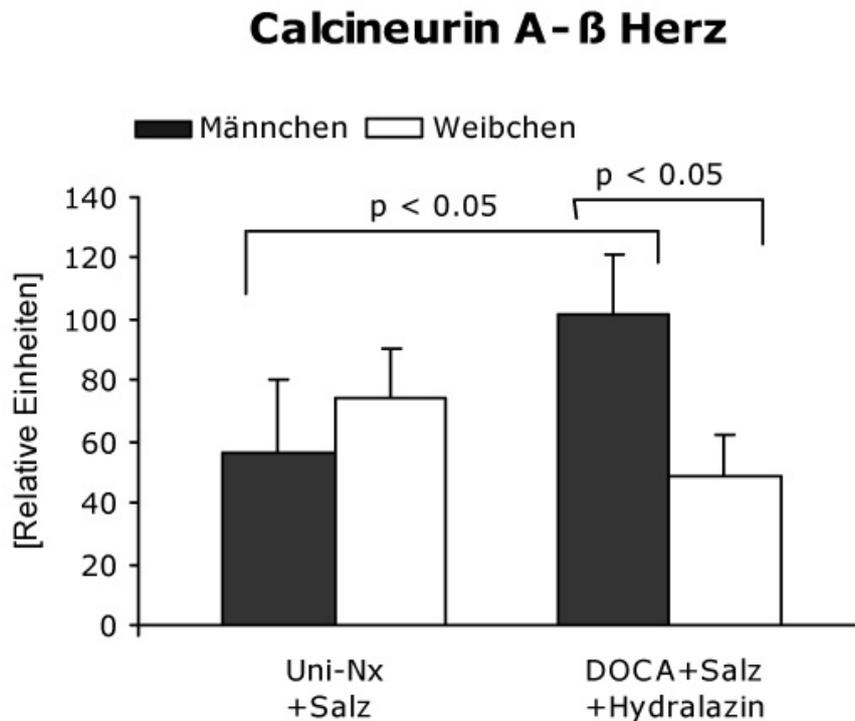


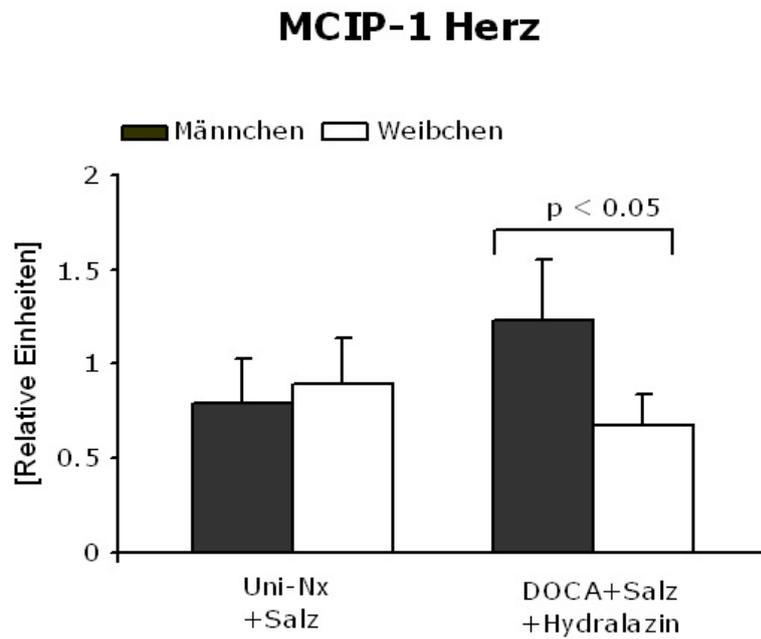
Abb. 16 Calcineurin A- $\beta$  mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die Calcineurin-Genexpression zwischen den Uni-Nx+Salz behandelten männlichen und weiblichen Mäusen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei den männlichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Mäusen wurde ein signifikanter Anstieg der mRNA-Genexpression von  $56,8 \pm 23,8$  auf  $101,5 \pm 19,7$  relative Einheiten verglichen zu ihren jeweiligen Uni-Nx+Salz Kontrollen beobachtet werden. Die DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Weibchen wiesen dagegen eine Herabregulierung von Calcineurin A- $\beta$  von  $74,2 \pm 16,3$  auf  $48,3 \pm 13,8$  relative Einheiten auf, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.

### 3.4.2 Genexpression von MCIP1

In Abbildung 17 ist die mRNA-Expression von Modulatory Calcineurin Inhibitor Protein 1 in den Herzen von Uni-Nx+Salz- und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.



*Abb. 17 Modulatory Calcineurin Interacting Protein 1 (MCIP1) mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.*

*Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.*

Die Genexpression von MCIP1 wies bei den Uni-Nx+Salz behandelten männlichen und weiblichen Mäusen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf. Die Expression von MCIP1 im Herzgewebe von DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen wies einen Anstieg von  $0,79 \pm 0,22$  auf  $1,16 \pm 0,35$  relative Einheiten, wohingegen die Weibchen eine Reduktion von  $0,89 \pm 0,25$  auf  $0,67 \pm 0,17$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen aufwiesen. Sowohl der Anstieg bei den männlichen Tieren als auch die Reduktion bei den weiblichen erreichte keine Signifikanz. Der geschlechtsspezifische Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Mäusen erschien dennoch statistisch signifikant  $p < 0,05$  zu sein. Der Anstieg von MCIP1 bei den männlichen Tieren korrelierte sowohl mit dem Anstieg der Calcineurin-Genexpression (Kap. 3.4.1, Abb. 16) als auch mit der Calcineurin-Gewebeaktivität (Kap. 3.4.3, Abb. 18).

### 3.4.3 Phosphorylierungsgrad von NFATc2

Western-Blot-Analysen mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen pNFATc2 sind in Abbildung 18 dargestellt.

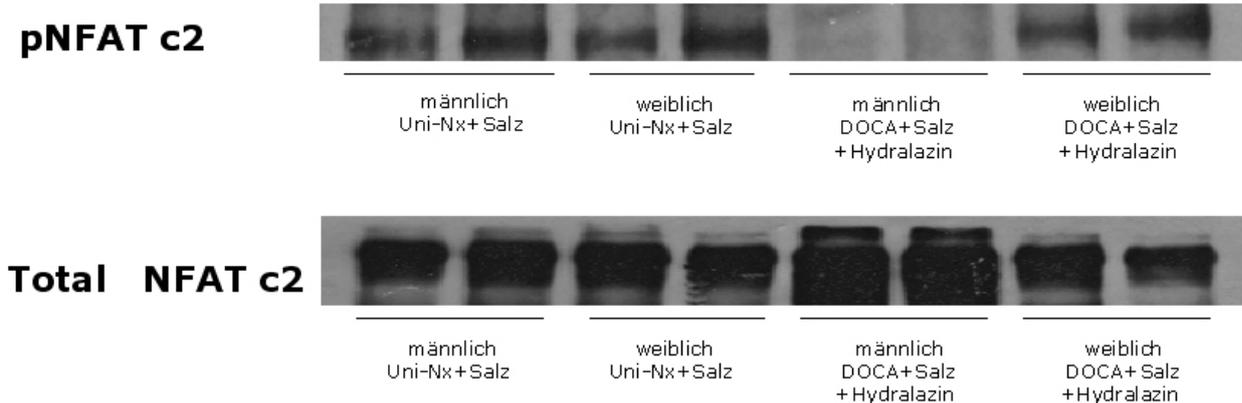


Abb. 18: Repräsentative Western-Blots von pNFATc2 und total NFATc2 aus Mäuseherzlysaten von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

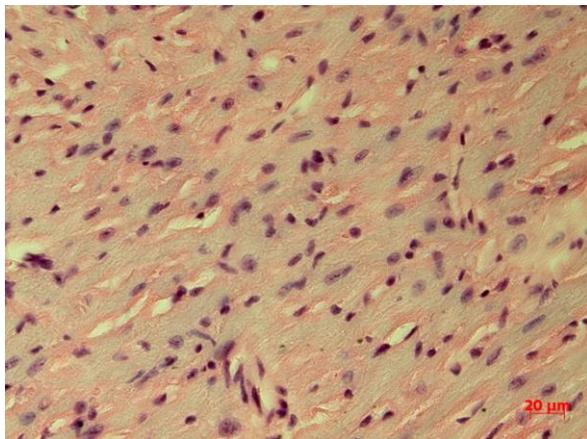
Bei dem Vergleich der Total NFATc2 und dem pNFATc2 ist eine deutliche Reduzierung der dunklen Balken bei den männlichen DOCA+Salz+Hydralazin Mäusen festzustellen. Der verminderte Phosphorylierungsgrad von NFATc2 in Herzen männlicher DOCA+Salz+Hydralazin behandelter Mäuse bei gleicher Gesamtmenge an NFATc2 in

allen Gruppen weist auf eine erhöhte Gewebeaktivität der Phosphatase Calcineurin A $\beta$  in männlichen Mäusen mit Mineralcortikoid-induzierter Myokardhypertrophie hin. Dies spiegelt den Nettoeffekt der erhöhten mRNA-Expression sowohl von Calcineurin A $\beta$  als auch von dessen Modulator MCIP1 wider.

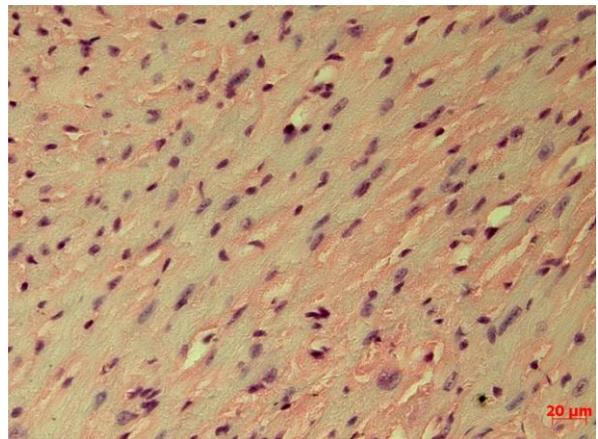
### 3.5 Myokardiales Remodeling

#### 3.5.1 Histologie

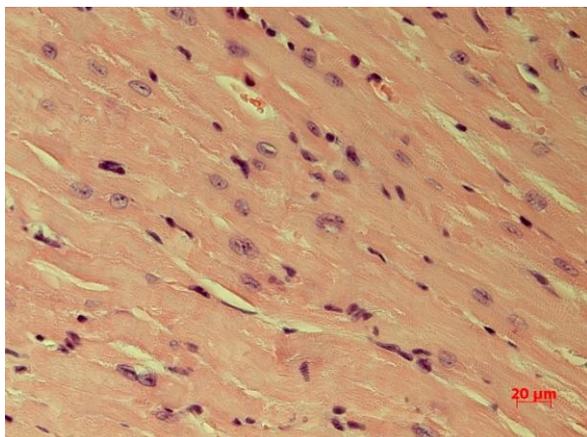
In Abbildung 19 sind exemplarisch H&E gefärbte Gewebeschnitte von Uni-Nx+Salz- und DOCA+Salz-Mäusen am Ende des Versuchs dargestellt.



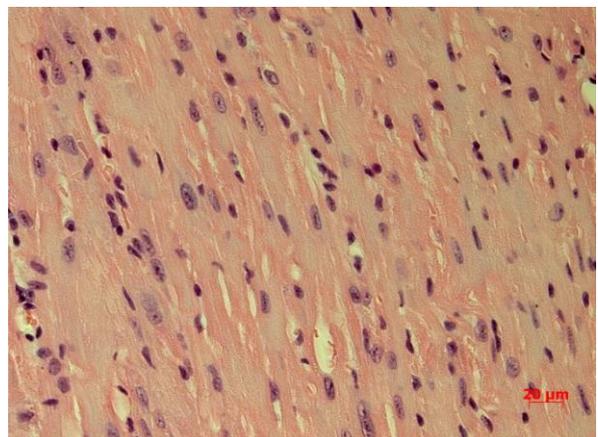
A



B



C



D

Abb. 19: H&E-Färbung von Herzgewebe.

(A) Uni-Nx+Salz Kontroll-Männchen; (B) Uni-Nx+Salz Kontroll-Weibchen; (C) DOCA+Salz+Hydralazin behandelte Männchen; (D) DOCA+Salz+Hydralazin behandelte Weibchen am Ende des Versuches nach sechs Wochen.

Im H&E-gefärbten Gewebe zeigten sich sowohl bei DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen als auch bei den Weibchen verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen deutlich hypertrophierte Kardiomyozyten. Die quantitative morphometrische Auswertung bestätigte die Zunahme der Kardiomyozytenquerschnittsfläche, die bei den Männchen ein größeres Maß erreichte (Kap. 3.3.3, Abb. 13).

### 3.5.2 Proliferation-Ki67 Herz

In Abbildung 20 sind repräsentative Ki67-gefärbte Herzschnitte von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen am Ende des Versuchs dargestellt.

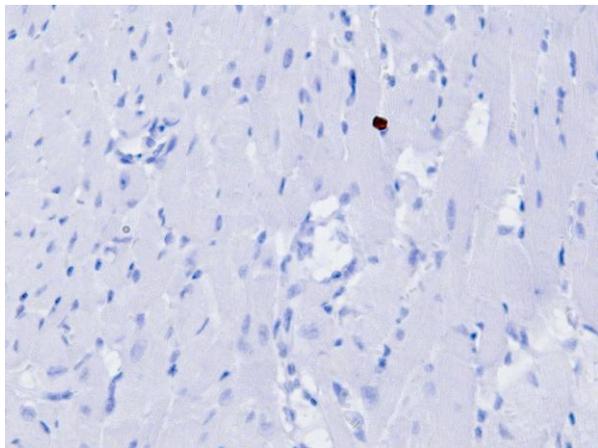
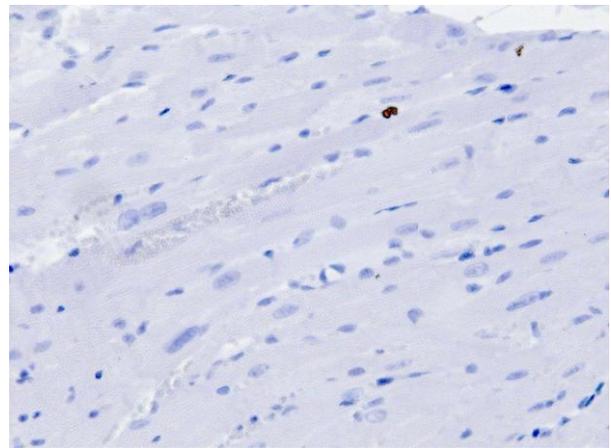
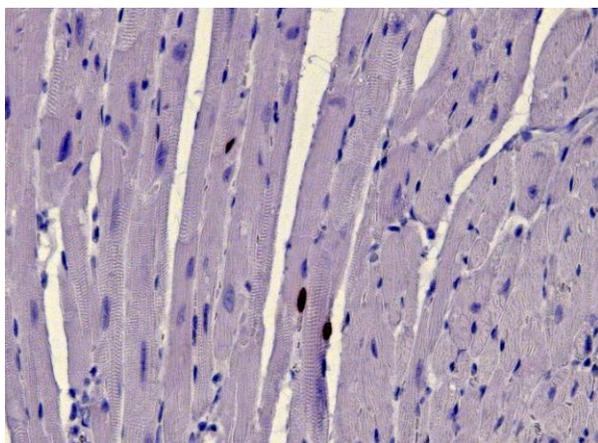
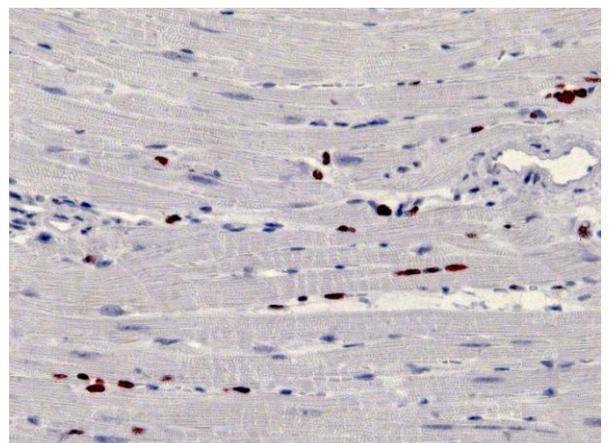
**A****B****D****E**

Abb. 20: Ki67-Färbung vom linken Ventrikel

(A) Uni-Nx+Salz Kontroll Männchen; (B) Uni-Nx+Salz Kontroll Weibchen; (C) DOCA+Salz+Hydralazin behandelte Männchen; (D) DOCA+Salz+Hydralazin behandelte Weibchen am Ende des Versuches nach sechs Wochen.

In Abbildung 21 ist die quantitative Auswertung der Ki67-positiven Zellen von je 10 zufällig ausgewählten Bildabschnitten im Herzgewebe von männlichen und weiblichen Uni-Nx+Salz Kontrollen und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren dargestellt.

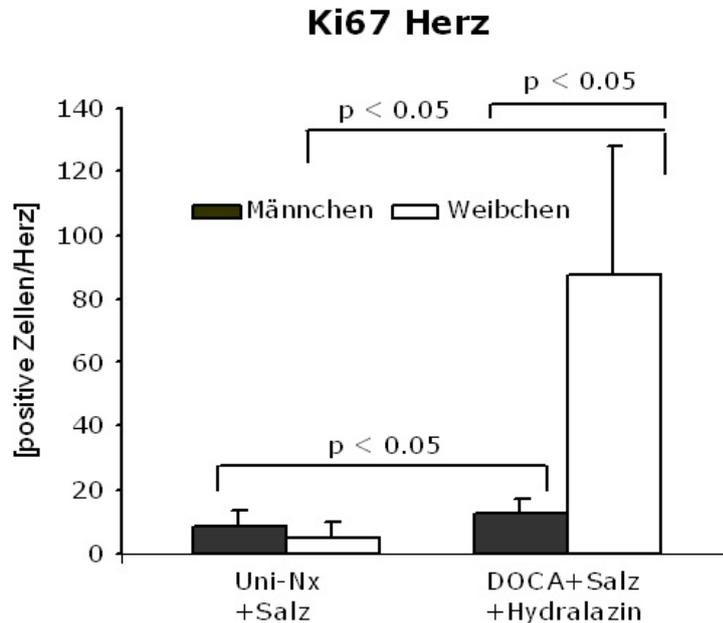


Abb. 21 Ki67 positive Zellen in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die immunhistochemische Auswertung ergab, wie schon in den Abbildungen 20 A–D zu sehen ist, dass sowohl männliche als auch weibliche DOCA+Salz+Hydralazin behandelte Mäuse eine deutlichere Zunahme von Ki67 Zellen aufwiesen. In den Herzen der DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen zeigte sich eine statistisch nicht signifikante Zunahme von  $8,5 \pm 4,8$  auf  $12,7 \pm 4,3$  von positiven Zellen verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen. Bei den weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren war ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Anstieg von  $5,1 \pm 4,9$  auf  $90,9 \pm 44,1$  positive Zellen verglichen zu ihren Kontrollen festzustellen.

### 3.5.3 Inflammatorische Antwort im Herzen

In Abbildung 22 ist die mRNA-Genexpression von MCP-1 im Herzgewebe von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

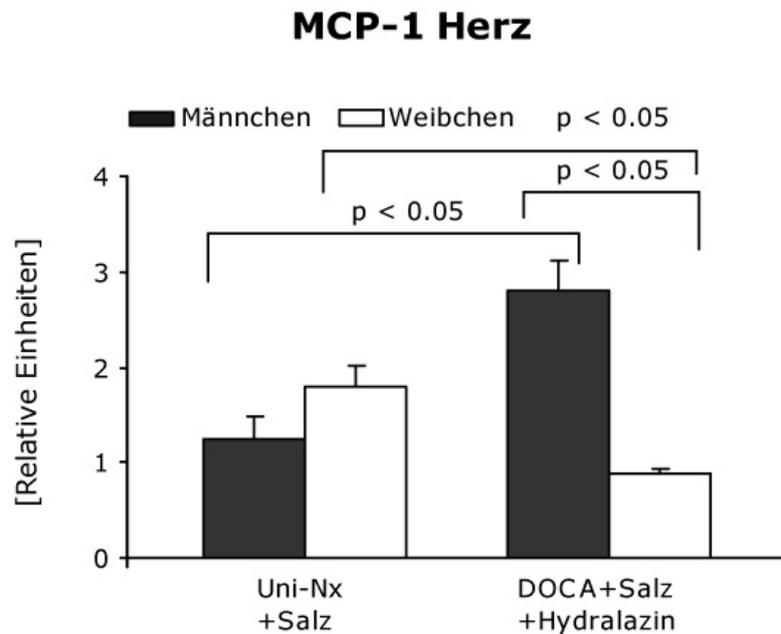


Abb. 22 MCP1 mRNA-Genexpression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen. Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

In den Herzgeweben DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen Tieren konnte ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von MCP-1 von  $1,25 \pm 0,61$  auf  $2,80 \pm 1,34$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen gemessen werden. Die weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin Mäuse zeigten dagegen eine signifikante Abnahme der MCP-1 mRNA-Expression von  $1,70 \pm 0,88$  auf  $0,90 \pm 0,47$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen.

### 3.5.4 Myokardiale Fibrose

#### 3.5.4.1 Genexpression von TGF- $\beta$ Herz

In Abbildung 23 ist die TGF $\beta$ -mRNA-Expression in Herzgeweben von männlichen und weiblichen Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren dargestellt.

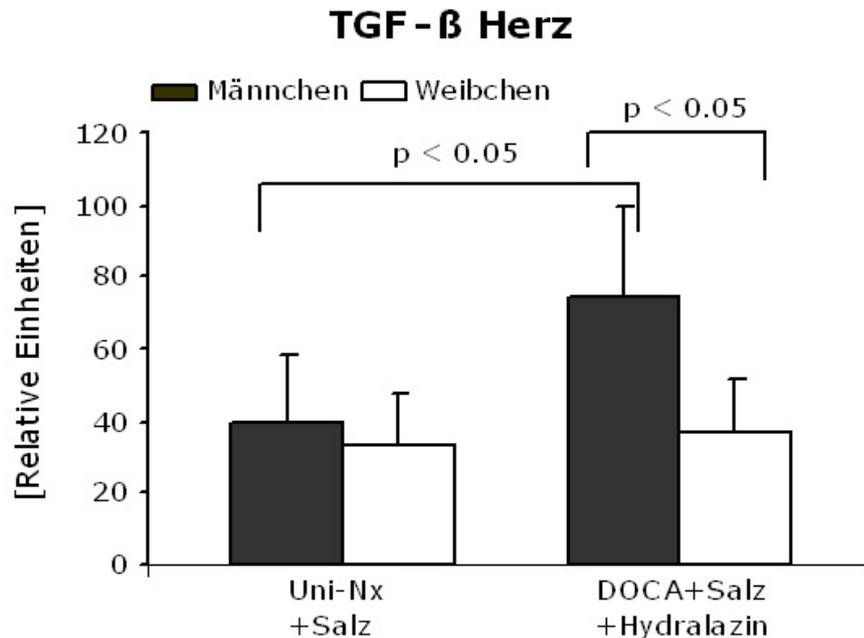


Abb. 23 TGF $\beta$  mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen. Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die mRNA-Genexpression von TGF- $\beta$  in den Herzen von DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen wies einen signifikanten Anstieg von  $40,11 \pm 18,60$  auf  $74,46 \pm 25,28$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen. Bei den weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren war nur ein geringer Anstieg von  $33,50 \pm 13,97$  auf  $36,70 \pm 14,79$  relative Einheiten, der keine statistische Signifikanz erreichte. Nach der Hydralazin Behandlung waren signifikante ( $p < 0,05$ ) Unterschiede in der TGF- $\beta$  Genexpression zwischen den Geschlechtern festzustellen.

#### 3.5.4.2 Genexpression von Kollagen I Herz

In Abbildung 24 ist die mRNA-Expression von Kollagen I in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

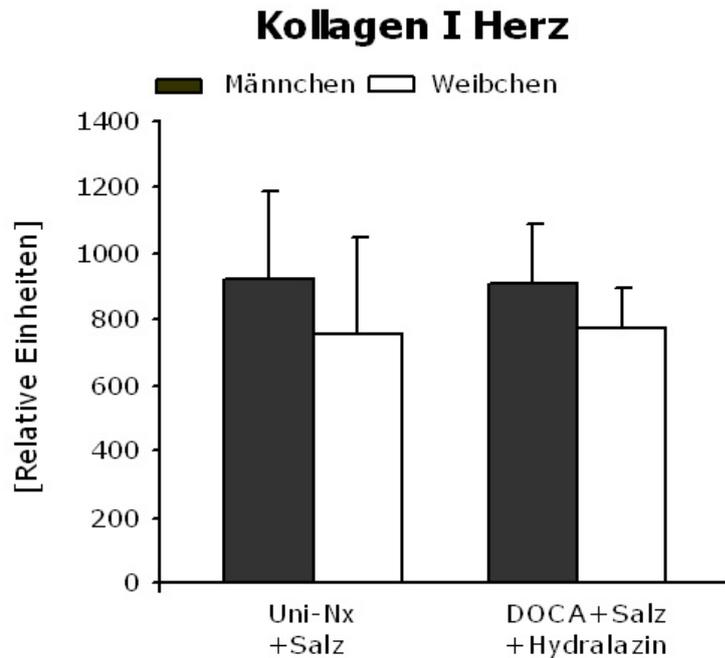


Abb. 24 Kollagen I mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die mRNA-Expression von Kollagen I in den Herzgeweben von DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen wies eine leichte statistisch nicht signifikante Abnahme bei Werten von  $920,25 \pm 266,40$  auf  $909,85 \pm 183,33$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen auf. Die weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tiere wiesen eine leichte nicht signifikante Steigung mit Werten von  $751,95 \pm 295,77$  auf  $772,92 \pm 123,06$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen auf.

#### 3.5.4.3 Genexpression von Kollagen III Herz

In Abbildung 25 ist die mRNA-Expression von Kollagen III von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

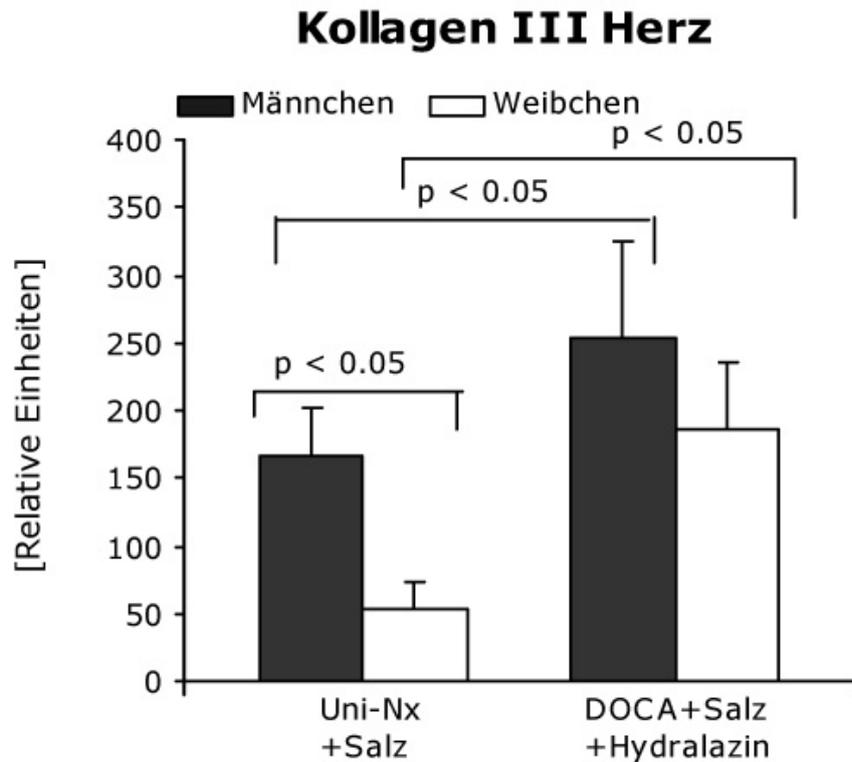


Abb. 25 Kollagen III mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die mRNA-Expression von Kollagen III in den Herzgeweben von den Uni-Nx+Salz Kontrollen war bereits eine signifikant hohe Expression bei den Männchen festzustellen. Nach der DOCA+Salz+Hydralazin Behandlung wiesen die Männchen einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Anstieg von  $167,32 \pm 33,85$  auf  $253,45 \pm 71,65$  relative Einheiten verglichen zu den jeweiligen Uni-Nx+Salz Kontrollen auf. Auch bei den weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren war ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Anstieg von  $53,50 \pm 19,10$  auf  $186,87 \pm 48,25$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen zu verzeichnen.

## 3.6 Renale Hypertrophie

### 3.6.1 Nierengewicht/Körpergewicht-Ratio

In Abbildung 26 ist die Nierengewicht/Körpergewicht-Ratio (NG/KG) von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

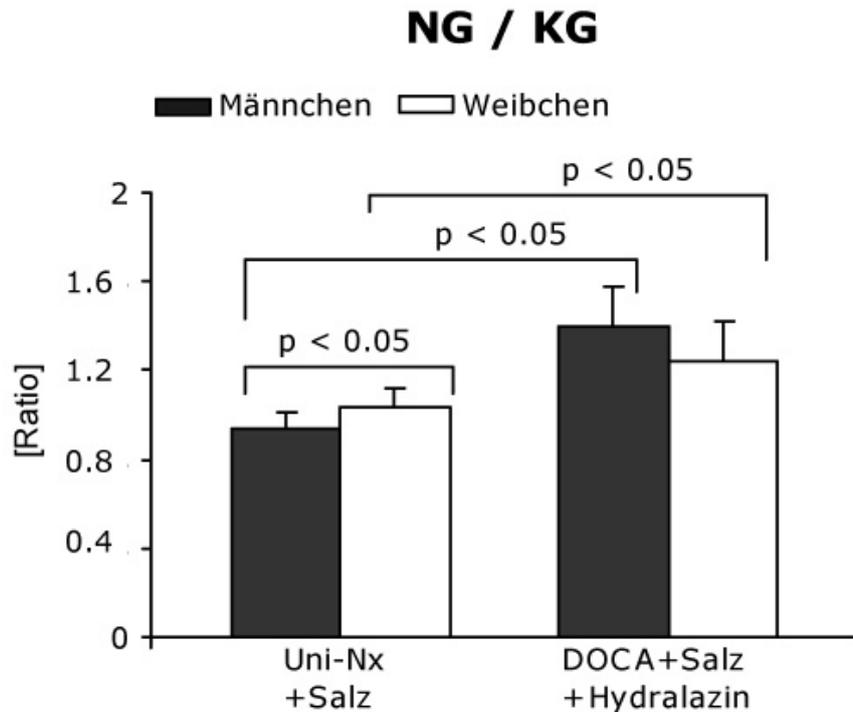


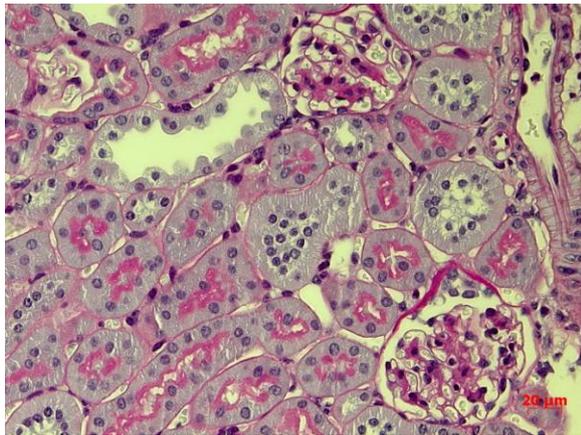
Abb. 26 Ratio von Nieren- und Körpergewicht (NG/KG) von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchsablaufes nach 6 Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

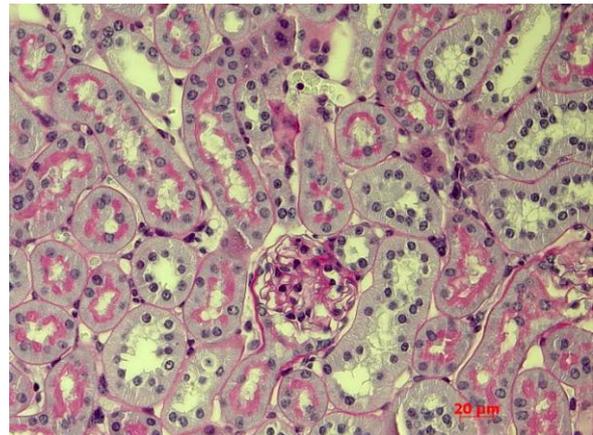
Die NG/KG-Ratio wies bei den Uni-Nx+Salz Kontrollen signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Werte bei den Weibchen verglichen zu den Männchen auf. Sowohl DOCA+Salz+Hydralazin behandelte Männchen als auch Weibchen zeigten einen signifikanten Anstieg der NG/KG Ratio verglichen zu den Uni-Nx+Salz Kontrolltieren. Bei den DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen stieg die Ratio von  $0,94 \pm 0,07$  auf  $1,39 \pm 0,18$  und den Weibchen von  $1,04 \pm 0,08$  auf  $1,24 \pm 0,18$ . Der Anstieg sowohl der Männchen als auch der Weibchen erreichte eine statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ).

### 3.6.2 Nierengewebsanalyse

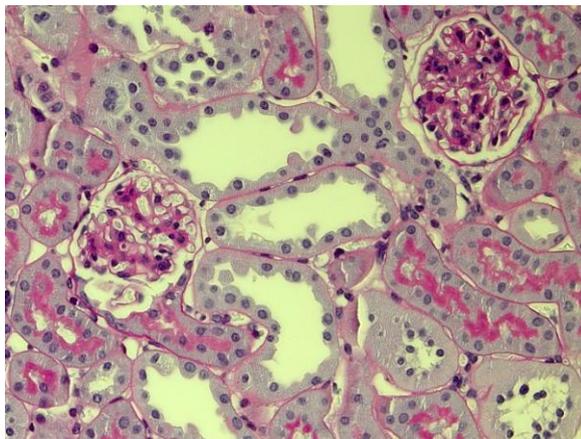
In den Abbildungen 27 A–D sind PAS-Färbungen der Niere von männlichen (A) und weiblichen (B) Uni-Nx+Salz Kontrollen verglichen zu den korrespondierenden DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen (C) und Weibchen (D) dargestellt.



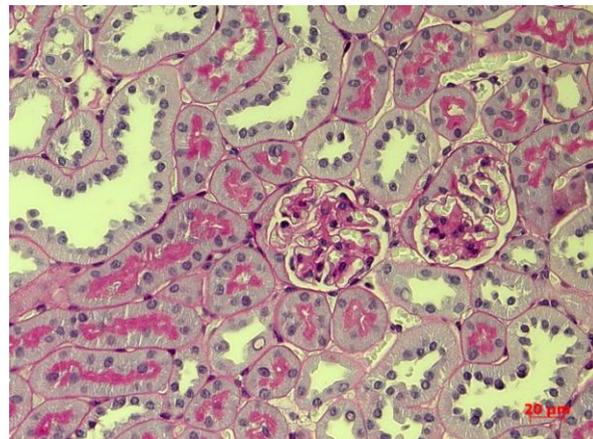
A



B



C



D

Abb. 27: PAS-Färbung von Nierengewebe. (A) Uni-Nx+Salz Kontroll-Männchen; (B) Uni-Nx+Salz Kontroll-Weibchen; (C) DOCA+Salz+Hydralazin-Männchen; (D) DOCA+Salz+Hydralazin-Weibchen am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Bereits lichtmikroskopisch waren bei den DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren im Vergleich zu ihren Kontrollen trotz Blutdrucksenkung erweiterte distale Tubuli und ein zell- und matrixreiches Interstitium erkennen.

### 3.6.3 Tubulusatrophie

In Abbildung 28 ist die Vergrößerung der Tubulusdurchmesser von 50 Tubuli in je 10 zufällig ausgewählten Bildabschnitten eines Querschnitts der Niere von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

## Distale Tubuli Durchmesser

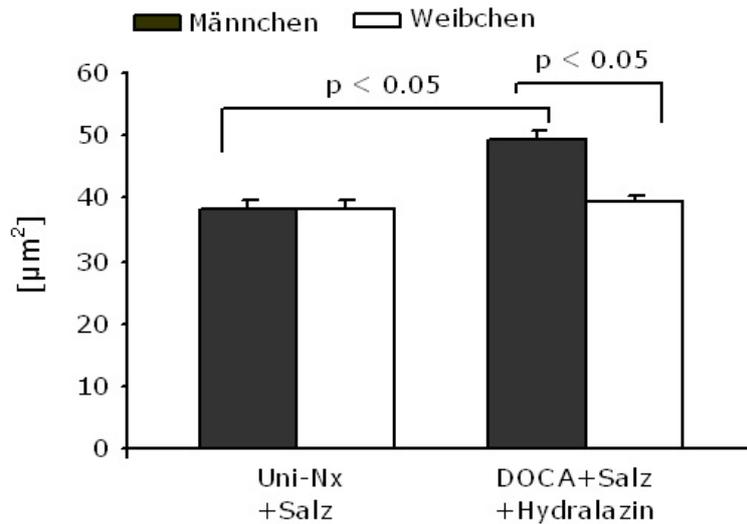


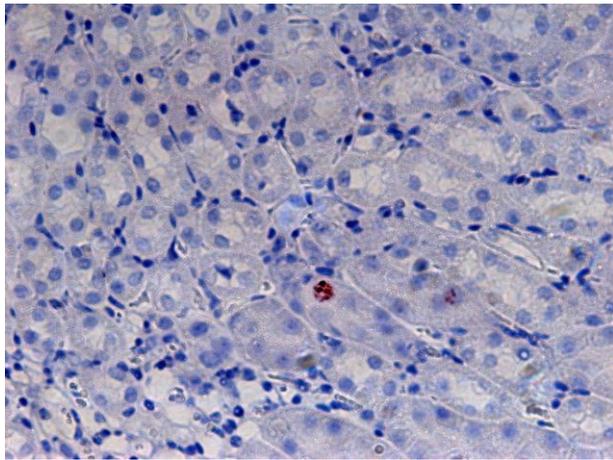
Abb. 28 Tubulus Durchmesser von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

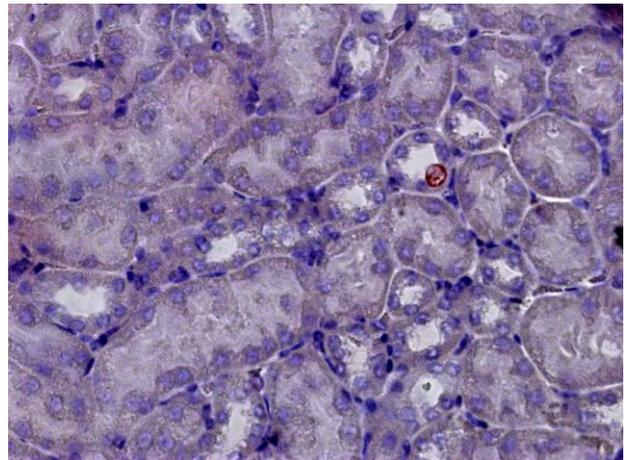
Bei den distalen Tubuli der männlichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tiere wurde eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Vergrößerung der Durchmesser von  $38,25 \pm 1,65 \mu\text{m}$  auf  $49,50 \pm 1,42 \mu\text{m}$  verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen beobachtet. Bei den weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin Mäusen wurde, bei einer Zunahme der Durchmesser von  $38,28 \pm 1,54 \mu\text{m}$  auf  $39,48 \pm 1,16 \mu\text{m}$  kein signifikanter Unterschied verglichen zu ihren Kontrollen festgestellt. Insgesamt waren die Tubuli nach der Hydralazin Behandlung bei den männlichen Tieren signifikant ( $p < 0,05$ ) größer als die der Weibchen.

### 3.8.4 Proliferation-Ki67 Niere

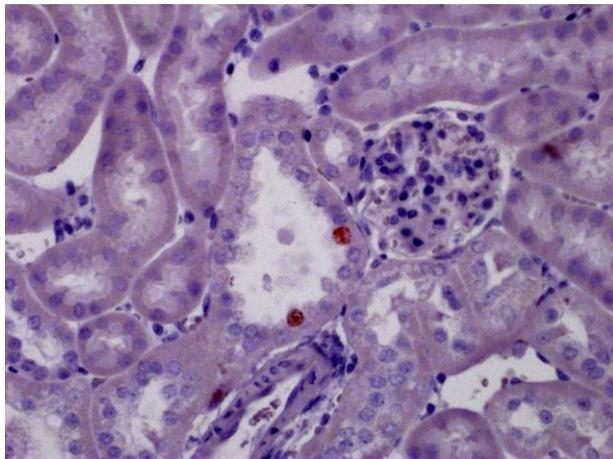
In Abbildung 29 sind representative immunhistochemische Ki67-Reaktionen von Nierengewebe von männlichen (A) und weiblichen (B) Uni-Nx+Salz Kontrollen gegenüber den korrespondierenden DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen (C) und Weibchen (D) dargestellt.



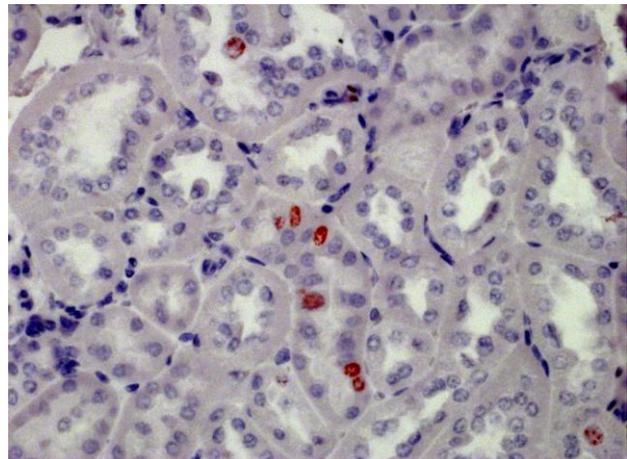
A



B



C



D

Abb. 29: Ki67-Färbungen von Nierengewebe.

(A) Uni-Nx+Salz Kontroll-Männchen; (B) Uni-Nx+Salz Kontroll-Weibchen; (C) DOCA+Salz+Hydralazin-Männchen; (D) DOCA+Salz+Hydralazin-Weibchen am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

In Abbildung 30 ist die histologische Auswertung der Ki67 positiven Zellen im Nierengewebe von je 50 Tubuli in 10 zufällig ausgewählten Bildabschnitten eines Nierenquerschnitts von männlichen und weiblichen Uni-Nx+Salz Kontrollen und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren dargestellt.

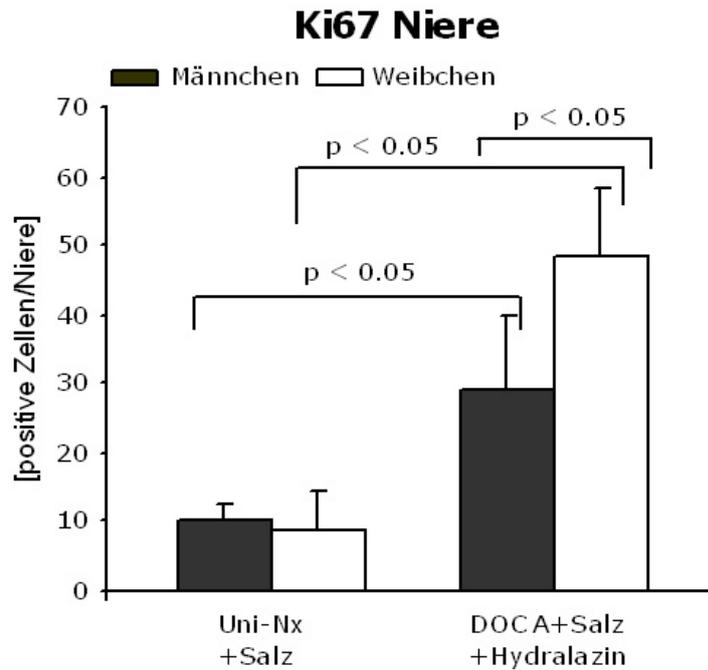


Abb. 30: Ki67 positive Zellen in den Nieren von Uni-Nx+Salz- und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

In den Nierengeweben von DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen war ein signifikanter Anstieg Ki67-positiver Zellen von  $10,17 \pm 2,3$  auf  $29,10 \pm 10,78$  verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen zu sehen. Bei den weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren zeigte sich eine noch größere Zunahme von  $8,78 \pm 5,58$  auf  $48,57 \pm 9,4$  positive Zellen verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen und verglichen zu den männlichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Mäusen.

### 3.6.5 Inflammatorische Antwort in der Niere

In Abbildung 31 sind die mRNA-Expressionen von MCP-1 bei Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen dargestellt.

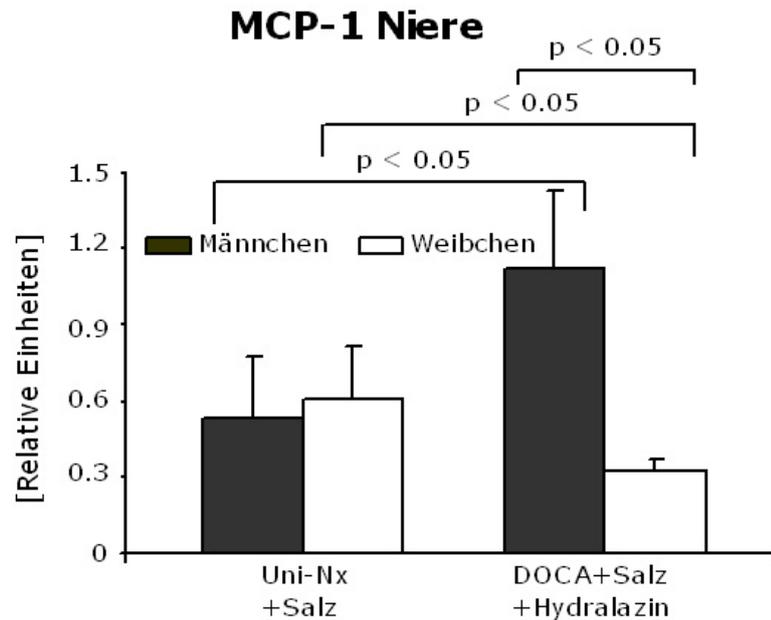


Abb. 31 MCP-1 mRNA-Expression in den Nieren von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazinbehandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Ähnlich wie bei den Herzgeweben stieg die mRNA-Expression von MCP-1 in den Nieren von DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen nach sechs Wochen von  $0,54 \pm 0,24$  auf  $1,12 \pm 0,30$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz-Kontrollen signifikant ( $p < 0,05$ ) an. Die weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Mäuse wiesen eine statistisch signifikante Abnahme der Genexpression von  $0,60 \pm 0,24$  auf  $0,33 \pm 0,05$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz-Kontrollen auf.

### 3.6.6 Renale Fibrose

#### 3.6.6.1 Genexpression von TGF- $\beta$ Niere

In Abbildung 32 ist die Auswertung der mRNA-Genexpression von TGF- $\beta$  in den Nierengewebe von männlichen und weiblichen Uni-Nx+Salz Kontrollen und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren dargestellt.

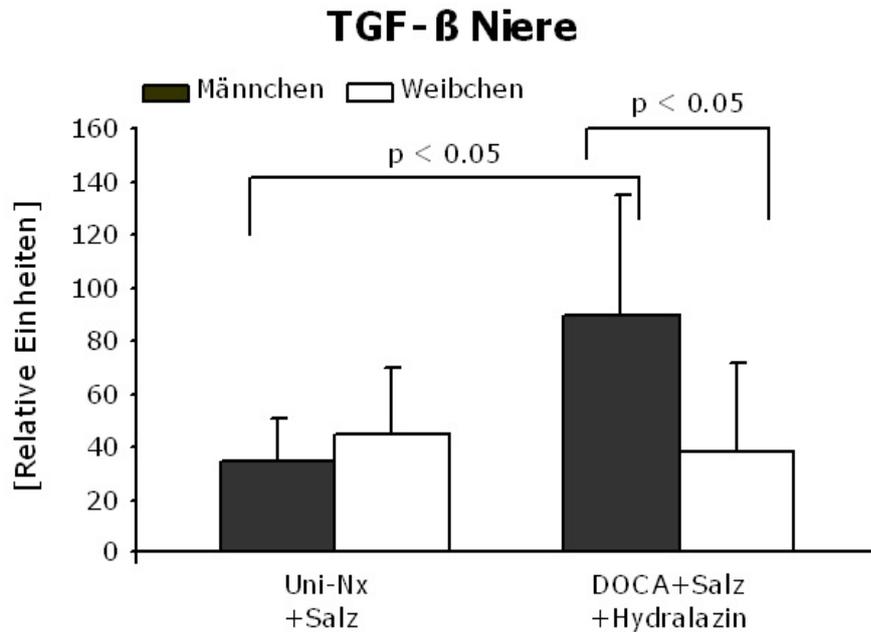


Abb. 32 TGF $\beta$  mRNA-Expression in den Nieren von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die Nieren von DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen zeigten eine stärkere Genexpression von TGF- $\beta$  bei einem Anstieg von  $34,3 \pm 16,4$  auf  $89,0 \pm 46,3$  relative Einheiten verglichen zu den Uni-Nx+Salz Kontrollen. Bei den weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren war keine statistisch signifikante Veränderung der Genexpression bei einer Reduktion von  $44,6 \pm 24,9$  auf  $38,0 \pm 33,3$  relative Einheiten verglichen zu den jeweiligen Kontrollen festzustellen.

### 3.6.6.2 Genexpression von Kollagen I Niere

In Abbildung 33 ist die Auswertung der mRNA-Expression von Kollagen I in den Nierengewebe von männlichen und weiblichen Uni-Nx+Salz Kontrollen und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren dargestellt.

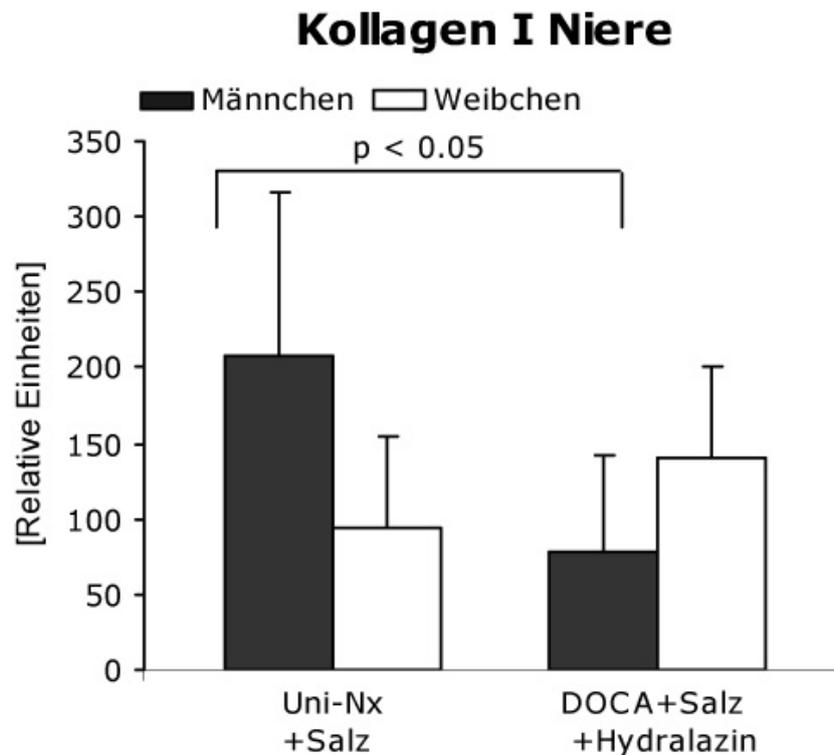


Abb. 33 Kollagen I mRNA-Expression in den Nieren von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die mRNA-Expression von Kollagen I in den Nierengeweben von DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen reduzierte sich nach der Hydralazin Verabreichung von  $207,37 \pm 109,23$  auf  $77,36 \pm 63,90$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen statistisch signifikant. Die weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tiere wiesen einen nicht signifikanten Anstieg mit von  $109,01 \pm 71,27$  auf  $139,88 \pm 60,57$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen auf.

#### 3.6.6.3 Genexpression von Kollagen III Niere

In Abbildung 34 ist die Auswertung der mRNA-Expression von Kollagen III in den Nierengeweben von männlichen und weiblichen Uni-Nx+Salz Kontrollen und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren dargestellt.

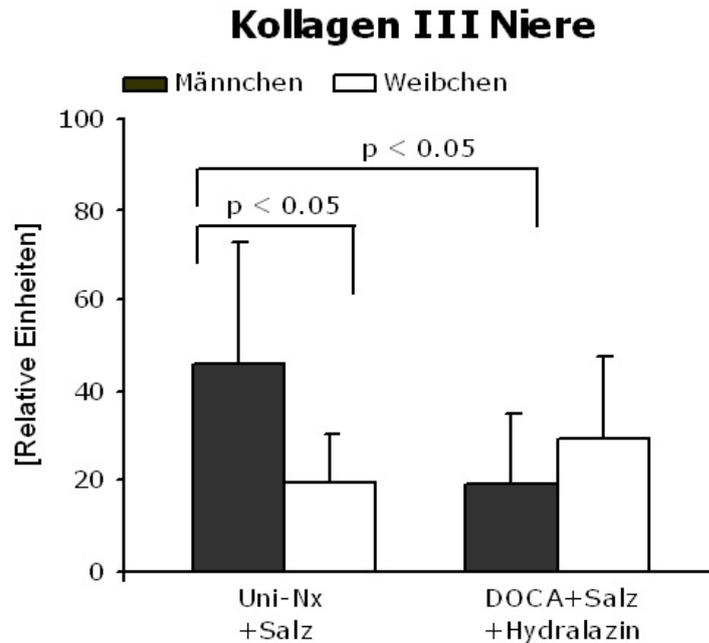


Abb. 34 Kollagen III mRNA-Expression in den Nieren von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die mRNA-Expression von Kollagen III in den Nierengeweben von DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen wiesen eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion von  $60,44 \pm 38,34$  auf  $19,18 \pm 15,81$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen auf. Die weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tiere dagegen wiesen einen statistisch nicht signifikanten Anstieg von  $17,35 \pm 10,69$  auf  $48,95 \pm 46,89$  relative Einheiten verglichen zu ihren Uni-Nx+Salz Kontrollen auf.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodenkritik

#### 4.1.1 Tiermodelle

Tiermodelle humaner Krankheiten sind ein wichtiges Instrument biomedizinischer Forschung. An ihnen lassen sich molekulare und biochemische Grundlagen von Krankheiten unter standardisierten Bedingungen und mit einer Vielzahl von Interventionen wie z. B. genetischen Manipulationen, die beim Menschen undenkbar sind, analysieren. Hierdurch wird die Basis für die Entwicklung neuartiger Therapieoptionen gelegt. Bei tierexperimentellen Arbeiten stellt sich aus ethischen Gründen immer die Frage nach Alternativen zum Versuch am lebenden Organismus. Die hier untersuchte Reaktion von Kreislauf, Herz und Niere auf Niereninsuffizienz, Mineralkortikoidexzess und Volumenüberladung ist ein systemisches Geschehen des gesamten Organismus, das die Fokussierung auf ein einzelnes Organ oder Organsystem nicht zulässt. Daher sind mögliche In-vitro-Untersuchungen an isolierten Organen nur im Hinblick auf spezielle Fragestellungen sinnvoll. Die Blutdruckregulation unterliegt dem Einfluss des autonomen Nervensystems und des endokrinen Systems. Dieser Einfluss ist an isolierten Organen unterbrochen. Zur Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit sind daher Tierversuche zwingend erforderlich. Als Modelltiere kommen prinzipiell verschiedene Organismen in Frage. Primaten sind zwar dem Menschen am nächsten verwandt und in entwicklungsbiologischer, biochemischer und anatomischer Hinsicht ähnlich, jedoch haben sie lange Generationszeiten und eine hohe Lebenserwartung, weshalb sich Krankheitsverläufe nur über sehr lange Zeiträume beobachten ließen. Aus diesen Gründen werden kleinere Labortiere wie Nagetiere genutzt. Mäuse, insbesondere die Hausmaus („*mus musculus*“), hat sich als Modell für viele Leiden des Menschen, durch ihre hohe Reproduktionsrate, eine geringe Lebenserwartung und eine sehr schnelle geschlechtsreife, bewährt. Sie ähnelt in biologischer und genetischer Hinsicht in ausreichendem Maß dem Menschen, so dass viele an der Maus gewonnene Erkenntnisse auch für den Organismus des Menschen gelten. Es gibt mittlerweile eine Vielzahl von Hypertonie-Modellen, die den sekundären Formen der Hypertonie des Menschen ähneln. Hierzu zählen die Nierenarterienstenose, renale Hypertonie sowie durch Mineralkortikoid und Glukokortikoid induzierte Hypertonie. Andere experimentelle Hypertonieformen wie z. B. die genetische Hypertonie kommen der primären Hypertonie näher. Zum induzieren der

sekundären Form der Hypertonie in Tiermodellen hat sich beispielsweise die „Two-Kidney, One Clip“ oder auch „Goldblatt“ genannte Methode besonders geeignet. Bei dem Goldblatt-Modell wurde mit Silberklips operativ eine Nierenarterie abgeklemmt und somit über einen bestimmten Zeitraum die Hypertonie induziert. Solch ein Tiermodell eignet sich nicht für experimente bei denen blutdruckunabhängige Mechanismen untersucht werden sollen. Bei dem in dieser Arbeit etablierten DOCA-Salz Modell wird ein irreversibler operativer Eingriff zur induktion von Hypertonie in die Niere vermieden, so daß der Blutdruck durch die Gabe des Vasodilators Hydralazin wieder normalisiert werden kann. Ein Tiermodell zur induktion von Herzhypertrophie wäre beispielweise das TAC-Modell, bei der nach experimenteller transversaler aortaler Konstriktion zur akuten Drucksteigerung im linken Ventrikel und somit zu einer Herzhypertrophie kommt. Da in unserem Modell die kardioresnale Interaktion untersucht werden soll, ist eine durch operativen eingriff in das Herz induzierte Herzhypertrophie nicht geeignet.

#### 4.1.2 Potenzielle Fehlerquellen des eingesetzten Tiermodells

Prinzipiell kann jede Manipulation eines Tieres zu Ungenauigkeiten in den physiologischen Versuchsergebnissen führen. Das Einbringen des Tieres in eine neue Umgebung, wie beispielsweise bei den Untersuchungen in Stoffwechsellkäfigen, verursacht insbesondere durch die schlechteren Haltungsbedingungen durch Bewegen auf einem Gitterrost Stress. Auch Verunreinigungen wie Kot im Urin oder Messungenauigkeiten bei der Urinmenge aufgrund von Verdunstung oder Verlust können die Ergebnisse bei der Urinsammlung verfälschen. Schonendere Stoffwechseluntersuchungen an nicht narkotisierten Mäusen sind bislang nicht möglich.

Die Isofluran-Narkose beeinflusst in starkem Maße den Kreislauf der Mäuse. Blutdruck und Herzfrequenz sind daher bei der invasiven Blutdruckmessung im Vergleich zur telemetrischen Messung deutlich abgesenkt. Um einen verfälschenden Einfluss der Narkose auf die Blutdruckdaten in unserem Modell auszuschließen, wurden an einer kleineren Anzahl von Mäusen (jeweils fünf Männchen und Weibchen) telemetrische Blutdruckmessungen an nicht-narkotisierten Tieren über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Aufgrund der enormen Kosten der Telemetriesendeinheiten und des hohen personellen Aufwands bei der Überwachung des Blutdruckes über einen langen Zeitraum konnte die telemetrische Blutdruckmessung nur bei einer kleineren Gruppe von Mäusen durchgeführt werden. Stress durch äußere Einflüsse, der zu Veränderungen der Blut-

druckeffekte führen könnte, wurde vermieden, indem die Mäuse während der Langzeitmessung mittels Telemetriesendern in einem separaten Raum, der nicht betreten werden durfte, gehalten wurden.

Hormonelle Schwankungen durch den weiblichen Zyklus können hormonabhängige physiologische Effekte beeinflussen. Da die hier beschriebenen Experimente über einen Zeitraum von sechs Wochen andauerten und am Ende kumulative Effekte auf Herz und Nieren untersucht wurden, war eine Synchronisation des Zyklus nicht erforderlich.

## 4.2 Diskussion der Versuchsergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden tierexperimentell geschlechtsspezifische Unterschiede bei kardialen und renalen Adaptationsprozessen bei verminderter Nierenfunktion und unter dem Einfluss von Mineralkortikoiden und Volumen auf morphologischer, funktioneller und molekularbiologischer Ebene untersucht. Das verwendete Modell entspricht beim Menschen der kardiorenenalen Interaktion bei chronischer Niereninsuffizienz. Das Geschlecht kann auf mehreren Ebenen diese Wechselwirkung beeinflussen. Denkbar sind beispielsweise geschlechtsbezogene Unterschiede in der Blutdruckregulation durch den Sympathikotonus oder in der Antwort auf den Mineralkortikoidexzess und die Salzretention.

Um untersuchen zu können, welche Geschlechtsunterschiede unabhängig vom Blutdruck bei der kardiorenenalen Interaktion in Hinblick auf die renale Adaptation und die Entwicklung einer Myokardhypertrophie bestehen, wurde der Blutdruck bei beiden Geschlechtern auf Normalniveau abgesenkt. Hierzu wurde Hydralazin gewählt, das zur Gruppe der direkten Vasodilatoren zählt. Es führt zu einer Erweiterung vor allem der kleinen Arterien, wodurch der systemische Gefäßwiderstand und somit auch der Blutdruck sinkt (Windholz M, 1983; Plumb DC, 1999) Im Gegensatz zu anderen Antihypertensiva wie beispielsweise den ACE-Hemmern hat Hydralazin keine direkten Auswirkungen auf die glomeruläre Hämodynamik (Anderson S, 1986), so dass es keinen über die systemische Blutdrucksenkung hinaus gehenden nephroprotektiven Effekt hat. Ein solcher würde den renalen Schaden abmildern und so das Modell über die Normalisierung des Blutdrucks hinaus beeinflussen.

Die Wirkung von DOCA, das durch eine vermehrte Ausscheidung von Kalium eine Hypokaliämie verursacht, konnte durch die Zunahme der Kaliumausscheidung im Urin

und die Abnahme von Kalium im Serum bei beiden Geschlechtern bestätigt werden. Außerdem war die deutliche Zunahme der Diurese ein Beleg für eine erhöhte Flüssigkeitsaufnahme als Hinweis auf eine vermehrte Volumenbelastung. Dies war eine Grundvoraussetzung für alle weiterführenden Untersuchungen. Hypokaliämie und metabolische Alkalose können als Folgen der Mineralkortikoidwirkung zur Entwicklung von Herz- und Nierenhypertrophie sowie einer daraus resultierenden kardialen Dysfunktion beitragen (Wang Q, 2000). Obwohl männliche uninephrektomierte Kontrolltiere höhere Serum-Kaliumwerte als Weibchen aufwiesen, zeigten sich nach DOCA+Salz+Hydralazin Behandlung keine Unterschiede in der Hypokaliämie verglichen zu den weiblichen Mäusen. Es wird deshalb angenommen, dass das Ausmaß der Hypokaliämie zu den beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschieden in unserem Modell beigetragen hat.

Die telemetrischen Blutdruckmessungen zeigten, dass sowohl der Anstieg des Blutdrucks durch die DOCA-Salz-Behandlung als auch die Blutdrucksenkung durch Hydralazin geschlechtsunabhängig verliefen, so dass davon auszugehen ist, dass sowohl Männchen als auch Weibchen in allen untersuchten Gruppen Blutdruck normotensiv waren. Die beobachteten Effekte auf Herz und Nieren sind demnach unabhängig von geschlechtsspezifischen Blutdruckunterschieden und unabhängig von der Höhe des Blutdruckanstieges.

Aufgrund der Hydralazin vermittelten Vasodilatation kann es zu einem über Barorezeptoren vermittelten Anstieg des Sympathikotonus kommen, der sich in einer erhöhten Herzfrequenz äußert. Geschlechterunterschiede in der autonomen Regulation sind bei Menschen und Tieren beschrieben worden (Evans, 1998; Convertino, 2001). Auch in der hier dargestellten Studie fand sich in der so genannten „Baseline“ bei der telemetrischen Blutdruckmessung bei weiblichen Mäusen eine nicht signifikant höhere Herzfrequenz, was auf eine höhere Sympathikusaktivität in weiblichen Mäusen zurückgeführt werden könnte. In früheren Experimenten wurde eine Begünstigung der Natriumretention durch einen erhöhten renalen Sympathikotonus bei DOCA- und Salz-behandelten Ratten beobachtet dies war für die Entwicklung der Hypertonie erforderlich (Katholi RE, 1980). Geschlechtsunterschiede in der autonomen kardiovaskulären Regulation sind sowohl bei Tieren als auch bei Menschen beschrieben worden. Weibliche Individuen sind durch eine reduzierte Ansprechbarkeit des Baroreflexes bei Orthostase und durch vasoaktive Substanzen charakterisiert (Evans JM, 2001; Convertino VA,

1998). Diese Unterschiede können möglicherweise von einer Stimulation von Östrogenrezeptoren in zentralen autonomen Kernen (Saleh MC, 2000) oder von Geschlechtsunterschieden in der Noradrenalintransporterfunktion herrühren (Schroeder C, 2004). Unter Einwirkung von Hydralazin waren in der vorliegenden Arbeit Unterschiede in der Herzfrequenz sowohl in der direkten Messung der anästhesierten Tiere als auch in der radiotelemetrischen Messung nivelliert, so dass in der Behandlungsgruppe keine deutlichen Unterschiede in der Sympathikusaktivität vorgelegen haben dürften. In einem Volumenbelastungsmodell durch aortocavalen Shunt bei Ratten entwickelten die Herzen der weiblichen Ratten eine signifikante konzentrische Hypertrophie ohne Verschlechterung der kardialen Funktion oder der myokardialen Compliance (Gardner JD, 2002). Obwohl es bei dem DOCA+Salz-Modell zu einer Zunahme der Salz- und Wasserretention kam, sind die Volumen-bezogenen Effekte noch weitgehend ungeklärt (Tietze J, 2006).

Mithilfe der zweidimensionalen transthorakalen Echokardiographie können sowohl morphologische Veränderungen des linken Ventrikels wie Kammergröße, Wanddicken und Masse als auch die Funktion nicht invasiv zuverlässig ermittelt werden (Collins KA, 2003). Nach der Auswertung der M-Mode-Bilder aller Tiere stellte sich eine signifikante Hypertrophie des linken Ventrikels in Form eines signifikanten Anstiegs der Septumdicke und der Hinterwand bei den männlichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren dar. Die stärker ausgeprägte Hypertrophieantwort bei den männlichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren konnte auch durch das Ermitteln des Hypertrophieindex (HG/KG-Ratio) und die Messung der Kardiomyozytenquerschnittsfläche bestätigt werden. Klinisch besteht eine gute Korrelation zwischen der mittels Echokardiographie bestimmten linksventrikulären Masse und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (Schillaci G, 1996), so dass die hier gezeigten Unterschiede des Surrogatparameters Myokardhypertrophie mit hoher Wahrscheinlichkeit Rückschlüsse auf Unterschiede in der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität zulassen.

Ein Anstieg der beiden natriuretischen Peptide ANP und BNP ist in der Literatur in Tiermodellen für Herzinfarkt (Cameron VA, 2000), Herzversagen (Luchner A, 1998; Takahashi T, 1992) und Hypertrophie (Kawakami H, 1996) beschrieben. Außerdem treten Veränderungen von ANP und BNP in Zusammenhang mit einer Aktivierung von NFAT auf (Fiedler B, 2002). In den hier beschriebenen Experimenten zeigten sowohl männli-

che als auch weibliche DOCA+Salz+Hydralazin behandelte Mäuse einen Anstieg der ANP-Werte nach sechs Wochen. Der Anstieg der Expression des BNP-Gens wurde in einem DOCA-Salz-Volumenbelastungsmodell im hypertensiven Stadium beobachtet (de Bold AJ, 1996). In unserem Modell wurde ein tendenzieller, aber statistisch nicht signifikanter Anstieg der BNP-Werte bei den Männchen auch im normotensiven Bereich beobachtet. Dies könnte ein Hinweis auf eine ausgeprägtere Neigung zur kardialen Dekompensation bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Tieren sein.

Die durchgeführten Experimente waren nicht darauf ausgerichtet, den relativen Beitrag einzelner blutdruckunabhängiger hypertropher Stimuli wie beispielsweise der unterschiedlichen neuroendokrinen Achsen auf die Aktivierung von Calcineurin und der downstream gelegenen Signaltransduktionswege zu untersuchen. Sowohl die Aktivierung adrenerger Rezeptoren durch den Sympathikus als auch Rezeptor-abhängige und -unabhängige Mineralkortikoidwirkungen konvergieren auf Veränderungen im Calciumhaushalt. Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung der Hauptbeobachtung dieser Arbeit, nämlich eine bisher unbekannte geschlechtsspezifische Aktivierung des Calcineurinsignalweges in der Myokardhypertrophie, die wahrscheinlich blutdruckunabhängig erfolgt. Die erhobenen Befunde stärken die Hypothese, dass durch Calcineurin Signalwege kontrolliert werden, die bei pathologischen Hypertrophieformen, aber nicht bei der physiologischen Adaptation von Bedeutung sind (Wilkins BJ, 2004). Da die direkte Messung der Calcineurinaktivität über die Messung der Phosphataseaktivität durch Hintergrundaktivität anderer Phosphatasen des Herzens oft verfälscht wird (Bueno OF, 2002), wurde stattdessen der Gehalt an phosphoryliertem NFAT über Western-Blot-Analysen gemessen. Zahlreiche Studien sowohl in transgenen Tieren als auch in Druckbelastungsmodellen haben die zentrale Rolle des Calcineurin/NFAT-Signaltransduktionswegs für die kardiale Hypertrophieentstehung belegt (van Empel VP, 2004). Die konstitutive Aktivierung von Calcineurin in den Herzen von transgenen Mäusen ist ausreichend, um eine massive kardiale Vergrößerung und ein Herzversagen auszulösen (Molkentin JD, 1998). In Tiermodellen für linksventrikuläres Remodeling nach einem Myokardinfarkt führte die Inhibition von Calcineurin durch MCIP1-Überexpression zur Unterbindung der hypertrophen Antwort (van Rooij E, 2004). Auch die Rolle des Calcineurin-Signaltransduktionswegs in blutdruckunabhängigen Formen der Hypertrophie und bei geschlechtsspezifischen Unterschieden ist noch weitgehend unbekannt. Pedram et al. fanden, dass Östradiol die durch Agonisten induzierte Myokardhypertrophie durch die Hochregulierung von MCIP1 und die nachfolgende Unter-

drückung der Calcineurinaktivität limitiert (Pedram A, 2005). Diese Wirkung von Östradiol erklärt möglicherweise den milder ausgeprägten hypertrophen Phänotyp, der bei den Weibchen beobachtet wurde.

Sowohl im Herz- als auch im Nierengewebe der weiblichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tiere waren im Vergleich zu ihren Uni-Nx+Salz-Kontrollen und auch zu den DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Männchen signifikant mehr proliferierende, Ki67-positive Zellen zu finden, was möglicherweise auf eine bessere Regeneration oder Wundheilung der weiblichen Tiere hindeuten kann. Lange wurde angenommen, dass das Herz sich nicht regenerieren kann, weil die Kardiomyozyten nach der Geburt ihre Teilungsfähigkeit verlieren. Anversa und seine Kollegen konnten durch das Bestimmen von Ki67, ein in allen Zellkernen sich teilender Kardiomyozyten vorkommendes Protein, widerlegen. Ki67 wird in allen Phasen des Zellzyklusses exprimiert und ist somit ein strenger Indikator für Zellteilung (Anversa P, 1997). In der Niere könnte die Zunahme von Ki67 bei den weiblichen Mäusen dem Verlust von Tubulsepithelzellen durch die Proliferation benachbarter Zellen und somit der Vermeidung der Entstehung von Fibrose hinweisen.

Endorganschäden wie die hier beschriebenen renalen und kardialen Veränderungen stehen möglicherweise mit Rezeptor-abhängigen und Rezeptor-unabhängigen Mineralkortikoideffekten in Zusammenhang. Mineralkortikoide fördern die Entwicklung der kardialen Hypertrophie in normotensiven 1-Renin-Gen-Mäusen teilweise durch die Aktivierung des Angiotensin II Typ 1 Rezeptors (Wang Q, 2002). Die Herzen und Nieren der weiblichen Mäuse zeigten Zeichen von Adaptation und Hypertrophie sowohl in Herzen als auch in Nieren als Antwort auf den Mineralkortikoidexzess. Der Calcineurinsignalweg vermittelt neben der hypertrophen Antwort auch die MCP-1-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen und fördert so die Inflammation in den Gefäßen (Behr TM, 2000). MCP-1 koordiniert Abwehrmechanismen des Immunsystems, indem es unter anderem Monozyten an den Ort der Infektion rekrutiert und die Differenzierung von T-Lymphozyten reguliert (Fuentes ME, 1995; Rollins BJ, 1996). Es wurde eine höhere MCP-1 Expression sowohl in Herzen als auch Nieren der Männchen, was mit der höheren Calcineurinaktivität in den Herzen dieser Tiere zusammenhängen kann, beobachtet. Diese Befunde stimmen mit der von Behr et al. berichteten Überexpression von MCP-1 in Kardiomyozyten von Ratten, bei denen ein Herzversagen durch chronische Volumenbelastung induziert wurde (Behr TM, 2000), überein.

In hypertrophierten Kardiomyozyten wird die Bildung von TGF- $\beta$  induziert (Ruwhof C, 2000), welches als Fibrosierung des Myokards den Hauptgrund für die kardiale Dysfunktion darstellt. Es wird angenommen, dass Wachstumsfaktoren wie Angiotensin II und TGF- $\beta$  verstärkt im Zusammenhang mit myokardialen Stress, ungünstigem myokardialen Wachstum und Fibrose stehen (Dixon J, 1997). Aldosteron ist durch multiple Mechanismen an der Induktion von kardialer Fibrose beteiligt (Young MC, 2007). Brooks et al. fanden heraus, dass die Herzen TGF- $\beta$ 1-heterozygot mutierter Mäuse weniger Fibrose und somit eine bessere Compliance und verminderte myokardiale Steifigkeit im Vergleich zu Kontrollgruppen entwickelten.

Infolge der chronischen Drucküberlastung bei Klappenfehlern kommt es im Myokard ebenfalls zum Remodeling mit Fibrosierung im Interstitium (Weber KT, 2000). Es kann also davon ausgegangen werden, dass TGF- $\beta$  ein wichtiger Mediator des „cardiac remodelling“ ist. Brilla et al. zeigten, dass die Fibroblastenaktivität im Herz für die Akkumulation der Kollagentypen I und III verantwortlich ist.

Der in dieser Arbeit beschriebene Anstieg der TGF- $\beta$ -Genexpression steht in Verbindung mit der durch Fibrose charakterisierten maladaptiven Hypertrophieantwort in männlichen DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Tieren.

Die Befunde von Pearlman und Mundhenke, die bei Hypertrophie durch Dauerbelastung eine starke Erhöhung von Kollagen Typ I fanden, ließen sich in den hier durchgeführten Experimenten nicht bestätigen (Pearlman ES, 1981; Mundhenke M, 2002). In dem hier beschriebenen Modell konnte keine Veränderung in der Genexpression von Kollagen Typ I in Herzen und Nieren beider Geschlechter festgestellt werden. Der Anstieg der TGF- $\beta$ -Expression und die Veränderungen im Kollagengehalt sowohl im Herzen als auch in den Nieren können nicht direkt durch die Aktivierung des Calcineurin-Pfades erklärt werden. Sie stehen möglicherweise in Zusammenhang mit einem unterschiedlichen Ansprechen auf genomische und nicht genomische Mineralkortikoideffekte.

Der Verlust an renaler Masse durch eine Nephrektomie hat eine Volumenzunahme der zurückbleibenden Niere zur Folge. Dies ist Ausdruck einer renalen Kompensation, die nicht durch eine Zunahme an Nephronen in der verbliebenen Niere geleistet wird, sondern über eine verstärkte Filtrationsleistung der vorhandenen Glomerula. Da geschlechts- und altersabhängige Mechanismen in diesen Prozess involviert sind, können

Art und Ausmaß der kompensatorischen renalen Größenzunahme variieren (Mulroney SE, 1999).

Aldosteron kann die Calcineurinaktivität in den kortikalen Sammelrohren von Rattennieren durch nicht genomische Effekte stimulieren (Tumlin JA, 1997). Ähnliche Effekte können an der Vergrößerung der distalen Tubulusdurchmesser, die wir bei den männlichen Mäusen nach DOCA+Salz+Hydralazin Behandlung beobachtet haben, beteiligt sein. Die Tubulusdilataion ist wahrscheinlich zusammen mit dem beschriebenen proinflammatorischen Zeichen Bestandteil eines tubulointerstitiellen Remodelings, was ein zuverlässiger Marker für die Schwere eines progressiven renalen Schadens ist (Gilbert NE, 1999). Anderson et al. wiesen bereits 1986 darauf hin, dass eine alleinige Blutdrucksenkung mit Hydralazin, Hydrochlorothiazid und Reserpin nicht ausreicht, um im Rattenmodell vor einer Bluthochdruck-getriggerten fortschreitenden Nierenerkrankung zu schützen (Anderson S, 1986). Die beobachtete Tubulusdilataion in männlichen Mäusen spricht für Unterschiede in der Aldosteron-Sensitivität des distalen Nephrons. Zur Klärung dieser Frage sind jedoch weitergehende Untersuchungen erforderlich.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein tierexperimentelles Modell etabliert, welches die Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Entwicklung des durch einen Mineralkortikoidexzess in Kombination mit Salzbelastung induzierten kardioresalen Schadens in männlichen und weiblichen Mäusen in Blutdruck unabhängiger Art und Weise erlaubt. Es zeigte sich trotz vergleichbarer Blutdruckwerte eine bei männlichen Tieren stärker ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie, die mit einer im Vergleich zu weiblichen Mäusen stärkeren Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signaltransduktionsweges im Herzen einherging. Dies stützt die These, dass dieser Pathway insbesondere bei der maladaptiven Myokardhypertrophie auf pathologische Stimuli, die durch Fibrosierung, zunehmende Dilatation und schließlich progredientem Funktionsverlust gekennzeichnet ist, von Bedeutung ist. Auch bei den renalen Veränderungen zeigten die männlichen Tiere eine stärkere distaltubuläre Dilatation und Größenzunahme, was auf Geschlechtsunterschiede im Ansprechen dieses Nephronabschnitts auf Mineralkortikoide hinweist. In beiden Organsystemen zeigten die Weibchen eine geringere proinflammatorische und profibrotische Antwort, die sich in niedrigeren TGF $\beta$ - und Kollagen III-Expressionsraten zeigte, was zusammen mit einer stärkeren proliferativen Aktivität der funktionstragenden Orgazellen auf eine bessere kardioresale Adaptationsfähigkeit hinweist. Dies lässt erwarten, dass der Funktionsverlust der betroffenen Organe später einsetzt als bei den Männchen.

Weitere Arbeiten an Östrogen- und Androgenrezeptor Knockout-Mäusen sind erforderlich, um die relative Bedeutung der unterschiedlichen Rezeptoren der Geschlechtshormone für die beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede zu erklären. Die dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass es nicht nur je nach Art des Hypertrophie induzierenden Stimulus wie pathologischer versus physiologischer Stimulus oder Mineralkortikoidexzess versus Druckbelastung sondern auch in Abhängigkeit des Geschlechts zu einer komplexen differenziellen Steuerung der Signaltransduktion kommt. Dies macht deutlich, dass das Ziel einer individualisierten Therapie von Patienten auch diese Faktoren berücksichtigen muss, und zeigt gleichzeitig mögliche Angriffspunkte für eine derartige Therapie auf. Einige der betreffenden Signaltransduktionswege werden nämlich durch Substanzen beeinflusst, die bereits in der Klinik bei unterschiedlichen Patientenkollektiven verwendet werden. Hierzu gehören beispielsweise die Calcineurininhibitoren, die heutzutage wegen der durch sie vermittelten Hemmung der

T-Zell-Aktivierung die Basis der Immunsuppression bei Patienten nach Nierentransplantation bilden. Dieses Patientenkollektiv weist häufig eine linksventrikuläre Hypertrophie auf, die an der hohen kardiovaskulären Mortalität dieser Patientengruppe maßgeblich beteiligt ist, so dass eine geschlechtsspezifische Interaktion von Calcineurininhibitoren mit pro-hypertrophen Signaltransduktionswegen im Herzen unmittelbare klinische Bedeutung hat.

## 6 Literaturverzeichnis

1. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens* 1999; 17(2):151–183.
2. Agabiti-Rosei E, Muiesan ML: Left ventricular hypertrophy and heart failure in women. *J Hypertens Suppl.* 2002 May;20(2):S. 34–8. Review.
3. Aitken A, Klee CB, Cohen P: The structure of the B subunit of calcineurin. *Eur J Biochem.* 1984 Mar 15;139(3):663-71.
4. Anderson S, Rennke HG, Brenner BM: Antihypertensive therapy must control glomerular hypertension to limit glomerular injury. *J Hypertens Suppl.* 1986 Dec;4(5):S242-4. Review.
5. Anversa P, Olivetti G, Leri A, Liu Y, Kajstura J: Myocyte cell death and ventricular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1997 Mar;6(2):169-76. Review.
6. Aukrust P, Ueland T, Müller F, Andreassen AK, Nordøy I, Aas H, Kjekshus J, Simonsen S, Frøland SS, Gullestad L: Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1998 Mar 31;97(12):1136-43.
7. Aurigemma GP, Gaasch WH: Gender differences in older patients with pressure-overload hypertrophy of the left ventricle. *Cardiology.* 1995;86(4):310–7. Review.
8. Barbato JC, Mulrow PJ, Shapiro JI, Franco-Saenz: Rapid effects of aldosterone and spironolactone in the isolated working rat heart. *Hypertension.* 2002 Aug;40(2):130-5.
9. Behr TM, Wang X, Aiyar N, Coatney RW, Li X, Koster P, Angermann CE, Ohlstein E, Feuerstein GZ, Winaver J: Monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated in rats with volume-overload congestive heart failure. *Circulation.* 2000;102:1315–1322.
10. Boldyreff B, Wehling M: Non-genomic actions of aldosterone: mechanisms and consequences in kidney cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Sep;18(9):1693-5. Review.
11. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E: Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature.* 1992 Nov 26;360(6402):361-4.
12. Bourajaj M, Armand AS, da Costa Martins PA, Weijts B, van der Nagel R, Heeneman S, Wehrens XH, De Windt LJ: NFATc2 is a necessary mediator of calcineurin-dependent cardiac hypertrophy and heart failure. *J Biol Chem.* 2008 Aug

- 8;283(32):22295-303. Epub 2008 May 12.
13. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
  14. Brewster UC, Perazella MA: The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med.* 2004 Feb 15;116(4):263-72. Rev.
  15. Brilla CG, Weber KT: Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med.* 1992 Dec;120(6):893-901.
  16. Brown DW, Giles WH, Croft JB: Left ventricular hypertrophy as a predictor of coronary heart disease mortality and the effect of hypertension. *Am Heart J.* 2000 Dec;140(6):848-56.
  17. Buckberg GD, Weisfeldt ML, Ballester M, Beyar R, Burkhoff D, Coghlan HC, Doyle M, Epstein ND, Gharib M, Ideker RE, Ingels NB, LeWinter MM, McCulloch AD, Pohost GM, Reinlib LJ, Sahn DJ, Sopko G, Spinale FG, Spotnitz HM, Torrent-Guasp F, Shapiro EP: Left ventricular form and function: scientific priorities and strategic planning for development of new views of disease *Circulation.* 2004 Oct 5;110(14):e333-6.
  18. Bueno OF, van Rooij E, Molckentin JD, Doevendans PA, De Windt LJ: Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc Res.* 2002;53:806–821.
  19. Bueno OF, van Rooij E, Molckentin JD, Doevendans PA, De Windt LJ: Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc Res.* 2002;53:806–821.
  20. Burnett JC Jr: Novel therapeutic directions for the natriuretic peptides in cardiovascular diseases: what's on the horizon. *J Cardiol.* 2006 Nov;48(5):235-41. Review.
  21. Buttini M, Limonta S, Luyten M, Boddeke H: Distribution of calcineurin A isoenzyme mRNAs in rat thymus and kidney. *Histochem J.* 1995 Apr;27(4):291-9
  22. Cameron AM, Steiner JP, Roskams AJ, Ali SM, Ronnett GV, Snyder SH: Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca<sup>2+</sup> flux. *Cell.* 1995 Nov 3;83(3):463-72.
  23. Cameron VA, Rademaker MT, Ellmers LJ, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM: Atrial (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) expression after myocardial infarction in sheep: ANP is synthesized by fibroblasts infiltrating the infarct. *Endocrinology.* 2000 Dec;141(12):4690-7.
  24. Campese VM, Kogosov E: Renal afferent denervation prevents hypertension in rats with chronic renal failure. *Hypertension.* 1995 Apr;25(4 Pt 2):878–82.

25. Cataliotti A, Malatino LS, Jougasaki M et al: Circulating natriuretic peptide concentrations in patients with end-stage renal disease: role of brain natriuretic peptide as a biomarker for ventricular remodeling. *Mayo Clin. Proc.* 2001. 76, 1111-1119.
26. Cao L, Wu J, Gardner DG: Atrial natriuretic peptide suppresses the transcription of its guanylyl cyclase-linked receptor. *J Biol Chem.* 1995 Oct 20;270(42):24891-7.
27. Carroll JD, Carroll EP, Feldman T, Ward DM, Lang RM, McGaughey D, Karp RB: Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation.* 1992 Oct;86(4):1099-107.
28. Chapman D, Weber KT, Eghbali M: Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ Res.* 1990 Oct;67(4):787-94.
29. Chenais F, Virella G, Patrick CC, Fudenberg HH: Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A--Sepharose as substrate. *J Immunol Methods.* 1977;18(1-2):183-92.
30. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
31. Cleutjens JP, Creemers EE: Integration of concepts: cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail.* 2002 Dec;8(6 Suppl):S344-8.
32. Collins KA, Korcarz CE, Lang RM: Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiol Genomics.* 2003 May 13;13(3):227-39. Review.
33. Collins R, MacMahon S: Blood pressure, antihypertensive drug treatment and the risks of stroke and of coronary heart disease. *Br Med Bull.* 1994 Apr;50(2):272-98. Review.
34. Convertino VA: Gender differences in autonomic functions associated with blood pressure regulation. *Am J Physiol.* 1998;275:R1909-R1920.
35. Cooper ME, Webb RL, de Gasparo M: Angiotensin receptor blockers and the kidney: possible advantages over ACE inhibition? *Cardiovasc Drug Rev.* 2001 Spring;19(1):75-86. Review.
36. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem.* 1984 Feb;32(2):219-29.

37. Cutler JA: High blood pressure and end-organ damage. *J Hypertens Suppl.* 1996 Dec;14(6):S. 3–6. Review.
38. Davis JO, Hartroft PM, Titus EO, Carpenter CC, Ayers CR, Spiegel HE: The role of the renin-angiotensin system in the control of aldosterone secretion. *J Clin Invest.* 1962 Feb;41:378-89.
39. de Bold AJ, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML: Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc Res.* 1996 Jan;31(1):7-18. Review.
40. de Bold A J, Ma KK, Zhang Y, de Bold ML, Bensimon M and Khoshbaten A: The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *J Physiol Pharmacol.* 2001. 79, 705-714.
41. De Nicola L, Bellizzi V, Cianciaruso B, Minutolo R, Colucci G, Balletta M, Fuiano G, Conte G: Pathophysiological role and diuretic efficacy of atrial natriuretic peptide in renal patients. *J Am Soc Nephrol.* 1997 Mar;8(3):445-55.
42. de Simone G, Devereux RB, Daniels SR, Meyer RA: Gender differences in left ventricular growth, Hypertension. 1995 Dec;26(6 Pt 1):979-83.
43. Delling U, Tureckova J, Lim HW, De Windt LJ, Rotwein P, Molkenin JD: A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Mol Cell Biol.* 2000 Sep;20(17):6600-11.
44. Dickson MC, Slager HG, Duffie E, Mummery CL, Akhurst RJ: RNA and protein localisations of TGF beta 2 in the early mouse embryo suggest an involvement in cardiac development. *Development.* 1993 Feb;117(2):625-39.
45. Ding B, Price RL, Borg TK, Weinberg EO, Halloran PF, Lorell BH: Pressure overload induces severe hypertrophy in mice treated with cyclosporine, an inhibitor of calcineurin. *Circ Res.* 1999 Apr 2;84(6):729-34.
46. Dixon J : Angiotensin II and TGF- $\beta$  in the Development of Cardiac Fibrosis, Myocyte Hypertrophy, and Heart Failure. *Heart Failure Reviews* (Ausgabe 0004/1997)
47. Dworkin LD, Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM: Hemodynamic basis for glomerular injury in rats with desoxycorticosterone-salt hypertension. *J Clin Invest.* 1984 May;73(5):1448-61.
48. Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, Woods C, Bhambi B: Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ Res.* 1991 Aug;69(2):483-90.
49. Espiner EA: Physiology of natriuretic peptides. *J Intern Med.* 1994 Jun;235(6):527-41. Review.
50. Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, Arai N, Sata M, Sugiura S, Takenaka K, Gualberto

- A, Hixon ML, Wagner MW, Aoyagi T: Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. *Circulation*. 2000 May 9;101(18):2134-7.
51. Evans JM, Ziegler MG, Patwardhan AR, Ott JB, Kim CS, Leonelli FM, Knapp CF: Gender differences in autonomic cardiovascular regulation: spectral, hormonal, and hemodynamic indexes. *J Appl Physiol*. 2001;91: 2611–2618.
52. Fiedler B, Lohmann SM, Smolenski A, Linnemuller S, Pieske B, Schroder F, Molkenkin JD, Drexler H, Wollert KC: Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signalling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99: 11363–11368.
53. Fiedler B, Wollert KC: Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2004 Aug 15;63(3):450-7. Review.
54. Fielitz J, Hein S, Mitrovic V, Pregla R, Zurbrugg HR, Warnecke C, Schaper J, Fleck E, Regitz-Zagrosek V: Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Apr;37(5):1443-9.
55. Freedman BI, Beck SR, Rich SS, Heiss G, Lewis CE, Turner S, Province MA, Schwander KL, Arnett DK, Mellen BG; HyperGEN Investigators: A genome-wide scan for urinary albumin excretion in hypertensive families. *Hypertension*. 2003 Sep;42(3):291–6.
56. Frey N, Olson EN: Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:45-79. Molkenkin JD: Calcineurin, mitochondrial membrane potential, and cardiomyocyte apoptosis. *Circ Res*. 2001 Jun 22;88(12):1220-2.
57. Fuentes ME, Durham SK, Swerdel MR, Lewin AC, Barton DS, Megill JR, Bravo R, and Lira SA: Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol*. 1995.155:5769-5776.
58. Fuller PJ, Young MJ: Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension* 2005; 46: 1227–1235.
59. Funder JW: Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation. *Molecular and cellular endocrinology* 2004; 217:1-21-2, 263-269.
60. Gardner JD, Brower GL, Janicki JS: Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload. *J Card Fail*. 2002;8: 101–107.
61. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH: Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem*. 1996 Jul 26;271(30):17779-84.

62. Gilbert RE, Cooper ME: The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? *Kidney Int.* 1999;56:1627–1637.
63. Graef IA, Chen F, Crabtree GR: NFAT signaling in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev.* 2001 Oct;11(5):505-12. Review.
64. Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Stallone G, Schena FP: Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. *Transplantation.* 1997 Feb 15;63(3):414-20.
65. Greene EL, Kren S, Hostetter TH: Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest.* 1996 Aug 15;98(4):1063-8.
66. Gross V, Tank J, Obst M, Plehm R, Blumer KJ, Diedrich A, Dietrich A, Jorgan J, Luft FC: Autonomic nervous system and blood pressure regulation in RGS-2-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288:R1134–R1142.
67. Hammerer-Lercher A, Neubauer E, Muller S, Pachinger O, Puschendorf B, and Mair J: Head-to-head comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction. *Clin. Chim.* 2001a; Acta 310, 193-197.
68. Hayward CS, Webb CM, Collins P: Effect of sex hormones on cardiac mass. *Lancet.* 2001 Apr 28;357(9265):1354–6. Review.
69. Heineke J, Molkentin JD: Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways.. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Aug;7(8):589-600. Review.
70. Hill JA, Karimi M, Kutschke W, Davisson RL, Zimmerman K, Wang Z, Kerber RE, Weiss RM: Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation.* 2000 Jun 20;101(24):2863-9.
71. Ho AM, Jain J, Rao A, Hogan PG: Expression of the transcription factor NFATp in a neuronal cell line and in the murine nervous system. *J Biol Chem.* 1994 Nov 11;269(45):28181-6.
72. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A: Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 2003 Sep 15;17(18):2205-32. Review.
73. Hunter JJ, Chien KR: Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med.* 1999 Oct 21;341(17):1276-83. Review.
74. Jafar TH, Schmid CH, Stark PC, Toto R, Remuzzi G, Ruggenenti P, Marcantoni C, Becker G, Shahinfar S, De Jong PE, De Zeeuw D, Kamper AL, Stranggaard S, Levey AS: The rate of progression of renal disease may not be slower in women compared with men: a patient-level meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Oct;18(10):2047–53.
75. Karim R, Hodis HN, Stanczyk FZ, Lobo RA, Mack WJ: Relationship between

- serum levels of sex hormones and progression of subclinical atherosclerosis in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jan;93(1):131–8. Epub 2007 Oct 9.
76. Katholi RE, Naftilan AJ, Oparil S: Importance of renal sympathetic tone in the development of DOCA-salt hypertension in the rat. *Hypertension.* 1980;2:266 – 273.
77. Kawakami H, Okayama H, Hamada M, Hiwada K: Alteration of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide gene expression associated with progression and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats. *Clin Sci (Lond).* 1996 Mar;90(3):197-204.
78. Kelly R, Struthers AD: Are natriuretic peptides clinically useful as markers of heart failure? *Ann Clin Biochem.* 2001 Sep;38(Pt 5):575-83. Review.
79. Kincaid RL, Takayama H, Billingsley ML, Sitkovsky MV: Differential expression of calmodulin-binding proteins in B, T lymphocytes and thymocytes. *Nature.* 1987 Nov 12-18;330(6144):176-8.
80. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH: Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Dec;76(12):6270-3.
81. Klee CB, Ren H, Wang X: Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):13367-70.
82. Kreutz R, Hübner N: Congenic rat strains are important tools for the genetic dissection of essential hypertension. *Semin Nephrol.* 2002 Mar;22(2):135–47. Review.
83. Kreutz R: Therapy of hypertension. *Clin Res Cardiol.* 2006;95 Suppl 6:VI34–40. German.
84. Krumholz HM, Larson M, Levy D: Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension. *Am J Cardiol.* 1993 Aug 1;72(3):310–3.
85. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
86. Lamparter S, Maisch B: Significance of matrix metalloproteinases in cardiovascular diseases. *Z Kardiol.* 2000 Oct;89(10):949-57. Review.
87. Laughlin GA, Barrett-Connor E: Sexual dimorphism in the influence of advanced aging on adrenal hormone levels: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Oct;85(10):3561–8.
88. Levin A, Singer J, Thompson CR, Ross H, Lewis M: Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: identifying opportunities for intervention. *Am J Kidney Dis.* 1996 Mar;27(3):347–54.

89. Levin ER, Gardner DG, Samson WK: Natriuretic peptides. *N Engl J Med.* 1998 Jul 30;339(5):321-8.
90. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP: Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990 May 31;322(22):1561-6.
91. Lim HW, Molkenin JD: Reply to revisiting calcineurin and human heart failure *Nat Med.* 2000 Jan;6(1):3.
92. Lim HW, Molkenin JD: Calcineurin and human heart failure. *Nat Med.* 1999 Mar;5(3):246-7.
93. Lindpaintner K, Sen S: Role of sodium in hypertensive cardiac hypertrophy *Circ Res.* 1985 Oct;57(4):610-7.
94. Lorell BH, Carabello BA: Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation.* 2000 Jul 25;102(4):470-9. Review.
95. Lorenz JN, Robbins J: Measurement of intraventricular pressure and cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse. *Am J Physiol.* 1997 Mar;272(3 Pt 2):H1137-46.
96. Luchner A, Burnett JC Jr, Jougasaki M, Hense HW, Riegger GA, Schunkert H: Augmentation of the cardiac natriuretic peptides by beta-receptor antagonism: evidence from a population-based study. *J Am Coll Cardiol.* 1998 Dec;32(7):1839-44.
97. MacLellan WR, Schneider MD: Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:289-319. Review.
98. MacLellan WR: Advances in the molecular mechanisms of heart failure. *Curr Opin Cardiol.* 2000 May;15(3):128-35.
99. Mair J, Hammerer-Lercher A, Puschendorf B: The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure. *Clin Chem Lab Med.* 2001 Jul;39(7):571-88. Review.
100. Manalan AS, Krinks MH, Klee CB: Calcineurin: a member of a family of calmodulin-stimulated protein phosphatases. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1984 Oct;177(1):12-6.
101. Mason DY, Sammons R: Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol.* 1978 May;31(5):454-60.
102. McCaffrey PG, Luo C, Kerppola TK, Jain J, Badalian TM, Ho AM, Burgeon E, Lane WS, Lambert JN, Curran T, et al.: Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp. *Science.* 1993 Oct 29;262(5134):750-4.
103. Modena MG, Aveta P, Menozzi A, Rossi R: Aldosterone inhibition limits collagen

- synthesis and progressive left ventricular enlargement after anterior myocardial infarction. *Am Heart J.* 2001 Jan;141(1):41-6.
104. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN: A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 1998 Apr 17;93(2):215-28.
  105. Mulrone SE, Woda C, Johnson M, Pesce C : Gender differences in renal growth and function after uninephrectomy in adult rats. *Kidney Int.* 1999 Sep;56(3):944-53.
  106. Mundhenke M, Schwartzkopff B, Stark P, Schulte HD, Strauer BE: Myocardial collagen type I and impaired left ventricular function under exercise in hypertrophic cardiomyopathy. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Aug;50(4):216-22.
  107. Murray CJ, Lopez AD: Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 1997 May 17;349(9063):1436-42.
  108. Neugarten J, Acharya A, Silbiger SR: Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Feb;11(2):319-29.
  109. Nicholls MG, Robertson JIS, Inagami T: The Renin-Angiotensin System in the Twenty-first Century. *Blood Pressure* 2001 Nov; 10(5-6): 327-343(17).
  110. Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A, Crabtree GR: NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature.* 1994 Jun 9;369(6480):497-502.
  111. Oka T, Dai YS, Molkenin JD: Regulation of calcineurin through transcriptional induction of the calcineurin A beta promoter in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol.* 2005 Aug;25(15):6649-59.
  112. Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P: Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol.* 1995 Oct;26(4):1068-79.
  113. Orth SR, Amann K, Strojek K, Ritz E: Sympathetic overactivity and arterial hypertension in renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16 Suppl 1:67-9. Review.
  114. Packer M: Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. *Circulation.* 1988 Apr;77(4):721-30. Review.
  115. Pearlman ES, Weber KT, Janicki JS: Quantitative histology of the hypertrophied human heart *Fed Proc.* 1981 May 15;40(7):2042-7.
  116. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Levin ER: Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through

- induction of MCIP1. *J Biol Chem.* 2005;280: 26339–26348.
117. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M; Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators: Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2003 May 29;348(22):2271.
  118. Plumb DC; *Veterinary Drug Handbook.* PharmaVet Publishing, White Bear Lake (USA); 853 pp, 1999
  119. Proost P, Wuyts A, van Damme J: The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res.* 1996;26(4):211-23. Review.
  120. Rascher W, Lang RE, Taubitz M, Meffle H, Unger T, Ganten D, Gross F: Vasopressin-induced increase in total peripheral resistance in deoxycorticosterone acetate hypertensive rats is buffered by the baroreceptor reflex. *Clin Sci (Lond).* 1981 Dec;61 Suppl 7:153-156.
  121. Regitz-Zagrosek V, Brokat S, Tschöpe C: Role of gender in heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007 Jan–Feb;49(4):241–51. Review.
  122. Regitz-Zagrosek V: Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 May;5(5):425–38. Review.
  123. Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ: Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Mol Cell Endocrinol.* 2004 Mar 31;217(1-2):203-12. Review.
  124. Rollins BJ: Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol.Med.*1996.Today 2:198-204.
  125. Rossi GP, Cavallin M, Nussdorfer GG, Pessina AC: The endothelin-aldosterone axis and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001 Nov;38 Suppl 2:S49-52.
  126. Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS: A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem.* 2000 Mar 24;275(12):8719-25.
  127. Ruggenenti P, Perna A, Gherardi G, Gaspari, Benini R, Remuzzi G. Renal function and requirement for dialysis in chronic nephropathy patients on long-term ramipril: REIN follow-up trial. Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia (GI-SEN). Ramipril Efficacy in Nephropathy. *Lancet* 1998; 352(9136):1252-1256.
  128. Ruskoaho H: Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev.* 1992 Dec;44(4):479-602. Review.
  129. Ruwhof C, van der Laarse A: Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res.* 2000

- Jul;47(1):23-37. Review.
130. Saleh MC, Connell BJ, Saleh TM: Autonomic and cardiovascular reflex responses to central estrogen injection in ovariectomized female rats. *Brain Res.* 2000;879:105–114.
  131. Sambrook J, Gething MJ: Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* 1989 Nov 16;342(6247):224-5.
  132. 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.* 2007 Dec;306(1–2):221–30.
  133. Sanna B, Brandt EB, Kaiser RA, Pfluger P, Witt SA, Kimball TR, van Rooij E, De Windt LJ, Rothenberg ME, Tschoop MH, Benoit SC, Molkentin JD: Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May 9;103(19):7327-32.
  134. Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M: The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol.* 1987 Dec;133(3):579-84.
  135. Sato A, Suzuki Y, Saruta T: Effects of spironolactone and angiotensin-converting enzyme inhibitor on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 1999; 22: 17–22.
  136. Schillaci G, Verdecchia P, Borgioni C, Ciucci A, Zampi I, Battistelli M, Gattobigio R, Sacchi N, Porcellati C: Association between persistent pressure overload and ventricular arrhythmias in essential hypertension. *Hypertension.* 1996 Aug;28(2):284-9.
  137. Schillaci G, Verdecchia P, Reboldi G, Pede S, Porcellati C: Subclinical left ventricular dysfunction in systemic hypertension and the role of 24-hour blood pressure. *Am J Cardiol.* 2000 Sep 1;86(5):509–13.
  138. Schlöndorff D, Nelson PJ, Luckow B, Banas B: Chemokines and renal disease. *Kidney Int.* 1997 Mar;51(3):610-21. Review.
  139. Schmidt BM, Montealegre A, Janson CP, Martin N, Stein-Kemmesies C, Scherhag A, Feuring M, Christ M, Wehling M: Short term cardiovascular effects of aldosterone in healthy male volunteers. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;84(10):3528-33.
  140. Scholzen T, Gerdes J: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22. Review.
  141. Schroeder C, Adams F, Boschmann M, Tank J, Haertter S, Diedrich A, Biaggioni I, Luft FC, Jordan J: Phenotypical evidence for a gender difference in cardiac norepinephrine transporter function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*

- 2004;286:R851–R856.
142. Segerer S, Cui Y, Hudkins KL, Goodpaster T, Eitner F, Mack M, Schlöndorff D, Alpers CE: Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Dec;11(12):2231-42.
  143. Selye H, Hall CE, Rowley EM: Malignant hypertension produced by treatment with desoxicorticosterone acetate and sodium chloride. *Can Med Assoc J* 49: 88–92, 1943.
  144. Shin SY, Choo SM, Kim D, Baek SJ, Wolkenhauer O, Cho KH: Switching feedback mechanisms realize the dual role of MCIP in the regulation of calcineurin activity. *FEBS Lett.* 2006 Oct 30;580(25):5965-73.
  145. Silbiger SR, Neugarten J: The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1995 Apr;25(4):515–33. Review.
  146. Sluijmer AV, Heineman MJ, De Jong FH, Evers JL: Endocrine activity of the postmenopausal ovary: the effects of pituitary down-regulation and oophorectomy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Jul;80(7):2163–7.
  147. Soncin F, Asea A, Zhang X, Stevenson MA, Calderwood SK: Role of calcium activated kinases and phosphatases in heat shock factor-1 activation. *Int J Mol Med.* 2000 Dec;6(6):705-10.
  148. Spach C, Streeten DH: Retardation of sodium exchange in dog erythrocytes by physiological concentrations of aldosterone, in vitro. *J Clin Invest.* 1964 Feb;43:217-27.
  149. Sporn MB, Roberts AB: TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul.* 1990 Nov;1(12):875-82. Review.
  150. Statistisches Bundesamt 2007
  151. Stefenelli T: Wirkprinzip der AT1-Rezeptorblocker. *Journal für Kardiologie* 2000; 7 (Supplementum A), 3-5.
  152. Strack S, Wadzinski BE, Ebner FF: Localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in the hindbrain and spinal cord of the rat. *J Comp Neurol.* 1996 Nov 4;375(1):66-76.
  153. Takahashi N, Calderone A, Izzo NJ Jr, Mäki TM, Marsh JD, Colucci WS: Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor-beta 1 expression in rat ventricular myocytes. *J Clin Invest.* 1994 Oct;94(4):1470-6.
  154. Takahashi T, Allen PD, Izumo S: Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca(2+)-ATPase gene. *Circ Res.* 1992 Jul;71(1):9-17.
  155. Tamura T; Said S; Gerdes MA: Gender-Related Differences in Myocyte

- Remodeling in Progression to Heart Failure. *Hypertension*. 1999;33:676-680.
156. Tanabe A, Naruse M, Naruse K, Hase M, Yoshimoto T, Tanaka M, Seki T, Demura R, Demura H: Left ventricular hypertrophy is more prominent in patients with primary aldosteronism than in patients with other types of secondary hypertension. *Hypertens Res*. 1997 Jun;20(2):85-90.
  157. Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, Hunter JJ, Chien KR, Ross J Jr: Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation*. 1996 Sep 1;94(5):1109-17.
  158. Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park JK, Fiebeler A, Barta P, Ganten D, Haller H, Dietz R, Luft FC: Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord*. 2002;2:3. Epub 2002 Jan 18.
  159. Titze J, Luft FC, Bauer K, Dietsch P, Lang R, Veelken R, Wagner H, Eckardt KU, Hilgers KF: Extrarenal Na<sup>+</sup> balance, volume, and blood pressure homeostasis in intact and ovariectomized deoxycorticosterone-acetate salt rats. *Hypertension*. 2006 Jun;47(6):1101-7.
  160. Tumlin JA, Lea JP, Swanson CE, Smith CL, Edge SS, Someren JS: Aldosterone and dexamethasone stimulate calcineurin activity through a transcription-independent mechanism involving steroid receptor-associated heat shock proteins. *J Clin Invest*. 1997;99:1217-1223.
  161. Vakili BA, Okin PM, Devereux RB: Prognostic implications of left ventricular hypertrophy: *Am Heart J*. 2001 Mar;141(3):334-41.
  162. van Empel VP, De Windt LJ: Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act. *Cardiovasc Res*. 2004;63:487-499.
  163. van Rooij E, Doevendans PA, Crijns HJ, Heeneman S, Lips DJ, van Bilsen M, Williams RS, Olson EN, Bassel-Duby R, Rothermel BA, De Windt LJ: MCIP1 overexpression suppresses left ventricular remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res*. 2004; 94:e18-e26.
  164. Villari B, Campbell SE, Schneider J, Vassalli G, Chiariello M, Hess OM: Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload. *Eur Heart J*. 1995 Oct;16(10):1410-9.
  165. Wang Q, Hummler E, Nussberger J, Clement S, Gabbiani G, Brunner HR, Burnier M: Blood pressure, cardiac, and renal responses to salt and deoxycorticosterone acetate in mice: role of Renin genes. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:1509-1516.
  166. Wang Q, Hummler E, Nussberger J, Clement S, Gabbiani G, Brunner HR, Burnier M: Blood pressure, cardiac, and renal responses to salt and deoxycorticosterone acetate in mice: role of Renin genes. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:1509-1516.
  167. Weber KS, Nelson PJ, Gröne HJ, Weber C: Expression of CCR2 by endothelial

- cells implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Sep;19(9):2085-93.
168. Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol* 15: 264–272, 2000.
169. Weber KT: Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med.* 2001 Dec 6;345(23):1689-97. Review.
170. Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR, Molkentin JD: Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2004; 94:110 –118.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen und Symbole

Ak	Antikörper
ANP	atrial natriuretic peptid
BNP	brain natriuretic peptid
BSA	Bovines Serum Albumin
BPM	beats per minutes
Ca <sup>2+</sup>	Calzium
°C	Grad Celsius
CaM	Calmodulin
CaN	Calcineurin
cDNA	komplementäre DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d	diastole
dDNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DOCA	Desoxycorticosterone acetat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
et al.	et alii, und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunden
HE	Hämatoxylin Eosin

---

HG	Herzgewicht
HR	Herzfrequenz
IVS	intraventricular septum thickness
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
KG	Körpergewicht
Ki-67	Ki= Kiel, Ki-67 Antigen
L	Liter
LVID	left ventricular diameter
LVPW	left ventricular posterior wall thickness
m	Meter
M	Molar
MAD	mittlerer arterieller Druck
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MCIP1	modulatory calcineurin interacting protein
min	Minute
ml	Mililiter
mM	Milimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	$10^{-9}$
NaCl	Natriumchlorid
NFAT	Nuklear Factor of Activated T cells
NG	Nierengewicht
o.g.	oben genannten
PAS	periodic acid shiff
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	pH-Wert
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaktion
rpm	round per minute
RWT	relative Wanddicke
s	systole
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Elektrophoresis

---

Sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TBS	tris buffered saline
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor $-\beta$ 1
Uni-Nx	uninephrektomiert
UV	Ultraviolettes Licht
Vs.	versus
Vol.	Volumen
$\mu$	$10^{-6}$
10 x konz.	zehnfach konzentriert

## 7.2 Abbildungs-und Tabellenverzeichnis

### 7.2.1 Abbildungen

Abb. 1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	4
Abb. 2: Strukturelle Darstellung der katalytischen Calcineurin A-Untereinheit mit der Phosphatase-Domäne, regulatorischen Domäne mit Calcineurin B-Untereinheit, Calmodulin-Bindungsstelle und der autoinhibitorischen Domäne.....	13
Abb. 3: Calcineurin-NFAT-Signaltransduktionsweg des Herzens.....	16
Abb. 4: Urinausscheidung in ml/24h bei Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen. ....	41
Abb. 5: Kalium-Exkretion in mmol/24h bei Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	42
Abb. 6: Serum Kalium in Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	43
Abb. 7: Mittlerer Arterieller Druck (MAD) gemessen mittels Millar Katheter in Uni-Nx+Salz, Uni-Nx+Salz + DOCA sowie DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	44
Abb. 8: Herzfrequenz (BPM) gemessen mittels Millar Katheter in Uni-Nx+Salz, Uni-Nx+Salz + DOCA sowie DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	45
Abb. 9: Mittlerer arterieller Blutdruck (MABD) gemessen mittels Telemetrie in unbehandelten, Uni-Nx+Salz + DOCA sowie DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, während einer Versuchsdauer von 33 Tagen. ....	46
Abb. 10: Herzfrequenz gemessen mittels Telemetrie in unbehandelten, Uni-Nx+Salz + DOCA sowie DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, während einer Versuchsdauer von 33 Tagen. ....	47
Abb. 11: Repräsentativer echokardiographischer M-Mode eines männlichen Herzens. ....	48

Abb. 12: Ratio von Herzgewicht und Körpergewicht (HG/KG) von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	50
Abb. 13: Kardiomyozytenquerschnittsflächen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	51
Abb. 14: ANP mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz-Kontrollen und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	52
Abb. 15: BNP mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	53
Abb. 16: Calcineurin A- $\beta$ mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	54
Abb. 17: Modulatory Calcineurin Interacting Protein 1 (MCIP1) mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	55
Abb. 18: Repräsentative Western-Blots von pNFATc2 und total NFATc2 aus Mäuseherzlysaten von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	56
Abb. 19: HE-Färbung von Herzgewebe.....	57
Abb. 20: Ki67-Färbung von Herzschnitten.....	58
Abb. 21: Ki67 positive Zellen in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	59
Abb. 22: MCP1 mRNA-Genexpression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen. Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte $\pm$ SD.....	60
Abb. 23: TGF $\beta$ mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen. Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte $\pm$ SD.....	61
Abb. 24: Kollagen I mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	62

Abb. 25: Kollagen III mRNA-Expression in den Herzen von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	63
Abb. 26: Ratio von Nieren- und Körpergewicht (NG/KG) von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchsablaufes nach 6 Wochen.....	64
Abb. 27: PAS-Färbung von Nierengewebe. (A) Uni-Nx+Salz Kontroll-Männchen; (B) Uni-Nx+Salz Kontroll-Weibchen; (C) DOCA+Salz+Hydralazin-Männchen; (D) DOCA+Salz+Hydralazin-Weibchen am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	65
Abb. 28: Tubulus Durchmesser von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	66
Abb. 29: Ki67-Färbungen von Nierengewebe.....	67
Abb. 30: Ki67 positive Zellen in den Nieren von Uni-Nx+Salz- und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	68
Abb. 31: MCP-1 mRNA-Expression in den Nieren von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	69
Abb. 32: TGF $\beta$ mRNA-Expression in den Nieren von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	70
Abb. 33: Kollagen I mRNA-Expression in den Nieren von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	71
Abb. 34: Kollagen III mRNA-Expression in den Nieren von Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchs nach sechs Wochen.....	72

## 7.2.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primer Sequenz und Annealing Temperatur .....	35
Tab. 2: Echokardiographische M-Mode-Messungen vom linken Ventrikel in Uni-Nx+Salz und DOCA+Salz+Hydralazin behandelten männlichen und weiblichen Mäusen, am Ende des Versuchsablaufes nach 6 Wochen. ....	49

### 7.3 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Dragun für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Doktorarbeit und die Unterstützung im Verlauf der gesamten Promotion.

Ich möchte mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken. Ganz besonders möchte ich mich bei Yvonne Linde, Dr. Uwe Hoff, Melanie Näther, Philline Wagner, Dr. Daniela Fliegner, Kathleen Cantow, Dr. Carola Schubert, Dr. Volkmarr Groß und Prof. Schneider für die freundliche Unterstützung bedanken.

Vor allem möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Björn Hegner für die hingebungsvolle Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit bedanken.

Meiner Familie danke ich ganz herzlich für die unermüdliche Hilfe bei der Unterstützung meiner mütterlichen Pflichten und das Vertrauen in mich, vor allem meiner Mutter.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Mann Soner danken, der mir stets mit Geduld und Liebe zur Seite gestanden hat, und meinen Söhnen Baran und Merdan, die eines Tages verstehen werden, warum sie mich so oft entbehren mussten.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## 7.5 Publikationen

**Karatas A**, Hegner B, de Windt LJ, Luft FC, Schubert C, Gross V, Akashi YJ, Gürgen D, Kintscher U, da Costa Goncalves AC, Regitz-Zagrosek V, Dragun D: Deoxycorticosterone acetate-salt mice exhibit blood pressure-independent sexual dimorphism. *Hypertension*. 2008 Apr;51(4):1177-83. Epub 2008 Feb 7.

Riad A, Jäger S, Sobirey M, Escher F, Yaulema-Riss A, Westermann D, **Karatas A**, Heimesaat MM, Bereswill S, Dragun D, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschöpe C: Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *J Immunol*. 2008 May 15;180(10):6954-61

## Erklärung

„Ich, Aysun Karatas, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Sexuelle Dimorphismen bei Blutdruck unabhängigen Mechanismen des DOCA-Salz induzierten kardio-renalen Schadens der Maus selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift