Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Untersuchungen zur kardialen Funktion eines mRen2/SERCA2a doppelt-transgenen Hypertoniemodells

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Trinks

aus Dresden

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. R. Vetter

- 2. Priv.-Doz. Dr. med. M. Oppert
- 3. Priv.-Doz. Dr. med. D. Pappert

Datum der Promotion: 22.03.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		III	
Ab	bildungsver	zeichnis	\mathbf{V}
Ta	bellenverze	ichnis	VI
1.	Einleitung		1
	1.1.	Ca ²⁺ -Homöostase des intakten Kardiomyozyten	2
	1.2.	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums-SERCA2a	5
	1.3.	Ca ²⁺ -Homöostase bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz	8
	1.4.	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	11
	1.5.	Hypertonie-bedingte kardiale Hypertrophie	14
	1.6.	Das mRen2-transgene Rattenmodell	15
	1.7.	Zielstellung der Arbeit	17
2.	Material u	nd Methoden	18
	2.1.	Versuchstiere	18
	2.2.	Genotypisierung	19
	2.2.1	. Gewebeproben	19
	2.2.2	. Extraktion der genomischen DNA	19
	2.2.3	. Konzentrationsbestimmung der dsDNA	20
	2.2.4	. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
	2.2.5	. Gelelektrophorese	23
	2.3.	Histologische Untersuchung	24
	2.3.1	. Paraffineinbettung der Organe	24
	2.3.2	. Schneiden der linken Ventrikel	24
	2.3.3	. Färbung mit Sirius-Rot	24
	2.3.4	. Bildaufnahme	25
	2.4.	Hämodynamische Messungen	25
	2.4.1	. Präparation und Katheterisierung der Versuchstiere	25
	2.4.2	. Datenaufzeichnung und -verarbeitung	27
	2.4.3	. ß-adrenerge Stimulation mit Dobutamin	29
	2.4.4	. Antagonisierung der β_1 -Adrenorezeptoren mittels Metoprolol	29
	2.4.5	. Organentnahme	29
	2.5.	Ca ²⁺ -Transport	30
	2.5.1	. Herzhomogenate	30
	2.5.2	Proteinbestimmung	30
	2.5.3	. Oxalat-stimulierter ⁴⁵ Ca ²⁺ -Transport	31
	2.6.	Statistik	33

3.	Ergebnisse		34
	3.1. Charak	sterisierung der Versuchstiere	34
	3.1.1. Wurfgröße, Genotypenverteilung und Überlebenszeit der Tiere		34
	3.1.2.	Genotypisierung	36
	3.1.2.1.	Nachweis des mRen2-Transgens	36
	3.1.2.2.	Nachweis des SERCA2a-Transgens	37
	3.1.3.	Grad der kardialen Fibrosierung	37
	3.1.4.	Basischarakterisierung der Tiere	39
	3.2. Hämo	dynamische Funktionsparameter	41
	3.2.1.	Aortaler Blutdruck	41
	3.2.2.	Systolische linksventrikuläre Funktion	44
	3.2.2.1.	Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP)	45
	3.2.2.2.	Maximale systolische Druckanstiegsgeschwindigkeit (+d P/dt_{max})	48
	3.2.2.3.	Kraft-Frequenz-Produkt	52
	3.2.2.4.	Zeitintervall der systolischen Druckentwicklung	53
	3.2.3.	Diastolische linksventrikuläre Funktion	55
	3.2.3.1.	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)	55
	3.2.3.2.	maximale diastolische Druckabfallsgeschwindigkeit (-dP/dt_max)	57
	3.2.3.3.	Zeitparameter der diastolischen Relaxation	60
	3.3. Arrhytl	hmien	65
	3.4. SERCA	A2a- vermittelter Ca ²⁺ -Transport	66
4.	Diskussion		69
	4.1. mRen2	2-transgenes Rattenmodell	70
	4.1.1.	Arterielle Hypertonie	70
	4.1.2.	Kardiale Hypertrophie	72
	4.1.3.	Überleben mRen2-transgener Tiere	73
	4.2. SERCA	A2a/mRen2-doppeltransgenes Rattenmodell	74
	4.2.1.	Veränderungen der linksventrikulären Funktion	75
	4.2.2.	Systolische Funktionsparameter	76
	4.2.3.	Diastolische Funktionsparameter	79
	4.3. Die tra	nsgene Ratte als Modell der Herzinsuffizienz	83
	4.4. Einflus	ss der zusätzlichen Expression des SERCA2a-Transgens auf die	85
	Arrhyt	hmogenese bei kardialer Hypertrophie	
5.	Zusammenfa	assung	87
6.	Literaturverz	zeichnis	89
7	Anlagen		101
1.	7.1. Danks	agung	101
	7.2. Selbsts	tändigkeitserklärung	102
	7.3. Curricu	ulum vitae	103
	7.4. Veröffe	entlichungen	104

Abkürzungsverzeichnis

- dP/dt _{max}	maximale Druckabfallgeschwindigkeit
$+ dP/dt_{max}$	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
$[Ca^{2+}]$	Konzentration von Calciumionen
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACE2	Angiotensin-Converting-Enzym Typ 2
ACI	Arteria carotis interna
ADP	Adenosin-di-phosphat
АНА	American Heart Association
ANG I	Angiotensin 1
ANG II	Angiotensin 2
AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
AT I	Angiotensin-Rezeptor Subtyp 1
AT II	Angiotensin-Rezeptor Subtyp 2
АТР	Adenosin-tri-phosphat
BD	Blutdruck
Ca ²⁺	Calciumion
CaMKII	Calcium-Calmodulin-Kinase 2
cAMP	zyklisches Adenosin-mono-phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAD	delayed afterpolarization (verspätete Nachdepolarisation)
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EAD	early afterdepolarization (verfrühte Nachdepolarisation)
ES	Extrasystolen
HF	Herzfrequenz
HI	Herzinsuffizienz
kDA	kilodalton
LTCC	L-Typ Calcium-Kanäle
LVdP	linksventrikulär entwickelter systolischer Druck
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
M6P	Mannose-6-Phosphat
MAP	mitogen-aktivierte Proteinkinase

Mg^{2+}	Magnesiumion
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NFAT	nuclear factor of activated T-cells - Transkriptionsfaktor
NTG	nicht-transgene Tiere
PCR	Polymerasekettenreaktion
РНТ	Pressure-half-time
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PLZF	Promyelozyten Leukämie Zink Finger Protein
РМСА	sarkolemmale Calciumpumpe
PP1	Proteinphosphatase 1
РДТ	pressure-quater-time
RAAS	systemisches Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAS	lokales Renin-Angiotensin-System
rate*pressure	Frequenz-Druck-Produkt
Ren2	mRen2-transgene Tiere
RnBP	Reninbindungsprotein
RR	Ruthenium-Rot
RyR	Ryanodinrezeptor
SERCA2a	Ca ²⁺ -ATPase des kardialen sarkoplasmatischen Retikulums
SERen	SERCA2a/mRen2-doppeltransgene Tiere
SLN	Sarcolipin
Sparks	spontane sarkoplasmatische Ca ²⁺ -Entladungen
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
ssDNA	Einzelstrang-DNA
TTCC	T-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle
WΤ	Spraque-Dawley Ratten vom Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.	Schematischer Darstellung transmembranärer Ca2+-Ströme eines intakten	3
	Kardiomyozyten während eines Kontraktionsablaufes	
Abb.1.2.	Schematisches Modell der Ca ²⁺ -ATPase SERCA2a in der Membran des	6
	Sarkoplasmatischen Retikulums	
Abb. 1.3.	Schematische Darstellung veränderter transmembranärer Ca2+-Ströme	10
	eines Kardiomyozyten pathologisch hypertrophierter insuffizienter Her-	
	zen	
Abb. 1.4.	Schematische Darstellung der enzymatischen Kaskade des systemischen	12
	Renin-Angiotensin-Systems	
Abb. 1.5.	Schematische Darstellung der Induktion kardialer Hypertrophie	15
Abb. 2.1.	Teilsequenz der für die Genotypisierung verwendeten transgenspezifi-	21
	schen Primer	
Abb. 2.2.	Schematische Darstellung der PCR zur Amplifizierung der transgenspezi-	23
	fischen Teilsequenzen	
Abb. 2.3.	Prinzip der Oxalat-stimulierten Ca ²⁺ -Aufnahme	32
Abb. 3.1.	Anzahl der Ren2-/SERen-Nachkommen	34
Abb. 3.2.	Wurfgrößenverteilung der untersuchten SERCA2a-/Ren2-/SERen-Tiere	35
Abb. 3.3.	Überlebensrate von Ren2-/SERen-Tieren	35
Abb. 3.4.	Nachweis des mRen2-Gens in Ren2-/SERen- und SERCA2-Tieren	36
Abb. 3.5.	Nachweis des transgenspezifischen SERCA2a-Gens in Ren2- und SERen-	37
	Tieren	
Abb. 3.6.	Exemplarische Histologie des linken Ventrikels von WT-/SERCA2-	38
	/Ren2- und SERen-Tieren	
Abb. 3.7.	Exemplarischer supravalvulärer aortaler Blutduckverlauf	41
Abb. 3.8.	Aortaler Blutdruck und Herzfrequenz	43
Abb. 3.9.	Repräsentativer linksventrikulärer Druckverlauf	45
Abb. 3.10.	Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP)	45
Abb. 3.11.	Beziehung des LVdP zum LV-Gewicht	46
Abb. 3.12.	LVdP unter ß-adrenerger Stimulation mit Dobutamin	47
Abb. 3.13.	LVdP unter ß-adrenerger kompetitiver Hemmung mit Metoprolol	48
Abb. 3.14.	Maximale linksventrikuläre systolische Druckanstiegsgeschwindigkeit	49
	$(+dP/dt_{max})$	

Abb. 3.15.	Beziehung der +dP/dt _{max} zum LVdP	49
Abb. 3.16.	$+dP/dt_{max}$ unter ß-adrenerger Stimulation mit Dobutamin	50
Abb. 3.17.	$+dP/dt_{max}$ bei ß-adrenerger kompetitiver Hemmung mit Metoprolol	51
Abb. 3.18.	Kraft-Frequenzprodukt (rate*pressure) SERCA2a-transgener Tiere	52
Abb. 3.19.	Kraft-Frequenzprodukt (rate*pressure) hypertensiver Versuchstiere	53
Abb. 3.20.	Frequenzabhängigkeit der systolischen Druckentwicklung	54
Abb. 3.21.	Systolische Druckentwicklung unter ß-adrenerger Stimulation bzw. kom-	54
	petitiver Hemmung	
Abb. 3.22.	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)	55
Abb. 3.23.	LVEDP unter B-adrenerger Stimulation mit Dobutamin	56
Abb. 3.24.	LVEDP unter ß-adrenerger kompetitiver Hemmung mit Metoprolol	57
Abb. 3.25.	Maximal entwickelte linksventrikuläre diastolische Druckabfallsgeschwin-	57
	digkeit (-dP/dt _{max})	
Abb. 3.26.	Beziehung der -dP/dt _{max} zum LVdP	58
Abb. 3.27.	$-dP/dt_{max}$ unter ß-adrenerger Stimulation mit Dobutamin	59
Abb. 3.28.	-dP/dt _{max} unter ß-adrenerger kompetitiver Hemmung mit Metoprolol	60
Abb. 3.29.	Darstellung der Zeitparameter des diastolischen Druckabfalls	60
Abb. 3.30.	Zeitparameter des diastolischen Druckabfalls	61
Abb. 3.31.	Zeitparameter des diastolischen Druckabfalls unter ß-adrenerger Stimula-	63
	tion mit Dobutamin	
Abb. 3.32.	Zeitparameter des diastolischen Druckabfalls unter B-adrenerger kompe-	64
	titiver Hemmung mit Metoprolol	
Abb. 3.33.	Oxalat-stimulierter ⁴⁵ Ca ²⁺ -Transport in linksventrikulären Homogenate bei	66
	verschiedenen ⁴⁵ Ca ²⁺ -Konzentrationen	

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1.	Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches	22
Tab. 3.1.	Allgemeine Charakterisierung der Versuchstiere	40
Tab. 3.2.	Aortaler Blutdruck und Herzfrequenzen unter ß-adrenerger kompetitiver	44
	Hemmung mit Metoprolol	
Tab. 3.3.	Veränderungen der Oxalat-stimulierten ⁴⁵ Ca ²⁺ -Transportrate sarkoplas-	67
	matischer Membranvesikel unter Einfluss der ⁴⁵ Ca ²⁺ -Konzentration und	
	der Wirkung von Ruthenium- Rot	

1.Einleitung

1. Einleitung

In Deutschland starben im Jahr 2008 nach Angaben des Statistischen Bundesamtes ca. 50.000 Patienten an den Folgen einer chronischen Herzinsuffizienz (HI)². In Europa leiden durchschnittlich 7% aller Personen, die älter als 55 Jahre sind, an einer HI³. In den USA konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz der HI in der Altersgruppe über 80 Jahren sogar bei 25% liegt⁴. Trotz großem therapeutischen Aufwand überleben lediglich 42% der diagnostizierten Patienten die ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung. Andere Daten legen jedoch eine weniger dramatische Entwicklung dar⁵. Dieser Unterschied ist auf eine immer noch uneinheitliche Definition der chronischen HI zurück zu führen. Die American Heart Association (AHA) als führendes Institut in der Bewertung herzinsuffizienzrelevanter Themen, definiert die Herzinsuffizienz als Unvermögen des Herzens durch eingeschränkte Funktionalität des linken Ventrikels ausreichend Blut auszuwerfen oder sich zu füllen. Daraus resultiert eine insuffiziente Oxygenierung der Gewebe. Klinisch manifestiert sich dies in Form belastungsinduzierter Dyspnoe, Abgeschlagenheit, Flüssigkeitsretention mit der Gefahr pulmonaler Ödembildung sowie der Ausbildung peripherer Ödeme⁶. Anhand dieser Kriterien werden Stadien eingeteilt, die abhängig vom bestehenden Risikoprofil und den klinischen Untersuchungsergebnissen sind. Prinzipiell lassen sich eine diastolische und eine systolische Funktionseinschränkung differenzieren. In fortgeschrittenem Krankheitsstadium besteht zumeist eine Globalinsuffizienz. Dies hat zur Folge, dass eine exakte klinische Evaluierung auf Grund der Komplexität des Krankheitsbildes schwierig ist. Unbestritten ist hingegen, dass ein Zusammenspiel verschiedener Risikofaktoren die Ausprägung der Erkrankung beeinflusst. Ein Großteil der beobachteten Herzinsuffizienzen ist auf eine ischämische Myokardschädigung zurückzuführen⁵. Etablierte Risikofaktoren des Myokardinfarkts wie arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie, Adipositas und Nikotinabusus stellen auch eigene Entitäten in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz dar⁷. Neben seltenen Pathomechanismen, wie beispielsweise der genetisch bedingten hypertroph-obstruktiven Kardiomyopathie oder dem obstruktiven Schlafapnoesyndrom, stellt noch immer die arterielle Hypertonie den wichtigsten nicht-ischämischen ätiologischen Faktor in der Entstehung einer HI dar^{8, 9}. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes sind in Deutschland ca. 29% aller Einwohner von einer andauernden arteriellen Hypertension betroffen. Die der Hypertension zu Grunde liegenden Mechanismen sind ebenso vielfältig wie die des Myokardinfarkts. Jedoch kann unabhängig von der Ätiologie der arteriellen Hypertonie eine Veränderung des Myokards beobachtet werden. Durch strukturellen Umbau myokardialen Gewebes im Sinne einer pathologischen Myokardhypertrophie und zellulären bzw. molekularen Modifikationen kann eine persistierende Hypertonie den herzinsuffizienztypischen kardialen Phänotyp bedingen¹⁰. Dies ist in dem dieser Arbeit zu Grunde liegendem mRen2- bzw. mRen2/SERCA2a-transgenen hypertensiven Ratenmodell der Fall¹¹. An diesem hypertensiven Tiermodell können nicht nur die Auswirkungen der hämodynamischen Aspekte der arteriellen Hypertonie auf die Entwicklung einer Myokardhypertrophie, sondern gleichzeitig die humoralen Effekte des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) auf Hypertonie und Herzinsuffizienz untersucht werden¹². Im Fokus der Untersuchungen stehen dabei die Veränderungen der intrazellulären Ca²⁺-Regulation des Herzens¹³⁻¹⁵. Unter den Vorrausetzungen einer kardialen Hypertrophie konnten geänderte Ca²⁺-Ströme/ bzw. -Transportmechanismen über das Sarkolemm und die Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) beschrieben werden¹⁶. In überwiegender Zahl konnte eine reduzierte Aktivität der SR-Ca²⁺-ATPase SER-CA2a, welche den Ca²⁺-Rücktransport ins SR katalysiert, mit einer diastolischen Dysfunktion in kausalen Zusammenhang gestellt werden. Daher bestand das Ziel dieser Arbeit darin, den Einfluss einer konsekutiven Expression von SERCA2a auf die Funktion hypertrophierter Herzen von mRen2-transgenen Ratten mit Renin-bedingter arterieller Hypertonie zu untersuchen.

1.1. Ca²⁺-Homöostase des intakten Kardiomyozyten

Die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration der Kardiomyozyten und deren rhythmische Veränderungen sind essentiell für den Erregungsablauf, die Kraftentwicklung und Relaxation des Herzens. Daher soll im Folgenden die Regulation des intrazellulären Ca²⁺ aufgezeigt werden.

Die einzelnen Kardiomyozyten sind untereinander durch transmembranäre Konnektionsproteine, den Gap-junctions, miteinander verbunden und bilden ein elektrophysiologisches sowie funktionelles Synzytium¹⁷. Das im Sinusknoten generierte Schrittmacherpotential wird über das Reizleitungssystem des Herzen zu den einzelnen Kardiomyozyten übertragen. Dort löst diese Potentialänderung des Ruhemembranpotentials der Zelle ein Aktionspotential aus. Die Änderung des sarkolemmalen Membranpotentials führt über Aktivierung spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle zum Na⁺-Einstrom. Daraus resultiert der depolarisierende Aufstrich des Aktionspotentials. Spannungsabhängige L-Typ Ca²⁺-Kanäle (LTCC) werden dadurch aktiviert und es wird ein ebenfalls depolarisierender Einstrom von Ca²⁺ ausgelöst, das so genannte Trigger-Ca²⁺. Weitere sarkolemmale Ca²⁺-Kanäle wie beispielsweise der T-Typ Ca²⁺-Kanal (TTCC) sind beschrieben worden, doch tragen diese Ionenkanäle mehr zur Generierung des Schrittmacherpotentials in Zellen des Reizleitungssystems bei¹⁸. Der LTCC-vermittelter Ca²⁺-Einstrom wird durch die Interaktion von Ca²⁺ und dem Ca²⁺-Bindungsprotein Calmodulin selbstlimitierend beendet¹⁹. Das eingeströmte Trigger-Ca²⁺ bewirkt nun eine Freisetzung von gespeichertem Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Diese Zellorganelle stellt die wichtigste Schaltzentrale in der intrazellulären Ca2+-Regulation dar.

1.Einleitung



Abb. 1.1. Schematische Darstellung transmembranärer Ca²⁺-Ströme eines intakten Kardiomyozyten während eines Kontraktionsablaufes

Durch Änderungen des Membranpotentials zu Beginn der Systole kommt es über spannungsabhängige L-Typ-Ca²⁺-Kanäle zum Einstrom von Ca²⁺ [1], welches einen Ca²⁺-Ausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über Ryanodin-sensitive Kanäle (RyR) bewirkt [2]. Die Erhöhung der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration führt zur Kontraktion der Myofilamente über ATP-abhängige Aktin-Myosin-Bewegungen. Durch den ATP-katalysierten Ca²⁺-Transport über SERCA2a ins SR wird die diastolische Ca²⁺-Konzentration wiederhergestellt und damit die Relaxation ermöglicht [3]. Die Senkung der Ca²⁺-Konzentration auf diastolische Werte wird durch sarkolemmalen NCX-Efflux [4], sarkolemmale Ca²⁺-ATPase[5] und mitochondrialen Uniporter[6] unterstützt. PLB – Regulatorprotein Phospholamban der SERCA2a, CaMKII - Ca²⁺-Calmodulin abhängige Proteinkinase, * - RyR assoziertes Stabilisatorprotein FKBP12.6 mit SR-Proteinkomplex aus Calsequestrin-Calstabin-Triadin-Junctin. Modifiziert nach Bers et al. ²⁰

Das SR kann in funktionelle Einheiten untergliedert werden. Neben dem longitudinalen Anteil, welcher die Myofilamente umgibt, stellt der in Diaden bzw. Triaden gegliederte transversale Teil die Verbindung zu den sarkolemmalen T-Tubuli dar²¹. In diesem transversalem Anteil des SR sind SR-Ca²⁺-Freisetzungskanäle in dichter Assoziation an LTCC lokalisiert, welche nach Aktivierung durch das Trigger-Ca²⁺ einen Ca²⁺-Strom in das Zytosol bedingen. Diese Funktionskanäle vom Ryanodinrezeptortyp (RyR) sind in der Membran des SR zu 200 µm messenden Einheiten von bis zu 100 transmembranären RyR-Proteinen zusammengefasst²². Im Säugerorganismus lassen sich drei verschiedene RyR-Isoformen RyR1-3 nachweisen, wobei in der Membran des SR eines Kardiomyozyten fast ausschließlich RyR vom Typ 2 (RyR2) zu finden sind²³. RyR2 sind mit verschiedenen Regulatoren assoziiert, welche die Ca²⁺-Freisetzung modulieren. An der zytoplasmatischen Domäne dieses Kanals konnte das inhibitorisch wirkende FKB-506 Bindungsprotein (FKBP12.6) beschrieben werden. Neben dem zytoplasmatischen Ca²⁺-Bindungsprotein Sorcin, welches die Verbindung zum LTCC herstellt, sind weitere Proteine des SR beschrieben, welche ebenfalls die Aktivität des RyR2 als Inhibitoren modulieren²⁴. Ein anderer Mechanismus, welcher Ca^{2+} zur Verfügung stellen und damit eine myokardiale Kontraktion auslösen kann, ist prinzipiell der Ca^{2+} -Einstrom über den sarkolemmalen Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX)²⁰. Dieser elektrogene Antiporter transportiert 3 Na⁺ gegen 1 Ca²⁺-Ion. Die Hauptaufgabe dieses Transportproteins ist allerdings der Auswärtstransport zytosolischen Ca²⁺, welches bei jedem Aktionspotential (AP) in die Zelle gelangt. Treibende Kraft für diesen Ca²⁺-Efflux ist der transsarkolemmale Na⁺-Gradient getriebene Ca²⁺-Efflux (I_{NCX}). Jedoch können auch lokale Anstiege der [Na⁺]_i vor und während des Aufstrichs eines AP's und Membranpotentialänderungen an sich einen Ca²⁺-Influx über den NCX (I_{NCX rev}) bewirken und somit auch zu einer Aktivierung von RyR2 führen.

Innerhalb eines Zeitraumes von annähernd 100 ms bewirkt die Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR über die RyR2 eine Anhebung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺], von einem basalen Wert von <10⁻⁷mol/l auf 10⁻⁵mol/l. Entscheidend für das Ausmaß dieser Ca²⁺-Freisetzung ist neben dem Aktivitätsgrad der RyR2 auch die sarkoplasmatische Ca²⁺-Konzentration. Diese entspricht im Normalfall dem ca. 100-fachen der zytosolischen [Ca²⁺]. Die intrasarkoplasmatische Ca²⁺-Konzentration hat Auswirkungen auf die Affinität des RyR2 und damit indirekt auch dem Ca²⁺-Efflux aus dem SR. Neben einer direkten Bindungsstelle für Ca²⁺-Ionen wird diese Interaktion durch Calsequestrin vermittelt und kann bei einer zu geringen [Ca²⁺]_{SR} dazu führen, dass keine Herzaktion erfolgt²⁴. Freie Ca²⁺-Ionen im SR werden an das Ca²⁺-Bindungsprotein Calsequestrin gebunden. Dieses luminale Protein besitzt eine hohe Ca²⁺-Bindungskapazität von 800-900 nmol Ca²⁺/mg Protein (ca. 40 mol Ca²⁺/mol Calsequestrin). Dies wird durch eine hohe Anzahl negativ polarisierter Aminosäurereste ermöglicht²⁵.

Bei regulärer elektromechanischer Kopplung führt der systolische Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zur Bindung von Ca^{2+} an Troponin C. Diese Bindung führt durch Interaktion mit Troponin I dazu, dass Tropomyosin und Troponin T eine Konformationsänderung erfahren. Nun ist unter ATP-Verbrauch ein Weiterwandern der Aktin-Myosin-Bindung um ein Aktinmonomer gewährleistet, woraus die Kontraktion des Kardiomyozyten resultiert²⁶. Der zugrundeliegende Mechanismus der Beendigung des Ca^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -Effluxes aus dem SR ist bisher noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Ca^{2+} -Freisetzung durch die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und Absenkung der $[Ca^{2+}]_{SR}$ durch nachfolgende Änderung der RyR-Konfiguration endet^{23, 27}. Es wurden bisher vier konkurrierende Systeme in Kardiomyozyten beschrieben welche die $[Ca^{2+}]_i$ wieder auf die basale diastolische Konzentration von 150nM senken und damit die kardiale Relaxation durch Beendigung der Aktin-Myosin-Interaktion einleiten ²⁸. Ca. 70-90% dieser diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ -Senkung wird durch einen Ca^{2+} -Transport ins SR über eine an der Membran des sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Retikulums befindliche Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) katalysiert. Dadurch wird das SR wieder ausreichend mit Ca²⁺ für die nachfolgende Kontraktion beladen. Das Ca²⁺-Transportprotein SERCA2a wird im Folgenden Abschnitt noch exakter beschrieben, da sie das zentrale Protein für die zytoplasmatischen Ca²⁺-Regulation darstellt. Um die Zelle vor einer Ca²⁺-Überladung durch LTCC-vermittelten Ca²⁺-Influx zu bewahren, wird auch Ca²⁺ über den bereits beschriebenen I_{NCX} in den Extrazellularraum befördert. Zusätzlich kann ein Ca²⁺-Efflux durch ATP-abhängigen Transport über das Sarkolemm beobachtet werden. Dieser wird von einer sarkolemmalen Ca²⁺-ATPase (PMCA) katalysiert. Jedoch sind die Transportkapazitäten dieser ATPase sehr gering und damit ist von keinem relevanten Einfluss dieses Transportes auf die myokardiale Ca²⁺-Homöostase auszugehend. Simultan dazu kann ein Ca²⁺-Transport in das Mitochondrium über den mitochondrialen Ca²⁺-Uniporter beobachtet werden. Für die diastolische Relaxation ist dieser Ca²⁺-Transport von geringer Relevanz, doch zeigt sich hier erstmals, dass die zyklische intramyokardiale Ca²⁺-Konzentrationsänderung nicht allein der Kontraktion der Zelle dient, sondern auch regulatorisch Einfluss auf den Energiestoffwechsel nimmt.

1.2. Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums – SERCA2a

Im humanen Kardiomyozyten wird das zur Kontraktion und damit zur Kraftentwicklung nötige Ca²⁺ hauptsächlich aus dem SR bereitgestellt. Dort wird es durch transmembranären Ca²⁺-Transport diastolisch konzentriert. Dieser Ca²⁺-Strom wird durch die Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Retikulums SERCA2a von einem Molekulargewicht von 110 kDa katalysiert. Die ATPasen vom P-Typ katalysieren den Aufbau eines Ionengradienten unter der Hydrolyse von energiereichem Adenosintriphosphat (ATP)²⁹. Es sind bisher acht Isoformen identifiziert wurden, die gewebespezifisch exprimiert werden und durch alternatives Spleißen von drei bekannten Genen entstehen³⁰. Auf mRNA-Ebene konnten 11 verschieden Isoformen ausfindig gemacht werden. Diese Diskrepanz entsteht dadurch, dass sich verschiedene Spleißvarianten nur durch differente Sequenzen in Introns unterscheiden und daher dasselbe Protein resultiert.

Das auf Chromosom 12 lokalisierte ATP2A2-Gen kodiert die im Herzmuskel exprimierte Isoform SERCA2a. Zusätzlich findet sich SERCA2a auch im langsam kontrahierenden, roten Skelettmuskel und temporär in neonatalen Skelettmuskelzellen. Die Isoform 2a ist die erste Variante des alternativen Spleißens der ubiquitär zu findenden Isoform 2b. Diese zwei annähernd homologen Isoformen unterscheiden sich nur durch vier Aminosäuren (AS) des C-Terminus³¹. Neben den schnell zuckenden, weißen Skelettmuskeln kann SERCA2b in fast allen Geweben gefunden werden³². Eine Besonderheit stellt die SERCA2c-Isoform dar, die zu Beginn nur in Epithelzellen, mesenchymalen Zellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen gefunden werden konnte³³. Eine Untersuchung legt aber den Verdacht nahe, dass diese Isoform auch in hypertrophierten Kardiomyozyten exprimiert wird³⁴. Auf Chromosom 16 konnte das Gen ATPA1 identifiziert werden, welches die hauptsächlich im weißen Skelettmuskel zu findende SERCA1a kodiert.



Abb.1.2. Schematisches Modell der Ca²⁺-ATPase SERCA2a in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums

Hochaffine Ca²⁺-Bindungsstellungen sind in den acht transmembranären α-Helices dargestellt. Zusätzliche Darstellung des assoziierten Regulatorproteins Phospholamban (PLB) mit den zytoplasmatischen Phosphorylierungsstellen. Modifiziertes Schema nach MacLennan³⁵

In neonatalen und pathologisch hypertrophierten Myozyten ist eine Spleißvariante, die SER-CA1b, identifiziert worden³⁶⁻³⁸. Des Weiteren konnten noch drei weitere Spleißvarianten einer durch das ATP2A3-Gen auf Chromosom 17 kodierten SERCA3-Isoform in Zellen des lymphatischen Systems gefunden werden³⁹. In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt aber auf der Isoform SERCA2a, da sie mit ca. 40% des Gesamtproteingehalts des SR die Schlüsselrolle in der kardialen Ca²⁺-Regulation einnimmt⁴⁰. Aus der cDNA der kardialen SERCA2a-Isoform kann ein 110kDa großes Protein mit 997AS abgeleitet werden³¹. Ein aus Rattenkardiomyozyten stammendes SER-CA2a-Protein unterscheidet sich vom humanen Korrelat nur durch einige wenige AS, die aber funktionell inaktiv sind. Daher ist hier eine Homologie anzunehmen. Durch verschiedene biochemische Analysen konnte die Struktur von SERCA2a bestimmt werden. Das Protein lässt sich in einen großen zytoplasmatischen und einen kleineren transmembranären Anteil, welcher auch die luminale Komponente im SR birgt, strukturell untergliedern. Der transmembranäre Anteil ist aus zehn α-Helices zusammengesetzt, welche sich zu einer kanalanalogen Struktur organisieren. Hier findet sich das funktionelle Zentrum des Proteins mit der Ca²⁺-Bindungsstelle und den Translokationsmechanismus. Der an diese α-Helices assoziierte SR-luminale Anteil bildet den Kontakt zum intrasarkoplasmatischen Raum und ist im Vergleich zum extramembranären zytosolischen Anteil des Proteins von geringerer Relevanz⁴¹. Neben einer kleinen zytosolischen Schleife, der β-Domäne, welche bei der Konformationsänderung im Zuge des Ca²⁺-Translokationsprozesses bedeutsam wird, konnte eine große zytoplasmatische Schleife identifiziert werden. Hier findet sich am Aspartatrest 351 die Phosphorylierungstelle von SERCA2a, welche maßgeblich die Interaktion mit Phospholamban (PLB) modifiziert. Die Bindungsstelle von Phospholamban ist räumlich in der Nähe dieses Aminosäurerestes lokalisiert. Neben einer Nukleotidbindungsstelle, welche ebenfalls die Ca²⁺-Affinität des Enzyms reguliert, ist an der gro-Ben zytoplasmatischen Schleife eine ATP-Bindungsstelle zum Hydrolyse-katalysiertem Ca2+-Transport lokalisiert³⁵. Durch Hydrolyse von Mg²⁺-ATP erfolgt eine Autophosphorylierung des SERCA2a-Proteins an dem beschriebenen Aspartatrest. Durch die Bindung von Ca²⁺-Ionen an die transmembranäre α-Helix im Inneren des Enzyms entsteht eine energiereiche Verbindung. Durch die somit initiierte Änderung der Proteinstruktur von SERCA2a, bei der die Ca²⁺-Bindungsstelle an die luminale Seite gelangt, wird nun ein energieärmerer Zustand erreicht. Dies stellt die treibende Kraft für den transmembranären Ionentransport dar. Da bei dieser nun erreichten Enzymkonformation die Affinität der Bindungsstelle für Ca²⁺ um das 100-fache geringer ist, diffundieren die Ionen in Lumen des SR ab. Durch erneute Hydrolyse der intermediären Phosphorverbindung wird der Ausgangszustand des Enzyms erreicht²⁹. Während eines Zyklus können damit maximal zwei Mol Ca²⁺ pro einem Mol hydrolysiertem ATP bewegt werden.

Die Transportkapazität der sarkoplasmatischen SERCA2a stellt keine feste Größe dar, sondern ist durch verschiedene Faktoren modulierbar. Dies ist nötig um die differenzierte Anpassung der Herzaktion an unterschiedliche Anforderungen zu gewährleisten. Die Kapazität des sarkoplasmatischen Ca²⁺-Transports ist durch zwei unabhängige Modalitäten reguliert. Zum einen stellt die SERCA2a-Expression, die durch die Promoteraktivität des ATP2A2-Gens und der Stabilität der messenger-RNA bestimmt wird, einen limitierenden Faktor dar^{42, 43}. Bei einer Halbwertszeit des SERCA2a-Proteins von zwei bis drei Tagen ist dies ein Weg der längerfristigen Regulierung⁴⁴.

Zum anderen begrenzt die Ca²⁺-Affinität des Enzyms die maximale Ca²⁺-Transportaktivität. Dies geschieht neben der direkten Modifikation der Proteinkonformation hauptsächlich durch zwei kleine Phosphoproteine, welche an SERCA2a in der Membran des SR assoziiert vorliegen⁴⁵. PLB ist ein kleines transmembranäres Protein und stabilisiert SERCA2a in der energiearmen Ca²⁺-Konformation. Zusätzlich bewirkt die Interaktion von PLB eine reversible Senkung der Ca²⁺-Affinität des Enzyms und somit ist PLB der wichtigste Inhibitor der sarkoplasmatischen Ca²⁺-Transportaktivität⁴⁶. Weiterhin konnte Sarcolipin (SLN) als Inhibitor des SERCA2a-vermittelten

Ca²⁺-Transports im Herzen identifiziert werden. Dieses Protein ist in seiner Aminosäuresequenz dem PLB sehr ähnlich und reguliert die SERCA2a-Aktivität vornehmlich in den Vorhöfen. Der aktivitätssenkende Effekt wird auf eine inhibierte Polymerisation der PLB-Pentamere zurückgeführt. PLB-Pentamere gelten als weniger effektiv in der Modulation der Ca²⁺-Affinität als Monomere. Daher wird von Bhupathy et al. postuliert, dass Sarcolipin eine Superinhibition von SERCA2a bewirkt⁴⁵. SLN und PLB sind an der schnellen Modulation der Ca²⁺-Aktivität beteiligt, denn eine Phosphorylierung dieser beiden Proteine führt durch veränderte elektrostatische Wechselwirkungen zu einer verminderten inhibitorischen Wirkung auf SERCA2a. Ausdruck findet dies beispielhaft in der Steigerung der Ca²⁺-Transportaktivität und damit indirekt in der Kontraktionskraft durch β -adrenergen Einfluss^{47, 48}. Kardiale β_1 -Rezeptoren führen als G-Protein gekoppelte Rezeptoren über eine Aktivierung der Adenvlatzyklase zu gesteigerten intrazellulären Konzentration an zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche nun die inotropen und lusitropen Effekte über eine Phosphorylierung von PLB und SLN vermittelt⁴⁹. Neben der Phosphorylierung durch PKA kann auch eine Phosphorylierung der SERCA2a-Regulatorproteine durch die Proteinkinase C und die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) beobachtet werden. Eine direkte Phosphorylierung von SERCA2a durch CaMKII konnte ebenfalls nachgewiesen, jedoch von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden^{50, 51}. Somit könnten erhöhte zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentrationen direkt zu einer verstärkten Ca²⁺-Transportaktivität ins SR führen. Durch die Aktivität der Proteinphosphatase 1 (PP1) und 2A (Calcineurin) sowie der resultierenden Dephosphorylierung ist eine Reversibilität dieser Prozesse gegeben⁵². Neben den beschriebenen Einflussfaktoren auf die SERCA2a-Aktivität sind noch weitere zytoplasmatische Proteine erkannt worden, welche die Ca²⁺-Affinität von SERCA2a modulieren können. An dieser Stelle sei auf eine Übersichtsarbeit von Vandecaetsbeek et al. verwiesen⁵³.

1.3. Ca²⁺-Homöostase bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz

Kardiomyozyten terminal insuffizienter humaner Herzen oder Herzen aus Tiermodellen der Herzinsuffizienz zeigen deutliche Veränderungen auf zellulärer, subzellulärer und molekularer Ebene⁵⁴. Neben den induzierten Apoptoseprozessen und den Störungen im zytoskeletären Aufbau sind die Veränderungen in der Expression und Aktivität an der kardialen Ca²⁺-Regulation beteiligter Proteine von besonderer Bedeutung⁹. Ein verminderter Ca²⁺-Gehalt des SR mit nachfolgend reduzierter Erhöhung der [Ca²⁺]_i in der Systole wird für die systolische Dysfunktion hypertrophierter insuffizienter Herzen verantwortlich gemacht^{16, 55-57}. Die Gründe hierfür werden unter anderem in einer verstärkten Aktivität des NCX, verminderter Ca^{2+} -Transportaktivität durch SERCA2a und einem gesteigerten diastolischen Ca^{2+} -Strom aus dem SR über RyR2 gesehen¹³. Die erhöhte NCX-Aktivität bei HI wird von einigen Autoren durch eine gesteigerte Expression auf mRNA- und Proteinniveau erklärt⁵⁸. Auch ein für insuffiziente Kardiomyozyten charakteristischer Anstieg des β -adrenergen Einflusses durch PKA-vermittelte Phosphorylierung am NCX, welcher die Aktivität steigern könnte, wird in verschiedenen Arbeitsgruppen diskutiert⁵⁹. Ein durch verringerte Aktivität spannungsabhängiger sarkolemmaler Na⁺-Kanäle in hypertrophierten Myozyten verlängertes Aktionspotential und die insgesamt reduzierte $[Ca^{2+}]_i$ limitieren den beschriebenen Ca²⁺-Verlust über den NCX⁶⁰.

Gesichert scheint hingegen, dass eine PKA- und CaMKII-vermittelte Hyperphosphorylierung des sarkoplasmatischen RyR2 mit nachfolgender Dissoziation des inhibitorischen FKBP12.6. eine gesteigerte Wahrscheinlichkeit von spontanen diastolischen Ca2+-Entladungen aus dem SR (so genannte Ca²⁺-sparks) in hypertrophierten Kardiomyozyten verursacht und damit den sarkoplasmatischen Ca²⁺-Gehalt senkt^{61, 62}. Diese ebenfalls auf den gesteigerten Sympathikotonus zurückgeführte erhöhte RyR2-Aktivität wirkt nicht nur an der Entstehung der systolischen Dysfunktion, sondern auch an der Entwicklung der diastolischen Dysfunktion mit. An insuffizienten Herzen lassen sich erhöhte diastolische [Ca²⁺], nachweisen. Nicht nur die Ca²⁺-Konzentration ist erhöht, sondern auch der zeitliche Ablauf des Ca²⁺-Transienten ist prolongiert⁶²⁻⁶⁶. Daraus resultiert eine inadäquate Relaxation des Myokards mit insuffizienter diastolischer Füllung und reduzierter koronarer Perfusion als Zeichen der diastolischen Insuffizienz. Diese wird jedoch hauptsächlich durch eine verminderte Ca²⁺-Aufnahmerate ins SR bedingt. Hierbei spielt die reduzierte SERCA2a-Aktivität eine herausragende Rolle⁶⁷. Die meisten Untersuchungen an hypertrophierten Kardiomyozyten konnten eine herunterregulierte Genexpression des ATP2A2-Gens und eine verminderte SERCA2a-Proteinkonzentration belegen¹⁶. Dies allein scheint jedoch nicht der Grund der verminderten Ca2+-Transportkapazität zu sein. In verschiedenen Analysen konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von PLB unter den Bedingungen einer kardialen Hypertrophie kaum verändert^{55, 68}. Daraus ergibt sich eine Steigerung der PLB/SERCA-Ratio, welche sich in einer reduzierten Ca²⁺-Aufnahme des gesamten SR äußert⁶⁹. Zusätzlich kann auch ein geringerer Grad der Phosphorylierung von PLB in hypertrophierten Kardiomyozyten den inhibitorischen Einfluss unphosphorylierten PLB's vergrößern und somit die Kapazität des transmembranären Ca²⁺-Transports senken⁶⁷. Als Ursache dieser geringeren Phosphorylierung trotz gesteigerter PKA- und CaMKII-Aktivität wird eine vermehrte Expression und Funktion der antagonistisch wirkenden PP1 und PP2A gesehen⁷⁰. Insgesamt ist von einer komplexen Veränderung der Genexpression und Aktivität aller an der Ca²⁺-Regulation beteiligten Faktoren durch die Induktion einer kardialen Hypertrophie mit nachfolgender Insuffizienzentwicklung auszugehen.

1.Einleitung



Abb. 1.3. Schematische Darstellung veränderter transmembranärer Ca²⁺-Ströme eines Kardiomyozyten pathologisch hypertrophierter insuffizienter Herzen

Durch Rezeptor gekoppelte Aktivierung zytoplasmatischer Proteinkinasen [1] (PKA – Proteinkinase A, CaMKII - Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, PLC – Phospholipase C nicht dargestellt) und damit assoziierter Hyperphosphorylierung kommt es zum diastolischen Ca²⁺-Leak aus dem Ryanodin-sensiblen Ca²⁺-Kanal (RyR) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) mit erniedrigtem SR-Ca²⁺-Gehalt. Kompensatorisch verstärkter Ca²⁺-Einstrom über L-Typ Ca²⁺-Kanäle(LTCC) [30]. Niedrigere SERCA2a-Transportaktivität durch verminderte Genexpression und Inhibition führt zur vermindertem SR-Ca²⁺-Gehalt. Verminderter SR-Ca²⁺-Gehalt ermöglicht nur einen insuffizienten systolischen Anstieg des zytoplasmatischen Ca²⁺ mit nachfolgender gestörter Kontraktion der Myofilamente - systolische Dysfunktion [5]. Ebenfalls gesteigerter Ca²⁺-Verlust durch Na⁺-Ca²⁺-Austauscher (NCX)-vermittelten Ca²⁺-Efflux bei kompensatorischer Hochregulation der NCX-Genexpression und aktivitätssteigernden Phosphory-lierung. Abb. Modifiziert nach Bers et al.²⁰

Neben einer direkten Beeinflussung der kontraktilen Elemente führt die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie auch zu ausgedehnten Veränderungen in der Elektrophysiologie des Herzens⁷¹. Es konnte gezeigt werden, dass Abweichungen im kardialen Erregungsablauf zu einer desynchronisierten Kontraktion des Herzens führen können. Daraus resultiert eine Abnahme der Kontraktionskraft und verstärkt das Bild einer kontraktilen Dysfunktion⁷². Ein großer Anteil der Patienten mit HI verstirbt an den Folgen maligner ventrikulärer Rhythmusstörungen, welche auf nicht-kreisenden Erregungen beruhen⁷³. Diese ventrikulären Arrhythmien entstehen aus frühen (EAD) oder späten Nachdepolarisationen (DAD) von Kardiomyozyten außerhalb des kontrollierten Erregungsablaufes. Dem zu Grunde liegen zumeist Störungen der Ca²⁺-Regulation in hypertrophierten Myozyten, wie ausführlich in Abb. 1.3. dargestellt wird⁷⁴. Eine Hyperphosphorylierung des sarkoplasmatischen RyR in hypertrophierten Zellen kann simultan zu den Bedingungen einer SR-Ca2+-Überladung im intakten Herzen zur vermehrten Offenheitswahrscheinlichkeit des Kanals in der Diastole des Herzens führen. Die daraus resultierenden Ca2+-Sparks erhöhen die Anzahl positiver Valenzen im subsarkolemmalen Raum und können beim Erreichen des Schwellenpotentials ein Aktionspotential im Sinne einer DAD initiieren⁷⁵. Diese Ca²⁺-Sparks bewirken, dass AP durch einen als Iti bezeichneten Ionenstrom, welcher im humanen Myozyten meist durch einen NCX-vermittelten Na⁺-Influx vermittelt wird, im regulären Kontraktionsablauf verfrüht auftreten⁷⁶. Außerdem werden noch weitere Mechanismen, wie ein Ca²⁺-abhängiger Cl-Strom oder ein unspezifischer Kationenstrom als Ursache für I_{ti} diskutiert⁷⁴. Daher kann auch die erhöhte Wahrscheinlichkeit des Auftretens ventrikulärer Arrhythmien bei Herzinsuffizienz erklärt werden, da eine β-adrenerg bedingte Hyperphosphorylierung und eine gesteigerte NCX-Expression im hypertrophierten Herzen synergistisch arrhythmogen wirken. Zusätzlich kann die verminderte Anzahl sarkolemmaler K⁺-Kanäle, die durch K⁺-Efflux (I_{IR}) das Ruhemembranpotential stabilisieren, in insuffizienten Kardiomyozyten ein geringeres Schwellenpotential erzeugen und somit ebenfalls die DAD-Induktion begünstigen^{77, 78}. Jedoch können unter Hypertrophiebedingungen auch Arrhythmien beobachtet werden, welche ihren Ausgang in der Plateauphase des AP nehmen⁷⁹. Die Ursache dieser EAD's konnte bisher nicht eindeutig beschrieben werden. Doch liefern die Untersuchungen von Yamada et al. Hinweise, dass LTCC an der Entstehung beteiligt sind⁸⁰.

1.4. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Seit der Entdeckung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System stellen die molekularen Grundlagen dieses Systems sowie die differenzierten Wirkmechanismen der einzelnen Bestandteile ein Hauptziel der aktuellen Hypertonieforschung dar. Die als systemisches Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) bezeichnete Enzymkaskade bildet hierbei die Grundlage.

Das unter physiologischen Bedingungen von den Zellen des renalen juxtaglomerulären Apparates bei hypotonen hämodynamischen Verhältnissen sezernierte Prorenin stellt ein Vorläuferprotein des proteolytischen Enzyms Renin dar⁸¹. Neueste Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass dieses bisher als unfunktionelles Precoursorprotein verstandene Protein durch Bindung an Mannose-6-phosphate (M6P)/Insulin-Like Growth Factor Rezeptor bereits vasokonstriktive und hypertrophieinduzierende Effekte hervorrufen kann^{82, 83}. Durch Bindung an M6P-Rezeptoren kann Prorenin über eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, wie beispielweise die Aktivierung Mitogen-aktivierender-Proteinkinasen (MAP), zelluläre Genexpression modifizieren⁸⁴. Wie Peters et al. jedoch zeigen konnten, ist durch eine alleinige Prorenin-modifizierte Genexpression keine gewebsspezifische Matrixveränderung induzierbar⁸⁵. Hierzu sind weitere Faktoren notwendig. Aus dem Proreninmolekül geht durch Abspaltung eines Aminosäurerestes das aktive Renin hervor. Renin kann, ähnlich dem Prorenin, u.a. durch Bindung an ein Reninbindungsprotein (RnBP) M6P-Rezeptoren aktivieren und dem Prorenin simultane Effekte auslösen⁸⁶. Neben einer direkten zellulären Interaktion bewirkt Renin als Protease die Aktivierung des hepatisch sezernierten





ACE – Angiotensin-Converting-Enzym, ANG - Angiotensin, Mas-R – Mas-Rezeptor, AT – Angiotensin-II-Rezeptor. Schema nach Castrop et al. ¹ Angiotensinogens zum Oktapeptid Angiotensin I (ANG I)⁸⁷. ANG I wird hauptsächlich durch die membrangebundene Metalloproteinase

Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), welche sich in höchster Konzentration auf den Endothel der pulmonalen Strombahn findet, zum Octapeptid Angiotensin II (ANG II) aktiviert. Alternativ konnte eine von Mastzellen generierte und ebenfalls endothelassoziierte Chymase als katalytische Einheit zur Umwandlung von ANG I in ANG II gefunden werden⁸⁸. ANG II gilt als der Hauptef-

fektor des RAAS. Durch Bindung an gewebsspezifische Rezeptoren ist eine differenzierte Wirkung möglich. Bisher sind zwei 7-transmembran Glykoproteinrezeptorklassen, Angiotensin-II-Rezeptor Typ I (AT I) und Typ II (AT II) klassifiziert worden⁸⁹. Die Bindung von ANG II an den G-Protein-gekoppelten AT I, wovon bisher 2 Subtypen (AT I_A und AT I_B) bekannt sind, führt zur Aktivierung der Phospholipase C. Das durch diese Lipase gebildete Inositol-1,4,5trisphosphat führt durch Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum zu weiteren zytoplasmatischen Effekten, wie beispielsweise der glattmuskulären Kontraktion und damit über den Anstieg des Gefäßwiderstandes zur Blutdruckerhöhung^{89, 90}. Daneben sind die Hemmung der Adenylatzyklase und die Stimulation der Phospholipase A₂ Signaltransduktionswege der AT I-Rezeptoren⁹¹. AbdAlla et al. konnten als erste zeigen, dass der AT II-Rezeptor der physiologische Antagonist der AT I vermittelten Wirkung ist⁹². Die geschieht zum einen durch eine direkte Polymerisation beider Rezeptormoleküle und damit Inaktivierung der AT I-Signaltransduktion und zum anderen durch direkt AT II-vermittelte Effekte. Beispielsweise bewirkt eine AT II-induzierte Aktivierung von Tyrosin- oder Serin/Threonin-Phosphatasen eine Inhibition der zytoplasmatischen AT I-Kaskade ⁹³. Über diese Signalwege und die Aktivierung einer NO-Synthetase führt die Bindung von ANG II an AT II-Rezeptoren zur Vasodilatation und antiproliferativen Wirkung durch Verringerung der MAP-Kinaseaktivität⁸⁹. Einige aktuelle Ergebnisse deuten jedoch auch darauf hin, dass ebenfalls eine AT II-assoziierte Proliferationsinduktion durch Aktivierung von PLZF (Promyelozyten-Leukämie-Zink-Finger-Protein) möglich ist⁹⁴.

Neben der bereits etablierten Enzymkaskade vom Prorenin zum Effektorprotein ANG II sind in den letzten Jahren mehrere zusätzliche Faktoren im RAAS identifiziert worden. Beispielsweise konnten zahlreiche ANG II Spaltprodukte (ANG 1-7) mit zum Teil gegenregulatorisch vasodilatativer Wirkung klassifiziert werden⁹⁵. ANG 1-7 entsteht durch proteolytische Spaltung der Zink-Metalloproteinase Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE 2)¹. Die Expression dieses Enzyms konnte bisher im arteriellen Endothel und tubulärem Epithel der Niere nachgewiesen werden[%]. Ebenso ermöglicht diese Proteinnase die Bildung von ANG 1-9 aus ANG I, welche anschließend unter ACE-katalysierter Reaktion wieder zu ANG 1-7 gespalten wird. Die Wirkung von ANG 1-7 auf Endothelzellen wird durch die Interaktion mit dem membrangebundenen Mas-Rezeptor vermittelt⁹⁷. Die exakte Signaltransduktionskaskade dieses Rezeptors ist bisher nicht hinreichend bekannt, jedoch wird eine inaktivierende Polymerisation mit dem AT I-Rezeptor und die zytoplasmatische Aktivierung der Janus-Kinase 2 vermutet⁹⁸. Auf Grund dieser Erkenntnisse stellt das RAAS ein in einem Regelkreis selbstlimitiertes endokrines System zur Regulation des Vasotonus, der Serumelektrolytkonzentration und Modifikator der Genexpression in verschiedenen Geweben dar. Innerhalb der letzten Jahre verlagerte sich die Aufmerksamkeit auf das sogenannte lokale Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Durch Genexpressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass es in fast allen Geweben zur lokalen Expression der zum RAAS gehörigen Gene und Proteine kommt, welche beispielsweise eine entscheidende Rolle in der hypertonie-assozierten kardialen Hypertrophie spielen⁹⁹.

1.5. Hypertonie-bedingte kardiale Hypertrophie

Die kardiale Hypertrophie stellt nicht nur einen Mechanismus zur Adaptation des Herz-Kreislauf-Systems an veränderten Bedingungen dar, sondern ist auch der führende Pathomechanismus bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Die verschiedenen, im Folgenden beschriebenen Mechanismen führen zur Modifikation des gesamten Herzmuskelgewebes. Im Gegensatz zur embryonalen Entwicklung kommt es bei der Entwicklung der Hypertrophie nicht zur zellulären Hyperplasie sondern nur zur Größenzunahme der Kardiomyozyten. Prinzipiell ist die pathologische kardiale Hypertrophie von einer physiologischen Adaptation des Herzmuskels an gesteigerte Anforderungen zu differenzieren. Im Rahmen einer pathologischen Hypertrophie kommt es neben einem im Verhältnis zum Längenwachstum überproportionalen Dickenwachstum der Kardiomyozyten sowie zur vermehrten interzellulären Matrixproduktion (Fibrosierung). Diese Veränderungen führen zur zunehmenden insuffizienten Kontraktion und Relaxation der Ventrikel 100. Als Induktoren der kardialen Hypertrophie konnten einige Faktoren als besonders bedeutsam identifiziert werden. Beispielsweise konnte eine direkte Induktion der kardialen Hypertrophie durch mechanischen Stress, welcher im Rahmen der arteriellen Hypertonus bei Erhöhung der linksventrikulären Nachlast simuliert wurde, beobachtet werden. Hierbei kommt es zur myokardialen Aktivierung des lokalen Renin-Angiotensin-Systems durch myokardiale und vaskuläre Ausschüttung von Angiotensin II und Endothelin 1¹⁰¹. Die damit assoziierte Aktivierung des membranassozierten G-Protein-gekoppelten AT I-Rezeptors bewirkt intrazellulär durch PLCvermittelte Ca²⁺-Freisetzung oder direkte Aktivierung der MAP/Ras-Kinasen über Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren die Induktion von Hypertrophie-Gensequenzen¹⁰². Die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration spielt dabei eine entscheidende Rolle. Durch Anstieg der zytoplasmatischen [Ca²⁺] kommt es zur Dephosphorylierung und damit Aktivierung von NFAT durch die Ca²⁺-Calmodulin-aktivierte-Phosphatase Calcineurin¹⁰³.

Neben der Aktivierung dieser intrazellulären Signaltransduktionskaskaden zur Induktion transkriptionsrelevanter Faktoren durch ANG II und Endothelin ist eine ähnliche Aktivierung auch durch Katecholamine beschrieben worden. Eine anhaltende adrenerge Stimulation kann ebenfalls eine kardiale Hypertrophie induzieren ¹⁰⁴. Die Auswirkungen der hypertrophiebedingten Änderungen an den Ionenkanälen des Kardiomyozyten sind bereits unter 1.3. darlegt. Da dies nicht expliziter Bestandteil dieser Arbeit ist, sei für weitere detaillierte Darstellungen der intrazellulären Signaltransduktionswege auf entsprechende Übersichtarbeiten verwiesen¹⁰⁵.



Vereinfachte Darstellung der möglichen intrazellulären Signalkaskade nach Heineke et al.¹⁰². PLC – Phospholipase C, DAG – Di-acylglycol, MAPK – mitogen-assoziierte Proteinkinase, IP₃ – Inositol-1,4,5-trisphosphat, CaMK - Ca²⁺-Calmodulin abhängige Proteinkinase, NFAT - nuclear factor of activated T-cells - Transkriptionsfaktor.

1.6. Das mRen2-transgene Rattenmodell

Da das beschriebene RAAS eine zentrale Rolle in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie darstellt, bestand ein großes Bestreben zur Entwicklung eines human-nahen Tiermodells zur weiteren Erforschung dieses komplexen Systems. Im Jahr 1990 konnte erstmals, nach vorherigen Nachweisen in einem Mausmodell, das monogenetisch hypertensive transgene Rattenmodell TGR(mRen2)27 durch Mullins et al. generiert und charakterisiert werden¹⁰⁶. Nach hormoneller Induktion einer Superovulation gelang es durch oozytären Transfer mittels Mikroinjektion eines linearen DNA-Fragmentes, welches das murine DBA/2JRen2 kodiert, transgen-positive Tiere zu erzeugen.

Durch weitere Verpaarung dieser nun transgenen Nachkommen mit nicht-transgenen Wildtyptieren vom Hannover-Spraque-Dawley-Rattenstamm gelang es heterozygote und im weiteren Verlauf homozygote Tiere des hypertensiven Mausrenin-transgenen Rattenstammes TGR(mRen2)27 bzw. mRen2 zu generieren¹¹. Die transgenen Tiere entwickeln bereits ab einem Alter von vier Wochen einen signifikanten arteriellen Hypertonus im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe. Die vollständige Ausprägung des hypertensiven Phänotypes ist bereits nach neun Wochen zu verzeichnen. Bei den homozygot-transgenen Tieren kommt es zur Ausprägung eines malignen Hypertonus mit systolischen Blutdruckwerten über 300mmHg mit einer deutlich erhöhten Mortalität auf Grund hämorrhagischer Komplikationen, so dass bei diesen Tieren eine frühzeitige antihypertensive medikamentöse Therapie notwendig ist. Bei heterozygot transgenen Tieren kann eine Elevation des systolischen arteriellen Blutdrucks bis auf 240 mmHg beobachtet werden¹⁰⁷. Dieser Unterschied lässt bereits den Schluss zu, dass die Anzahl der transgenen Gensequenzen und damit die Menge des murinen Reningenproduktes direkten Einfluss auf das Ausmaß der Hypertonie haben. Neben einem ebenfalls signifikant erhöhten diastolischen Blutdruck können bereits in sieben bis elf Wochen alten heterozygot transgenen Tieren weitere signifikante Veränderungen des Phänotyps aufgezeigt werden. Eine deutliche Zunahme des linksventrikulären Feuchtgewichtes ist neben einer adaptiven Myokardhyperplasie und im Verlauf -hypertrophie auch auf den zunehmenden perivaskulären Kollagengehalt, als Zeichen der kardialen Fibrosierung bei kardialer Hypertrophie, zurückzuführen. Ebenfalls können arteriosklerotische Veränderung im Sinne einer erhöhten Wandstärke der abdominellen Aorta oder im weiteren Verlauf auch renale Schäden wie Albuminurie bei histologischer Glomerulosklerose nachgewiesen werden^{100,} ¹⁰⁸. Ein deutlicher sexueller Dimorphismus im Sinne einer deutlicheren Ausprägung des transgenen hämodynamischen Phänotypes in männlichen Tieren konnte bereits von Lee et al. beschrieben werden¹¹. Der eigentliche Pathomechanismus der Hypertonieenstehung des mRen2transgenen Rattenmodells ist noch nicht hinreichend geklärt und wird kontrovers diskutiert. Während die primären Arbeiten einen transgen-induzierten hohen Plasmaspiegel des Vorläuferproteins Prorenin bei niedrig-normalen Renin-Plasmaspiegel nachweisen konnten¹⁰⁶, konnten beispielsweise Tokita et al. erhöhte Reninspiegel registrieren¹⁰⁹. Des Weiteren ist eine veränderte gewebespezifische Expression des Reningens im mRen2-transgenen Rattenmodell nachweisbar. Während die üblicherweise höchste Expression in der Niere zu finden ist, liegt sie in diesem Modell mit nur 20% vergleichsweise niedrig. Eine hohe Genexpression ist jedoch im Thymus, den Blutgefäßen und dem Myokard feststellbar. Neben anderen Beobachtungen hat dies zu der Hypothese geführt, dass eher das lokale Renin-Angiotensin-System ursächlich für die Entwicklung des systemischen Hypertonus durch Expression des murinen Ren2^d-Gens ist^{110, 111}. Ebenfalls können die zellulären und molekularen Effekte des Angiotensin I und II (siehe beschreibend 1.4.) im mRen2-Modell experimentell untersucht werden^{89, 107, 112}

1.Einleitung

1.7. Zielstellung der Arbeit

Bei chronischer Herzinsuffizienz infolge einer Drucküberlasthypertrophie sind eine Verminderung der Expression der kardialen Ca²⁺-ATPase SERCA2a und der SERCA2a-vermittelten Ca²⁺-Transportaktivität des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) pathogenetisch bedeutungsvoll für die kontraktile Dysfunktion des Herzens. Geeignete Ansätze zur Verhinderung dieser molekularen und funktionellen Veränderungen bei Herzinsuffizienzen verschiedener Ätiologie sind bisher nur ungenügend erforscht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob eine verbesserte SERCA2a-Ausstattung des SR von hypertensiven mRen2-transgenen Ratten (Ren2) durch zusätzliche kardiale Expression eines SERCA2a-Transgens die Ca²⁺-Transportfunktion dieser Ca²⁺-regulierenden Herzzellorganelle verbessert und die kontraktile Dysfunktion der hypertrophierten Herzen dieser hypertensiven Tiere verhindern kann. Die vergleichenden Untersuchungen wurden an Herzen eines neuen doppelt-transgenen mRen2/SERCA2a-Rattenmodells (SERen) und an heterozygoten hypertensiven Ren2-Tieren mit chronischer linksventrikulärer Drucküberlastung infolge genetisch-bedingter arterieller Hypertonie vorgenommen. Im Einzelnen wurde untersucht, ob durch zusätzliche Expression eines SERCA2-Transgens im Herzen hypertensiver transgener Ren2-Tiere, d.h. in SERen, die Ausbildung einer linksventrikularen Hypertrophie verhindert, eine defizitäre SERCA2a-katalysierte Ca2+-Transportaktivität des SR verbessert sowie verschiedene linksventrikuläre Funktionsparameter günstig beeinflusst werden können. Außerdem wurde geprüft, ob durch Expression des SERCA2a-Transgens in SERen prooder antiarrhythmische Effekte induziert wurden.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Tiere, auf die sich in dieser Arbeit bezogen wird, wurden im Tierhaus des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, in Zusammenarbeit mit den ansässigen Fachtierpflegern und Tierärzten gehalten. Die Versuche wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (G-0054/00 und O-0139/05). Basis der Zucht stellt eine etablierte SERCA2a-transgene Rattenlinie dar, welche u.a. von der Arbeitsgruppe PD Dr. Roland ausführlich charakterisiert wurde¹¹³. Diese Tiere exprimieren zusätzlich zum endogenen SERCA2a-Gen ein in das Genom integriertes und über einen humanen Cytomegalievirus-Enhancer und Hühnchen-ß-Aktin-Promoter reguliertes SERCA2a-Transgen. Des Weiteren wurde das hypertensive TGRmRen2(27)-transgene Rattenmodell verwendet¹¹. Dieses Tiermodell exprimiert das ursprünglich aus dem Mausgenom extrahierte DBA/2J mRen2-Gen (5.3 kb des 5' Endes und 9.5 kb des 3' Endes) zusätzlich zum endogenen Renin-Gen. Durch Verpaarung homozygoter TGRmRen2(27)-transgener männlicher Ratten mit heterozygoten SERCA2a-transgenen Weibchen gelang es, neben einfach-transgenen mRen2-Tieren (Ren2), doppelt-transgene mRen2/SERCA2a (SERen) Nachkommen zu züchten. Alle Nachkommen dieser Zucht waren dementsprechend heterozygot für das mRen2-Transgen. Ca. 50% der Nachkommen waren zusätzlich heterozygot für das SERCA2a-Transgen und demnach doppel-transgen (SERen). Als Kontrollgruppen wurden Spraque-Dawley Wildtypratten (WT) gleichen Alters (30 Wochen) der Fa. Charles River Deutschland sowie männliche 30 Wochen alte einfach heterozygot-SERCA2a-transgene Tiere (SERCA2) verwendet.

In einem gedeckelten Makrolonkäfig Typ IV (EBECO®, L-B-H 590-380-200mm) wurden maximal drei Ratten (Spraque Dawley) gehalten. Das Raumklima wies eine konstante Temperatur von 22±1°C mit einer relativen Luftfeuchte von 55±5% auf. Der Frischluftaustausch erfolgte zehn mal pro Stunde bei einer mittleren Raumluftgeschwindigkeit von 0,3 m/s. Die Tiere lebten in einem natürlichen Hell-Dunkel-Rhythmus (Beleuchtungsstärke 150-200 lx). Die Versuche wurden entsprechend der Ruhephasen des künstlichen Tagesrhythmus der Ratten am Vormittag oder Nachmittag durchgeführt.

Die Tiere hatten freien Zugang zu Nahrung (Altromin C1000, Fa. Altromin, Lage, Deutschland) und Trinkwasser. Das Trinkwasser der zur Zucht verwendeten homozygot transgenen TGRm-Ren2(27)-Rattenmännchen wurde mit dem Antihypertensivum Ramipril 3µg/l versetzt. Die untersuchten Tiergruppen Ren2, SERen, SERCA2 und WT erhielten keine Medikation. Nach dem

Absetzen der Jungtiere von der Mutter erhielten diese mit einer Lochzange eine in systematischer Nummerierung laufende Ohrmarkierung.

2.2. Genotypisierung

2.2.1. Gewebeproben

Um genomische DNA transgener Ratten zu erhalten, erfolgte bei allen geborenen Jungtieren (Alter 3-4 Wochen) eine Resektion des distalen Schwanzes von ca. 1-5 mm Länge. Die dabei aufgetretene Gewebeverletzung wurde mit Histoacryl[®] Gewebekleber (Fa. B. Braun-Dexon GmbH, Tuttlingen) verschlossen. Das entnommene Gewebe wurde anschließend bis zur weiteren Untersuchung in einem 2ml Eppendorf-Tube (SafeLock®) bei einer Temperatur von -20°C verwahrt. Dies wurde als Dienstleistung durch das Personal des Tierstalls erbracht.

2.2.2. Extraktion der genomischen DNA

Nach dem Auftauen der gefrorenen Schwanzbiopsieproben bei Raumtemperatur wurde dem Gewebe eine Pufferlösung (100 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SDS und 50 mM Tris bei einem pH 8,0) und 35 µl Proteinase K (Fa. GibcoBRL; 10 mg/ml) zugesetzt. Dieser Enzymzusatz dient der Proteolyse zellulärer Proteine und entspricht mit den verwendeten 15 IE einem Überschuss um einen vollständigen Proteinverdau zu garantieren. Dieser Ansatz wurde anschließend für 12 Stunden in einem Eppendorf-Thermocomfort-Mixer (Thermomixer Comfort; Fa. Eppendorf, Hamburg) bei 650 U/min und 55°C inkubiert. Nachfolgend wurden 500µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Sigma P 3803) hinzu pipettiert und sorgfältig gevortext. Nach einer Ruhezeit der Probe von 5-10 min auf Eis wurde erneut gevortext. Anschließend erfolgte die Trennung des Ansatzes für 25 min bei 13.000 U/min in einer Zentrifuge (Megafuge 1.OR, Rotor 3041; Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland). Während dieser Zeit wurden die benötigten 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen (SafeLock®) durch Zugabe von jeweils 60 µl 3M Na-Acetat Lösung (pH 7,0) vorbereitet. Aus den zentrifugierten Proben konnte nun der obere Überstand abgenommen werden, welcher die verbliebene DNA, RNA und Peptidfragmente. Durch Zugabe von 5 µl RNAse A (10 µl/ml, Fa. Sigma, 100 mM Tris/HCl, 15 mM NaCl, pH 7,5) wurden noch erhaltene RNA-Fragmente hydrolysiert. Dies erforderte eine erneute Lagerung im Eppendorf-Thermocomfort-Mixer ohne Rotation für 15 min bei 37°C. Durch Zugabe von 600 µl auf -20°C gekühlter Isopropanollösung (Sigma I 9516) konnte die Fällungsreaktion ausgelöst werden. Die Probe wurde anschließend bei -20°C mindestens eine Stunde inkubiert bevor sie bei 10000 U/min für 15 min zentrifugiert werden konnte. Die enthaltene DNA sedimentierte sich zu einem Pellet und der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgenommen. Das entstandene Pellet wurde anschließend mit 800-1000 μl -20°C kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugierung bei 13.000 U/min für 10 min wurde der Überstand durch dekantieren verworfen. Nun wurde das entstanden Pellet bei Raumtemperatur für ca. 30 min getrocknet. Die sedimentierte DNA wurde dann in 30 μl sterilem TE-Puffer (10 mM, Tris/HCl, 1 mM EDTA; pH 7,6) bei 37 °C für 60 min in einem Thermoblock in Lösung gebracht.

2.2.3. Konzentrationsbestimmung der dsDNA

Durch Messung der Absorption bei 260nm konnte die Konzentration der vorliegenden Nukleinsäuren bestimmt werden. Dazu wurden die Extinktion der Proben in UV-absorbtionsneutralen Quarzküvetten von 1,0 cm Breite gemessen. Um mögliche Proteinverunreinigungen zu erfassen, wurden die Proben zusätzlich bei einer Wellenlänge von 280 nm untersucht. Durch Bestimmung des Absorptionsquutienten von $_{260nm}/^{280nm}$ lassen sich Rückschlüsse auf die Reinheit der Probe ziehen. Eine Lösung von 50% Protein/ 50% Nukleinsäuren weist ein Verhältnis von 1,5 auf. Die zu untersuchende DNA-Probe wurde im Verhältnis 1:50 mit TE-Pufferlösung verdünnt. Die DNA-Konzentration in der unverdünnten Probe wurde anschließend nach folgender Formel berechnet: $C_p = A * M * V$

 $C_{\rm P}$ – Konzentration der dsDNA in der Probe [µg/ml]

A – gemessene optische Dichte (Absorption bei 260nm)

M – Multiplikationsfaktor für standardisierte dsDNA (50µg/ml)

V – Verdünnungsfaktor TE-Puffer

2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung zum nachfolgenden Nachweis der transgenspezifischen DNA-Sequenzen erfolgte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Bei transgenen Ren2-Tieren wurde auf Grund des zu erwartenden Verteilungsmuster des Transgens bei der Züchtung dieser Tiere nur exemplarisch der Nachweis des mRen2-Transgens durchgeführt. Hierzu konnte in der PCR, durch Einsatz eines spezifischen Primers für das Maus-Renin-Gen (mRen2), die Teilsequenz zwischen den Basenpaaren 4184 und 4859 amplifiziert werden. Als forward Primer wurde "mRen2-forward", als reverse Primer "mRen2-reverse" der Fa. TIB MOLBIO (Berlin, Deutschland), verwendet. Um die aus der Zucht hervorgegangenen doppelt-transgenen Nachkommen (SERen) zu identifizieren, wurde alle Versuchstieren mittels PCR unter Verwendung eines für das SERCA2a-Transgen spezifischen Primers genotypisiert.

Sense-Strang

5'······1¹⁸ATTACGGGGGTCATTAGTTCATAGCC······ACATGACCTTATGGGACTTTCCTAC₄₂₂······3' CMV351:5' → TGTACTGGAATACCCTGAAAGGATG·······5'

3'········TAATGCCCCAGTAATCAAGTATCGG········· TGTACTGGAATACCCTGAAAGGATG·····5' 5'······· ATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC ← CMVIE71:5'

Antisense-Strang

5'·····⁴¹⁸⁴CAAAGTCATCTTTGACACGGG⁴²⁰⁴ ········⁴⁸³⁹GCCTCTATGAGTCCTCTGACT₄₈₅₉······3' reverse Primer → CGGAGATACTCAGGAGACTGA········5'

Antisense-Strang

Abb. 2.1. Teilsequenz der für die Genotypisierung verwendeten transgenspezifischen Primer

Hybridisierungsbereiche der CMVIE71:5-Sense und CMV351:5-Antisense Oligonukleotid-Primer des SERCA2a-Transgens (blau) und mRen2-forward/-reverse-Primer (rot) des murinen Renin-Transgens (mRen2).

Um das in das Rattengenom integrierte SERCA2a-Transgen vom endogenen SERCA2a-Gen zu differenzieren, wurde eine Teilsequenz des transgenspezifischen humanen Cytomegalie-Virus immediate-early Enhancers (Basenpaar 119-422) amplifiziert. Teilsequenzen der von der Fa. TIB BIOMOL produzierten Primer wurden in Abb. 2.1. gezeigt.

Das Prinzip der durchgeführten PCR beruht auf der thermischen Denaturierung der dsDNA in komplementäre Einzelstränge (ssDNA) durch Thermolyse zwischen den Basen bestehender Wasserstoffbrückenbindungen. Im Anschluss daran erfolgte die Hybridisierung der beschriebenen sequenzspezifischen Oligonukleotide (Primer) an die freien 3'-OH Enden der beiden ssD-NA (Annealing). Durch Katalyse der thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase, die in Gegenwart freier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) die Primer verlängert (Elongation) konnte der zur entsprechenden ssDNA komplementäre Strang synthetisiert werden. Für die PCR wurde die DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums Thermus aquaticus (Gen-Therm™DNA Polymerase; Fa. Rapidozym, Berlin, Deutschland) verwendet. Für die PCR wurde der in der anstehenden Tabelle beschriebene Mastermix hergestellt.

Komponenten	Konzentrationen	µl/Ansatz	
10x Puffer (160mM (NH4)2SO4, 0,1% Tween 20, 670mM Tris-HCL, pH 8,8 (25°C))	1x Puffer (16mM (NH4)2SO4, 0,1% Tween 20, 67 mM Tris-HCL)	2,5	
$MgCl_2$ (50mM)	1,5mM	0,75	
dNTP (je 10mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	0 ,1m M	0,25	
DNA- Taq Polymerase (5U/µl)	0,02U/µl	0,1	
sense primer (10µM)	0,25μΜ	0,625	
antisense primer (10µM)	0,25μΜ	0,625	
dsDNA	0 ,2µg/µl	25	
ddH ₂ O	-	19,15	

Tab. 2.1. Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches

Die vorbereiteten Ansätze mit einer Konzentration von insgesamt 5 µg genomische DNA pro Ansatz wurden auf Eis in 200 µl fassende PCR-Reaktionsgefäße (8er-Strip Reaktionsgefäße; Fa. Neolab, Heidelberg, Deutschland) pipettiert. Ohne Zeitverzug wurde der Ansatz in den verwendeten Thermozykler (Mastercycler Gradient, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verbracht. Abb. 2.2. zeigt den Ablauf und die gewählten PCR-Versuchsbedingungen. Ein Zyklus führte theoretisch zu einer exponentiellen ($2^{Anzahl} der Zyklen$) Vermehrung der primer-abhängigen Teilsequenzen der eingesetzten DNA, wobei die neu synthetisierte dsDNA bzw. amplifizierte Teilsequenz wieder als Template im folgenden Zyklus fungierte. Praktisch jedoch ist eine Amplifikation von ca. 1,6 - 1,7^{Anzahl der Zyklen} zu erwarten. Nach Beendigung der PCR wurde die Probe für maximal 24h bei 4°C gelagert.



Abb. 2.2. Schematische Darstellung der PCR zur Amplifizierung der transgenspezifischen Teilsequenzen Temperaturwahl in dem Intervall der Primer-Hybridisierung bei Verwendung der CMV-Enhancers-spezifischen Primer CMV351:5' und CMVIE71:5' : 63,5°C, bei mRen2-foward und mRen2-reverse Primern: 60°C. Zyklen bestehen aus dem wiederholten Ablauf der Denaturierung, des Primer-Annealing und der Elongationsphase.

2.2.5. Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-amplifizierten transgenspezifischen DNA-Teilsequenzen erfolgte spätestens 24 Stunden nach Beendigung der PCR-Reaktion. Für die Herstellung des hierzu notwendigen 0,8%-igen Agarosegels wurden 2,8 g Agarose (ULTRApure, Fa.Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 350ml TAE-Puffer (40mM Tris; 0,11%v/v Eisessig; 1mM EDTA; pH 8,0) gemischt. Um die Löslichkeit der partikulären Agarose zu erhöhen wurde das Gemisch dreimal für eine Minute in einer Mikrowelle bei 600W (Micromat, Fa. AEG, Frankfurt, Deutschland) erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurden 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt. Unter UV-Licht-Anregung emittiert der interkalierte Komplex (DNA - Ethidiumbromid) ein rot-oranges Licht, welches photometrisch detektiert werden kann. Diese Lösung wurde nun zu einem 5-8 mm dicken Maxi- Flachgel (19,5 cm x 24,5 cm) im Gelstand einer horizontalen Kammer (BIO-RAD® Mini Sub Cell GT, Hercules California, USA) gegossen. Durch einen Kamm konnten Taschen im Gel mit einem Volumen von ca. 40µl ausgespart werden. Das erkaltete und verfestigte Gel wurde im Anschluss mit TAE-Puffer bis zu ca. 3 mm überschichtet. Die in 30 µl portionierten PCR-Proben wurden nun mit 5 µl Ladepuffer (60 mM Tris-HCl, 6mM EDTA, 40%w/v Saccharose 0,25%, w/v Bromphenolblau, pH 7,4) vermischt und in die ausgesparten Geltaschen pipettiert. Zusätzlich zu den untersuchten PCR-Amplifikaten wurde in eine freie Geltaschen 0,4 µg 100 bp DNA-Leiterlösung (DNA Ladder lyophiliesed, Fa. AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gegeben. In die Gele zur Detektion des spezifischen SER-CA2-/ bzw. mRen2-Transgens wurden zusätzlich eine Positivkontrolle (20 µg dsDNA gepoolter und durch Southern Blot bestätigter transgener Tiere) und eine Negativkontrolle (PCR-Produkt nicht transgen-spezifischer dsDNA) gegeben. Bei Gelen zum Nachweis des SERCA2a-Transgens wurde zusätzlich 1 µg Apa-I-restriktionsverdaute aufgereinigte, transgene SERCA2a-Plasmid-DNA aufgetragen. Die elektrophoretische Aufteilung der PCR-Amplifikate erfolgte nun bei konstanter Spannung von 55 V (PowerPack 300; Lifetechnologies, Fa. GibcoBrl, Karlsruhe, Deutschland) für 75 min und im Anschluss bei 75 V über 45 min.

2.3. Histologische Untersuchung

2.3.1. Paraffineinbettung der Organe

Die entnommenen Organe wurden zu Beginn der Fixierung für 24 Stunden in Bouinscher Lösung modifiziert und nach Dubosq-Brasil (100ml enthielten 65,04 ml alkoholische Pikrinsäurelösung DB, 28,32 ml 37-38%iger Formaldehydlösung und 6,64 ml Eisessig) fixiert. Im Anschluss daran erfolgte die erneute Inkubation über 24 Stunden in 80%-iger Ethanollösung. Die so fixierten linken Ventrikel wurden in Histologie-Kassetten umgelagert. In diesen erfolgten die Paraffineinbettung und die dazu nötige Entwässerung nach dem Tauchprinzip. Hierbei wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe 2 Stunden in 90%igen Ethanol, 4 Stunden in 100%igen Ethanol und 2 Stunden in Isopropylalkohol entwässert sowie anschließend 6 Stunden in Intermedium (Vulcite M2, Fa. Fina Europe, Belgien) und 3 Stunden in einem Wärmetopf mit einem Gemisch aus Intermedium und Paraffin im Verhältnis 1:1 der Alkohol entfernt. Daran anschließend wurden die Histologiekassetten in einem Wärmetopf mit reinem Paraffin 24 Stunden inkubiert.

2.3.2. Schneiden der linken Ventrikel

Mit Hilfe einer Einbettungsvorrichtung wurden die linksventrikulären fixierten Präparate in Längsachse in dafür vorgesehene Einbettungsringe mit reinem Paraffin eingelagert. Mit einem Rotationsmikrotom (Fa. Microm - Apogent, Huntsville, USA) wurden in transversaler Schnittebene 3 µm dicke Schnitte der Präparate angefertigt. Vor der anschließenden Färbung wurden jeweils 2 Schnitte auf einen Objektträger übertragen und auf einer 37°C temperierten Wärmeplatte getrocknet.

2.3.3. Färbung mit Sirius-Rot

Das Prinzip der Färbung basiert auf der Reaktion des Farbstoffes Picro-Sirius Rot mit den Seitenketten des Kollagens. Der anionische Farbstoff hat NaSO₃-Seitengruppen, welche mit den basischen Seitengruppen der im Kollagen vorhandenen Aminosäuren eine Bindung eingehen. Hierbei lagert sich das langkettige Farbmolekül parallel an das Kollagen an. Unter dem Lichtmikroskop lassen sich anschließend rot gefärbte Areale mit Kollagenanteilen im Gewebe nachweisen. Die auf den Objektträgern getrockneten Schnitte wurden in einem Färbeautomat (Fa. Microm) nach folgendem Schema gefärbt:

Histoclear[®] (Xylol-Ersatz, Engelbrecht, Deutschland) für 30 min → absteigende Alkoholreihe: 100%iger Alkohol für 5 min, 90%iger Alkohol für 5 min, 80%iger Alkohol für 5 min, 70%iger Alkohol für 5 min → spülen in H₂O für 3 min → Aqua dest. für 2 min → Sirius-Rot F3BA für 60 min (0,1%ige Picro-Siriusrot Färbelösung (0,5 g Picro-Siriusrot in 500 ml 1,2%iger Pikrinsäure) Aufsättigung der Farblösung mit 5 mg Pikrinsäure bis zum Ausfallen von Kristallen) → 0,01 N HCl für 4 min → aufsteigende Alkoholreihe; 70%iger Alkohol für 3 min, 90 %iger Alkohol für 3 min, 95%iger Alkohol für 5 min, 95%iger Alkohol für 5 min, 100%iger Alkohol für 5 min, 100%iger Alkohol für 5 min → Histoclear[®] für 30 min.

2.3.4. Bildaufnahme

Die gefärbten Präparate wurden unter einem Durchlicht-Photomikroskop (Axiophot, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Der Beste aus drei linksventrikulären Schnitten eines Tieres wurde unter konstanten Einstellungen am Mikroskop beurteilend aufgenommen. Für die Aufnahme der Bilder wurde das Mikroskop mit einem Videosystem der Fa. AVT-HORN (Aalen, Deutschland) verbunden. Dieses Videosystem beinhaltet eine Farb-Videokamera mit drei 1/2"-CCD-Chips, ein externes Kamerasteuergerät und einen Frame grabber. Die Farbvideokamera wurde mit dem externen Kamerasteuergerät an einen Computer (Power Macintosh 8200/120, Cork, Irland) und dem Frame grabber angeschlossen. Alle Bilder wurden nach einer Aufwärmzeit der Bildanalyseeinheit von 10 Minuten mit den gleichen Einstellungen am Mikroskop und der Kamera digitalisiert, im Tagged Image File Format (TIFF) gespeichert.

2.4. Hämodynamische Messung

2.4.1 Präparation und Katheterisierung der Versuchstiere

Vor Beginn der über die gesamte Versuchszeit aufrecht erhaltenen Narkotisierung der Tiere erfolgte die initiale Sedierung mittels des volatilen Anästhetikums Isofluran. Hierzu wurden die Versuchstiere in einen durchsichtigen, mit Papierhandtüchern ausgelegten Makrolonkäfig (L - B -H, 590 mm – 380 mm - 200 mm) verbracht. In den Standarddeckel waren Anschlussstücke zur Gaszu- und Abfuhr eingearbeitet. Zur Einleitung erfolgte über einen Verdampfer (Isoflurankalibrierung, Fa. Dräger Medical, Deutschland) die kontinuierliche Zufuhr von 5 Vol% Isofluran/95 Vol% O₂ mit einem Fluss von 700 ml/min über 3 min. Nach Versagen der Spontanmotorik der Tiere erfolgte die intraperitoneale Injektion des Barbiturates Thiopental (Trapanal[®], (RS)-5-Ethyl-5- (1-methylbutyl)-2-thioxo- 1,3-dihydropyrimidin-4,6-dion Fa. Fresenius, Deutschland) in einer Dosierung von 70 mg/kg Körpergewicht (KG). Anschließend wurden die Tiere in dem oben beschriebenen Käfig unter einem Gasfluss von 700ml/min 100 Vol% O₂ bis zum Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe und unter ständiger Kontrolle der Atemfrequenz beobachtet. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde beim Erlöschen des Kornealreflexes und einer ausbleibenden Abwehrreaktion nach Setzen eines Schmerzreizes mit einer anatomisch geformten Pinzette am Mittelfuß angenommen.

Im Anschluss wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Wärmeplatte an allen vier Extremitäten fixiert. Die Wärmeplatte hatte eine konstante Temperatur von 37±0,5°C und wurde durch eine Wärmepumpe (Umwälzthermostat MT Lauda-Königshofen, Deutschland) kontinuierlich beheizt. Zur Erleichterung der Atmung und zur Verbesserung der Präparationsbedingungen wurde der Kopf des Tieres leicht überstreckt und der Oberkiefer durch eine Schlaufe am Rand der Wärmeplatte befestigt.

Danach erfolgte das Ableiten des Elektrokardiogramms (EKG). Vier aus Akupunktur-Nadeln (Stabilo® Kupfergriff, Fa. Wandrey, Berlin, Deutschland) gefertigte Elektroden wurden in allen Extremitäten subkutan angebracht und mit dem Powerlab Bio Amplifier (Fa. ADInstruments, Milford, MA) verbunden. Das EKG wurde ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich registriert. Anschließend wurde die rechte Halspartie mit einem in 37°C warmen NaCl 0,9% eingetauchten Tupfer befeuchtet um eine Verunreinigung der im Folgenden freigelegten Präparationsstelle mit Haaren zu vermeiden. Nach erneuter Überprüfung der Narkosetiefe durch Prüfung des Kornealreflexes erfolgte nach kurzem Einschnitt ein longitudinaler Schnitt unter Schonung der subkutanen Strukturen vom kaudalen Rand der Mandibula bis zum Beginn der Medioklavikularlinie. Besonders wurde hierbei auf die Vena jugularis externa geachtet. Die weitere Präparation erfolgte stumpf mit zwei gebogenen Splitterpinzetten (Aesculap Splitterpinzette gebogen 90 mm, 3 1/2, Melsungen Deutschland). Nun wurde die Haut vorsichtig mit einer feinen Schere beiderseits ca. 1,5 cm nach lateral vom Unterhautfettgewebe abpräpariert, was den Blick auf einen Bindegewebslappen freigab, in dem die Speicheldrüsen der Ratte (Gl. submandibularis) eingelagert sind. Am kaudalen Ende dieses Lappens wurde nun inzidiert und der Lappen mitsamt den enthaltenen Drüsen nach kranial bis zu den laterokranial liegenden Gefäßen freipräpariert. Unter Umständen musste zur Vermeidung von Spannungs- und Reizungszuständen an den Gefäßen eine transversale Durchtrennung des Musculus sternocleidomastoideus erfolgen. Anschließend wurde der Gefäß-Nervenstrang des lateralen Halses dargestellt. Die entstandene Wunde konnte durch einen Wundspreitzer offen gehalten werden. Unter Schonung des Nervus vagus und des sympathischen perivaskulären Nervengeflechtes wurde die Arteria carotis communis, sowie die Aufteilung in die beiden Hauptäste A. carotis interna (ACI) und A. carotis externa (ACE) dargestellt. Nach Freipräparation der ACI erfolgten eine Ligatur des Gefäßes am kranialen Ende der Darstellung und eine Fixation, damit die Beweglichkeit der ACI insgesamt reduziert wurde. Um Hinweise auf eine durch die veränderte extrakranielle Blutversorgung eventuell auftretende kritische zerebrale Oxygenierung zu erhalten, wurde die Atem- und Herzfrequenz in diesem Teil des Experimentes genau registriert. Anschließend wurden zwei weitere Ligaturen locker im kaudalen Drittel der präparierten Gefäßstrecke vorbereitet und proximal davon eine Gefäßklemme auf die ACI gesetzt. Mit einer Mikrofederschere (gerade 120 mm, 4 3/4, Aesculap, Melsungen, Deutschland) wurde nun das Gefäß eröffnet. Hierzu erfolgte der Einschnitt von ca. 3/4 des Gefäßdurchmessers distal der proximalen 2 lockeren Ligaturen und proximal der distalen Ligatur. Nun wurde der 2 French (F) messende Katheter durch den Einschnitt ins Gefäßsystem verbracht und nach proximal bis zur Gefäßklemme vorgeschoben. Nun konnten die bisher lockeren Ligaturen angezogen und fixiert werden, sowie die Gefäßklemme gelöst werden. Um einen eventuell auftretenden Blutverlust über die Gefäßinzision zu vermeiden, konnten die proximalen Ligaturen nochmals gestrafft werden. Nun erfolgte unter leicht rotierenden Bewegungen der Vorschub des Katheters durch die ACI, A. carotis communis dexter, Truncus brachiocephalicus und den Pars ascendens der thorakalen Aorta zum Auffinden der Valvula aortae, was sich als federnder Widerstand bemerkt machte. Nun konnten die supravalvulären Blutdruckwerte aufgezeichnet werden. Nach 5 Minuten Aufzeichnung konnte unter Kontrolle der registrierten Druckparameter der Katheter in den linken Ventrikel verbracht werden. Nach Abschluss der Datenaufzeichnung wurde der Katheter wieder in die supravalvuläre Position gezogen und erneut die Blutdruckparameter registriert. Im Vergleich der diastolischen Blutdruckwerte vor und nach Insertion des Katheters in den linken Ventrikel konnte eine eventuell entstandene Verletzung der Aortenklappe ausgeschlossen werden.

2.4.2. Datenaufzeichnung und -verarbeitung

Die Aufzeichnung der registrierten Parameter erfolgte mit Hilfe eines Analog-Digital-Wandlers (Powerlab 4/20, Fa. ADInstruments, Milford, MA), welcher an einen Computer (Fa. Eteque, 700 MHz Pentium II Prozessor) angeschlossen wurde. Die Aufzeichnung und Verarbeitung der registrierten Daten erfolgte mit der Software Chart v5.5.4. (Fa. Wisstech, Oberhausen, Deutschland). Mit dieser Software wurden kontinuierlich der Verlauf des gemessenen Druckes an der Katheterspitze und das EKG registriert. Die Aufzeichnung erfolgte mit 2000 Messpunkten pro Sekunde. Aus diesen Parametern konnten die Herzfrequenz aus dem EKG und der abgeleiteten Druckkurve errechnet und aufgezeichnet werden. Des Weiteren wurden die 1. Ableitung des

Druckverlaufs der maximal und minimal gemessene Druck kontinuierlich errechnet und aufgezeichnet.

Zur Auswertung der aufgezeichneten Datenmengen wurden jeweils 6 unabhängige Kontraktionen aus einem Versuchsabschnitt gewertet und die Werte gemittelt. Um die einzelnen Phasen der Herzaktion genauer zu betrachten wurden verschiedene Parameter der systolischen Kontraktion und der diastolischen Relaxation aus dem registrierten Druckverlauf errechnet. Aus der 1. Ableitung des linksventrikulären Druckanstieges wurde die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt_{max}) errechnet. Des Weiteren wurde die Differenz aus dem maximal gemessenen Druck einer Kontraktion und dem gemessenen Druck vor Beginn der systolischen Druckentwicklung am Ende der Diastole errechnet und als maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP) bezeichnet. Als Zeitparameter des systolischen Druckaufbaus diente die Bestimmung der Zeitspanne vom Beginn der markierten Druckkurve bis zum Erreichen des maximalen Wertes (time to peak).

Um den frühdiastolischen Druckabfall zu charakterisieren, wurde die maximale Druckabfallgeschwindigkeit (-dP/dt_{max}) aus der ersten Ableitung der Ventrikeldruckkurve berechnet. Der enddiastolische Druckwert unmittelbar vor Beginn des systolischen Druckanstieges wurde als LVEDP bezeichnet. Das Zeitintervall bis zum 25%igen (PQT) bzw. 50%igen (PHT) Abfall des registrierten linksventrikulären Drucks ausgehend vom maximal entwickelten Druck beschreibt den frühdiastolischen Druckabfall (Relaxation). Um die Phase der späten Relaxation näher zu beschreiben wurde die Zeitkonstante τ bestimmt. Aus analysierten Druck-Volumen-Diagrammen konnte der Beginn der isovolumetrischen Relaxation, also der Konstanz des linksventrikulären Volumens im Rahmen der Relaxation, am Punkt der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit (-dP/dt_{max}) beschrieben werden. Die Berechnung dieser dem Druckverlauf angenäherten Exponentialfunktion der Zeitkonstante τ erfolgte mit Hilfe der Software Chart v5.5.4. (Fa. Wisstech, Oberhausen, Deutschland) unter Verwendung der Formel $x_t = T_1 exp (t-t^0/\tau) + n$ (T1: Druck zum Zeitpunkt von -dP/dtmax; n: Schnittpunkt der variablen Asymptote mit der Ordinate, x_t : beliebiger Druck nach T_1 ; t⁰ und t: die entsprechenden Zeiten von T_1 und x_t). Die Zeitkonstante **t** wird somit unter der Schätzung von n auf Grund eines möglichen baseline-drift von der Software bestimmt.

Um Extrasystolen zu quantifizieren erfolgte die Umrechnung des registrierten Stromkurvenverlaufs aus der unipolaren EKG-Ableitung. Aus den Maxima des abgeleiteten Stromkurvenverlaufs (R-Zacken) erfolgte die periodische Frequenzberechnung. Das dabei errechnete Zeitintervall wurde kontinuierlich zwischen zwei aufeinanderfolgenden R-Zacken bestimmt. Dabei wurde eine R-Zacke bei einem Anstieg und Abfall der gemessenen Spannung über das 2,5-fache der Standardabweichung der Spannung der vorangegangenen Zacke über einem von der Software ge-
schätzten Niveau gewertet. Dieser Wechsel der R-R-Abstände wurde in einem Kurvenverlauf dargestellt. Aus dieser Kurve konnte nun die 1. Ableitung bestimmt werden und somit die Extrasystolen als auffällige Anstiege gezählt werden.

2.4.3. ß-adrenerge Stimulation mit Dobutamin

Nach Registrierung der linksventrikulären hämodynamischen Basalwerte wurden die linksventrikulären Funktonsparameter nach intraperitonealer Applikation 0,6mg/kg KG Dobutamin ((RS)-4-{2-[3-(4- Hydroxyphenyl)-1- methylpropylamino] ethyl}brenzcatechin, Fresenius liquid, Bad Homburg, Deutschland registriert). Es wirkt als Agonist an α_1 -, β_1 - und β_2 -Adrenorezeptoren. Durch die funktionell antagonistische Wirkung der α_1 - und β_2 -Adrenorezeptoren entsteht eine scheinbare β_1 - Selektivität. Dobutamin wirkt am Herzen hauptsächlich positiv inotrop und chronotrop.

2.4.4. Antagonisierung der β_1 -Adrenorezeptoren mittels Metoprolol

Die über Stimulation der β_1 -Adrenorezeptoren vermittelten Wirkungen wurden ca. 10 Minuten nach Dobutaminapplikation durch die intraperitoneale Gabe von 1,14 mg /kg KG Metoprolol ((*RS*)-1-(Isopropylamino)-3-[4-(2-methoxyethyl)- phenoxy]propan-2-ol, Sigma 115391-1G) antagonisiert.

2.4.5. Organentnahme

Nach Entfernung des Katheters aus dem Gefäßsystem und festem Verschluss der ACI durch Anziehen der proximalen Ligaturen wurde unter bestehender Narkose die Abdominalhöhle eröffnet und mit einem transversalen Schnitt ein transdiaphragmaler Zugang zur Pleurahöhle geschaffen. Sofort wurde der Thorax durch zwei transcostale Scherenschnitte in der mittleren Axillarlinie eröffnet und das entstandene, vordere Thoraxschild nach kranial geklappt. Nun konnten die thorakalen Gefäße dargestellt werden. Nach Fassen des Pars ascendens der thorakalen Aorta mit einer gebogenen anatomischen Pinzette wurde diese durchtrennt. Ohne Zeitverzug wurde nun das Herz aus seiner mediastinalen Position gelöst und die weiteren vaskulären Verbindungen (Vena cava superior et inferior, Truncus pulmonalis und Venae pulmonales) abgesetzt. Um eine hypoxische Beeinflussungen der weiteren Untersuchung zu minimieren wurde das Herz anschlie-Bend in eisgekühlte 0,9% NaCl-Lösung getaucht. Vor dem endgültigem Stillstand der Herzaktion erfolgte so das Auspressen des noch vorhandenen Restblutes aus den anatomischen Herzhöhlen. Nun wurde auf Eis noch vorhandenes mediastinales Bindegewebe abpräpariert und die Vorhöfe abgesetzt. Weiter erfolgte das Ablösen des rechten Ventrikels vom Linken. Anschließend die linksventrikulären Präparate mit einer vorgekühlten Wollenberger-Zange in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.5. Ca²⁺-Transport

2.5.1 Herzhomogenate

Für die Analyse des SERCA2a-katalysierten Ca²⁺-Transportes in die Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums wurden linksventrikuläre Homogenate hergestellt. Dazu wurden zunächst 20-30mg der bei -80°C gelagerten linksventrikulären Gewebeproben in einem Polypropylenröhrchen (Falcon, 12x75mm) mit dem 30-fachen Volumen eines eiskalten Homogenisationspuffers (0,25 M Saccharose, 10 mM Histidin, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 0,3 mM PMSF und 0,5 mM DTT, pH 7,4) versetzt. Mit einem ebenfalls vorgekühlten Polytron-Homogenisator (Schaft PTA 10S) wurden die Probe anschließend bei 21.000 U/min und Kühlung im Eiswasserbad sechs-mal für 10s homogenisiert. Zwischen den Homogenisationsschritten wurde eine Pause von 15s eingehalten. Das durch eine Polyamidgaze (140 μm, Fa. Neolab, Heidelberg, Deutschland) gefilterte Homogenat wurde in 50 μl bzw. 100 μl Fraktionen portioniert und anschließend in 1,5 ml Eppendorf-tubes in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Durchführung der folgenden Experimente erfolgte bei -80°C.

2.5.2. Proteinbestimmung

Um eine quantitative Aussage über den vesikulären Transport ⁴⁵Ca²⁺-Transport an den verwendeten Homogenaten linker Ventrikel treffen zu können, musste zuvor eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration der Probe erfolgen. Hierzu wurde die Methode nach Lowry verwendet¹¹⁴. Da dieses Verfahren auf der Bestimmung von Extinktionswerten beruht, musste zunächst eine standardisierte Eichkurve erstellt werden. Aus einer Proteinstammlösung (Bio-Rad; Protein Standard Assay) mit der Konzentration von 1,37 mg/ml wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt werden: 13,7 µg, 27,4 µg, 41,1 µg, 54,8 µg, 68,5 µg

Nachdem 50µl der linksventrikulären Homogenate bzw. der vorverdünnten Proteinstammlösungen mit 50 µl NaOH gemischt wurden, konnten 2,5 ml eines Gemisches aus 1ml Lösung 1 (2% Na₂CO₃ in 0,1 M NaOH) und 50ml Lösung 2 (1% CuSO₄*5H₂O in 2% K-Na-Tartat) hinzugegeben werden. Hierbei ist ein blauer Farbumschlag zu beobachten, welcher auf der Bindung freier Cu²⁺ -Ionen mit Stickstoffatomen der vorliegenden Peptidbindungen beruht. Um eine möglichst vollständige Reaktion dieser Cu²⁺-Ionen zu gewährleisten, wurde die Lösung für 15 min bei Raumluft inkubiert. Anschließend wurden 250 µl Folin Reagenz (Folin-Ciocalteu`s-Phenol) zugefügt. Im Anschluss an eine Ruhephase von 40 min konnten die Extinktionen der Lösungen bei 585 nm mit einem Absorptionsspektralphotometer UV-VIS 1202 (Fa. Shimadzu, Duisburg, Deutschland) bestimmt werden. Nach Doppelbestimmung der Extinktion für jede Probe konnte an Hand der ermittelten Eichkurve aus der verdünnten Proteinstammlösung und der Software Radlig 3.0 (Biosoft, Cambridge, GB) die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet werden.

2.5.3. Oxalat-stimulierter ⁴⁵Ca²⁺-Transport

Der durch SERCA2a- katalysierte Ca²⁺-Transport in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) wurde als Oxalat-stimulierte ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme in Homogenaten linksventrikulärer Präparate (siehe2.5.1.) gemessen. Es handelt sich hierbei um die. Millipore-Vakuum-Filtrationsmethode unter Nutzung von ⁴⁵CaCl. Die SR-Membranvesikel sind in den Homogenaten so orientiert wie das SR in einem Kardiomyozyten, so dass die SERCA2a-ATPase der SR-Vesikel unter in vitro Bedingungen ⁴⁵Ca²⁺ aus dem Ansatzmedium in das Vesikellumen transportieren wird. Die Reaktionsbedingungen waren dabei so gewählt, dass nicht SR-assoziierte Ca2+-Transportaktivitäten in den Homogenaten weitestgehend ausgeschaltet wurden. So hemmt das in der Ansatzlösung enthaltene NaN₃ die mitochondriale Ca²⁺-ATPase. Die Aktivität des sarkolemmalen NCX wurde durch das vollständig Na⁺-freie Medium inhibiert. Neben der SERCA2a-katalysierten Transportaktivität stellt die durch Ca²⁺-ATPasen der Plasmamembran vermittelte ATP-abhängige Ca²⁺-Aufnahme, unter den gewählten Bedingungen nur einen Anteil von kleiner als 5% dar. Das Ca2+-Aufnahmemedium mit einem Ansatzvolumen von 200 µl enthielt 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaN₃, 0,2 mM EGTA, 5 mM Tris ATP, 6 mM Kreatinphosphat, 10 mM K-Oxalat, 40 mM Imidazol sowie variable Konzentrationen von radioaktiv markiertem ⁴⁵CaCl₂. In zwei verschiedenen Versuchsreihen wurden freie ⁴⁵Ca²⁺-Konzentrationen von 0,346 µmol/l bzw. 3,68µmol/l verwendet. Die Einstellung der freien Ca²⁺-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Ca²⁺/ EGTA-Puffersystems. Das in das Vesikellumen transportierte ⁴⁵Ca²⁺ bildet mit Oxalatanionen das schwer lösliche ⁴⁵Ca-Oxalat und präzipitiert bei Überschreiten des Löslichkeitsproduktes innerhalb der Vesikel. Daraus resultiert eine anhaltend niedrige intravesikuläre Konzentration an freiem ⁴⁵Ca²⁺, welche einen hohen transmembranären Ca²⁺-Konzentrationsgradient aufrechterhält und den passiven Efflux aus den SR-Vesikeln vermindert. Durch die Oxalatwirkung wird daher der SR-⁴⁵Ca²⁺-Transport ca. 100-fach gesteigert. Die pro Zeiteinheit aufgenommene ⁴⁵Ca²⁺-Menge ist ein verlässliches in vitro Maß für die SERCA2a-katalysierte Ca²⁺-Transportaktivität des SR.

Der Start des vesikulären ⁴⁵Ca²⁺-Transports erfolgte durch Zugabe 10µl des linksventrikulären Homogenats zum ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahmemedium. Nach zwei Minuten wurden 150 µl Reaktionsmedium durch einen 0,45 µm Membranfilter (Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland) in einer Vakuumfiltrationsapparatur filtriert und so der Ca²⁺-Aufnahmeprozess beendet. Um sicher zu stellen, dass sämtliche Ca²⁺-Transportaktivitäten vollständig unterbunden wurden, erfolgte eine sofortige Spülung der Membranfilter mit zweimal 3 ml eiskalter Waschlösung (2mM EGTA, 100mM KCl, 40mM Imidazol, pH 7,0). Nach Überführung der gewaschenen Filter in Szintillationsröhrchen wurden sie für 30 min bei 60°C im Trockenschrank getrocknet. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit die Messung der β-Strahlung in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Liquid Szintillation Analyzer TRI-CARB 2200CA, Fa. Packard BioScience GmbH, Dreieich, Deutschland) gegen ⁴⁵Ca-Standard. Dabei stellt die gemessene Strahlung ein Maß für die filtergebundene ⁴⁵Ca-Menge dar. Der Variationskoeffizient dieser Methode liegt bei weniger als fünf Prozent. Es erfolgten routinemäßig Dreifachbestimmungen bei jeweils niedriger und hoher freier ⁴⁵Ca²⁺-Konzentration sowie nach Zugabe von 20μM Ruthenium-Rot, welches den passiven vesikulären ⁴⁵Ca²⁺ inhibiert.



Abb. 2.3. Prinzip der Oxalat-stimulierten Ca²⁺-Aufnahme

Senkung der intravesikulären freien [Ca²⁺] durch Komplexierung und Ca²⁺-Oxalatpräzipation. Oxalat²⁻ gelangt über einen Anionenaustauscherprozess in das Vesikellumen und ist für die Ca²⁺-Aufnahme nicht geschwindigkeitslimitierend. Ruthenium-Rot wirkt als Antagonist der Ca²⁺-Freisetzungskanäle (**RyR** - Ryanodinrezeptor) Effluxlimitierend, **SERCA2a** – Isoform 2a der Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, **PLB** – Phospholamban, Regulationsprotein von SERCA2a

2.6. Statistik

Für die statistischen Analysen wurde die Software SigmaStat v3.5.0 (Fa. SYSTAT Software Inc., Erkrath, Deutschland) verwendet. Bei der Analyse der Daten von mehr als zwei Gruppen erfolgte bei normal verteilten Daten die Varianzanalyse(ANOVA). Als post-Tests wurden anschließend der Holm-Sidak und bei Mehrfachvergleichen gegenüber einer Kontrollgruppe der Dunnetts-Test verwendet. Bei nicht-normal verteilten Daten wurde eine Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis (One Way Analysis of Variance on Ranks) verwendet. Hierbei dienten bei ungleicher Gruppengröße der Dunn`s-Test und bei weiteren Vergleichen zweier Gruppen der Tukey-Test als post-Tests.

Nichtparametrische Analysen zweier unabhängiger Stichproben wurden mit dem Rangsummentest nach Mann-Withney bestimmt, parametrische mit dem t-Test. Abhängige Stichproben wurden dementsprechend mit dem Wilcoxon Rangsummentest und dem gepaarten t-Test analysiert. Die Methode des kleinsten Quadrates diente der Untersuchung möglicher Korrelation zweier Mengen mittels einer linearen Regressionsanalyse.

Alle in dieser Arbeit angegebenen Werte sind, falls es nicht anders ausgewiesen wurde, Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM). Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p<0,05 angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Versuchstiere

3.1.1. Wurfgröße, Genotypenverteilung und Überlebenszeit der Tiere

Bei der Analyse der Wurfgröße, Genotypenverteilung und Überlebenszeit der Tiere wird sich in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich auf die Ergebnisse der Untersuchung von doppelttransgenen mRen2/SERCA2a (SERen) und einfach-transgenen mRen2-Tieren (Ren2) konzentriert. Des Weiteren erfolgten die Untersuchungen an Tieren der Kontrollgruppen vom Wildtyp und einer normotensiven SERCA2a-Tiergruppe. Im untersuchten Zeitraum von 04/2005 bis 07/2009 gingen insgesamt 369 Tiere aus der Zucht von hypertensiven homozygot-transgenen TGRmRen2(27)-Männchen mit normotensiven heterozygot-transgenen SERCA2-Weibchen hervor. Die Geschlechtsverteilung war, wie in Abb. 3.1. dargestellt, im ausgeglichenen Verhältnis mit 182 männlichen Nachkommen und 187 weiblichen Nachkommen. Unter den weiblichen Nachkommen waren 56% Ren2-Tiere und 44% SERen-Tiere. Von den männlichen Nachkommen zählten 52% zur Ren2-Gruppe und 48% zur SERen-Gruppe. Die Verteilung der Genotypen über die beiden Geschlechter entspricht demnach der erwarteten Verteilung.



Abb. 3.1. Anzahl der Ren2-/SERen -Nachkommen

Nachkommen aus der Verpaarung homozygoter TGRmRen2(27)-transgener männlicher Ratten mit heterozygoten SERCA2a-transgenen Weibchen der. Ren2 – heterozygote mRen2-transgene Ratten, SE-Ren – heterozygote doppelt transgene mRen2/SERCA2-transgene Ratten. w = weiblich, m = männlich

Die mittlere Wurfgröße der heterozygoten SERCA2a-transgenen Mütter in der Zucht betrug sieben Tiere. Im Vergleich dazu betrug die mittlere Wurfgröße aus der Zucht SERCA2transgener Weibchen mit männlichen SERCA2-transgenen Tieren neun Nachkommen pro Wurf. Die Wurfgröße unterliegt hierbei der in Abb. 3.2. dargestellten, ausgeprägten Varianz.

Pro Wurf wurden im Durchschnitt 3,6 weibliche und 3,5 männliche Ren2 bzw. SERen-Nachkommen geboren. Die Genotypenverteilung der Würfe gestaltete sich ausgeglichen. Im Mittel gingen aus jedem Wurf 2,0 weibliche Ren2, 1,7 weibliche SERen sowie 1,8 männliche Ren2 und 1,7 männliche SERen Nachkommen hervor. Um einen Überlebensvorteil bzw. - nachteil herauszustellen, erfolgte die Analyse der natürlich verstorbenen Tiere bis zu einem Lebensalter von 30 Wochen, dem Zeitpunkt der hämodynamischen Messungen und Herzentnahme.



Abb. 3.2. Wurfgrößenverteilung der untersuchten SERCA2-/Ren2-/SERen-Tiere

Verteilung der Wurfgrößen in % aller Würfe der Tiere über den Zeitraum 04/2005 bis 07/2009

Bis zu einem Alter von 30 Wochen verstarben insgesamt 58 männliche und 34 weibliche Ren2bzw. SERen-Tiere. Bei annähernd gleicher Verteilung unter männlichen Tieren innerhalb der Versuchsgruppen (31 Ren2-Tiere und 27 SERen-Tiere) ist kein Vorteil bezüglich des Überlebens bis zur 30. Woche durch zusätzliche Expression des SERCA2a-Transgens in den hypertensiven Tiergruppen festzustellen. Im Vergleich dazu verstarben in diesem Zeitraum nur 11 weibliche Ren2-Tiere, was somit einen statistisch signifikanten Unterschied von der männlichen Ren2-Gruppe bedeutet. Mit einer Gesamtzahl von 23 verstorbenen weiblichen SERen-Tieren ist kein signifikanter Unterschied zur männlichen SERen-Gruppe zu finden. Trotz des tendenziell längeren Überlebens der weiblichen Ren2-Tiere im Vergleich zu den zusätzlich SERCA2-transgen SERen-Tieren ist dies auf Grund der großen Varianz nicht statistisch signifikant (siehe Abb. 3.3.).



Abb. 3.3. Überlebensrate von Ren2-/SERen-Tieren

A - Vergleich des Überlebens der männlichen Ren2- und SERen-Tiere in % aller Lebendgeborenen
B - Vergleich des Überlebens der weiblichen Ren2- und SERen-Tiere in % aller Lebendgeborenen.
Untersuchungszeitraum bis zum Lebensalter von 30 Wochen von insgesamt 369 Nachkommen

3. Ergebnisse

3.1.2. Genotypisierung

3.1.2.1. Nachweis des mRen2-Transgens

Zur Beschreibung des Genotyps von Ren2- und SERen-Tieren wurde, wie unter Punkt 2. (Material und Methoden) näher beschrieben, aus Schwanzbiopsien drei Wochen alter Ratten DNA extrahiert und mittels transgen-spezifischer Primer in der PCR amplifiziert werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung der gewonnen PCR-Amplifikate konnte ein deutliches positives Signal in der erwarteten 700 Kilobasenpaare (kb) Bande bei DNA von Tieren mit dem mRen2-Transgen gezeigt werden (Abb. 3.4.). Dies entspricht der Erwartung der Zucht und beweist die Transgenität des verwendeten Tiermodells. Die DNA-Proben der verpaarten SERCA2-Weibchen zeigen dementsprechend ein negatives Signal.



Abb. 3.4. Nachweis des mRen2-Gens in Ren2-/SERen- und SERCA2-Tieren

Die Abbildung zeigt ein Ethidiumbromid-gefärbtes 0,8%-iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennter PCR-Produkte von 6 SERCA2-Tieren (negativ bezüglich des mRen2-Transgens (-)) und 17 Ren2-/SERen (transgenpositiven (+)) Tieren. +**C** – Positivkontrolle, -**C** – Negativkontrolle, **L** – Leerprobe ohne DNA, **100bp** - 2,5 μ g 100 bp DNALeiter (0,5 μ g/ μ l)

3.1.2.2. Nachweis des SERCA2a-Transgens

Simultan des mRen2-Nachweises (siehe 3.1.2.1.) erfolgte zum Nachweis des SERCA2a-Transgens im Genom der Versuchstiere eine elektrophoretische Auftrennung der zuvor in der PCR amplifizierten transgen-spezifischen Teilsequenzen.

Da die Nachkommen aus der Verpaarung der TGRmRen2(27)-Männchen und SERCA2-Weibchen entweder heterozygot SERCA2a-transgen positiv oder transgen-negativ waren, wurden alle Tiere nach dieser Methode genotypisiert und bei einem positiven Signal in der 304kb-Bande als SERen und bei fehlendem Signal als Ren2 klassifiziert (exemplarisch siehe Abb. 3.5.).



Abb. 3.5. Nachweis des transgenspezifischen SERCA2a-Gens in Ren2- und SERen-Tieren

Ethidiumbromid gefärbtes 0,8 % -iges Agarosegel mit der Gelelektrophorese von PCR-amplifizierten transgenspezifischen Teilsequenzen (humaner CMV-Immediate-Early-Enhancer) von jeweils 5 SERCA2-transgen-negativen Ren2-Tieren (-) und 5 transgen-positiven SERen-Tieren (+). **+C** - Positivkontrolle (durch Southern Blot-Analysen geprüfte DNA von SERCA2a-transgen-positiven Tieren) **-C** - Negativkontrolle **P** – SERCA2a-Transgen-Plasmid, **L** – Leerprobe ohne DNA, **100bp** - 2,5 μ g 100 bp DNALeiter (0,5 μ g/ μ l), Pfeil markiert 304bp

3.1.3. Grad der kardialen Fibrosierung

Um einen optischen Eindruck über den interzellulären Fibrosierungsgrad der Herzen der untersuchten Tiermodelle zu erhalten, wurden linksventrikuläre Schnittpräparate angefertigt und mittels Pircosirius-Rot gefärbt. Besonders stellt sich hierbei die extrazelluläre Kollagenmatrix dar, welche sich im Rahmen einer kardialen Fibrosierung deutlich vermehrt. Eine zunehmende Fibrosierung ist in der Entwicklung einer Herzhypertrophie zu beobachten. In der vergleichenden Betrachtung, der exemplarisch in Abb. 3.6. dargestellten Schnitte, fällt eine deutlich stärkere Färbung der extrazellulären Matrix hypertensiver Ratten (Ren2, SERen) gegenüber den korrespondierenden normotensiven Tieren (WT, SERCA2) auf. Während durch eine zusätzliche Expression des SERCA2a-Transgens in den normotensiven Gruppen kein Unterschied hinsichtlich des angefärbten Kollagens erkennbar ist, scheint diese zusätzliche Expression bei den hypertensiven Versuchsgruppen zu einer Verminderung der dargestellten Matrixproteine zu führen. Diese Beobachtung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter photometrisch bzw. morphometrisch quantifiziert, da die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse gegen diesen Eindruck sprechen.



Abb.3.6. Exemplarische Histologie des linken Ventrikels von WT-/SERCA2-/Ren2- und SERen-Tieren Repräsentative Picrosirius-Rot gefärbte Schnitte des linken Ventrikels von SERCA2a-transgenen (SERCA2a), mRen2-transgenen (Ren2) und mRen2/SERCA2a-doppeltransgenen (SERen) Ratten in einer 5-fachen Vergrößerung

3. Ergebnisse

3.1.4. Basischarakterisierung der Tiere

Bei der allgemeinen Charakterisierung der Versuchstiergruppen ist bezüglich der Körpergewichte und der spezifischen Herzgewichte kein relevanter Unterschied zwischen den normotensiven Gruppen der SERCA2a- und Spraque-Dawley Wildtyptiere festzustellen. Bei vergleichbaren Gesamtkörpergewichten der Ratten von im Mittel 503±4 g zeigt sich eine signifikante Zunahme der linksventrikulären Masse in den hypertensiven, d.h. mRen2-transgenen Gruppen Ren2 und SE-Ren. Dies ist in Tab 3.1. dargestellt. Ebenfalls stellte sich eine um 30% erhöhte Ratio des linksventrikulären Feuchtgewichtes in Bezug auf die Gesamtkörpermasse in beiden mRen2transgenen Tiergruppen vergleichbar dar. Im Gegensatz dazu sind die Feuchtgewichte des rechten Ventrikels hypertensiver Ratten und das auf das Körpergewicht normierte rechtsventrikuläre Gewicht nicht signifikant vom Wildtyp verschieden. Ein Effekt der zusätzlichen SERCA2-Expression auf die Herzgewichte und deren Indizes in der hypertensiven SERen-Gruppe, vergleichend zur ebenfalls hypertensiven Ren2-Gruppe ist nicht erkennbar.

Parameter	WT	SERCA2	Ren2	SERen
KG (g)	481 ± 6	502 ± 12 (+4)	537 ± 21 (+12)	515 ± 22 (+7)
LV (mg)	995 ± 24	1079 ± 35 (+8)	$1421 \pm 52^{*} (+43)$	1344 ± 53* (+35)
RV (mg)	254 ± 10	308 ± 14 (+20)	$328 \pm 26 $ (+28)	340 ± 23 (+32)
HW (mg)	1375 ± 29	1532 ± 45 (+11)	$1982 \pm 95*$ (+44)	$1906 \pm 79*$ (+39)
LV/KG (mg/g)	2,07 ± 0,04	$2,15 \pm 0,06$ (+3)	$2,72 \pm 0,17*$ (+31)	$2,68 \pm 0,18*$ (+30)
RV/KG (mg/g)	0,53 ± 0,02	0,62 ± 0,03 (+17)	$0,63 \pm 0,06$ (+19)	$0,68 \pm 0,06$ (+28)

Tabelle 3.1. Allgemeine Charakterisierung der Versuchstiere

Körpergewicht (KG), linksventrikuläres Feuchtgewicht (LV), rechtsventrikuläres Feuchtgewicht (RV), Gesamtherzgewicht (HW). Daten sind Mittelwerte ± SEM für 10 bis 17 Versuchstiere pro Gruppe. 30 Wochen alte Spraque-Dawley Wildtypratten (WT), SERCA2a-transgenen (SERCA2), mRen2-transgenen (Ren2) und SERCA2a/mRen2 doppelt-transgenen (SERen) Ratten. Prozentuale Änderung im Vergleich zu WT in Klammern. *p<0.05 vs. WT und SERCA2.

3.2. Hämodynamische Funktionsparameter

Die hämodynamischen Funktionsparameter einschließlich des aortalen Blutdruckes und der linksventrikulären Funktion wurden, wie ausführlich in 2. Material und Methoden beschrieben, mittels eines über die rechte Arteria carotis communis eingebrachten 2F MillarTip-Katheters und supravalvulär in der aszendierenden Aorta liegend, registriert und über Druck-Zeit-Diagramme berechnet.

3.2.1. Aortaler Blutdruck

Zur Bestimmung des Blutdruckes wurden registrierte Druck-Zeit-Diagramme ausgewertet. In Abb. 3.7. sind repräsentative Kurvenverläufe für 3 Versuchsgruppen dargestellt. Der innerhalb eines Kurvenverlaufes höchste gemessene Druckwert wurde als systolischer und der niedrigste gemessene Druckwert als diastolischer Blutdruckwert definiert. Die angegebene Blutdruckamplitude errechnet sich als Differenz des diastolischen vom systolischen Wert. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied im aortalen Druckverhalten zwischen den mRen2-transgenen und normotensiven Tiergruppen. Auf Grund der höheren Amplitude ergibt sich ein steilerer Druckanstieg. Ebenfalls ist bei den hypertensiven Tieren eine Abflachung des Druckanstieges vor maximaler Druckentwicklung, wie vergleichend in der Kontrollgruppe dargestellt, nicht zu erkennen. Außerdem wird deutlich, dass der diastolische Druckabfall beschleunigt abläuft.



Abb.3.7. Exemplarischer supravalvulärer aortaler Blutdruckverlauf

 \mathbf{A} – Verlauf der Blutdruckkurve eines repräsentativen SERen-Tieres. \mathbf{B} – Verlauf der Blutdruckkurve eines repräsentativen Ren2-Tieres. \mathbf{C} – Verlauf der Blutdruckkurve eines repräsentativen Kontrolltieres vom Wildtyp

Die registrierten Herzfrequenzen zeigten im Vergleich aller Versuchsgruppen keinen signifikanten Unterschied. Es zeigt sich jedoch eine leichte Zunahme der Herzfrequenz in den Renintransgenen Tiergruppen Ren2 und SERen, die jedoch im Vergleich zum WT nicht signifikant unterschiedlich ist (siehe Abb. 3.8.).

Innerhalb der normotensiven Tiergruppe, der einfach SERCA2-transgenen Tiere, wurde ein gemittelter systolischer Blutdruck von 138±5 mmHg bestimmt, welcher somit zur WT-Kontrollgruppe mit 134±3 mmHg nicht signifikant verändert ist. Wie in Abb. 3.8. abgebildet, zeigt sich mit einer signifikanten Zunahme des systolischen Blutdruckes um 31% der Ren2-Tiere und um 27% bei der doppelt-transgenen SERen Rattenlinie der hypertensive Zustand dieser Tiere (Ren2- 174±7 mmHg, SERen- 170±6 mmHg). Der diastolische Blutdruck ist mit 131±5 mmHg bei Ren2-Tieren ebenfalls um 26% zum WT erhöht. Gleiches zeichnet sich auch bei der doppelt-transgenen SERen-Tiergruppe mit einem diastolischen Blutdruck von 129±5 mmHg ab. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den hypertensiven Tiergruppen. Die einfachtransgenen SERCA2-Tiere zeigen mit einem diastolischen Blutdruck von 108±4 mmHg keine relevante Differenz zur Kontrollgruppe. Wie ebenfalls in Abb. 3.8. repräsentiert ist eine deutliche Zunahme der gesamten Blutdruckamplitude der hypertensiven Gruppen Ren2 und SERen im Vergleich zum Wildtyp (30±1 mmHg) zu verzeichnen. Mit der Erhöhung der Amplitude um 43% der einfach-transgenen Ren2 -Tiere und +42% der doppelt-transgenen SERen-Tiere im Vergleich zur Kontrolle, stellt sich jedoch kein Einfluss der zusätzlichen Expression des SER-CA2-Transgens dar. (44±2mmHg Ren2, 42±2mmHg SERen).

In Tabelle 3.2. ist die Änderung des aortalen Blutdrucks nach Gabe des β_1 -selektiven Antagonisten Metoprolol (1,14 µg/g KG i.p.) dargestellt. Beim Vergleich des systolischen Blutdruckes der hypertensiven Gruppen Ren2 und SERen zum Wildtyp ergibt sich ein signifikant höherer maximaler Druckwert nur bei Ren2-Tieren. Der systolische Blutdruck vom doppelt-transgenen SE-Ren-Tiere wiederum unterscheiden sich unter Einfluss von Metoprolol nicht vom dem des Wildtyptieres. Während beim Wildtyp eine leichte Zunahme des systolischen Blutdruckes zu verzeichnen ist, kommt es in der SERen-Gruppe zu einem signifikanten Absinken des systolischen Blutdruckwertes im Vergleich zur Ausgangsbedingung.





A - systolischer aortaler Blutdruck (BD_{syst}) ; **B** - diastolischer aortaler Blutdruck (BD_{diast}); **C** - Blutdruckamplitude (BD Amplitude); **D** - spontane Herzfrequenz bei aortal liegender Katheterspitze. Wildtypkontrollratten (WT), SER-CA2-transgene (SERCA2), Ren2-transgene (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgene (SERen) Versuchstiere. Daten sind Mittelwerte \pm SEM für 10-15 Tiere pro Gruppe. *p<0.05 vs. WT und SERCA2

Ein deutlicher Effekt der ß₁-adrenergen Antagonisierung ist mit einer Abnahme des diastolischen Wertes um 26% bei Ren2- und 25% bei SERen-Ratten aufzuzeigen. Bei interessanterweise kaum verändertem diastolischem Blutdruckverhalten der Wildtyptiere unter dem Einfluss von Metoprolol ist kein signifikanter Unterschied mehr zu SERen- bzw. Ren2-Tieren nachzuweisen In den normotensiven Tiergruppen SERCA2 und WT ist die Amplitude des registrierten Blutdruckes im Vergleich zum Ausgangswert unter Metoprololwirkung signifikant vergrößert (+38% SERCA2, +33% WT). Sie liegt nun im Bereich der Amplitude der hypertensiven Tiergruppen unter Ausgangsbedingungen. Im Kontrast dazu, findet sich in den mRen2-transgenen Gruppen eine nicht signifikant veränderte Blutdruckamplitude unter der Wirkung von Metoprolol. Unter dem Einfluss einer ß-adrenergen Antagonisierung sind kaum Veränderungen der spontanen Herzfrequenz zu beobachten.

Parameter	W'T	SERCA2	Ren2	SERen
BD syst (mmHg)	142 ± 4 (+5)	140 ± 7 (+1)	$157 \pm 5^{**}$ (-10)	152 ± 5 (-11)*
BD diast (mmHg)	102 ± 2 (-1)	95 ± 9 (-13)	96 ± 13 (-26)*	95 ± 14 (-25)*
BD Ampl (mmHg)	$41 \pm 2 (+33)^*$	44 ± 3 (+38)*	$51 \pm 3^{**}$ (+16)	45 ± 4 (+7)
HF (min ⁻¹)	294 ± 10 (-3)	322 ± 13 (+7)	$321 \pm 9 (+3)$	304 ± 12 (-6)

Tabelle 3.2. Aortaler Blutdruck und Herzfrequenzen unter ß-adrenerger kompetitiver Hemmung mit Metoprolol

Systolischer Blutdruck (BD_{syst}), diastolischer Blutdruck (BD_{diast}), Blutdruckamplitude (BD Ampl) sowie Herzfrequenz (HF) unter ß-adrenerger Hemmung mit 1,14 μ g/g KG i.p. Metoprolol nach vorangegangener ß-adrenerger Stimulation mit Dobutamin (0,06 μ l/g KG (10mg/ml)) an SERCA2-transgenen (SERCA2), Ren2-transgenen (Ren2), SERCA2/Renin doppelt transgenen (SERen) Ratten und Kontrollratten vom Wild-Typ (WT) in einer Thiopentalnarkose mit 70mg/kg KG intraperitoneal. Relative Änderungen in Prozent in Klammern beziehen sich auf aortal registrierte Werte vor medikamentöser Intervention. Daten sind Mittelwerte \pm SEM für 10-15 Tiere pro Gruppe. *p<0,05 vs. BD basal **p<0.05 vs. WT

3.2.2. Systolische linksventrikuläre Funktion

Zur Untersuchung der linksventrikulären kardialen Funktion wurde, wie ausführlich in 2. Material und Methoden beschrieben, ein 2F MillarTip-Katheter durch die Valva aortae in den linken Ventrikel verbracht und die registrierten Druckveränderungen über Druck-Zeit-Diagramme ausgewertet. Ein typischer Verlauf dieser Druckentwicklung ist in Abb. 3.9. abgebildet.



Abb. 3.9. Repräsentativer linksventrikulärer Druckverlauf

A – Verlauf der linksventrikulären Druckkurve eines Wildtyp(WT) -Tieres. B – Verlauf der Druckkurve eines Ren2transgenen (Ren2) -Tieres. C - Verlauf der Druckkurve eines Renin/SERCA2a-doppeltransgenen (SERen)-Tieres. 1 – linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP). 2- maximale systolische Druckanstiegsgeschwindigkeit +dP/dt_{max}. 3 – maximaler systolischer linksventrikulärer Druck, entspricht systolischem Blutdruck (peak). 4 - maximale diastolische Druckabfallsgeschwindigkeit -dP/dt_{max}.

3.2.2.1. Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP)

Mit einem LVdP von 148±2 mmHg bei Wildtyptieren und 158±5 mmHg bei den SERCA2-Tieren besteht kein statisch signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden normotensiven Tiergruppen. Bei einem im Mittel um 3% niedrigeren LVdP als bei den Kontrolltieren besteht bei den hypertensiven Tiergruppen Ren2 (143±3 mmHg) und SERen (143±5mmHg) keine Einschränkung der systolischen Druckentwicklung des linken Ventrikels unter Ruhebedingungen.



Abb. 3.10. Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP)

LVdP von narkotisierten Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2-transgenen (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgenen (SERen) Ratten unter basalen Bedingungen. Daten sind Mittelwerte± SEM für 9-11 Tiere pro Gruppe. Bei Betrachtung der Abhängigkeit des LVdP von der linksventrikulären Muskelmasse (LV-Gewicht) in Abb. 3.11.A zeigt sich eine inverse lineare Korrelation dieser Parameter. Der bestehende Korrelationskoeffizient von annähernd r=0,3 verstärkt die Annahme der zunächst funktionell noch kompensierten Hypertrophie der mRen2-transgenen Tiere. Mit steigender LV-Masse kommt es zum Absinken des maximalen entwickelten linksventrikulären Druckes. Auf Grund dieser Annahme und der bereits beschriebenen strukturellen kardialen Veränderungen der hypertensiven Tiergruppen erfolgt die Betrachtung des LVdP in Abhängigkeit des LV-Gewichts.

Die in Abb. 3.11.B gezeigte maximale linksventrikuläre Druckentwicklung normiert auf das jeweilige LV-Gewicht bringt mit einer Abnahme von 27% bei Ren2 ($108\pm2 \text{ mmHg/g}$) in Bezug zum WT ($147\pm3 \text{ mmHg/g}$) eine systolische Funktionseinschränkung zum Ausdruck. Eine zusätzliche Expression des SERCA2a-Transgens in SERen-Tieren hat auf diese Entwicklung keinen relevanten Einfluss (SERen – $104\pm2 \text{ mmHg/g}$)





maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP), linksventrikuläres Feuchtgewicht (LV Gewicht) Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2-transgenen (Ren2) und SERCA2/mRen doppelt transgenen (SERen) Ratten unter basalen Bedingungen. **A** – Abhängigkeit des LVdP vom linksventrikulären Feuchtgewicht, y=-13.9x+162, r=0,3; **B** – Normierung des LVdP auf das LV Gewicht. Daten sind Mittelwerte± SEM für 8-10 Tiere pro Gruppe; *p<0,05 vs. WT

Nach Stimulation der ß₁-Adrenorezptoren durch Gabe von 0,06 µl/g KG (10mg/ml) Dobutamin intraperitoneal zeigt sich die in Abb.3.12. dargestellte Steigerung des LVdP. Eine Zunahme der entwickelten Kraft auf 161±11 mmHg der WT-Ratten ist vergleichbar der Zunahme der hypertensiven Ren2 und SERen (156±4mmHg bzw. 159mmHg). Die nicht dargestellten SERCA2transgenen Tiere zeigten sich mit einer Erhöhung des LVdP auf 161±5mmHg zum WT vergleichbar. Im Bezug auf die ß-adrenerge Reaktion stellte sich eine tendenziell verminderte Ansprechbarkeit der mRen2-transgenen Tiere dar. Dies wird durch einen 1,3-fachen Anstieg des LVdP unter Dobutaminwirkung in der Kontrollgruppe im Vergleich zum nur 1,1-fachen Anstieg der Ren2 im Bezug zum Ruhewert deutlich. Ebenfalls zeichnet sich eine nicht signifikant schwächere Zunahme des LVdP um das 1,07-fache bei SERen-Tieren ab. Dies ist mit dem Zuwachs des LVdP um das 1,04-fache bei SERCA2-Tiere vergleichbar.



Abb. 3.12. LVdP unter ß-adrenerger Stimulation mit Dobutamin

A - Normierung des LVdP auf das LV Gewicht **B** - Absolutwerte **C** - relative Zunahme des maximal entwickelten linksventrikulären Druckes im Vergleich zum Ausgangswert . Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP), Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2-transgenen (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgenen (SERen) Ratten. 0,06 μ /g KG (10mg/ml) Dobutamin. Mittelwerte ± SEM für 9-11 Tiere pro Gruppe. *p<0,05 vs. WT

In der im Anschluss an die Dobutaminstimulation durchgeführte Gabe des β_1 -selektiven Adrenorezeptorantagonisten Metoprolol mit 1,14µg/g KG intraperitoneal ist der LVdP der Ren2-Tiere mit 132±4 mmHg signifikant geringer als der LVdP der Kontrollgruppe vom WT mit 151±7mmHg. Mit 137±10mmHg ist der LVdP der doppelt-transgenen SERen-Gruppe im Verhältnis zum WT nur leicht negativiert und unterscheidet sich damit statistisch nicht signifikant von diesem. Bei der Analyse der relativen Änderung des LVdP unter Metoprololwirkung im Vergleich zum Ausgangswert zeigt sich mit einem um 11% reduzierten LVdP der SERen-Tiere ein signifikanter Unterschied zur Zunahme des LVdP um 3% bei der untersuchten Kontrolle. Dieser negativ inotrope Effekt von Metoprolol ist auch bei der Ren2- Gruppe mit einer Abnahme des LVdP um 3 % und der einfach SERCA2-transgen Gruppe mit 2% jedoch nicht signifikant zu beobachten (siehe Abb. 3.13.).



Abb. 3.13. LVdP unter ß-adrenerger kompetitiver Hemmung mit Metoprolol

A - Normierung des LVdP auf das LV Gewicht **B** - Absolutwerte des LVdP unter ß-adrenerger kompetitiver Hemmung mit Metoprolol **C** - relative Änderung des maximal entwickelten linksventrikulären Druckes unter kompetitiver Hemmung der ß1-Adrenorezeptoren nach vorangegangener Stimulation mittels Dobutamin im Vergleich zu basalen Bedingungen. Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP), Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2transgenen (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgenen (SERen) Ratten. 1,14 µl/g KG i.p. Metoprolol Mittelwerte \pm SEM für 8-10 Tiere pro Gruppe. *p<0.05 vs. WT

3.2.2.2. Maximale systolische Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt_{max})

Mit einem 16% schnellerem systolischen Druckanstieg von 8830±634 mmHg/s unterscheiden sich die SERCA2-Tiere nicht signifikant von der Kontrollgruppe der Wildtyptiere mit einem +dP/dt_{max} von 7562±296 mmHg/s. Somit kommt es ergänzend zum Ergebnis der Betrachtung des LVdP unter basalen Bedingungen zu keiner wesentlichen Veränderung der wesentlichen systolischen Funktionsparameter durch zusätzliche SERCA2-Expression in normotensiven Tieren. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Betrachtung des +dP/dt_{max} renin-transgener hypertensiver Ratten. Die um ca. 20% höher liegende maximale Druckanstiegsanstiegsgeschwindigkeit der Ren2-Tiere im Vergleich zum Wildtyp ist ebenso wie die um 14% höhere Anstiegsgeschwindigkeit der gruppen nicht signifikant verschieden.

Der direkte Einfluss des maximal entwickelten linksventrikulären Druckes auf die entsprechende maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ist in Abb.3.15. gezeigt. Es besteht eine positive Korrelation der beiden systolischen Funktionsparameter. Der Zusammenhang des LVdP mit der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit verhält sich innerhalb der hypertensiven Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe äquivalent.



Abb. 3.14. Maximale linksventrikuläre systolische Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt_{max})

Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2-transgenen (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgenen (SERen) Ratten. Mittelwerte \pm SEM für *n* = 8-10 Tiere pro Gruppe.





A - Beziehung der linksventrikulären systolischen Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt_{max}) zum maximal entwickelten linksventrikulären Druck (LVdP), r=0,538, y=32,1x+3597,4 **B** - +dP/dt_{max} normiert auf den maximal entwickelten linksventrikulären Druck (LVdP) bei vergleichbarer Herzfrequenz. maximalen linksventrikulären systolischen Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt_{max}), maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP), Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2-transgene (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgene (SERen) Ratten. (Daten sind Mittelwerte ± SEM für *n* = 8-10 Tiere pro Gruppe, *p<0,05 vs. WT

Es zeichnet sich eine signifikant höhere Druckanstiegsgeschwindigkeit normiert auf den entsprechend LVdP der Ren2-Tiere im Vergleich zum WT ab (Ren2 – 63 ± 2 1/s , WT – 54 ± 1 1/s). Bei SERen-Tieren ist mit 58±2 1/s dieser normierte +dP/dt_{max} weder zur ebenfalls hypertensiven Ren2-Gruppe noch zum WT signifikant verschieden.

Nach Gabe von Dobutamin erhöht sich die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit der Wildtyptiere auf 21830 \pm 996 mmHg/s. Mit einer Steigerung des \pm dP/dt_{max} unter dem ß-adrenergen Einfluss von Dobutamin auf 20529 \pm 1713 mmHg/s der SERCA2-transgenen Tiere ist keine Veränderung zum WT zu erkennen. Aus den in Abb. 3.16. gezeigten Daten geht eine deutlich geringere \pm dP/dt_{max} der hypertensiven Tiergruppen SERen und Ren2 hervor. Mit 15156 \pm 1042 mmHg/s ist die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit der Ren2-Tiere bereits um 30% im Vergleich zum Wildtyp signifikant geringer. Mit einer \pm dP/dt_{max} von nur 10474 \pm 712 mmHg/s werden lediglich 52% des WT erreicht. Die 31% geringere \pm dP/dt_{max} der SERen-Tiere im Vergleich zur einfach-transgenen hypertensiven Ren2-Gruppe zeigt einen nachteiligen Effekt der zusätzlichen Expression des SERCA2-Transgen trotz annähernd gleicher maximaler Druckentwicklung und nicht divergenter Herzfrequenz unter dobutaminerger Stimulation. Als Zeichen der herabgesetzten ß-adrenergen Ansprechbarkeit ist die Steigerung des \pm dP/dt_{max} auf das 1,7-fache der Ren2 und das 1,4-fache der SERen-Tiere im Kontrast zum signifikant stärkeren Anstieg der maximalen systolischen Druckanstiegsgeschwindigkeit auf das 2,7-fache des Ausgangswertes zu deuten.





A - +dP/dt_{max} normiert auf den maximal entwickelten linksventrikulären Druck (LVdP) bei vergleichbarer Herzfrequenz **B** - Absolutwerte unter ß-adrenerger Stimulation. **C** - relative Änderung der auf den maximal entwickelten Druck (LVdP) normierten +dP/dt_{max} unter dobutaminerger Stimulation im Vergleich zum Ausgangswert. Maximale linksventrikuläre systolische Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt_{max}), Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2transgene (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgene (SERen) Ratten. 0,06 µl/g Körpergewicht (10mg/ml) Dobutamin. Mittelwerte ± SEM für *n* = 8-10 Tiere pro Gruppe. *p<0,05 vs. WT, **p<0,05 vs. Ren2 & WT

Dieser unterschiedliche Effekt der Stimulation durch den β -Agonisten Dobutamin wird durch die Abb.3.16.B verdeutlich. Die ebenfalls dargestellte relative Änderung des +dP/dt_{max} in Bezug auf den simultan entwickelten maximalen systolischen Druck unter Dobutaminwirkung im Vergleich zum Ruhewert belegt die Tendenz. Mit einer Zunahme des beschriebenen Quotienten um das 1,2-fache bei SERen ist dieser zur einfach-transgenen Ren2-Tiergruppe um 25% signifikant ver-

mindert. Der 2,3-fache Anstieg des $+dP/dt_{max}/LVdP$ beim WT ist jedoch nicht signifikant höher verändert als der Zuwachs auf das 1,6-fache der hypertensiven Ren2 Gruppe.

Korrelierend zur Situation der maximalen systolischen Druckanstiegsgeschwindigkeit unter Ruhebedingungen zeigt die Abb. 3.17. das Verhalten dieses systolischen Funktionsparameters unter der kompetitiven ß-adrenergen Hemmung mit Metoprolol. Mit 6915 \pm 622 mmHg/s ist die $+dP/dt_{max}$ der SERen-Tiere zwar tendenziell vermindert, jedoch im Vergleich zum WT und Ren2 nicht signifikant (WT - 8936 \pm 787 mmHg/s, Ren2 - 7975 \pm 577 mmHg/s). Bei der Betrachtung des $+dP/dt_{max}$ im Vergleich zum Ausgangswert zeigt sich beim WT eine Zunahme des $+dP/dt_{max}$ um 15%. Dagegen steht bei nahezu unveränderter Druckanstiegsgeschwindigkeit der einfach-transgenen hypertensiven Ren2 Tiere (-6%) unter der Wirkung von Metoprolol ein Abfall des $+dP/dt_{max}$ von 20% auf das 0,82fache des Ruhewertes bei SERen.



Abb. 3.17. +dP/dt_{max} bei ß-adrenerger kompetitiver Hemmung mit Metoprolol

A - Absolutwerte unter β-adrenerger Hemmung mit Metoprolol und vorangegangener Stimulation mit Dobutamin. **B** - relative Änderung im Vergleich zum Ausgangswert. Maximale linksventrikuläre systolische Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt_{max}), Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2-transgene (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgene (SERen) Ratten. 1,14 µl/g KG Metoprolol. Daten sind Mittelwerte ± SEM für *n* = 8-10 Tiere pro Gruppe. *p<0,05 vs. WT, *p<0,005 vs. Ausgangswert

3.2.2.3 Kraft-Frequenz-Produkt

Dieser Parameter kennzeichnet die globale linksventrikuläre frequenzabhängige Kraftentwicklung. In Ruhebedingungen zeigt sich ein gesteigertes Kraft-Frequenz-Produkt der SERCA2-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe des Wildtyps. Diese 25% Zunahme ist in Abb. 3.18. dargestellt. Unter der B-adrenergen Stimulation mit Dobutamin ist dieser Unterschied in der Zunahme des Kraft-Frequenz-Produktes der WT-Tiere auf das 1,5fache und 1,4fache der SERCA2-Tiere zu erkennen. Dies verdeutlicht die annähernd gleiche ß-adrenerge Ansprechbarkeit dieser beiden normotensiven Tiergruppen bei verschieden Ausgangswerten. Vergleichend dazu zeichnet sich ebenfalls in den hypertensiven Tiergruppen Ren2 und SERen ein tendenziell höheres Kraft-Frequenz-Produkt unter Ruhebedingungen ab. Mit 49238±3421 mmHg*min der Ren2 und 52875±3431 mmHg*min der zusätzlich SERCA2a-transgenen SERen ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu finden, wie es im Bezug der normotensiven Tiergruppen WT und SERCA der Fall ist. Im Kontrast dazu stellt sich eine signifikant geringere Zunahme des Kraft-Frequenz-Produktes unter dem Einfluss des ß-Agonisten Dobutamin dar (siehe Abb. 3.19.). Die Steigerung des Produktes um nur 18% auf das 1,2fache des Ausgangswertes der SE-Ren repräsentiert erneut die verminderte ß-adrenerge Ansprechbarkeit dieser Gruppe im Vergleich zum 1,5fachen Zuwachs in der WT-Gruppe. Die Steigerung auf das 1,4fache in der einfach-transgenen hypertensiven Ren2- Gruppe ist mit dem WT vergleichbar. Der Unterschied innerhalb der hypertensiven Tiere zeigt trotz deutlicher Tendenz keinen statistisch signifikanten Unterschied.





A - Absolutwerte unter basalen Konditionen. **B** - Absolutwerte unter ß-adrenerger Stimulation mit 0,06 μ l/g Körpergewicht (10mg/ml) Dobutamin **C** - Absolutwerte unter ß-adrenerger Antagonisierung mit 1,14 μ l/g KG Metoprolol . Wildtyp-Kontrollratten (WT) und SERCA2-transgene Ratten (SERCA2). Daten sind Mittelwerte ± SEM für *n* = 8-10 Tiere pro Gruppe. *p<0,05 vs. WT.



Abb. 3.19. Kraft-Frequenzprodukt (rate*pressure) hypertensiver Versuchstiere

A - Absolutwerte unter basalen Konditionen. **B** - Absolutwerte unter ß-adrenerger Stimulation mit 0,06 μ l/g Körpergewicht (10mg/ml) Dobutamin. **C** - Absolutwerte unter ß-adrenerger Antagonisierung mit 1,14 μ l/g KG Metoprolol Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2-transgene (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgene (SERen) Ratten. Daten sind Mittelwerte ± SEM für *n* = 8-10 Tiere pro Gruppe. *p<0,05 vs. entsprechendem Wert unter basalen Bedingungen.

3.2.2.4 Zeitintervall der systolischen Druckentwicklung

Das in Abb. 3.20. dargestellte Zeitintervall vom Beginn bis zum Erreichen der maximalen systolischen Druckentwicklung (time to peak) ist ein weiterer Parameter zur Charakterisierung der systolische linksventrikulären Funktion. Die in der Abb. gezeigte Korrelation dieser Kenngröße zur simultanen Herzfrequenz verdeutlich mit einem Korrelationskoeffizienten <0,6 die weitgehende Unabhängigkeit dieses Zeitparameter von der Herzfrequenz. Unter basalen Bedingungen ist die linksventrikuläre systolische Funktion hypertensiver Ren2-und SERen-Tiere trotz vergleichbarer Druckanstiegsgeschwindigkeiten durch ein schnelleres Erreichen der maximalen Druckentwicklung im Vergleich zum Wildtyp gekennzeichnet. Mit einer time to peak von 77±2 ms der Ren2 und 74±1 ms der SERen-Tiere unterscheiden sich die hypertensiven Tiere signifikant von der Kontrollgruppe der WT mit 85 ±1 ms jedoch nicht untereinander. Eine deutliche Umkehr dieses Verhältnisses ist unter der ß-adrenergen Stimulation mit Dobutamin zu erkennen. Die nunmehr noch 34±5 ms betragende time to peak der WT ist signifikant von der time to peak der hypertensiven Gruppen (Ren2 – 49±4ms, SERen – 52±2ms) verschieden. Ein Einfluss der zusätzlichen Expression des SERCA2a-Transgenes innerhalb der hypertensiven Tiere ist in der Betrachtung der Absolutwerte unter B-adrenerger Stimulation nicht zu erkennen. Aus Abb. 3.21.B geht jedoch hervor, dass sich die relative Änderung der time to peak unter Dobutaminwirkung im Vergleich zum Ausgangswert bei den SERen-Ratten auf das 0,8-fache ändert. Dies ist ein 52%-iger Unterschied dieser Gruppe zum Wildtyp und unterstützt die bereits beschriebene verminderte ßadrenerge Ansprechbarkeit von SERen-Tieren. Ren2-Ratten zeigen einen um 41% geringeren

Abfall der time to peak im Vergleich zur Kontrollgruppe, welcher jedoch statistisch nicht signifikant ausfällt.



Abb. 3.20. Frequenzabhängigkeit der systolischen Druckentwicklung

A – Korrelation der time to peak mit der simultanen Herzfrequenz. **B** – Absolutwerte unter basalen Bedingungen. Zeitintervalls vom Beginn bis zum Erreichen der maximalen systolischen Druckentwicklung (time to peak), **)** Wild-typ-Kontrollratten (WT), Ren2-transgene (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgene (SERen) Ratten Daten sind Mittelwerte \pm SEM für n = 8-10 Tiere pro Gruppe. *p<0,05 vs. WT.





A – Absolutwerte ohne medikamentöse Intervention **B** – Absolutwerte unter ß-adrenerger Stimulation mit 0,06 µl/g Körpergewicht (10mg/ml) Dobutamin **C** – Absolutwerte unter ß-adrenerger Antagonisierung mit 1,14 µl/g KG Metoprolol. Zeitintervall vom Beginn bis zum Erreichen der maximalen systolischen Druckentwicklung (time to peak), Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2-transgene (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgene (SERen) Ratten. Mittelwerte rot gekennzeichnet für *n* = 8-10 Tiere pro Gruppe. *p<0,05 vs. WT.

3.2.3. Diastolische linksventrikuläre Funktion

3.2.3.1. Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

Der verwendete LVEDP bezieht sich auf linksventrikulär registrierte Druck-Zeit-Diagramme und bezeichnet den gemessenen Druck unmittelbar vor Beginn der systolischen Druckentwicklung.



Abb. 3.22. Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

A – Vergleich der Absolutwerte von Ren2- sowie SERen –Ratten zum Wildtyp. **B** – LVEDP normiert auf das linksventrikuläre Feuchtgewicht. Wildtyp (WT), SERCA2-trangenen (SERCA2), Renin-transgene (Ren2) sowie Serca2/nRen-doppelt-transgene (SERen) Ratten. Daten sind Mittelwerte \pm SEM für n = 8-11 Tiere pro Gruppe, *p<0,05 vs. WT & Ren2.

Im Vergleich der enddiastolischen Druckwerte zwischen den Versuchsgruppen fällt eine massive Erhöhung des LVEDP bei SERen-Ratten unter Ruhebedingungen auf. Dies ist in Abb. 3.22. dargestellt. Dieser, um 345% höhere Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe, ist s als Ausdruck der diastolischen linksventrikulären Funktionsstörung zu sehen (WT – 4,4±3 mmHg, Ren2 – 7±4 mmHg, SERen – 14,9±6 mmHg). Trotz eines tendenziell erhöhten LVEDP der Ren2-Ratten ist kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festzustellen. Auch eine SERCA2-Überexpression in normotensiven Tieren ruft keine Veränderung des LVEDP wie vergleichend in der SERen-Gruppe hervor (SERCA2 – 6,3±2 mmHg).

Um den Einfluss der linksventrikulären Masse als Maß einer Hypertrophie zu reduzieren erfolgte die Normierung auf diese. Die Beziehung des basalen LVEDP auf das linksventrikuläre Feuchtgewicht bewirkt keine wesentliche Änderung der Ergebnisse und verdeutlicht die diastolische Funktionsstörung der SERen-Tiere. Während eine Stimulation der kardialen β_1 -Adrenorezeptoren durch Dobutamin in der WT- und Ren2-Gruppe zu einem Absinken des LVEDP führt, kommt es, wie Abb. 3.23. zu sehen, in der SERen-Gruppe noch zu einem Anstieg des LVEDP (SERen – 16,5±9 mmHg). Mit 4,5±2 mmHg ist der LVEDP der hypertensiven Ren2 Tiere dem der Kontrollgruppe unter Dobutaminwirkung vergleichbar (WT – 3,5±3 mmHg). Wiederum zeigt sich bei der normotensiven SERCA2-transgenen zum WT-Gruppe eine simultane Veränderung und somit kein Einfluss der z. Unter Berücksichtigung des linksventrikulären Feuchtgewichtes zeigt sich ein niedrigerer Index für die Ren2-Gruppe als der WT.





A – LVEDP normiert auf das LV-Feuchtgewicht unter ß-adrenerger Stimulation mit Dobutamin. **B** –Absolutwerte von unter ß-adrenerger Stimulation mit Dobutamin. **C** – relative Änderung des LVEDP unter Dobutaminwirkung im Vergleich zum Ausgangswert. Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP), Wildtyp (WT), SERCA2trangene (SERCA2), Renin-transgene (Ren2) sowie Serca2/Renin-doppelt-transgene (SERen) Ratten. **0**,06 μ l/g Körpergewicht (10mg/ml) Dobutamin. Daten sind Mittelwerte ± SEM für *n* = 8-11 Tiere pro Gruppe, *p<0,05 vs. WT & Ren2.

Für vergleichbare Ansprechbarkeiten auf die adrenerge Reizung spricht der Abfall auf das 0,7fache des Ausgangswertes beim WT und 0,75-fache bei der Ren2 Gruppe. Im Vergleich dazu besteht eine Erhöhung des LVEDP bei der SERen-Linie auf das 1,13-fache.

Einen deutlichen Effekt auf den LVEDP bewirkt ebenfalls die anschließende Gabe des β -Antagonisten Metoprolol. Unter Blockade der β_1 -Rezeptoren kommt es bei allen Tiergruppen zum Anstieg des LVEDP. Im Vergleich zum LVEDP ohne medikamentöse Intervention steigt der LVEDP in den hypertensiven Gruppen Ren2 und SERen gleich dem der Kontrollgruppe

(LVEDP-Anstieg WT/Ren2/SERen – 1,3-fach). Dies leg nahe, dass weder die Renin-induzierte Hypertonie noch eine zusätzliche Expression des SERCA2a-Transgens einen Einfluss auf die Ansprechbarkeit einer ß-adrenergen Blockade ausübt. Es besteht weiterhin eine signifikante Erhöhung des LVEDP von SERen gegenüber der Kontrolle und der einfach-transgenen hyperten-



siven Ren2-Gruppe unter dem Einfluss von Metoprolol (WT 5 \pm 0,8 mmHg, Ren2 – 9 \pm 2 mmHg, SERen – 18 \pm 3 mmHg)



A – LVEDP normiert auf das LV-Feuchtgewicht unter ß-adrenerger Antagonisierung mit Metoprolol **B** – Absolutwerte des LVEDP unter ß-adrenerger Antagonisierung mit Metoprolol **C** – relative Änderung unter kompetitiver Hemmung der ß₁-Rezeptoren mit Metoprolol nach vorangegangener Stimulation mit Dobutamin im Vergleich zu den Ausgangswerten. Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP), Wildtyp (WT), Renin-transgene (Ren2) sowie Serca2/Renin-doppelt-transgene (SERen) Ratten. 1,14 µl/g KG Metoprolol Daten sind Mittelwerte ± SEM für *n* = 8-11 Tiere pro Gruppe, *p<0,05 vs. WT & Ren2.

3.2.3.2. maximale diastolische Druckabfallsgeschwindigkeit $(-dP/dt_{max})$

Der Punkt der maximalen Druckabfallgeschwindigkeit wird über die Berechnung des 1. Differentials der diastolischen Phase der Druckkurve des linken Ventrikels bestimmt. Dieser Parameter gibt unter anderem Auskunft über die Lusitropie des Herzens, und ist somit ein Maß für die diastolische Funktion.



Abb. 3.25. Maximal entwickelte linksventrikuläre diastolische Druckabfallsgeschwindigkeit (-dP/dt_{max}) A – Vergleich der Absolutwerte SERCA2-transgener und WT-Ratten unter spontaner Herzfrequenz. B - Absolutwerte von Ren2-, SERen und WT-Ratten unter Ausgangsbedingungen. Wildtyp- (WT), Renin-transgene (Ren2) sowie SERCA2a/mRen(SERen) Ratten. Daten sind Mittelwerte \pm SEM für n = 9-11 Tiere pro Gruppe. *p<0,05 vs. WT.

Unter Ausgangsbedingung zeigt sich eine signifikant geringere -dP/dt_{max} der doppelt-transgenen SERen-Ratten (-6130±510 mmHg/s) gegenüber der Kontrollgruppe vom Wildtyp. Bei der Ren2-Gruppe ist eine im Vergleich zum WT zwar tendenziell niedrigere -dP/dt_{max} aber insignifikante Veränderung zu messen (WT - -8707±456 mmHg/s, Ren2 – -7418±550 mmHg/s). Dies deutet, wie schon der auffallend hohe LVEDP, auf eine diastolische Dysfunktion der hypertensiven Tiere, mit einer besseren Kompensation der Ren2-Tiere, hin. Einen direkter Einfluss der transgenen SERCA2a-Expression scheint im normotensiven Tier nicht zu bestehen (-dP/dt_{max} SERCA2 - -8472±552mmHg/s).

Da die $-dP/dt_{max}$ von verschieden Faktoren der Herzaktion beeinflusst wird, erfolgt die Korrelation auf den maximal entwickelten linksventrikulären Druck (siehe Abb. 3.26.A). Hier zeigt sich, über alle der 3 Versuchsgruppen korreliert, eine tendenzielle Abhängigkeit dieser beiden Parameter (r=0,32). Bei der anschließenden Betrachtung der auf den LVdP normierten $-dP/dt_{max}$ -Werte zeigt sich erneut die diastolische Funktionsstörung der SERen-Ratten (-43 ± 3 1/s). Während in den Absolutwerten ein Unterschied zwischen den hypertensiven Ren2-Tieren und dem Wildtyp zu finden ist, so zeigt sich bei der Normierung auf den LVdP eine Angleichung dieser Gruppen (WT - -59 ± 1 1/s, Ren2 - -55 ± 3 1/s).





A - Beziehung der -dP/dt_{max} zum LVdP, r=0,003, y=0,008x-8034,5; **B** - -dP/dt_{max} normiert auf LVdP bei vergleichbarer Herzfrequenz. Maximale linksventrikuläre diastolische Druckabfallsgeschwindigkeit (-dP/dt_{max}), maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP), Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2-transgene (Ren2) und SER-CA2/Renin doppelt transgene (SERen) Ratten. Daten sind Mittelwerte \pm SEM für n = 8-10 Tiere pro Gruppe, *p<0,05 vs. WT Die genannte Diskrepanz innerhalb der renin-transgenen Versuchsgruppen ist unter dem Einfluss von Dobutamin nicht mehr zu erkennen Bei vergleichbaren Werten zwischen SERen und Ren2 besteht eine signifikanter Unterschied zur Wirkung des Dobutamins auf WT-Tiere (SERen - -51±1 1/s, Ren2 - -53±1 1/s, WT - -78±2 1/s). Ein Einfluss der zusätzlichen transgenen SERCA2a-Expression ist nicht zu erkennen, denn wie auch unter Ausgangsbedingungen zeigt sich bei der normotensiven SERCA2-Linie kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.





A – auf LVdP normierte -dP/dt_{max} unter dobutaminerger Stimulation **B** – Absolutwerte unter ß-adrenerger Stimulation mit Dobutamin. **C** - Vergleich der relativen Änderungen unter Einfluss des ß-Agonisten Dobutamin im Vergleich zum Ausgangswert. Maximal entwickelte linksventrikuläre diastolische Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}), Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2-transgene (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgene (SERen) Ratten. ß-Agonist Dobutamin (0,06 µl/g Körpergewicht (10mg/ml). Daten sind Mittelwerte \pm SEM für n = 10-12Tiere pro Gruppe. *p<0,05 vs. WT.

Simultan der Ergebnisse unter ß-adrenerger Stimulation zeigte sich die kardiale Lusitropie unter dem Einfluss von Metoprolol. Während es bei den hypertensiven Tiergruppen (Ren2 – 98±0,2%, SERen – 94±0,2% des Ausgangswertes) zu einem leichten Abfall des –dP/dt_{max} unter der Wirkung des ß-Antagonisten Metoprolol ohne statisch signifikante Unterschiede kam, zeigten die Wildtyptiere einen Anstieg der maximalen diastolischen Druckabfallsgeschwindigkeit um 18% im Vergleich zu den Bedingungen ohne medikamentöse Intervention. Wie in Abb. 3.2.19 zu sehen ist zeichnet sich der Unterschied der renin-transgenen Tiere im Vergleich zum Wildtyp ähnlich wie unter dobutaminerger Stimulation ab (WT - -10232±812 mmHg/s). Jedoch ist kein Einfluss der zusätzlichen transgenen SERCA2a-Expression auf die ausgebildete diastolische Funktionsstörung der hypertrophierten Herzen zu erkennen (Ren2 - -7148±674 mmHg/s, SERen – -6102±358mmHg/s). Bei der Betrachtung des in Abb.3.28.A dargestellten, auf den maximal ent-

wickelten systolischen Druck normierten -dP/dt_{max}-Wertes wird dieser Effekt deutlicher. Die

renin-transgenen Ren2-Ratten entwickelten unter ß-adrenerger Antagonisierung nur 81% während die doppelt-transgenen SERen-Tiere sogar nur 66% des -dP/dt_{max} der Kontrollgruppe entwickeln.





A – auf LVdP normierte -dP/dt_{max} unter ß-adrenerger Blockade mit Metoprolol **B** – Absolutwerte unter ßadrenerger Blockade **C** - Vergleich der relativen Änderungen unter Einfluss des ß-Antagonisten Metoprolol im Vergleich zum Ausgangswert. Maximal entwickelte linksventrikuläre diastolische Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}), Wildtyp-Kontrollratten (WT), Ren2-transgene (Ren2) und SERCA2/Renin doppelt transgene (SERen) Ratten. ß-Antagonisten Metoprolol (1,14 µl/g KG i.p.) Daten sind Mittelwerte ± SEM für n = 10-12 Tiere pro Gruppe. *p<0,05 vs. WT.

3.2.3.3. Zeitparameter der diastolischen Relaxation

Zur weiteren Quantifizierung der diastolischen Funktion erfolgte die Analyse der diastolischen Zeitparameter. Die im Folgenden beschriebenen Parameter eignen sich besonders zur Analyse der diastolischen Funktion, da sie zum größten Teil unabhängig von dem maximal entwickelten systolischen Druck und der muskulären Masse des linken Ventrikels sind. Um die frühe Phase der Relaxation zu beschreiben erfolgte die Analyse des Zeitintervalls des Druckabfalls vom Maximum bis zum Erreichen von 75% (pressure quater time – PQT). Das folgende Intervall, welches die PQT mit einschließt, beschreibt den Verlauf des Druckes vom Maximum bis zur Halbieren dessen (pressure half time – PHT). Zur Betrachtung der zweiten Hälfte der Relaxation wurde der Druckverlauf mittels der Zeitkonstante τ , welche näher unter 2. Material und Methoden beschrieben wird, analysiert. Dies wird nochmals in Abb.3.29. grafisch verdeutlicht.



Abb. 3.29. Darstellung der Zeitparameter des diastolischen Druckabfalls

Exemplarische Darstellung der verwendeten diastolischen Zeitparameter PQT, PHT und der Zeitkonstante τ (Tau) an Hand eines linksventrikulären Druckverlaufs eines Wildtyptieres Beim Vergleich der diastolischen Relaxationsparameter von einfach SERCA2-transgener und Wildtyptieren lässt sich unter Ausgangsbedingungen in der frühen Phase kein Unterschied feststellen (PQT SERCA2 – 21,9±0,7ms, WT – 22,5±0,5ms). Ebenfalls lässt sich in der letzten Phase des Druckabfalls kein Einfluss der transgenen SERCA2a-Expression unter normotensiven Bedingungen registrieren (τ SERCA2 – 14,5±0,5ms, WT – 15,2±0,6ms).





Bei der Untersuchung des frühen diastolischen Druckabfalls mit der Bestimmung der PQT fanden sich keine Unterschiede zwischen der normotensiven Kontrollgruppe und den Ren2-Tieren (PQT Ren2 – 24,1±1ms). Auch eine Beeinflussung durch die transgene SERCA2a-Expression in SERen in dieser Phase mit hohen intrazellulärem Ca²⁺-Gehalt lässt sich nicht nachweisen (PQT SERen – 23,7±0,7ms). Während bei der Evaluation der ersten Hälfte des diastolischen Druckabfalls sich eine tendenzielle Verlangsamung des Ablaufs, in Form der PHT, in der Ren2-Gruppe zeigt, ist dieser Unterschied mit einer PHT von 31,3±1ms bei SERen signifikant vom Wildtyp verlängert (PHT WT – 27,6±0,6ms, Ren2 – 30,4±1ms, SERen –). Dies kann wiederum als Marker einer diastolischen Dysfunktion analog zu den Ergebnissen zur Berechnung des LVEDP gewertet werden. In gleichem Maße verstärkte sich diese Tendenz in der zweiten Phase der Relaxation. Während sich die Zunahme von τ in der Ren2-Gruppe von 13% im Vergleich zum Wildtyp tendenziell verlängert zeigt, ist bei den hypertensiven doppelt-transgenen SERen-Tieren ein signifikanter Zuwachs von 34% aufzuzeigen.

Ahnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Betrachtung der diastolischen Zeitparameter unter ßadrenerger Stimulation mit Dobutamin. Während bei dem Vergleich der Absolutwerte von PQT und PHT es zu keinem Unterschied zwischen hypertensiven Gruppen und der Kontrollgruppe kam, zeigte sich dass der ß-adrenerge Effekt zu einer Beschleunigung des Druckabfalls im Verhältnis zur Ausgangssituation bei den hypertensive Tieren Ren2 und SERen (PQT_{rel} WT - 1,06, Ren2 – 0,90, SERen – 0,88, x-faches des Ausgangswertes) führt. Während es unter der Situation ohne medikamentöse Intervention zu einem signifikant langsameren Absinken des diastolischen Druckes der SERen-Tiere kam, ist unter dobutaminerger Stimulation keine statisch signifikante Diskrepanz mehr festzustellen (PHT WT – 28,4±3ms, SERen – 28,5±2ms). Jedoch zeigt die Veränderung der PHT im Verhältnis zur Ausgangssituation des 0,95-fachen bei der Kontrollgruppe und des 0,90- bzw. des 0,89-fachen in den hypertensiven Gruppen Ren2 bzw. SERen, dass die ß-adrenerge Ansprechbarkeit in diesem Fall gleich scheint. Konträr hierzu erschien die Veränderung der Zeitkonstanten τ unter Dobutaminwirkung. Mit 20,0±2 ms ist τ bei SERen-Tieren im Vergleich zu Ren2-Tieren mit 12,3±1ms und der Kontrollgruppe vom Wildtyp mit 10,8±1ms deutlich und signifikant verlangsamt. Während die Ansprechbarkeit der zweiten Hälfte der diastolischen Druckentwicklung auf B-adrenerge Stimulation in der Ren2-Gruppe und der Kontrollgruppe sich annähend gleichförmig verhielt (7 WT – 72%, Ren2 – 68% des Ausgangswertes) zeigte sich die SERen-Gruppe dazu signifikant langsamer (τ SERen 95%des Ausgangswertes). Daraus ergibt sich, dass sich die bereits beschriebene diastolische Funktionseinschränkung der doppelt-transgenen Tiere vornehmlich in der letzten Hälfte der diastolischen Relaxation unter ß-adrenergem Stress ausprägt.



Abb. 3.31. Zeitparameter des diastolischen Druckabfalls unter ß-adrenerger Stimulation mit Dobutamin A – Zeitintervall des diastolischen Druckabfalls von 100% bis 75% des maximal entwickelten systolischen Druckes (pressure quater time – PQT) B – Zeitintervall des diastolischen Druckabfalls um 50% des maximal entwickelten systolischen Druckes (pressure half time – PHT) C –Zeitkonstante der zweiten Hälfte des diastolischen Druckabfalls (Tau) D/E/F – relative Änderung der unter A-C beschrieben Zeitparameter unter dobutaminerger Stimulation im Vergleich zu Ausgangsbedingungen. Wildtyp (WT), Renin-transgene (Ren2) sowie Serca2/Renin-doppelttransgene (SERen) Ratten. 0,06 µl/g Körpergewicht (10mg/ml) Dobutamin i.p. Werte sind Mittelwerte ± SEM für *n* = 9-11 Tiere pro Gruppe, *p<0,05 vs. WT, **p<0,05 vs. WT & Ren2.

Unter der Antagonisierung des ß-adrenerger Einflusses durch Gabe von Metoprolol ergab sich eine statistisch signifikante Verlängerung der PQT in den hypertensiven Tiergruppen (PQT Ren2 – 26,5±1ms, SERen – 25,6±2ms) in Relation zum Wildtyp mit 20,7±0,5ms, während die relativen Änderungen im Vergleich zur Ausgangssituation sich nicht signifikant unterschieden. Im Vergleich dazu kann bei der Analyse der PHT zwar tendenziell für beide mRen2-transgenen Tiergruppen (PHT Ren2 – 30,6±2ms, SERen – 32,0±1ms) ein prolongierter Druckabfall beschrieben werden, jedoch ist nur die SERen-Gruppe unter Metoprololeinfluss signifikant vom Wildtyp mit 26,6±8ms verschieden. Während sich die SERen-Tiere bei der Betrachtung von τ unter dobutaminerger Stimulation von der Ren2-Gruppe unterschieden, kann ein korrespondierender ,jedoch nicht signifikanter, Effekt für die ß-adrenerge Antagonisierung nachgewiesen werden. Metoprolol führte in der Kontrollgruppe vom WT zu einer Beschleunigung von 10% im Vergleich zum interventionsfreien Zustand. Hingegen konnte bei fast unverändertem Verhalten der Ren2-Tiere und eine Elongation der Konstante τ von 15% bei den doppelt-transgenen SE-Ren Tieren erfasst werden. Dies verstärkt den bereits unter Ausgangsbedingung registrierten Unterschied der SERen-Tiere (τ SERen – 22,0±2ms) im Vergleich zum Wildtyp (τ WT – 14,6±1ms) und lässt eine vermehrte diastolische Dysfunktion der hypertrophierten Herzen annehmen.



Abb. 3.32. Zeitparameter des diastolischen Druckabfalls unter ß-adrenerger kompetitiver Hemmung mit Metoprolol

A – Zeitintervall des diastolischen Druckabfalls von 100% bis 75% des maximal entwickelten systolischen Druckes (pressure quater time – PQT) **B** – Zeitintervall des diastolischen Druckabfalls um 50% des maximal entwickelten systolischen Druckes (pressure half time – PHT) **C** –Zeitkonstante der zweiten Hälfte des diastolischen Druckabfalls (Tau) **D**/**E**/**F** – relative Änderung der unter A-C beschrieben Zeitparameter unter ß-adrenerger Blockade mittels Metoprolol im Vergleich zu Ausgangsbedingungen. Wildtyp (WT), Renin-transgene (Ren2) sowie Serca2/Renindoppelt-transgene (SERen) Ratten. 1,14 µl/g KG Metoprolol. Werte sind Mittelwerte ± SEM für *n* = 9-11 Tiere pro Gruppe, *p<0,05 vs. WT, **p<0,05 vs. WT & Ren2.
3. Ergebnisse

3.3. Arrhythmien

Da die freie intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration und deren funktionelle Veränderung im Rahmen der elektromechanischen Kopplung zur Aufrechterhaltung des Membranpotential und des regelrechten Erregungsablaufs des Herzens bedeutsam ist, erfolgte die Analyse der kontinuierlichen Herzfrequenz und der aufgetretenen Arrhythmien. Die Technik der Auswertung ist näher in Kapitel 2. Material und Methoden dargelegt. Da auf Grund der technischen Voraussetzungen keine Klassifizierung der aufgetretenen Extrasystolen (ES) in Ihren atrialen bzw. ventrikulären Ursprung möglich war, erfolgte die Auswertung als Summe dieser Beiden.

Nach Einführen des Katheters in den linken Ventrikel und einer Äquilibrierungszeit von 5 min konnten in einem Überwachungszeitraum von einer Minute in der Kontrollgruppe vom Wildtyp durchschnittlich 1,9±1,2 Extrasystolen beobachtet werden. In den hypertensiven Gruppen Ren2 wurden mit 2,5±1 und SERen mit 0,8±0,3 ES registriert. Trotz des beobachteten Unterschiedes der doppelt-transgenen SERen-Tiere zu den beiden Vergleichsgruppen lässt sich auf Grund der hohen Varianz durch das unterschiedliche Reagieren einzelner Tiere keine statistische Signifikanz erreichen. Um das Verhalten des Herzrhythmus unter erhöhter zytosolischer Ca²⁺-Belastung zu beobachten erfolgte die Registrierung unter Stimulation mit dem B1-Agonisten Dobutamin über ein Intervall von 3 min. Unter dieser Stimulation kam es zu einem Anstieg der Extrasystolenfrequenz um 51% auf 2,8ES/min bei den Wildtyptieren. Simultan dazu konnten unter gleichen Bedingungen bei Ren2 4±1,2ES/min und 2,2±0,9ES/min bei SERen-Tieren erfasst werden, wobei kein Unterschied zum Ausgangswert bestand. Um den weiteren ß-adrenergen Einfluss zu charakterisieren erfolgte die Auswertung der Extrasystolie unter der Wirkung des B1-Antagonisten Metoprolol. Bei Blockade der sympathischen Rezeptoren am Herzen zeigte sich, dass es zu einem Absinken der Extrasystolenrate auf 0,1±0,005ES/min bei den Wildtyptieren kam. Innerhalb der untersuchten hypertensiven Tiergruppen konnte ebenfalls eine Erniedrigung der registrierten Extrasystolen beobachtet werden. Mit einer Reduktion um 65% gegenüber den Ausgangsbedingungen konnten bei SERen (0,33±0,09ES/min) signifikant weniger Extrasystolen erfasst werden als bei Ren2 (1,7±0,6ES/min, p<0,05 vs. WT & Ren2). Da es sich hierbei auch um einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe handelt, ist anzunehmen, dass eine transgene SERCA2a-Expression in hypertrophierten Herzen eine Arrhythmiereduktion unter B1-adrenerger Blockadebewirkt.

3.4. SERCA2a vermittelter Ca²⁺-Transport

Um die Aktivität der endogenen sarkolemmalen Ca2+-ATPase SERCA2a und der zusätzlichen transgenen SERCA2a in vitro zu untersuchen, erfolgte die Messung der Ca²⁺-Transportaktivität an linksventrikulären Membranhomogenaten. Da aus vorbestehenden Arbeiten bekannt ist, dass die freie ⁴⁵Ca²⁺ Konzentration im Versuchsansatz einen erheblichen Einfluss auf die Transportkapazität der membrangebundenen SERCA2a-ATPase ausübt, wurden die Analysen der Versuchsgruppen unter 2 verschiedenen freien ⁴⁵Ca²⁺-Konzentrationen durchgeführt. Da, zwischen nicht SERCA2a-transgenen Tieren (NTG) der Linie 1167 und den Kontrolltieren vom Wildtyp, keine funktionellen Unterschiede feststellbar sind, wurde die NTG-Gruppe in diesem Teil als normotensive Kontrollgruppe zu den hypertensiven mRen2-transgenen Gruppen verwendet. Unter der niedrigeren freien Konzentration an ⁴⁵Ca²⁺ von 0,346 µmol/l konnten, wie in Abb. 3.34., dargestellt, ist die Abnahme der vesikulären ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme in den hypertensiven Versuchstieren SERen & Ren2 im Vergleich zur Kontrolle nur insignifikant (Ren2 - -15%, SERen - -32%) Bei Erhöhung der verfügbaren ⁴⁵Ca²⁺-konzentration im Versuchsansatz auf eine gesättigte Konzentration von 3,68 µmol/l zeigten alle Homogenate einen signifikanten Zuwachs (p=0,001) des Oxalat-stimulierten ⁴⁵Ca²⁺-Transportes. In diesem Fall lag die Kapazität der doppelttransgenen SERen-Tiere zur vesikulären ⁴⁵Ca²⁺-Anreicherung im Vergleich zur Kontrolle 19% niedriger. Auch die Ren2-Tiere zeigten unter der angehobenen Konzentration eine geringere Transportaktivität (-12%).



Abb. 3.33. Oxalat-stimulierter ⁴⁵Ca²⁺-Transport in linksventrikulären Homogenate bei verschiedenen ⁴⁵Ca²⁺-Konzentrationen

Die ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme wurde nach einer Reaktionszeit von 2 min gestoppt und die ermittelten Werte auf die zuvor bestimmte Proteinkonzentration normiert. **A** - ⁴⁵Ca²⁺-Transport bei einer [⁴⁵Ca²⁺] von 0,346 µmol/l von nichttransgenen (NTG) Kontrolltieren, mRen2-transgenen (Ren2) und mRen2/SERCA2a-doppelttransgenen (SERen) Tieren nach Durchführung der oben beschriebenen linksventrikulären Katheterisierung **B** - ⁴⁵Ca²⁺-Transport bei einer gesättigten [⁴⁵Ca²⁺] von 3,68 µmol/l. Daten sind Mittelwerte ± SEM, n=10 pro Gruppe

Parameter	NTG	Ren2	SERen	
45 Ca ²⁺ -Transport- RATIO [Ca ²⁺] _{high} /[Ca ²⁺] _{low}	0,35 ± 0,04	0,31 ± 0,02 (-11)	0,29 ± 0,06 (-18)	
Stimulation durch RR (x-faches)	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,07	1,6 ± 0,1	

Tab. 3.3. Veränderungen der Oxalat-stimulierten ⁴⁵Ca²⁺-Transportrate sarkoplasmatischer Membranvesikel unter Einfluss der ⁴⁵Ca²⁺-Konzentration und der Wirkung von Ruthenium- Rot

Messung an linksventrikulären Membranhomogenaten von jeweils 10 nicht-transgenen (NTG), mRen2-transgenen (Ren2) und mRen2/SERCA2a-doppelttransgener Tieren (SERen). Die **Ratio** entspricht dem Quotienten der ⁴⁵Ca²⁺-Transportaktivität bei einer [⁴⁵Ca²⁺] von 0,346 μ mol/l (**Ca²⁺**_{low}) und gesättigten 3,68 μ mol/l (**Ca²⁺**_{high}).

Des Weiteren stellt sich die Stimulation durch die Zugabe von 20µM Ruthenium Rot (**RR**) als Wert des Quotienten der⁴⁵Ca²⁺-Transportaktivität bei einer [⁴⁵Ca²⁺] von 0,346 µmol/l und der unter Zugabe von RR dar. Daten sind Mittelwerte \pm SEM, n=10 Tiere pro Gruppe

Einen Unterschied im Ansprechen auf die ⁴⁵Ca²⁺-Konzentrationsveränderungen, d.h. die Aktivierbarkeit bzw. die Affinität der verfügbaren SERCA2a-Ca²⁺-ATPasen zum angebotenen ⁴⁵Ca²⁺, zwischen der normotensiven Kontrollgruppe und den hypertensiven Tiergruppen ist in Tab. 3.3. dargelegt.

Nach SERCA2a vermittelter ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme in die Membranvesikel der Herzhomogenate und der anschließenden szintillationsoptischen Konzentrationsbestimmung des präzipitierten ⁴⁵Ca²⁺ kann keine Aussage über die reelle Transportaktivität der ATPase getroffen werden. Durch beständigen Efflux von ⁴⁵Ca²⁺-Ionen aus dem Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) könnte eine eventuelle Erhöhung dieses Efflux-Transportweges eine verminderte SERCA2a-Aktivität simulieren. Um diese Möglichkeit zu minimieren erfolgte die Untersuchung der vesikulären ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme unter der Gegenwart von Ruthenium-Rot als bekannter Hemmstoff des SR-⁴⁵Ca²⁺-Effluxes. In dem dieser Farbstoff den in die Membran des longitudinale Tubulussystems verankerten integrierten Ca²⁺-Freisetzungskanal vom Ryanodinrezeptortyp (RYR Typ2) hemmt, wird der vesikuläre ⁴⁵Ca²⁺-Efflux minimiert. Um nun die Aktivität der SERCA2a-ATPase genauer zu analysieren wurde vergleichend zu den Versuchen mit der eben beschriebenen hohen ⁴⁵Ca²⁺-Konzentration eine Analyse in der Gegenwart von Ruthenium Rot durchgeführt. Hier sind, simultan zu den ⁴⁵Ca²⁺-Transportwerten unter einer [⁴⁵Ca²⁺] von 3,68 µmol/l ohne Ruthenium Rot, geringere Transportraten der hypertensiven Tiere Ren2 und SERen im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Diese Unterschiede sind jedoch auf Grund der hohen interindividuellen Varianz nicht statistisch signifikant sind (Ren2 - -85,1%, SERen – 74,3% Anteil erreichter ⁴⁵Ca²⁺ -Transportaktivität NTG).

Da sich die in Tab. 3.3. abgebildete Stimulation des SR-⁴⁵Ca²⁺-Transports in der Gegenwart von Ruthenium Rot in allen untersuchten Gruppen gleichartig verhielt, ist davon auszugehen das der ⁴⁵Ca²⁺-Efflux aus den verwendeten Membranhomogenaten durch den Ryanodinrezeptor vergleichbar ist und somit die gefundenen Differenzen der intravesikalen ⁴⁵Ca²⁺-Anreicherung am ehesten auf die unterschiedliche SERCA2a-Aktivität zurückzuführen ist.

4. Diskussion

Aus der weltweit zunehmenden Inzidenz der chronischen Herzinsuffizienz ergibt sich die Aufgabe nach der Suche ihrer molekularen Ursachen⁷². Die für das klinische Bild der Herzinsuffizienz verantwortliche Störung myokardialer Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit beruht unter anderem auf einer Störung der kardiomyozytären Ca²⁺-Homöostase¹⁶. Die in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) verankerte Ca2+-ATPase SERCA2a nimmt hierbei eine Schlüsselposition in der Regulation der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration ein. Im humanen Myozyten wird 70% des zur Kontraktion der Myofilamente nötigen Ca²⁺ aus dem SR bereitgestellt, welches zuvor durch SERCA2a-vermittelten Transport dort konzentriert wurde²⁶. Die Relaxation des Herzens in der Diastole eines Herzzyklus wird durch eine Senkung der freien zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration der einzelnen Kardiomyozyten erreicht. Dies wird im überwiegenden Maße durch einen Ca2+-Transport in das SR durch SERCA2a bewirkt¹¹⁵. In verschiedenen Beobachtungsmodellen der Herzinsuffizienz, Tiermodelle sowie bei Patienten mit klinisch terminaler Herzinsuffizienz, konnten Veränderungen in der myokardialen Ca²⁺-Regulation als pathogenetischer Faktor identifiziert werden. Dabei steht eine verminderte Aktivität sowie eine herabgesetzte Genexpression der Ca²⁺-ATPase SERCA2a im Fokus¹¹⁶. Ziel dieser Arbeit war es daher den Einfluss der gegenregulatorischen Expression eines SERCA2a-Transgens im komplexen Zusammenhang eines Hypertonie-bedingten Herzhypertrophiemodells zu analysieren. Um die Situation der Herzinsuffizienz zu simulieren, wurden Ratten generiert die durch Expression eines zusätzlichen Maus-Reningens eine Hypertonie-bedingte kardiale Hypertrophie entwickeln¹⁰. Die mRen2/SERCA2a doppelt-transgenen Tiere (SERen) bestätigen die Entwicklung einer Hypertrophie durch die Zunahme der auf das Körpergewicht normierten linksventrikulären Masse um 30% gegenüber dem Wildtyp ohne signifikanten Unterschied zur einfach-transgenen hypertensiven Ren2-Tiergruppe (31%). Durch diese kardiale Hypertrophie entwickelt sich auch eine systolische und diastolische Dysfunktion der mRen2-transgenen Tiere mit sogar vermehrter Funktionsstörung der SERen-Tiere:

- 28% verminderter maximal entwickelter linksventrikulärer Druck in Bezug auf das linksventrikuläre Feuchtgewicht bei SERen-Tieren im Vergleich zum Wildtyp (27% Ren2)
- Deutlich verminderte ß-adrenerge Ansprechbarkeit auf die Stimulation mit Dobutamin der SERen-Tiere
- Nicht kompensierte diastolische Funktionsstörung der SERen-Tiere:
 - Erhöhung des enddiastolischen Druckes in Ruhe um 345% im Vergleich zum Wildtyp und der hypertensiven Kontrollgruppe Ren2
 - 0 29% geringere maximale diastolische Druckabfallsgeschwindigkeit als der WT
 - 0 66%-ige Verlängerung der diastolischen Zeitkonstante τ

4.1. mRen2-transgenes Rattenmodell

Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell zur Charakterisierung des kardialen Phänotyps einer zusätzlichen Expression des SERCA2a- Transgens im Kontext einer kardialen Hypertrophie basiert auf einem heterozygoten Renin(mRen2)-transgenem hypertensiven Rattenmodell. Dieses hypertensive Rattenmodell wurde unter anderem von Mullins et. Al ausführlich beschreiben¹⁰⁶. In normotensiven weiblichen Spraque-Dawley Ratten wurde durch Gonadotropingabe eine Superovulation initiiert, und anschließend durch Mirkoinjektionstechnik das murine Ren2-Gen implementiert. Die genomische Vervielfältigung dieses Transgens in der Maus und eine Vererbung konnte von Mullins et al. gezeigt werden¹¹⁷. Das ursprünglich aus dem Mausgenom extrahierte DBA/2J(mRen2)-Gen (5.3 kb des 5' Endes und 9.5 kb des 3' Endes) führt bei genomischer Integration in Ratten auch zu einer ausgeprägten arteriellen Hypertonie¹¹⁸. Neben dem mRen2-Gen besitzen verschiedene Mausarten ein zweites Renin-Gen. Dieses mRen1^e-Gen unterscheidet sich in der gewebsspezifischen Expression und führt bei Integration in das Rattengenom erstaunlicherweise nicht zu einer arteriellen Hypertonie¹¹⁹. In den interventionellen Untersuchungen, welche dieser Arbeit zu Grunde liegen, konnte ein deutlicher arterieller Hypertonus der Versuchsgruppen Ren2 und SERen, welche das mRen2-Transgen exprimieren, gezeigt werden.

4.1.1. Arterielle Hypertonie

Heterozygote männliche mRen2-transgene Tiere entwickeln ab einem Lebensalter von 4 Wochen einen signifikanten Hypertonus. Das systolische Blutdruckmaximum wird durchschnittlich in der 8-9 Lebenswoche erreicht¹¹. Der durchschnittlich gemessene systolische Blutdruck der in dieser Arbeit untersuchten hypertensiver Tiere lag mit 172mmHg bei vergleichbaren Herzfrequenzen im Alter von 30 Wochen 30% unter dem von Lee et al. gemessenen Werten. Zum einen kann die unterschiedliche Methodik der Blutdruckregistrierung Ursache dieser Ergebnissdifferenz sein. Lee et al. verwendeten, im Gegensatz zur hier eingesetzten invasiven Registrierung, die transkutane-oszillatorische Blutdruckmessung am Schwanz, welche methodisch bedingt schon zu höheren systolischen Blutdruckwerten führt. Zum anderen ist von einer kardiodepressiven Wirkung des verwendeten Narkotikums Thiopental auszugehen. Reiz et al. beschreiben beispielsweise eine Abnahme des systolischen Blutdruckes um 27% bei mit Thiopental narkotisierten Menschen und bestehender Herzinsuffizienz¹²⁰. Flesch et al. konnten jedoch die in dieser Arbeit registrierten Blutdruckwerte mRen2-transgener Ratten mit vergleichbarer Methodik bestätigen¹¹².

Des Weiteren besteht eine kontroverse Diskussion darüber, über welche Mechanismen die Integration des mRen2-Transgens in das Rattengenom eine arterielle Hypertonie bedingt. Physiologischerweise findet sich die stärkste Expression des Renin-Gens in der Niere. In mRen2transgenen Ratten ist die höchste Konzentration jedoch in der Nebenniere zu finden¹²¹. Im Plasma finden sich dagegen, nicht wie zunächst erwartet erhöhte Spiegel von Renin und Angiotensin II (AT II), sondern normal bis leicht erniedrigte Konzentrationen¹¹¹. Langheinrich et al. konnten in der humoralen Charakterisierung des vorliegenden Tiermodells schon Veränderungen im zirkulierenden Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) beschreiben. Doch auch von dieser Arbeitsgruppe wurde ein direkter Einfluss des seit langen bekannten RAAS auf die Hypertonieentwicklung als unwahrscheinlich angesehen¹⁰⁷. Jedoch konnte eine erhöhte Plasmakonzentration von Prorenin identifiziert werden. Da von diesem Vorläuferprotein zunächst keine physiologische Relevanz in Bezug auf die arterielle Blutdruckregulation anzunehmen war, stellte dies keine schlüssige Erklärung der arteriellen Hypertension dar. Ein Einfluss auf die Strukturveränderung des Herzens scheint für Prorenin jedoch nachweisbar zu sein. Dieser Punkt wird in 4.1.2. detaillierter dargelegt. Auch bestehende differente enzym-kinetische Eigenschaften des residenten Renins und des Transgenen führten in Versuchen anderer Arbeitsgruppen nicht zu den beobachteten Blutdruckwerten¹²². Da eine pharmakologische Inhibition der AT II-Wirkung jedoch eine Reduktion der gemessenen Blutdruckparameter bewirkt, ist eine direkte Beeinflussung des Blutdrucks durch AT II als wahrscheinlich anzunehmen¹¹. Jedoch scheint das lokale gewebeständige Renin-Angiotensin-System (RAS) des Herzens und des vaskulären System die entscheidende Rolle gegenüber dem Einfluss des systemischen RAAS zu spielen⁹⁹. Die bereits in der Einleitung beschriebenen Effekte von AT II auf AT₁ bzw. AT₂-Rezeptoren sind hierbei von Bedeutung^{123,} 124

Ein weiterer Faktor in der Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie in dem vorliegenden Tiermodell stellt das vegetative Nervensystem dar. Wie von verschieden Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, führte eine Aktivierung des neuronalen RAS zu einer gesteigerten Noradrenalinausschüttung. Über eine verstärkte AT_1 -Rezeptorwirkung an postganglionären sympathischen Fasern mit nachfolgender gesteigerter Exozytose des Neurotransmitters ist der Effekt einer Blutdruckelevation erklärbar^{125, 126}. Dieser Einfluss scheint zunächst bei den in dieser Arbeit registrierten Blutdruckwerten nicht ausschlaggebend zu sein. Vergleichbare Herzfrequenzen hypertensiver und normotensiver Tiere legen diesen Schluss nahe. Um dies näher zu untersuchen erfolgte nach durchgeführter linksventrikulärer Katheterisierung eine erneute Messung des aortalen Blutdrucks unter Antagonisierung von β_1 -Adrenorezeptoren mittels intraperitonealer Applikation von gewichtsadaptiertem Metoprolol. Hierbei zeigten sich bei Ren2-Tieren im Vergleich zu normotensiven Ratten vergleichbare diastolische Blutdruckwerte. Die diastolischen Blutdruckwerte der WT-Tiere sind durch Metoprolol nicht signifikant beeinflussbar. Hingegen zeigten sich die systolischen Blutdruckwerte Renin-transgener Tiere nicht in vergleichbarem Maße durch die medikamentöse Intervention modifiziert. Eine Erklärung dieses beobachteten Effekts könnte aus einer vermehrten Aktivierung vaskulärer β2-Rezeptoren, mit nachfolgender peripherer Vasodilatation,

resultieren. Priviero et al. beobachteten bereits eine Vasodilatation unter dem Einfluss von Metoprolol¹²⁷. Jedoch führt diese Arbeitsgruppe den vasodilatativen Effekt der β_1 -Rezeptorblockade auf einen Stickstoffmonoxid vermittelten Mechanismus zurück. Dies würde aber die differenten Auswirkungen der β_1 -Antagonisierung auf normotensive Kontrolltiere und Renin-transgene Tiere, bei fast unveränderten Herzfrequenzen, nicht hinreichend erklären. Des Weiteren könnte eine Hypertonie-bedingte Degeneration der Aortenklappe im Rahmen der Katheterisierung des linken Ventrikels zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit verletzungsbedingter Klappeninsuffizienz der Valva aortae geführt haben¹²⁸. Ob dies mir der beobachteten Senkung des diastolischen Blutdruckes ursächlich verbunden ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterführend untersucht werden.

Die ebenfalls beschriebenen morphologischen Veränderung der aortalen Blutdruckkurve geben Hinweise auf einen veränderten Gefäßwandaufbau in den hypertensiven Tiergruppen Ren2 und SERen. Eine über AT₁-Rezeptoren bewirkte Abnahme der aortalen Elastizität in Folge gesteigerter Fibrosierung der Mediawandschicht, könnte diese Beobachtung erklären^{129, 130}. Gefäßmorphologische Veränderungen wurden jedoch im Rahmen dieser Dissertation nicht untersucht.

4.1.2. Kardiale Hypertrophie

Vergleichend zu den bereits von Zolk et al. beschriebenen hypertensiven Ratten, findet sich auch in den in dieser Arbeit vorgestellten Tiergruppen Ren2 und SERen ein ca. 30% erhöhtes linksventrikuläres Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht¹⁰⁸. Das rechtsventrikuläre Gewicht dieser Tiere zeigt sich zwar tendenziell auch vermehrt im Vergleich mit dem WT, doch eine fehlende Signifikanz deckt sich mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen. Die Steigerung des gesamten myokardialen Gewichts in Ren2 und SERen ist nicht allein durch kompensatorische Hypertrophie bzw. Hyperplasie der Kardiomyozyten zu erklären¹³¹. Vielmehr ist von einer zunehmenden Fibrosierung kardialen Gewebes in Form einer deutlich gesteigerten Produktion extrazellulärer Matrixproteine auszugehen¹³². Dies verdeutlichen auch die exemplarisch gezeigten Schnitte linksventrikulärer Präparate in der Anfärbung kollagener Strukturen mit Picro-Sirius-Rot. Der optische Eindruck einer vermehrten Farbgebung in Ren2-Tieren konnte auch schon photometrisch von Rothermund et al. quantifiziert werden¹³³. Hier konnte im selben mRen2transgenen Tiermodell eine signifikante Zunahme der perivaskulären kardialen Fibrosierung nachgewiesen werden.

Nachdem bereits ein Einfluss des zirkulierenden RAAS auf die Entwicklung der arteriellen Hypertonie belegt werden konnte, ist auch bei der Entstehung der aufgezeigten kardialen Hypertrophie das lokale kardiale RAS ein gewichtigerer pathogenetischer Faktor. Die Anzahl der implementierten Renin-Gene ist dabei ebenso ein maßgeblicher Faktor¹². Verschiedene Arbeitsgruppen verfolgten den Ansatz, dass die in dem mRen2-transgenen Rattenmodell gefundenen erhöhten Plasmakonzentrationen von Prorenin ursächlich an der Entwicklung der Hypertrophie sind⁸⁴. Dieses vermeintlich inaktive Reninvorläuferprotein wird durch proteolytische Abspaltung eines 43-Aminosäurenprosegments physiologischerweise zu Renin aktiviert. Es konnten allerdings in vitro direkte Effekte von Prorenin über einen entsprechenden und noch nicht näher klassifizierten sarkolemmalen Rezeptor gezeigt werden, die unabhängig von der Aktivierung des RAS und der Wirkung von intrazellulärem AT II sind^{134, 135}. Der Nachweis einer relevanten Einflussaufnahme auf die Hypertrophieinduktion ist bisher für diesen Mechanismus jedoch noch nicht gelungen. Wichtiger für die Entstehung einer kardialen Hypertrophie bei Renin-induzierter Hypertonie scheint dagegen die Wirkung des lokalen vaskulären und myozytären RAS zu sein⁸⁵. Alle bisherigen Ergebnisse deuten auf einen über AT1-Rezptoren vermittelten Mechanismus in der Induktion Hypertrophie-relevanter Gene hin^{99, 136}. Weiterhin konnten Zolk et al. auch zeigen das in einer Situation der Renin-induzierten Hypertrophie es neben einer herabgesetzten Genexpression kardialer B1-Rezeptoren und systemisch gesteigerten sympathischen Grundtonus zum vermehrten Einbau von a1-Adrenorezeptoren in das myokardiale Sarkolemm kommt. Stimulation dieser Rezeptoren führt in vivo über eine der AT₁-Rezptor ähnlichen intrazellulären Signaltransduktionskaskade zur Hypertrophie Entwicklung. Die Kopplung der Rezeptoren an stimulierende Untereinheiten der G-Proteine führt über eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung zur vermehrten Phosphorylierung kardialer Proteine durch die Proteinkinase A. Neben dem Einfluss der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]) auf die Regulation bestimmter Hypertrophiegene über den NFAT-Signalweg, können noch weitere Mechanismen die komplexe Ausprägung der kardialen Hypertrophie beeinflussen^{26, 102}. Bishop et al. konnten zeigen dass eine Blutdrucksenkung durch Amlodipin in mRen2-transgenen Ratten zu einer signifikanten Verringerung der kardialen Fibrose ohne Beeinflussung der AT II-Wirkung führt, und schlussfolgernd daher auch eine mechanische Dehnung von Myozyten Fibrosierung induzieren kann¹³⁷. Eine eindeutige Identifikation hypertrophieinduzierender Faktoren scheint in dem verwendeten Tiermodell nicht hinreichend möglich.

4.1.3. Überleben mRen2-transgener Tiere

Lee et al. konnten bereits zeigen, dass es bei heterozygoten mRen2-transgen positiven männlichen Ratten häufiger zu Todesfällen in den ersten Lebenswochen kommt als in der weiblichen Kontrollgruppe¹¹. Dies stimmt mit den in dieser Arbeit dargestellten Überlebensstatistiken überein. Es überleben durchschnittlich 20% mehr mRen2-transgene Weibchen den Untersuchungszeitraum von 30 Wochen als ihre männliche Vergleichsgruppe. Die Ursache der Todesfälle dürfte dabei auf die Beobachtungen zurückzuführen sein, dass in der Autopsie verstorbener männlicher homozygoter Tiere mit massivem arteriellen Hypertonus überdurchschnittlich häufig cerebrale hämorrhagische Ereignisse gefunden werden konnten. Transgene weibliche Tiere bilden einen milderen Hypertonus als ihre männlichen Artgenossen aus¹⁰⁶. Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede sind auch in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei Patienten mit arterieller Hypertonie bekannt¹³⁸. Die entscheidende Rolle scheint hierbei auf der Interaktion des Hypertonieinduzierenden RAS mit der Modulation und Aktivierung von Androgenrezeptoren zu liegen¹³⁹. Der genaue Mechanismus des geschlechtsspezifischen Unterschiedes ist derzeitig noch nicht hinreichend erklärbar^{140, 141}.

4.2. Das SERCA2a/mRen2-doppeltransgene Rattenmodell

In einem hypertensiven Kardiomyopathiemodell wie der mRen2-transgenen Ratte kommt es zu relevanten Veränderungen in der zytoplasmatischen Ca2+-Homöostase13. Neben Modifikation anderer an der Ca²⁺-Regulation beteiligter Proteine steht eine verminderte Expression und Aktivität des endogenen SERCA2a-Gens unter den Bedingungen einer Hypertrophie im Vordergrund¹⁴². Daher bestand die Intention dieser Arbeit darin, bestehende Regulationsstörungen durch eine zusätzliche Expression eines Transgens der sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPase vom P-typ (SERCA2a) gegenregulatorisch auszugleichen. Dieses SERCA2a-transgene Konstrukt konnte erstmals 1997 in das Genom der Mauslinie CJ5 integriert werden. Neben der Modulation durch Auswahl der Exons einer cDNA von SERCA2a der Ratte und selektiver Inklusion von Introns konnte die Expression erhöht werden. Die transgene Expression wird durch den humanen Cytomegalovirus immediate early enhancer (hCMV-enhancer) kontrolliert. Dieser wiederum ist an einen β-Actin Promoter des Huhns (cβA) gekoppelt, welcher transkribiert, jedoch nicht translatiert wird. Das 6,3kb große SERCA2a-Konstrukt wurde nun, wie bereits bei der Implementierung des mRen2-Gens beschrieben, in Oozyten fertiler Spraque Dawley Weibchen verbracht. Durch Verpaarung heterozygoter SERCA2a-transgener Weibchen mit homozygoten mRen2-transgenen Rattenböcken konnte das doppelt-transgene Rattenmodell der SER-CA2a/mRen2-transgenen Ratte (SERen) erzeugt werden. Die Verteilung des SERCA2a-Transgens in den Nachkommen dieser Zucht entspricht den Erwartungen der Mendel'schen Vererbungsregeln. Dabei sind ca. 50% der Nachkommen eines heterozygot SERCA2atransgenen Elternteils ebenfalls positiv bezüglich des Transgens in der PCR-Analyse getestet worden. Vetter et al. konnten zeigen dass eine Überexpression von SERCA2a in normotensiven Tieren zu einem 1,5-fachen Anstieg des mRNA-Signal im Vergleich zu Wildtyptieren führt. Dies bestätigt die Ergebnisse welche zuvor in der Maus gefunden wurden¹⁴³. Dem gegenüber steht jedoch nur eine 25%-ige Steigerung des kardiomyozytären SERCA2a-Proteingehalts. Als Ursache dieser Diskrepanz werden in der Literatur unter anderem eine fehlende Integration der Proteine in die Membran des SR oder eine herabgesetzte Translationseffizienz kontrovers diskutiert¹⁴³. Letzteren wurde eine mangelnde Aktivität des c β A-Promoters unterstellt und daher ein Modell entwickelt, welches einen myokardialen α -Myosin-Schwerketten-Promoter im SERCA2a-Genkonstrukt verwendet. In dieser Arbeit, in welcher der Einfluss der Transgenexpression in hypertrophierten Herzen untersucht werden soll, eignet sich dieses neuere transgene Modell nicht, denn eine mögliche Abschaltung dieses Promoters im Rahmen der veränderten Genexpression bei Hypertrophie erscheint möglich¹⁴⁴. Außerdem ist bisher der Einfluss einer renininduzierten kardialen Hypertrophie über die bereits beschriebenen Signaltransduktionskaskaden, auf die Genexpression kardialer Proteine, im Speziellen der endogenen und der transgenen SER-CA2a, nicht ausreichender erforscht¹².

Einen Einfluss der zusätzlichen Expression des SERCA2a-Transgens auf den im mRen2transgenen Rattenmodell gefundenen Hypertonus ist nicht zu verzeichnen. Männliche SERen-Tiere entwickeln vergleichbare Blutdruckwerte wie Ren2. Daher scheint es andere Ursachen zu haben die den Überlebensvorteil weiblicher Tiere verringern. Während bei weiblichen Ren2-Tiere signifikant weniger Todesfälle als in der männlichen Vergleichsgruppe bis zur 30. Woche auftreten, ändert sich dies in SERen. Die zusätzlich SERCA2a-transgenen SERen-Weibchen unterscheiden sich im Auftreten von Todesfällen innerhalb der ersten 30 Lebenswochen nicht mehr signifikant von ihrer männlicher Vergleichsgruppe und der männlichen Ren2-Gruppe. Dies stimmt weitestgehend mit den im Folgenden beschriebenen Ergebnissen bei der Charakterisierung der linksventrikulären Funktion überein.

4.2.1. Veränderungen der linksventrikulären Funktion

Die Beladung des SR mit Ca²⁺ und die zyklische Freisetzung dieser Ionen im Regelkreis der membranpotential gesteuerten Myofilamentkontraktion (elektromechanische Kopplung) sind, neben anderen Faktoren, entscheidend an der Kontraktionskraftentwicklung des gesamten Herzens beteiligt. In Herzen terminal herzinsuffizienter Patienten und experimentellen Modellen der Herzinsuffizienz konnte eine verminderte sarkoplasmatische Ca²⁺-Konzentration ursächlich für systolische Funktionsstörung beschrieben werden^{13, 145}. Ausgehend von diesem Wissen ist in dem hier verwendeten Modell der kardialen Hypertrophie theoretisch eine systolische Insuffizienz, wenn auch teilweise kompensiert, anzunehmen.

4.2.2. Systolische Funktionsparameter

Es finden sich in Ruhebedingungen keine Unterschiede in der maximal entwickelten linksventrikulären Kontraktionskraft (LVdP) mRen2 transgener Tiere (Ren2 & SERen) im Vergleich zum Wildtyp (WT). Auch hat die zusätzliche Ausstattung des SR mit transgenem SERCA2a keinen Einfluss auf den LVdP, da sich der LVdP von SERen-Tieren nicht signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Ein Grund dafür könnte in der noch kompensierten systolischen Herzinsuffizienz der Tiere liegen. Wie im Folgenden noch näher beschrieben wird, zeigen die hypertensiven Tiere eine deutliche Zunahme des enddiastolischen Druckes (LVEDP). Über den etablierten Frank-Starling-Mechanismus könnte so eine Kompensation der hypertrophiebedingten systolischen Insuffizienz erfolgen. Da die Erhöhung des LVEDP aber auch auf die Hypertrophie zurückzuführen ist, entsteht ein circulus vitiosus wie er in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz anerkannt ist²⁶. Bei genauerer Betrachtung zeigen sich jedoch Anzeichen einer systolischen myokardialen Insuffizienz. Der Quotient aus LVdP und dem linksventrikulären Feuchtgewicht beschreibt die Druckentwicklung einer kontraktilen Gewichtseinheit im Sinne von einem mg kontrahierendem Herzmuskelgewebes. Beim Vergleich dieser Quotienten wird deutlich, dass die als hypertroph anzusehenden kontraktilen Einheiten der Ren2 und SERen-Herzen deutlich weniger Kraft pro Gewichtseinheit entwickeln können. Dies wird auch in der inversen Korrelation von LVdP und dem linksventrikulären Feuchtgewicht deutlich. Auch hier stellt die Expression des zusätzlichen SERCA2a-Transgens in der SERen-Gruppe keinen Vorteil im Sinne einer verbesserten Kraft-Gewichtseinheits-Quotienten gegenüber Ren2 dar. Müller et al. fanden hingegen eine Verbesserung der kontraktilen Funktion insuffizienter Herzen durch SERCA2a Gentransfer. Sie nutzten dazu ein Modell der kardialen Überdruckbelastung durch Verringerung des aortalen Durchmessers als Induktion der Insuffizienz. Bei der Bestimmung des LVdP in isolierten Herzen zeigte sich eine deutliche Reduktion der Kraftentwicklung der so präparierten Herzen. Eine zusätzliche SERCA2a-Expression konnte in der untersuchten Tiergruppe sogar eine Normalisierung entsprechend der Kontrollgruppe bewirken¹⁴⁶. Da sich in den in dieser Dissertation untersuchten Tieren jedoch noch keine Reduktion der entwickelten Kraft einstellte, ist eine Vergleichbarkeit des Insuffizienzgrades der beiden Methoden der Hypertrophieinduktion fraglich. Damit ist auch eine endgültige Aussage über den Einfluss von SERCA2a-Überexpression in renininduzierter Hypertrophie durch diesen Vergleich nicht möglich.

Alle untersuchten kontraktilen Funktionsparameter der Tiergruppen Ren2 und SERen wiesen eine herabgesetzte Ansprechbarkeit auf die β -adrenerge Stimulierung mit Dobutamin auf. Zwar ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf LVdP, doch lassen sich Tendenzen registrieren die einen geringeren Zuwachs der Druckentwicklung in SERen nahe legen. Dramatischer zeigte sich die Situation bei Betrachtung der maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt_{max}). Eine hohe Konzentration an Ca²⁺ im SR führt nicht nur zu einer vermehrten Kraftentwicklung, sondern auch zu einem schnelleren Ansteigen des systolischen linksventrikulären Drucks²⁰. Unter basalen Bedingung zeigen die hypertensiven Tiere Ren2 und SERen annähernd gleiche Werte für +dP/dt_{max} wie die normotensive Kontrolle, was als vergleichbare SR-Ca²⁺-Beladung interpretiert werden kann. Unter β-adrenerger Stimulation allerdings ist im Vergleich eine deutlich geringere +dP/dt_{max} der hypertrophierten Herzen zu finden. Die verminderte Ansprechbarkeit durch verminderte Genexpression und gesenktes Proteinniveau kardialer β_1 -Adrenorezeptoren in Rahmen einer kardialen Hypertrophie bietet hierfür einen geeigneten Erklärungsansatz¹⁴⁷. Es ist bekannt, dass die Stimulation kardialer β_1 -Adrenorezeptoren zu einer vermehrten Adenylatzyklaseaktivität führt. Dies führt wiederum, über eine gesteigerte Phosphorylierung an der Ca²⁺-Homöostase beteiligter Proteine, zu einer gesteigerten Kraftentwicklung. Eine Phosphorylierung des an die SERCA2a assoziierten Membranprotein des SR, Phospholamban (PLB), führt zur Reduktion seiner ansonsten hemmenden Eigenschaften auf die Ca²⁺-Transportaktivität von SERCA2a⁵³. Im hypertrophierten Herzen kommt es neben einer reduzierten Expression von SERCA2a und B1-Adrenorezeptoren zur kaum veränderten Expression von PLB¹¹³. Dies hat zur Folge dass die geringere Menge an SERCA2a-Proteinen einer stärkeren Suppression durch PLB unterliegen könnte⁵³. Unter β-adrenerger Stimulation zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der SERen und Ren2-Gruppe. Was auf einen Einfluss der Expression des SERCA2a-Transgens in SERen unter dem ß-adrenergen Stimulus hinweist. Beide Tiergruppen unterliegen durch die entwickelte kardiale Hypertrophie Ca²⁺- Regulationsstörungen. Trotz transgener Expression von SERCA2a zeigen die SERen-Tiere eine signifikant geringere +dP/dt_{max} als Ren2 und WT bei Aktivierung durch Dobutamin.

Grund dafür könnte eine Inhibition endogener SERCA2a-Proteine durch die Expression des SERCA2a-Transgens sein und damit einer verminderter Gesamtkonzentration an SERCA2-Membranproteinen. Dieser grundsätzliche Diskussionspunkt transgener Tiermodelle ist bisher jedoch nicht eindeutig belegbar. In wie weit die translatierten Proteine des SERCA2a-Transgenskonstrukt in der Membran des SR verankert sind, und damit funktionell werden, ist ebenfalls unklar. Diesen Punkt sehen auch andere Arbeitsgruppen als Erklärung der Diskrepanz zwischen mRNA-Spiegel und Proteinkonzentration bzw. messbarem Ca²⁺-Transport an¹⁴³. Neben dem unklaren Verhältnis SR-assoziierter ATPasen und translatierter Proteine unterliegen die transgenen SERCA2a-Proteine nicht zuverlässig der Kontrolle durch PLB. Eine β-adrenerg bedingte PLB-Inhibition führt theoretisch durch gesteigerte Ca²⁺-Transportkapazität zur Konzentrationserhöhung von Ca²⁺ im SR und damit nachfolgend zur vermehrten linksventrikulären Druckentwicklung. Eine verminderte Assoziation funktioneller SERCA2a-Pumpen an PLB kann somit die verminderte β-adrenerge Ansprechbarkeit teilweise begründen.

Um den adrenergen Einfluss auf die kontraktile Funktion genauer zu analysieren, erfolgte die selektive Antagonisierung von β_1 -Adrenorezeptoren. Eine intraperitoneale Injektion des selektiven β_1 -Antagonisten Metoprolol führt zu einem geminderten Phosphorylierungsgrad der beschriebenen Ca²⁺-Transportproteine und ist bereits in der Therapie der Herzinsuffizienz eine etablierte Methode¹⁴⁸. Unter dieser medikamentösen Intervention zeigte sich eine Normalisierung von LVdP und +dP/dt_{max} der hypertrophierten Herzen von Ren2 und SERen nach vorangegangener dobutaminerger Stimulation. Erstaunlicherweise zeigte nur die doppelt-transgene SERen-Gruppe eine signifikante Änderung dieser Parameter im Vergleich zu den basalen Bedingungen ohne medikamentöse Intervention. Dies könnte auf einen erhöhten sympathischen Grundtonus der Tiere hindeuten, welcher zur Kompensation einer bestehenden Insuffizienz beiträgt. Unter Annahme dieser gesteigerten adrenergen Aktivität kann auch der ausbleibende Anstieg der systolischen Funktionsparameter unter der Dobutamin-Stimulation gesehen werden. Warum sich dies nur in SERen-Tieren und nicht in Ren2-Tieren manifestiert, bleibt offen.

Ein anderer gewichtiger Punkt in der Diskussion der verschlechterten systolischen Funktion in hypertrophierten Herzen mit einer transgenen Expression vonSERCA2a stellen die ermittelten Ergebnisse der Oxalat-stimulierten Ca²⁺-Transportmessung dar. Wie schon von anderen Gruppen gezeigt werden konnte, kommt es in den hypertrophierten Herzen der Ren2-Tiere zu einer 12% niedrigeren Ca²⁺-Transportkapazität in vitro im Vergleich zur Kontrolle¹³³. Um gerade dieser Entwicklung entgegen zu wirken, erfolgte die Implementierung des SERCA2a-Transgens in das SERen-Modell. Erstaunlicherweise zeigten Membranpräparationen dieser Tiere eine um 19% geringere Ca²⁺-Aufnahme als die normotensive Kontrolle. Somit zeigt sich ein der Erwartung gegensätzlicher Effekt.

Wie schon im oben Genannten erwähnt, führt eine Dissoziation der SERCA2a und des Regulatorproteins PLB zu einer Steigerung der Ca²⁺-Affinität^{45, 149}. Eine gesteigerte Affinität sollte eine messbare Steigerung der vesikulären Ca²⁺-Anreicherung bewirken. Vangheluwe et al. konnten zeigen das eine massiv gesteigerte Ca²⁺-Affinität von sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPasen zur Entstehung einer systolischen und diastolischen Dysfunktion in vivo führt. In dem dieser Dissertation zu Grunde liegendem Tiermodell ist von einer erhöhten Ca²⁺-Affinität auszugehen. Dies kann aus der 18% geringeren Ca²⁺-Transportratio ($[Ca^{2+}]_{high}/[Ca^{2+}]_{low}$) von SERen-Tieren in Bezug auf die Kontrolle geschen werden, denn es belegt einen höheren transmembranären Ca²⁺-Transport unter niedrigeren freien $[Ca^{2+}]$ im Vergleich zur gesättigten $[Ca^{2+}]$. Da aber die Absolutwerte dieser vesikulären Ca²⁺-Aufnahme eine verminderte Transportrate von SERCA2a in SERen gegenüber Ren2 und der Kontrolle aufweisen, ist zusammenfassend von einer verminderten Anzahl funktioneller Transportproteine auszugehen. Dies könnte auch die bereits beschriebene Reduktion der kontraktilen Parameter bei SERen-Tieren im Vergleich der Kontrollgruppen als teilkompensierte systolische Dysfunktion erklären.

4.2.3. Diastolische Funktionsparameter

Eine angenommene reduzierte Konzentration funktioneller SERCA2a-Proteine am SR stellt auch eine Erklärungsmöglichkeit für die gefundenen Ergebnisse der diastolischen Funktionsparameter der Versuchstiere dar. In der diastolischen Phase eines Herzzyklus führt die Senkung der zytoplasmatischen Konzentration an freiem Ca²⁺ zur Dissoziation dieser Ionen vom Troponin C, was wiederum zur Relaxation des Kardiomyozyten führt²⁶. Die Geschwindigkeit der Dissoziation und damit auch der myozytären Relaxation geschieht abhängig von der zytosolischen Ca2+-Konzentration. Neben anderen Mechanismen steht der Transport von freien Ca2+ durch ATPabhängigen aktiven Transport durch SERCA2a ins SR im Vordergrund der diastolischen Konzentrationssenkung. Unter den Bedingungen einer kardialen Hypertrophie kommt es zur Absenkung der SERCA2a-vermittelten Ca²⁺-Aufnahme ins SR und nachfolgend zur verlangsamten Absenkung der diastolischen [Ca²⁺]¹⁵⁰. Dies führt zur verlangsamten Relaxation der Myozyten mit dem Bild einer diastolischen Dysfunktion⁶⁶. Als Marker für die globale diastolische Funktion des linken Ventrikels gilt die Bestimmung des enddiastolischen linksventrikulären Druckes (LVEDP). Flesch et al. konnten neben anderen Gruppen zeigen, dass es in dem mRen2-transgenen Rattenmodell zu einem Anstieg des LVEDP bis zu 18mmHg als Zeichen diastolischen Insuffizienz kommen kann¹¹². Dies deckt sich annähernd mit den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werten. Ren2-Tiere weisen einen um 4mmHg höheren aber noch nicht signifikant veränderten LVEDP im Vergleich zum WT auf. Der um 345% erhöhte LVEDP der zusätzlich SERCA2atransgenen Tiere im Vergleich zum Wildtyp verdeutlich die von Flesch et al. bereits beschriebene Ausprägung der diastolischen Dysfunktion. Eine Erklärung hierfür kann wiederum in den Ergebnissen des vesikulären Ca²⁺-Transport gesucht werden. Eine gesenkte Ca²⁺-Transportaktivität durch vermutlich verminderten SERCA2a-Proteingehalt des SR könnte diese diastolische Insuffizienz hervorrufen. Die Ursache liegt hierbei wiederum in einer höheren enddiastolischen Ca2+-Konzentration und damit der nicht vollständigen Relaxation.

Eine andere Erklärung dieser Beobachtung liefern die Erkenntnisse der angehobenen zytoplasmatischen [Ca²⁺] durch spontane diastolische Ca²⁺-Ströme (leaks). Diese werden über den an der physiologischen elektromechanische Kopplung beteiligten Ca²⁺-Freisetzungskanal vom Ryanodinrezeptor-Typ (RyR) an der Membran des SR vermittelt¹⁶. Diese spontane diastolische Ca²⁺-Freisetzung trägt zur Entwicklung der diastolischen Dysfunktion bei¹⁵¹. Trotz kontroverser Diskussion sind verschiedene Ansatzmöglichkeiten gefunden wurden, welche die spontanen RyRvermittelten Ca²⁺-leaks erklären könnten. Marxs et al. konnten beispielsweise in Modellen der Herzinsuffizienz mit gesteigerter ß-adrenerger Aktivität, simultan dem mRen2-transgenen Rattenmodell, eine Hyperphosphorylierung des RyR Typ II an Ser-2809 nachweisen¹⁵². Diese gesteigerte Phosphorylierung führt zur Dissoziation von FKBP12.6. und RyR. FKBP12.6. ist ein an RyR assoziiertes Protein mit hemmendem Einfluss auf diesen Ca²⁺-Kanal. Aus der Dissoziation resultiert eine erhöhte diastolische Offenheitswahrscheinlichkeit dieses Ca²⁺-Freisetzungskanals. Wenn dies von führender Bedeutung für die diastolische Dysfunktion wäre sollte eine Reduktion der Phosphorylierung einen verminderten LVEDP hervorrufen. Einer Situation reduzierter RyR-Phosphorylierung kann durch die Antagonisierung des β-adrenergen Einflusses durch Metoprololgabe erzeugt werden. Jedoch konnte unter Wirkung dieses β_1 -Antagonosten sogar ein Anstieg des LVEDP im Vergleich zur Ausgangsbedingung in allen Versuchsgruppen beobachtet werden. Daher scheinen andere Mechanismen als die PKA-vermittelte Phosphorylierung ausschlaggebend zu sein. Eine vermehrte Phosphorylierung des RyR durch die Ca²⁺-Calmodulin abhängige Proteinkinase Typ II (CAMKII) führt zu ähnlichen Effekten. Die Aktivität dieser Proteinkinase ist von der zytoplasmatischen [Ca²⁺] abhängig. Untersuchungen von Ai et al. legen den Verdacht nahe, dass dieser Mechanismus die entscheidende Rolle in der Regulation des RyR in hypertrophierten Herzen spielt. Eine Inhibition von CAMKII führt zu einer signifikant gesenkten Offenwahrscheinlichkeit, eine Inhibition von PKA jedoch nicht¹⁵¹. Darin wird ein weiterer Kreislauf in der Entwicklung der diastolischen Dysfunktion sichtbar. Die Konzentration an freien zytoplasmatischen Ca²⁺, wie in hypertrophierten Myozyten zu beobachten ist, erhöht die Aktivität von CAMKII und diese von Neuem die [Ca²⁺]¹⁵³. Gegen diesen Erklärungsansatz in Bezug auf den massiv erhöhten LVEDP in der SERen-Gruppe spricht das ein vermehrtes Ca²⁺-leak zu einer gesenkten SR-Ca²⁺-Konzentration mit nachfolgender Verringerung der systolischen Kraftentwicklung führen sollte. Dies trifft aber bei den hier untersuchten Tieren bei vergleichbaren Werten von LVdP und +dP/dt_{max} von SERen und Kontrolle nicht zu. Ein vermehrter diastolischer Efflux von Ca²⁺-Ionen aus dem SR durch Ca²⁺-leaks könnte auch eine gesenkte Ca²⁺-Transportaktivität in Oxalat-stimulierten Ca²⁺-Transport an SR-Membranvesikeln simulieren. Die gemessene Ca2+-Transportaktivität wird in diesem Versuchsaufbau durch Messung der intravesikulär angereichert Ca²⁺-konzentration in einem definierten Zeitintervall abgeschätzt. Daher kann ein vermehrter vesikulärer Ca2+-Efflux durch niedrigere vesikuläre Ca2+-Konzentrationen eine reduzierte Transportrate vortäuschen. Durch Zugabe von Ruthenium-Rot in den Versuchsansatz können RyR-Rezeptoren und andere sarkoplasmatische Freisetzungskanäle inhibiert werden. Die Messung unter Zusatz von Ruthenium-Rot ergab jedoch für alle Versuchsgruppen eine vergleichbare Steigerung der vesikulären Ca²⁺-Transportaktivität. Daher lässt sich auch auf eine vergleichbare RyR-Aktivität in Abwesenheit von Ruthenium-Rot schlussfolgern. Zu beachten ist jedoch, dass diese Experimente durchgeführt wurden nachdem die Versuchstiere zuvor im Rahmen der Katheterisierung Metoprolol appliziert bekamen. Ein Einfluss dieser Medikation auf die Ca²⁺-Transportraten in vitro ist nicht auszuschließen und Rückschlüsse auf die Situation in vivo daher nur bedingt möglich¹⁵⁴.

Neben einer Erhöhung des LVEDP zeigt auch die Registrierung der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit (-dP/dt_{max}) eine verstärkte diastolische Funktionseinschränkung der SERen-Tiere. Während registrierte -dP/dt_{max} –Werte von Ren2-Ratten zwar tendenziell niedrigere Werte als die Kontrolle aufwiesen, zeigten SERen-Tieren mit SERCA2a-Überexpression signifikant reduzierte Relaxationsparameter. Dies ist wiederum am ehesten auf die bereits diskutierte verringerte Funktionalität von SERCA2a in diesen Tieren zurückzuführen.

Ein weiterer Punkt in der Diskussion dieser beobachteten Effekte stellt die Einflussnahme des sarkolemmalen Na⁺/Ca²⁺-Austauschers (NCX) dar. Dieses sarkolemmal lokalisierte Transportprotein vermittelt einen nicht elektroneutralen Antiport von 3 Na⁺-Ionen und 1 Ca²⁺-Ion. Abhängig von der intrazellulären Na⁺-Konzentration, der Ca²⁺-Konzentration und dem vorherrschenden Membranpotential kann dieser Transport einen Efflux (I_{NCX}) von Ca²⁺ oder Influx (I_{NCX} rev) bewirken¹⁵⁵. Unter physiologischen Bedingungen stellt NCX den Konkurrenten zum SER-CA2a-vermittelten Ca2+-Transport bei der diastolischen Senkung der zytosolischen Ca2+-Konzentration über I_{NCX} dar. Im humanen Myozyten bewirkt I_{NCX} 20-25% des diastolischen Ca²⁺-Transports, und steuert so einer Ca²⁺-Überladung durch Aktionspotentialgesteuerten Ca²⁺-Einstrom (Trigger Ca²⁺) entgegen²⁰. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten eine verstärkte Transportaktivität von NCX im Rahmen einer Herzinsuffizienz finden142, 156. Zum einen liegt dem eine nicht unumstrittene Steigerung der Genexpression im Rahmen einer kardialen Hypertrophie zu Grunde¹³. Zum anderen wird eine verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivitätssteigerung durch PKA und PKC diskutiert¹⁵⁷. Durch den damit vermuteten vermehrten Ca²⁺-Efflux in der Systole und nachfolgender geringerer SR-Ca²⁺-Beladung wird die Entwicklung einer systolischen Dysfunktion erklärt. Schillinger et al. konnten aber zeigen das eine NCX-Überexpression in der Maus nicht zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führt¹⁵⁸. Daher sehen verschiedene Gruppen diesen Weg sogar als Kompensationsmechanismus der systolischen Herzinsuffizienz an¹⁶. Durch veränderte Ionenströme unter den Bedingungen einer Herzhypertrophie kommt es zu einer Verlängerung des Aktionspotentials und einem Anstieg der intrazellulären Na⁺-Konzentration. Dadurch kann ein vermehrter I_{NCX rev} beobachtet werden, welcher zusätzlich Ca²⁺ für die Dauer des Aktionspotentials zur Verfügung stellt und der systolischen Dysfunktion entgegen wirken sollte¹⁵⁹. Nach der Dauer des Aktionspotential ist ein der nun niedrigeren intrazellulären [Na⁺] folgender Ca²⁺-Efflux durch I_{NCX} die Folge. Isenberg et al. konnte jedoch nachweisen das eine lokale Ca2+-Absenkung durch INCX in einem subsarkolemmalen Raum zur Umkehr des NCX-Transportes führt. Somit ist wieder ein vermehrter Ca²⁺-Influx über I_{NCX rev} zu verzeichnen¹⁶⁰. Bei einer bestehenden Veränderung der Genexpression in Folge einer kardialen Hypertrophie, wie genomische NCX-Upregulation und SERCA2a-Downregulation, kann dieser Mechanismus sogar die Herzinsuffizienz verstärken. Denn die erhöhten diastolischen Ca²⁺-Konzentrationen durch gesteigerten I_{NCX rev} können auf Grund verminderter Transportaktivität von SERCA2a nicht kompensiert werden, mit der daraus resultierenden Entstehung der diastolischen Dysfunktion von SERen-Tieren.

Wie schon erwähnt zeigt sich diese Entwicklung auch bei der Betrachtung von -dP/dt_{max}. Der gemessene linksventrikuläre Druck an diesem Punkt der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit stellt den Beginn der isovolumetrischen Relaxation des linken Ventrikels im Herzzyklus dar. Definitionsgemäß wird hier der Beginn der späten Relaxationsphase gesehen¹⁶¹. In der frühen Phase des diastolischen Druckabfalls ist noch eine submaximale zytosolische [Ca²⁺] anzunehmen. Diese Phase wird am besten durch die Zeitparameter pressure quater time (PQT) und der nachfolgenden pressure half time (PHT) beschrieben. Bei der Begutachtung der PQT ist kein Unterschied zwischen den beiden hypertensiven Versuchstiergruppen festzustellen. Bei weiterem Abfall der intrazellulären[Ca²⁺] nimmt die Bedeutung des SERCA2a-vermittelten Ca²⁺-Transports zu¹⁴⁶. Bei der Analyse der PHT der verschiedenen Versuchsgruppen zeigt sich schon der Beginn der diastolischen Dysfunktion von SERen durch eine zum WT signifikant verlängerte PHT. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Zeitparameter und die Berechnung der Relaxationskonstante τ die diastolische Dysfunktion schon frühzeitig quantifizieren können. Gerade bei durch erhöhte Nachlast induzierte Herzinsuffizient stellt τ einen sensitiven Marker dar¹⁶². Die Zeitkonstante τ charakterisiert auf Grund ihres mathematischen Modells die isovolumetrische Phase der kardialen Relaxation. Im Vergleich der errechneten τ -Werte aller Versuchstiere ist eine deutliche Verlängerung dieses Zeitintervalls bei zusätzlich SERCA2a-transgenen SERen-Tieren zu finden. Dies bedeutet, dass die Ursache der bereits diskutierten diastolischen Dysfunktion von SERen-Tiere in der zweiten Hälfte des diastolischen Druckabfalls zu suchen ist, und damit auch in dem am meisten SERCA2a-abhängigen Zeitintervall. Eine Korrelation von τ und LVEDP wurde bereits von Leite-Moreira et al. beschrieben, und daher als ebenso aussagekräftiger diastolischer Parameter angesehen. Müller et al. konnten bereits zuvor zeigen, dass bei durch Einengung der aortalen Strombahn hervorgerufenen Kardiomyopathie, eine Verlängerung von τ mit der verminderten Anzahl sarkoplasmatischer Ca2+-ATPasen korreliert. Eine Überexpression von SERCA2a brachte in diesem Falle eine Angleichung von τ an die normotensive scheinoperierte Gruppe, was diese Vermutung untermauert.

Die in dieser Dissertation gefundene β -adrenerge Ansprechbarkeit der kardialen Relaxationsparameter PQT und PHT bei SERen-Tieren entsprachen der Kontrolle. Hingegen ist bei τ zum wiederholten Male eine deutlich verringerte Reaktion auf den β-adrenergen Stimulus zu registrieren. Dies könnte ebenfalls als Hinweis auf die verminderte SERCA2a-Aktivität und deren Stimulierbarkeit gewertet werden.

Die Einschränkungen in der regelrechten Relaxation des Herzens und damit der linksventrikulären diastolischen Funktion von SERen-Tieren scheint sich in der Implementierung des SER-CA2a-Genkonstrukts zu begründen, da dies die Vergleiche mit der ebenfalls hypertensiven Ren2-Gruppe nahe legen. Zumeist konnten die registrierten Ergebnisse mit der gemessenen Ca²⁺-Transportaktivität und der daraus gefolgerten reduzierten Konzentration funktioneller SER-CA2a-Proteine neben anderen Ursachen begründet werden. Die Auslöser für die verminderte SERCA2a-Aktivität trotz genomischer Überexpression im Hintergrund der renin-induzierten kardialen Hypertrophie kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Jedoch konnten aktuell auch Zang et al. nachweisen das eine interventionell verstärkte SERCA2a-Aktivität in insuffizienten Kardiomyozyten die diastolische Insuffizienz verstärkt¹⁶³. Daraus wird nochmals deutlich, dass der Ca²⁺-Regulationsstörung hypertrophierter Myozyten in ihrem komplexen Zusammenspiel nicht allein durch SERCA2a-Intervention zu begegnen ist.

4.3. Die transgene Ratte als Modell der Herzinsuffizienz

Um die zellulären Veränderung der hypertrophierten Kardiomyozyten im Rahmen einer Herzinsuffizienz und die daraus folgenden Auswirkungen auf die kontraktilen Funktionen des Herzens zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden entwickelt, welche deren Entwicklung simulieren. Neben der Betrachtung isolierter adulter Kardiomyozyten und neonataler Zellkulturen stellt das Tiermodell die beste Beobachtungsmöglichkeit auch bei interventionellen Maßnahmen dar. Gerade bei Modifikationen in der kardialen Genexpression, durch genomische Implementierung transgener DNA, besitzt das Tiermodell viele Vorteile. Obwohl bei isolierten Zellanalysen die Anzahl irritierender Faktoren minimiert wird, können im Tiermodell komplexe Zusammenhänge analysiert werden und damit eine größere Aussagekraft erlangt werden. Obwohl Primaten dem Menschen evolutionsgenetisch und physiologisch am meisten ähneln, stellt die Ratte (Rattus norvegicus) auf Grund vieler Vorteile eine geeignete Art dar, um kardiale Veränderungen zu erforschen. Beispielsweise sind hier eine schnellere Generationenfolge und vergleichsweise geringere finanzielle Kosten sowie eine höhere gesellschaftliche Akzeptanz bei Tierversuche dieser Art anzuführen. Die Physiologie und im Speziellen die molekularen Grundlagen der kardialen Physiologie sind von Ratten sehr weitreichend charakterisiert und gut dokumentiert. Trotzdem bestehen Unterschiede im Vergleich zum humanen Kardiomyozyten die eine Vergleichbarkeit erschweren. Etwa lässt sich ein deutlich verkürztes Aktionspotential im Rattenkardiomyozyten ohne die für das Aktionspotential eines humanen Kardiomyozyten typische Plateauphase nachweisen¹⁶⁴. Da diese Plateauphase hauptsächlich durch einen langsamen Ca²⁺-Influx durch L-Typ Ca²⁺-Kanäle (LTCC) bedingt ist, ergeben sich schon erste Hinweise auf Abweichungen bei der Regulation der kardialen Ca²⁺-Homöostase. Im Rattenmyokard wird im Gegensatz zum Humanen 90% des int-razellulären Ca²⁺ diastolisch durch SERCA2a-katalysierten Transport im SR konzentriert, und 10% durch NCX- und der sarkolemmale Ca²⁺-ATPase (PMCA)-vermittelte Ca²⁺-Efflux aus dem Zytosol extrahiert. Im humanen Myozyten liegt dieses Verhältnis bei 70:30 und im hypertrophierten Myozyten bei sogar 50:50. Dies belegt die stärkere Gewichtung des transsarkolemmalen Ca²⁺-Stromes¹⁶⁵.

Ein Vorteil gegenüber anderen vergleichbaren Nagetierarten stellt die relativ niedrige Herzfrequenz von Rattenherzen bei im Mittel 270 Schlägen/min in Ruhe dar. Daher sind Vergleiche zum Menschen besser zu ziehen als beispielsweise in der Maus (Mus Musculus). Hier sind Herzfrequenzen von durchschnittlich 600 Schlägen/min zu finden.

Nützlich ist auch, dass die Blutdruckwerte und deren Modulation in der Ratte denen des Menschen vergleichbar sind¹⁰⁷. Gerade dies verbessert die Vergleichbarkeit Hypertonie-bedingten Herzinsuffizienz beim Menschen und dem Hypertonie-induzierten Kardiomyopathiemodell der mRen2-transgenen Ratte. Hier ist physiologischerweise eine negative Kraft-Frequenzbeziehung vorhanden. Dies stellt einen Gegensatz zum normalen humanen Herzen, jedoch weniger zum insuffizienten Herzen dar¹⁶⁶. Im Vergleich zu anderen Rattenmodellen mit arteriellen Hypertonus, wie beispielsweise der spontan hypertensiven Ratte SHR oder der Dahl salz-sensitiven Ratten, stellt das mRen2-Tier durch seinen monogenetischen Pathomechanismus ein gut zu analysierendes Modell dar. Im dem komplexen Zusammenspiel der humoralen und physikalischen Faktoren in der Ätiologie der Herzinsuffizienz ist dieses Modell vorzuziehen, da hier nur ein etablierter Risikofaktor der Hypertonieenstehung ursächlich ist. Die zu Grunde liegenden Pathomechanismen sind so klarer herauszustellen und durch gezielte Intervention verifizierbar geworden. Auch bietet das mRen2-transgene Rattenmodell im Kontrast zum ebenso häufig untersuchten Modell der aortalen Konstriktion den Vorteil, dass die Entwicklung der kardialen Hypertrophie eher dem Pathomechanismus im humanen Herzen ähnelt, und Langzeitbeobachtungen möglich sind. Wie bei der Hypertonie-bedingten Kardiomyopathie des Menschen entwickeln sich die kardialen Veränderungen der mRen2-transgenen Ratte allmählich und nicht schnell progredient wie bei dem Modell der Aortenkonstriktion zu beobachten ist. Wie im Fall der SERen-Tiere ist die zusätzliche transgene Intervention in der Langzeitbeobachtung und dem Zusammenspiel aller beteiligten pathogenetischen Faktoren möglich.

4.4. Einfluss der zusätzlichen Expression des SERCA2a-Transgens auf die Arrhythmogenese bei kardialer Hypertrophie

In der vorliegenden Arbeit wurde das Auftreten von Extrasystolen quantifiziert um einen Überblick über das Auftreten von Arrhythmien hypertrophierter Herzen zu erhalten. Eine genaue elektrophysiologische Analyse des kardialen Erregungsablaufes konnte mit dem verwendeten Versuchsaufbau nicht durchgeführt werden.

Viele Untersuchungen konnten zuvor belegen, dass es im Rahmen einer nicht-ischämischen Herzinsuffizienz zu vermehrten Arrhythmien kommt die ihren Ursprung in nicht kreisenden ventrikulären Erregungen (non-reentry-Mechanismen) finden⁶⁰. Unter Ausgangsbedingungen finden sich in allen untersuchten Tiergruppen vergleichbare Häufigkeiten von Extrasystolen. Dies findet sich auch in den Beschreibungen von Pogwidz et al. die eine gesteigerte Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Arrhythmien erst ab einem Herzinsuffizienzstadium von NYHA III sehen⁷⁴. Patienten mit diesem klinischen Stadium weisen eine ausgeprägte Einschränkung der linksventrikulären kontraktilen Funktion auf¹⁶⁷. Da die Charakterisierung der linksventrikulären Funktion von Ren2 und SERen-Ratten eine kompensierte Insuffizienz nahe legt, scheint dieser nicht vorhandene Unterschied in der Extrasystolenhäufigkeit daher erklärbar. Es konnte auch kein Unterschied zwischen Ren2-Tieren und SERen-Tieren mit zusätzlicher SERCA2a-Expression gefunden werden. Davia et al. konnten jedoch eine Reduktion auftretender Arrhythmien durch SER-CA2a-Überexpression an isolierten Hasenmyozyten zeigen¹⁶⁸. Eine erhöhte SR-Ca²⁺-Konzentration, wie beispielsweise unter dem Effekt einer β-adrenergen Stimulation oder einer vermehrten SERCA2a-Aktivität zu beobachten ist, wird von verschiedenen Arbeitsgruppen als Ursache der Arrhythmieentwicklung angesehen²⁶. Diese Hypothese konnte auch durch die von Chen et al. gefundenen Ergebnisse befürwortet werden¹⁶⁹. Diese Arbeitsgruppe konnte eine gesteigerte Arrhythmiewahrscheinlichkeit von Rattenherzen durch SERCA2a-Überexpression nachweisen.

Unter β -adrenerger Stimulation konnte in den in dieser Dissertation untersuchten Tieren ebenfalls eine Zunahme der Extrasystolenwahrscheinlichkeit gezeigt werden, jedoch ohne Unterschied zwischen den hypertensiven Tieren Ren2 und SERen. Die zu Grunde liegenden Mechanismen hierfür werden in einem vermehrten Ca²⁺-Gehalt des SR und dem veränderten Phosphorylierungsgrad der RyR durch vermehrte PKA-Aktivität gesehen. Dies bewirkt ein verstärktes Auftreten spontan diastolischer SR-Ca²⁺-Entladungen. Durch diesen Ca²⁺-Strom kann eine späte Nachdepolarisation (DAD) induziert werden, welche zur Entstehung von Extrasystolen beiträgt¹⁷⁰. Dieser Effekt zeigte sich durch Antagonisierung der β_1 -Adrenorezeporen mit Metoprolol reversibel. Die hypertrophen Herzen der Ren2- und SERen-Tiere zeigen eine ebenso deutliche Reduktion der Extrasystolie wie die der WT-Tiere. Am deutlichsten wird dieser Effekt jedoch bei den SERen-Tieren, welche unter dem Einfluss von Metoprolol signifikant weniger Extrasystolen entwickeln als ihre hypertensive Vergleichsgruppe Ren2 und den WT-Tieren. Daher scheint hier eine SERCA2a-Überexpression Auswirkungen zu haben, die aber nicht weiter untersucht werden konnten. Da in der Einleitung dieser Arbeit bereits beschrieben wurde wie komplex die Entstehung einer Extrasystolie unter den veränderten Ionenströmen eines hypertrophierten Kardiomyozyten ist, ist eine hinreichende Erklärung der gefundenen Ergebnisse mit den durchgeführten Untersuchung nicht möglich.

5. Zusammenfassung

Herzinsuffizienz ist eine der klinisch bedeutsamsten Erkrankungen weltweit. Maßgeblicher ätiologischer Faktor ist neben der akuten oder chronisch-ischämischen Kardiomyopathie die hypertensive Herzerkrankung als Folge eines langjährigen arteriellen Hypertonus. Pathophysiologisch liegt dieser strukturellen Herzerkrankung meist eine Myokardhypertrophie zu Grunde. Von besonderer Bedeutung bei der Ausbildung der diastolischen sowie systolischen Dysfunktion auf Grund einer Myokardhypertrophie sind Störungen der kardiomyozytären Ca²⁺-Homöostase. Hierbei steht vor allem ein reduzierter SERCA2a-katalysierter Ca2+-Transport aus dem kardiomyozytären Zytoplasma ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) im Vordergrund. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es daher die Einflüsse einer primär verbesserten Ausstattung des sarkoplasmatischen Retikulums mit SERCA2a-Ca2+-ATPasen durch zusätzliche Expression eines SERCA2a-Transgens auf den kardialen Phänotyp eines Hypertonie-induzierten Kardiomyopathie-Rattenmodells zu untersuchen. Als experimentelles Modell wurde dazu aus hypertensiven mRen2-transgenen (Ren2) und normotensiven SERCA2a-transgenen Tieren, deren primärer Phänotyp jeweils bekannt ist, ein neues doppeltransgenes mRen2/SERCA2a-Tiermodell (SERen) generiert. Die ausgewählten Untersuchungen des kardialen Phänotyps dieses doppelt-transgenen SERen-Rattenmodells sollten klären, ob sich durch zusätzliche Expression eines SERCA2-Transgens im Herzen hypertensiver transgener Ren2-Tiere, die Ausbildung einer linksventrikulären Hypertrophie verhindern und eine defizitäre SERCA2a-katalysierte Ca2+-Transportaktivität des SR verbessern lässt sowie dadurch verschiedene linksventrikuläre Funktionsparameter günstig beeinflusst werden können.

Die 30 Wochen alten SERen Tiere zeigten einen zum Wildtyp (WT) signifikant erhöhten systolischen Blutdruck (SERen 170±6 mmHg, Ren2 174±7 mmHg, p<0,05 vs. WT) und eine 31%-ige Massenzunahme des linken Ventrikels, welche sich nicht signifikant vom Ren2-Tier unterschied (SERen 2,68 mgLV/gKG, Ren2 2,72 mgLV/gKG, p<0,05 vs.WT). Die normierte maximale linksventrikuläre Druckentwicklung der doppelt-transgenen SERen-Tiere ist gegenüber dem WT um 29% reduziert, jedoch nicht vom Ren2-Tier verschieden (SERen 104mmHg/gLV, Ren2 108mmHg/gLV, p<0,05 vs. WT). Unter ß-adrenerger Stimulation mit Dobutamin zeigte sich bei SERen-Ratten eine verminderte Ansprechbarkeit einiger linksventrikulärer Funktionsparameter im Vergleich zum Wildtyp und Ren2-Tieren (Zuwachs +dP/dt_{max}/LVdP unter Dobutamin –

SERen 1,2-fach, Ren2 1,6-fach, WT 2,3-fach, p<0,05 vs. WT &Ren2). Die diastolische Dysfunktion von SERen Tieren ist neben einer massiven Erhöhung des LVEDP (SERen 14,9 mmHg, Ren2 7mmHg, WT 4mmHg, p<0,05 vs. WT & Ren2) durch Reduktion der normierten maximalen diastolischen Druckabfallsgeschwindigkeit um 29% (p<0,05 vs. WT) sowie einer bei SERenTieren um 34%verlängerten Zeitkonstante der späten diastolischen Relaxation π (p<0,05 vs. WT) charakterisiert. Entsprechend diesen Funktionsparametern ließ sich auch ein um ca. 32% reduzierter SERCA2a-katalysierter vesikulärer Ca²⁺-Transport in SERen Tieren gegenüber nichttransgenen Tieren messen (Ren2 -15%, p>0,05 vs. NTG)

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine zusätzliche Expression des SER-CA2a-Transgens in mRen2-transgenen hypertensiven Tieren nicht vor der Entwicklung einer systolischen oder diastolischen linksventrikulären Dysfunktion schützt, sondern die diastolischen Funktionsstörungen noch zu verstärken scheint. Dies begründet sich am ehesten durch eine unzureichende Steigerung des sarkoplasmatischen Ca²⁺-Transports durch Implementierung des SERCA2a-Transgens in mRen2-transgenen Tieren.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Castrop H, Hocherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev* 2010 April;90(2):607-73.
- (2) Statistisches Bundesamt Deutschland. Sterbefälle insgesamt 2008 nach den 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. Stand Januar 2009.
- (3) Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MC et al. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 2004 September;25(18):1614-9.
- (4) Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev* 2000 June;5(2):167-73.
- (5) Krum H, Abraham WT. Heart failure. Lancet 2009 March 14;373(9667):941-55.
- (6) Hunt SA. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). J Am Coll Cardiol 2005 September 20;46(6):e1-82.
- (7) van Jaarsveld CH, Ranchor AV, Kempen GI, Coyne JC, van Veldhuisen DJ, Sanderman R. Epidemiology of heart failure in a community-based study of subjects aged > or = 57 years: incidence and long-term survival. *Eur J Heart Fail* 2006 January;8(1):23-30.
- (8) Calvin AD, Albuquerque FN, Adachi T, Somers VK. Obstructive sleep apnea and heart failure. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2009 December;11(6):447-54.
- (9) Wexler RK, Elton T, Pleister A, Feldman D. Cardiomyopathy: an overview. *Am Fam Physician* 2009 May 1;79(9):778-84.
- (10) Flesch M, Schiffer F, Zolk O et al. Contractile systolic and diastolic dysfunction in renin-induced hypertensive cardiomyopathy. *Hypertension* 1997 September;30(3 Pt 1):383-91.
- (11) Lee MA, Bohm M, Paul M, Bader M, Ganten U, Ganten D. Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)27. *Am J Physiol* 1996 June;270(6 Pt 1):E919-E929.
- (12) Brosnan MJ, Devlin AM, Clark JS, Mullins JJ, Dominiczak AF. Different effects of antihypertensive agents on cardiac and vascular hypertrophy in the transgenic rat line TGR(mRen2)27. *Am J Hypertens* 1999 July;12(7):724-31.
- (13) Bers DM. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 2006 December;21:380-7.
- (14) MacLennan DH. Ca2+ signalling and muscle disease. *Eur J Biochem* 2000 September;267(17):5291-7.

- (15) Hardwick JC, Baran CN, Southerland EM, Ardell JL. Remodeling of the guinea pig intrinsic cardiac plexus with chronic pressure overload. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009 September;297(3):R859-R866.
- (16) Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. J Mol Cell Cardiol 2002 August;34(8):951-69.
- (17) Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM, Soler-Soler J. Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na(+) through gap junctions. *Circ Res* 1999 August 6;85(3):280-7.
- (18) Zhang Z, Xu Y, Song H et al. Functional Roles of Ca(v)1.3 (alpha(1D)) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ Res* 2002 May 17;90(9):981-7.
- (19) Han DY, Minobe E, Wang WY et al. Calmodulin- and ca(2+)-dependent facilitation and inactivation of the ca(v)1.2 ca(2+) channels in Guinea-pig ventricular myocytes. J Pharmacol Sci 2010 March 19;112(3):310-9.
- (20) Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002 January 10;415(6868):198-205.
- (21) Jorgensen AO, Broderick R, Somlyo AP, Somlyo AV. Two structurally distinct calcium storage sites in rat cardiac sarcoplasmic reticulum: an electron microprobe analysis study. *Circ Res* 1988 December;63(6):1060-9.
- (22) Soeller C, Crossman D, Gilbert R, Cannell MB. Analysis of ryanodine receptor clusters in rat and human cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 September 18;104(38):14958-63.
- (23) Laver DR. Ca2+ stores regulate ryanodine receptor Ca2+ release channels via luminal and cytosolic Ca2+ sites. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007 September;34(9):889-96.
- (24) Gyorke S, Terentyev D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res* 2008 January 15;77(2):245-55.
- (25) Knollmann BC. New roles of calsequestrin and triadin in cardiac muscle. J Physiol 2009 July 1;587(Pt 13):3081-7.
- (26) Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. Annu Rev Physiol 2008;70:23-49.
- (27) Stern MD, Cheng H. Putting out the fire: what terminates calcium-induced calcium release in cardiac muscle? *Cell Calcium* 2004 June;35(6):591-601.
- (28) Endoh M. Cardiac Ca2+ signaling and Ca2+ sensitizers. *Circ J* 2008 December;72(12):1915-25.
- (29) Apell HJ. How do P-type ATPases transport ions? *Bioelectrochemistry* 2004 June;63(1-2):149-56.
- (30) Brini M, Carafoli E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* 2009 October;89(4):1341-78.

- (31) Zarain-Herzberg A, varez-Fernandez G. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+-ATPase-2 gene: structure and transcriptional regulation of the human gene. *ScientificWorldJournal* 2002 May 29;2:1469-83.
- (32) Hilfiker H, Guerini D, Carafoli E. Cloning and expression of isoform 2 of the human plasma membrane Ca2+ ATPase. Functional properties of the enzyme and its splicing products. *J Biol Chem* 1994 October 21;269(42):26178-83.
- (33) Gelebart P, Martin V, Enouf J, Papp B. Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 April 4;303(2):676-84.
- (34) Dally S, Bredoux R, Corvazier E et al. Ca2+-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase 2 isoform (SERCA2c). *Biochem J* 2006 April 15;395(2):249-58.
- (35) MacLennan DH, bu-Abed M, Kang C. Structure-function relationships in Ca(2+) cycling proteins. *J Mol Cell Cardiol* 2002 August;34(8):897-918.
- (36) Zador E, Vangheluwe P, Wuytack F. The expression of the neonatal sarcoplasmic reticulum Ca2+ pump (SERCA1b) hints to a role in muscle growth and development. *Cell Calcium* 2007 April;41(4):379-88.
- (37) Kimura T, Nakamori M, Lueck JD et al. Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2005 August 1;14(15):2189-200.
- (38) Peters DG, Mitchell HL, McCune SA, Park S, Williams JH, Kandarian SC. Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gene expression in congestive heart failure. *Circ Res* 1997 November;81(5):703-10.
- (39) Kovacs T, Felfoldi F, Papp B et al. All three splice variants of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase 3 gene are translated to proteins: a study of their co-expression in platelets and lymphoid cells. *Biochem J* 2001 September 15;358(Pt 3):559-68.
- (40) Gomez AM, Valdivia HH, Cheng H et al. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science* 1997 May 2;276(5313):800-6.
- (41) Toyoshima C. Structural aspects of ion pumping by Ca2+-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 2008 August 1;476(1):3-11.
- (42) Misquitta CM, Chen T, Grover AK. Control of protein expression through mRNA stability in calcium signalling. *Cell Calcium* 2006 October;40(4):329-46.
- (43) Zarain-Herzberg A. Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase expression in the hypertrophic and failing heart. *Can J Physiol Pharmacol* 2006 May;84(5):509-21.
- (44) Andersson KB, Birkeland JA, Finsen AV et al. Moderate heart dysfunction in mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the Serca2 gene. J Mol Cell Cardiol 2009 August;47(2):180-7.
- (45) Bhupathy P, Babu GJ, Periasamy M. Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase. *J Mol Cell Cardiol* 2007 May;42(5):903-11.

- (46) Toyoshima C, Asahi M, Sugita Y, Khanna R, Tsuda T, MacLennan DH. Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca2+ ATPase. *Proc Natl Acad Sci* U S A 2003 January 21;100(2):467-72.
- (47) Munch G, Rosport K, Bultmann A et al. Cardiac overexpression of the norepinephrine transporter uptake-1 results in marked improvement of heart failure. *Circ Res* 2005 October 28;97(9):928-36.
- (48) Chaudhri B, del MF, Hajjar RJ, Harding SE. Interaction between increased SERCA2a activity and beta -adrenoceptor stimulation in adult rabbit myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 December;283(6):H2450-H2457.
- (49) Tada M, Ohmori F, Nimura Y, Abe H. Effect of myocardial protein kinase modulator on adenosine 3': 5'-monophosphate-dependent protein kinase-induced stimulation of calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum. J Biochem 1977 September;82(3):885-92.
- (50) Hagemann D, Xiao RP. Dual site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 2002 February;12(2):51-6.
- (51) Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res* 2005 December 1;68(3):366-75.
- (52) MacDougall LK, Jones LR, Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 1991 March 28;196(3):725-34.
- (53) Vandecaetsbeek I, Raeymaekers L, Wuytack F, Vangheluwe P. Factors controlling the activity of the SERCA2a pump in the normal and failing heart. *Biofactors* 2009 November;35(6):484-99.
- (54) Seixas-Cambao M, Leite-Moreira AF. Pathophysiology of chronic heart failure. *Rev Port Cardiol* 2009 April;28(4):439-71.
- (55) Wehrens XH, Marks AR. Molecular determinants of altered contractility in heart failure. *Ann Med* 2004;36 Suppl 1:70-80.
- (56) Lindner M, Erdmann E, Beuckelmann DJ. Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. J Mol Cell Cardiol 1998 April;30(4):743-9.
- (57) Lindner M, Bohle T, Beuckelmann DJ. Ca2+-handling in heart failure--a review focusing on Ca2+ sparks. *Basic Res Cardiol* 2002;97 Suppl 1:I79-I82.
- (58) Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM. Upregulation of Na(+)/Ca(2+) exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Cirr Res* 1999 November 26;85(11):1009-19.
- (59) Wei SK, Ruknudin A, Hanlon SU, McCurley JM, Schulze DH, Haigney MC. Protein kinase A hyperphosphorylation increases basal current but decreases beta-adrenergic responsiveness of the sarcolemmal Na+-Ca2+ exchanger in failing pig myocytes. *Circ Res* 2003 May 2;92(8):897-903.

- (60) Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 2004 February 1;61(2):208-17.
- (61) Maier LS. CaMKIIdelta overexpression in hypertrophy and heart failure: cellular consequences for excitation-contraction coupling. *Braz J Med Biol Res* 2005 September;38(9):1293-302.
- (62) Yano M, Yamamoto T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Abnormal ryanodine receptor function in heart failure. *Pharmacol Ther* 2005 September;107(3):377-91.
- (63) Bokenes J, Aronsen JM, Birkeland JA et al. Slow contractions characterize failing rat hearts. *Basic Res Cardiol* 2008 July;103(4):328-44.
- (64) Wang Y, Cheng J, Joyner RW, Wagner MB, Hill JA. Remodeling of early-phase repolarization: a mechanism of abnormal impulse conduction in heart failure. *Circulation* 2006 April 18;113(15):1849-56.
- (65) Leite-Moreira AF, Correia-Pinto J, Gillebert TC. Afterload induced changes in myocardial relaxation: a mechanism for diastolic dysfunction. *Cardiovasc Res* 1999 August 1;43(2):344-53.
- (66) de la BD, Levitsky D, Rappaport L et al. Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca2(+)-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* 1990 February;66(2):554-64.
- (67) Mishra S, Gupta RC, Tiwari N, Sharov VG, Sabbah HN. Molecular mechanisms of reduced sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake in human failing left ventricular myocardium. *J Heart Lung Transplant* 2002 March;21(3):366-73.
- (68) Zolk O, Flesch M, Nickenig G, Schnabel P, Bohm M. Alteration of intracellular Ca2(+)-handling and receptor regulation in hypertensive cardiac hypertrophy: insights from Ren2-transgenic rats. *Cardiovasc Res* 1998 July;39(1):242-56.
- (69) Koss KL, Grupp IL, Kranias EG. The relative phospholamban and SERCA2 ratio: a critical determinant of myocardial contractility. *Basic Res Cardiol* 1997;92 Suppl 1:17-24.
- (70) Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR et al. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1997 January;29(1):265-72.
- (71) MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 July;4(7):566-77.
- (72) Ramani GV, Uber PA, Mehra MR. Chronic heart failure: contemporary diagnosis and management. *Mayo Clin Proc* 2010 February;85(2):180-95.
- (73) Pogwizd SM, McKenzie JP, Cain ME. Mechanisms underlying spontaneous and induced ventricular arrhythmias in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1998 December 1;98(22):2404-14.
- (74) Pogwizd SM, Bers DM. Calcium cycling in heart failure: the arrhythmia connection. J Cardiovasc Electrophysiol 2002 January;13(1):88-91.

- (75) Eisner DA, Kashimura T, Venetucci LA, Trafford AW. From the ryanodine receptor to cardiac arrhythmias. *Circ J* 2009 September;73(9):1561-7.
- (76) Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* 2001 June 8;88(11):1159-67.
- (77) Tomaselli GF, Beuckelmann DJ, Calkins HG et al. Sudden cardiac death in heart failure. The role of abnormal repolarization. *Circulation* 1994 November;90(5):2534-9.
- (78) Tomaselli GF, Rose J. Molecular aspects of arrhythmias associated with cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol* 2000 May;15(3):202-8.
- (79) Nuss HB, Kaab S, Kass DA, Tomaselli GF, Marban E. Cellular basis of ventricular arrhythmias and abnormal automaticity in heart failure. *Am J Physiol* 1999 July;277(1 Pt 2):H80-H91.
- (80) Yamada M, Ohta K, Niwa A, Tsujino N, Nakada T, Hirose M. Contribution of L-type Ca2+ channels to early afterdepolarizations induced by I Kr and I Ks channel suppression in guinea pig ventricular myocytes. J Membr Biol 2008 April;222(3):151-66.
- (81) Catanzaro DF. Physiological relevance of renin/prorenin binding and uptake. *Hypertens* Res 2005 February;28(2):97-105.
- (82) Nguyen G, Muller DN. The biology of the (pro)renin receptor. J Am Soc Nephrol 2010 January;21(1):18-23.
- (83) Saris JJ, Derkx FH, De Bruin RJ et al. High-affinity prorenin binding to cardiac man-6-P/IGF-II receptors precedes proteolytic activation to renin. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001 April;280(4):H1706-H1715.
- (84) Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzhir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. J Clin Invest 2002 June;109(11):1417-27.
- (85) Peters J, Schluter T, Riegel T et al. Lack of cardiac fibrosis in a new model of high prorenin hyperaldosteronism. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009 November;297(5):H1845-H1852.
- (86) Schmitz C, Gotthardt M, Hinderlich S et al. Normal blood pressure and plasma renin activity in mice lacking the renin-binding protein, a cellular renin inhibitor. *J Biol Chem* 2000 May 19;275(20):15357-62.
- (87) Deschepper CF. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney Int* 1994 December;46(6):1561-3.
- (88) Urata H, Nishimura H, Ganten D. Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. Am J Hypertens 1996 March;9(3):277-84.
- (89) Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 January;292(1):C82-C97.

- (90) Siragy HM. Comparing angiotensin II receptor blockers on benefits beyond blood pressure. *Adv Ther* 2010 May;27(5):257-84.
- (91) Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW. Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. J Biol Chem 1998 July 31;273(31):19772-7.
- (92) bdAlla S, Lother H, bdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 2001 October 26;276(43):39721-6.
- (93) Bedecs K, Elbaz N, Sutren M et al. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J* 1997 July 15;325 (Pt 2):449-54.
- (94) Landon EJ, Inagami T. Beyond the G protein: the saga of the type 2 angiotensin II receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 January;25(1):15-6.
- (95) Haulica I, Bild W, Serban DN. Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 2005 December;6(3):121-31.
- (96) Danilczyk U, Eriksson U, Oudit GY, Penninger JM. Physiological roles of angiotensinconverting enzyme 2. *Cell Mol Life Sci* 2004 November;61(21):2714-9.
- (97) Tallant EA, Lu X, Weiss RB, Chappell MC, Ferrario CM. Bovine aortic endothelial cells contain an angiotensin-(1-7) receptor. *Hypertension* 1997 January;29(1 Pt 2):388-93.
- (98) Giani JF, Gironacci MM, Munoz MC, Pena C, Turyn D, Dominici FP. Angiotensin-(1 7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 August;293(2):H1154-H1163.
- (99) Paul M, Poyan MA, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006 July;86(3):747-803.
- (100) Pinto YM, Buikema H, van Gilst WH et al. Cardiovascular end-organ damage in Ren-2 transgenic rats compared to spontaneously hypertensive rats. J Mol Med (Berl) 1997 May;75(5):371-7.
- (101) Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol* 1999 June 17;83(12A):53H-7H.
- (102) Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 August;7(8):589-600.
- (103) Berry JM, Le V, Rotter D et al. Reversibility of adverse, calcineurin-dependent cardiac remodeling. *Circ Res* 2011 August 5;109(4):407-17.
- (104) Zhao M, Fajardo GA, Urashima T et al. Cardiac Pressure Overload Hypertrophy is Differentially Regulated by {beta}-Adrenergic Receptors. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011 June 24.
- (105) Rohini A, Agrawal N, Koyani CN, Singh R. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res* 2009 December 5.

- (106) Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990 April 5;344(6266):541-4.
- (107) Langheinrich M, Lee MA, Bohm M, Pinto YM, Ganten D, Paul M. The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR (mREN2)27 in hypertension research. Characteristics and functional aspects. *Am J Hypertens* 1996 May;9(5):506-12.
- (108) Zolk O, Flesch M, Schnabel P et al. Effects of quinapril, losartan and hydralazine on cardiac hypertrophy and beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in transgenic (mREN2)27 rats. *Br J Pharmacol* 1998 February;123(3):405-12.
- (109) Tokita Y, Franco-Saenz R, Mulrow PJ, Ganten D. Effects of nephrectomy and adrenalectomy on the renin-angiotensin system of transgenic rats TGR(mRen2)27. *Endocrinology* 1994 January;134(1):253-7.
- (110) Bader M, Zhao Y, Sander M et al. Role of tissue renin in the pathophysiology of hypertension in TGR(mREN2)27 rats. *Hypertension* 1992 June;19(6 Pt 2):681-6.
- (111) Peters J, Hilgers KF, Maser-Gluth C, Kreutz R. Role of the circulating reninangiotensin system in the pathogenesis of hypertension in transgenic rats. TGR(mREN2)27. *Clin Exp Hypertens* 1996 October;18(7):933-48.
- (112) Flesch M, Schiffer F, Zolk O et al. Angiotensin receptor antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition improve diastolic dysfunction and Ca(2+)-ATPase expression in the sarcoplasmic reticulum in hypertensive cardiomyopathy. *J Hypertens* 1997 September;15(9):1001-9.
- (113) Vetter R, Rehfeld U, Reissfelder C et al. Transgenic overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca2+ATPase improves reticular Ca2+ handling in normal and diabetic rat hearts. *FASEB J* 2002 October;16(12):1657-9.
- (114) LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 November;193(1):265-75.
- (115) Mackiewicz U, Lewartowski B. The effect of sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak on contractile activity of guinea pig heart myocytes depends in activity of sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase and Na+/Ca2+ exchanger. J Physiol Pharmacol 2008 June;59(2):287-300.
- (116) Piacentino V, III, Weber CR, Chen X et al. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ* Res 2003 April 4;92(6):651-8.
- (117) Mullins JJ, Sigmund CD, Kane-Haas C, Gross KW, McGowan RA. Expression of the DBA/2J Ren-2 gene in the adrenal gland of transgenic mice. *EMBO J* 1989 December 20;8(13):4065-72.
- (118) Oliver WJ, Gross F. Unique specificity of mouse angiotensinogen to homologous renin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966 July;122(3):923-6.
- (119) Fabian JR, Field LJ, McGowan RA, Mullins JJ, Sigmund CD, Gross KW. Allele-specific expression of the murine Ren-1 genes. *J Biol Chem* 1989 October 15;264(29):17589-94.

- (120) Reiz S, Balfors E, Friedman A, Haggmark S, Peter T. Effects of thiopentone on cardiac performance, coronary hemodynamics and myocardial oxygen consumption in chronic ischemic heart disease. *Acta Anaesthesiol Scand* 1981 April;25(2):103-10.
- (121) Peters J, Munter K, Bader M, Hackenthal E, Mullins JJ, Ganten D. Increased adrenal renin in transgenic hypertensive rats, TGR(mREN2)27, and its regulation by cAMP, angiotensin II, and calcium. *J Clin Invest* 1993 March;91(3):742-7.
- (122) Rong P, Campbell DJ, Skinner SL. Hypertension in the (mRen-2)27 rat is not explained by enhanced kinetics of transgenic Ren-2 renin. *Hypertension* 2003 October;42(4):523-7.
- (123) Admiraal PJ, van Kesteren CA, Danser AH, Derkx FH, Sluiter W, Schalekamp MA. Uptake and proteolytic activation of prorenin by cultured human endothelial cells. J Hypertens 1999 May;17(5):621-9.
- (124) Schulman IH, Zhou MS, Raij L. Nitric oxide, angiotensin II, and reactive oxygen species in hypertension and atherogenesis. *Curr Hypertens Rep* 2005 February;7(1):61-7.
- (125) Day MD, Owen DA. The interaction between angiotensin and sympathetically-induced vasoconstriction in the isolated perfused central ear artery of the rabbit. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol* 1968;259(2):164-5.
- (126) Kushiku K, Yamada H, Shibata K, Tokunaga R, Katsuragi T, Furukawa T. Upregulation of immunoreactive angiotensin II release and angiotensinogen mRNA expression by high-frequency preganglionic stimulation at the canine cardiac sympathetic ganglia. *Circ Res* 2001 January 19;88(1):110-6.
- (127) Priviero FB, Teixeira CE, Toque HA et al. Vasorelaxing effects of propranolol in rat aorta and mesenteric artery: a role for nitric oxide and calcium entry blockade. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006 May;33(5-6):448-55.
- (128) Goldbarg SH, Elmariah S, Miller MA, Fuster V. Insights into degenerative aortic valve disease. J Am Coll Cardiol 2007 September 25;50(13):1205-13.
- (129) Chamiot-Clerc P, Renaud JF, Safar ME. Pulse pressure, aortic reactivity, and endothelium dysfunction in old hypertensive rats. *Hypertension* 2001 February;37(2):313-21.
- (130) Struijker-Boudier HA, van EH, Fazzi G, De Mey JG, Qiu HY, Levy BI. Disproportional arterial hypertrophy in hypertensive mRen-2 transgenic rats. *Hypertension* 1996 November;28(5):779-84.
- (131) Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. J Clin Invest 1990 December;86(6):1913-20.
- (132) 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 October;67(4):787-94.
- (133) Rothermund L, Pinto YM, Vetter R et al. Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum Ca2+ handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene. *J Hypertens* 2001 August;19(8):1465-72.

- (134) Saris JJ, van den Eijnden MM, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA, Danser AH. Prorenin-induced myocyte proliferation: no role for intracellular angiotensin II. *Hypertension* 2002 February;39(2 Pt 2):573-7.
- (135) Nguyen G. The (pro)renin receptor in health and disease. Ann Med 2010;42(1):13-8.
- (136) Billet S, Aguilar F, Baudry C, Clauser E. Role of angiotensin II AT1 receptor activation in cardiovascular diseases. *Kidney Int* 2008 December;74(11):1379-84.
- (137) Bishop JE, Kiernan LA, Montgomery HE, Gohlke P, McEwan JR. Raised blood pressure, not renin-angiotensin systems, causes cardiac fibrosis in TGR m(Ren2)27 rats. *Cardiovasc* Res 2000 July;47(1):57-67.
- (138) Regitz-Zagrosek V, Brokat S, Tschope C. Role of gender in heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Prog Cardiovasc Dis* 2007 January;49(4):241-51.
- (139) Baltatu O, Cayla C, Iliescu R, Andreev D, Jordan C, Bader M. Abolition of hypertension-induced end-organ damage by androgen receptor blockade in transgenic rats harboring the mouse ren-2 gene. J Am Soc Nephrol 2002 November;13(11):2681-7.
- (140) Witt H, Schubert C, Jaekel J et al. Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. *J Mol Med* 2008 September;86(9):1013-24.
- (141) Weinberg EO, Thienelt CD, Katz SE et al. Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 1999 July;34(1):264-73.
- (142) Kranias EG, Bers DM. Calcium and cardiomyopathies. Subcell Biochem 2007;45:523-37.
- (143) He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R et al. Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest* 1997 July 15;100(2):380-9.
- (144) Baker DL, Hashimoto K, Grupp IL et al. Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts. *Circ Res* 1998 December 14;83(12):1205-14.
- (145) Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 1992 March;85(3):1046-55.
- (146) Muller OJ, Lange M, Rattunde H et al. Transgenic rat hearts overexpressing SERCA2a show improved contractility under baseline conditions and pressure overload. *Cardiovasc Res* 2003 August 1;59(2):380-9.
- (147) Bohm M, Flesch M, Schnabel P. Beta-adrenergic signal transduction in the failing and hypertrophied myocardium. *J Mol Med* 1997 November;75(11-12):842-8.
- (148) Waagstein F. Beta blockers in heart failure. Cardiology 1993;82 Suppl 3:13-8.
- (149) Vangheluwe P, Tjwa M, Van Den BA et al. A SERCA2 pump with an increased Ca2+ affinity can lead to severe cardiac hypertrophy, stress intolerance and reduced life span. J Mol Cell Cardiol 2006 August;41(2):308-17.

- (150) Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. Int J Biochem Cell Biol 2008;40(10):2023-39.
- (151) Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak in heart failure. *Circ Res* 2005 December 9;97(12):1314-22.
- (152) Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 2000 May 12;101(4):365-76.
- (153) Maier LS. Role of CaMKII for signaling and regulation in the heart. Front Biosci 2009;14:486-96.
- (154) Volpe P, Salviati G, Chu A. Calcium-gated calcium channels in sarcoplasmic reticulum of rabbit skinned skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol* 1986 February;87(2):289-303.
- (155) Hinata M, Yamamura H, Li L et al. Stoichiometry of Na+-Ca2+ exchange is 3:1 in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 2002 December 1;545(Pt 2):453-61.
- (156) Weber CR, Piacentino V, III, Houser SR, Bers DM. Dynamic regulation of sodium/calcium exchange function in human heart failure. *Circulation* 2003 November 4;108(18):2224-9.
- (157) Zhang YH, Hancox JC. Regulation of cardiac Na+-Ca2+ exchanger activity by protein kinase phosphorylation--still a paradox? *Cell Calcium* 2009 January;45(1):1-10.
- (158) Schillinger W, Janssen PM, Emami S et al. Impaired contractile performance of cultured rabbit ventricular myocytes after adenoviral gene transfer of Na(+)-Ca(2+) exchanger. *Circ* Res 2000 September 29;87(7):581-7.
- (159) Armoundas AA, Hobai IA, Tomaselli GF, Winslow RL, O'Rourke B. Role of sodiumcalcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts. *Circ Res* 2003 July 11;93(1):46-53.
- (160) Isenberg G. How can overexpression of Na(+),Ca(2+)-exchanger compensate the negative inotropic effects of downregulated SERCA? *Cardiovasc Res* 2001 January;49(1):1-6.
- (161) Gillebert TC, Brutsaert DL. Regulation of left ventricular pressure fall. *Eur Heart J* 1990 December;11 Suppl I:124-32.
- (162) Correia-Pinto J, Henriques-Coelho T, Oliveira SM, Leite-Moreira A. Determinants of afterload-induced diastolic dysfunction. *Rev Port Cardiol* 2002 October;21(10):1155-63.
- (163) Zhang T, Guo T, Mishra S et al. Phospholamban ablation rescues sarcoplasmic reticulum Ca(2+) handling but exacerbates cardiac dysfunction in CaMKIIdelta(C) transgenic mice. *Circ Res* 2010 February 5;106(2):354-62.
- (164) Hornby L, Hamilton N, Marshall D, Salerno TA, Laughlin MH, Ianuzzo CD. Role of cardiac work in regulating myocardial biochemical characteristics. *Am J Physiol* 1990 May;258(5 Pt 2):H1482-H1490.

- (165) Gaughan JP, Furukawa S, Jeevanandam V et al. Sodium/calcium exchange contributes to contraction and relaxation in failed human ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1999 August;277(2 Pt 2):H714-H724.
- (166) Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc* Res 1998 July;39(1):60-76.
- (167) Erdmann E. The management of heart failure--an overview. *Basic Res Cardiol* 2000;95 Suppl 1:I3-I7.
- (168) Davia K, Bernobich E, Ranu HK et al. SERCA2A overexpression decreases the incidence of aftercontractions in adult rabbit ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2001 May;33(5):1005-15.
- (169) Chen Y, Escoubet B, Prunier F et al. Constitutive cardiac overexpression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase delays myocardial failure after myocardial infarction in rats at a cost of increased acute arrhythmias. *Circulation* 2004 April 20;109(15):1898-903.
- (170) Eisner DA, Kashimura T, O'Neill SC, Venetucci LA, Trafford AW. What role does modulation of the ryanodine receptor play in cardiac inotropy and arrhythmogenesis? J Mol Cell Cardiol 2009 April;46(4):474-81.
7. Anlagen

7.1. Danksagung

Nachfolgend möchte ich all jenen danken, die mich auf dem nunmehr langen Weg der Entstehung dieser Dissertationsschrift begleitet und unterstützt haben:

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Roland Vetter für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und seine Betreuung danken. Durch seine langjährige Erfahrung und fachliche Kompetenz ist es gelungen diese experimentelle Arbeit voranzutreiben.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank dem begleitenden Doktoranden Michael Kluge für die inspirierende Zusammenarbeit sowie Motivation aus welcher auch eine feste Freundschaft im Privaten entstanden ist.

Mein Dank gilt auch den technischen Assistenten/-innen Frau Ursula Jacob-Müller Herrn Norbert Hinz, dem ehemaligen Mitglied der Arbeitsgruppe Dr. med. Wolfgang Weiß, sowie den Tierpflegern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie in Berlin Dahlem für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor sowie die Vermittlung verschiedener Methoden und Techniken.

Meiner Frau Julia und der guten Freundin Cecile möchte ich ebenfalls für ihre Geduld, Motivation und Hilfe bei der Entstehung dieser Promotion herzlichst danken.

7.2. Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Sebastian Trinks, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Untersuchungen zur kardialen Funktion eines mRen2/SERCA2a doppelt-transgenen Hypertoniemodells", 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.

Dresden, den 17.01.2013

Sebastian Trinks

7.3. Curriculum vitae

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

7.4. Veröffentlichungen

Poster

Sebastian Trinks*, Michael Kluge, Jaime-Jürgen Eulert-Grehn, Julia Hütter, Reinhold Kreutz, Martin Paul, Roland Vetter Lack of functional benefit of SERCA2a overexpression in hypertrophied hearts of rats with renin-dependent hypertension *Hypertension Berlin 2008*. June 14 - 19, *2008*.

*Posterpresenter