

## 2. Grundlagen

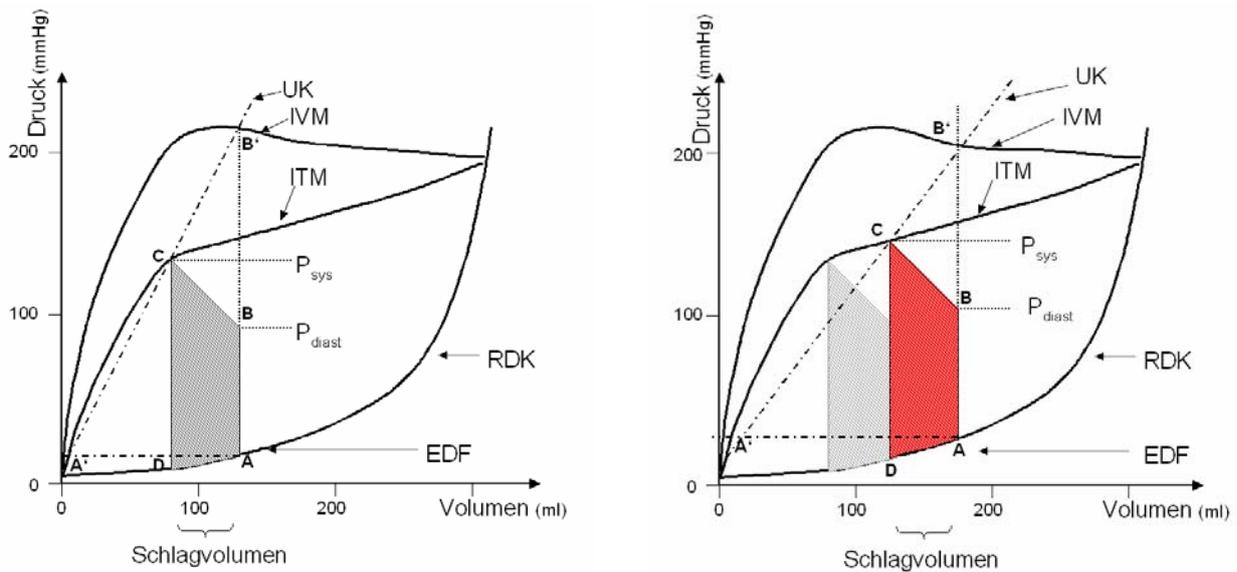
### 2.1. *Formen der Insuffizienz des Herzens*

Grundsätzlich lassen sich bei einer Herzinsuffizienz zwei Formen von Funktionsstörungen unterscheiden. Bei der ersten Form handelt es sich um eine systolische Einschränkung der Pumpfunktion (systolische Dysfunktion), bei der zweiten um eine diastolische Einschränkung der Dehnbarkeit der Ventrikelwand (diastolische Dysfunktion). Bei systolischer Dysfunktion kommt es durch eine Verminderung des Schlagvolumens, bei gleichem oder nur geringgradig verringertem Füllungsvolumen und bei unveränderter Kammerdehnbarkeit zu einem Anstieg von enddiastolischem Volumen und Druck.

Eine diastolische Dysfunktion liegt vor, wenn bei normalem enddiastolischem Volumen und erhöhtem Füllungsdruck die Auswurffraktion normal sowie das Schlagvolumen normal oder erniedrigt ist. Es besteht somit eine erhöhte diastolische Druck-Volumen-Relation. Als Ausdruck einer erniedrigten Dehnbarkeit des linken Ventrikels (20;76;120) ist die diastolische Druck-Volumen-Kurve dadurch nach oben verschoben (121).

Anfangs kann das Herz die erhöhte Druckbelastung noch über den Frank-Starling-Mechanismus kompensieren. Ihm liegt zu Grunde, dass es bei einer verstärkten Dehnung der Herzmuskelfaser zu einer Zunahme der Kontraktionskraft kommt (161). Bei längerfristiger gleichbleibend hoher Belastung, wie es bei der Herzinsuffizienz der Fall ist, nehmen die Dehnbarkeit des Herzmuskels und die maximale isometrische Kontraktionskraft jedoch ab. Die Volumenzunahme während der Kammerfüllung kann somit nur unter erheblichem Druckanstieg im Ventrikel erreicht werden. Bei der chronischen Herzinsuffizienz sind am Arbeitspunkt das enddiastolische Ventrikelvolumen und der enddiastolische Ventrikeldruck deutlich erhöht (105). Bei schwerstgradiger Herzinsuffizienz kann das Schlagvolumen daher nicht mehr zunehmen (s. **Abb. 2.1**).

Durch einen übermäßig erhöhten linksventrikulären Füllungsdruck werden Symptome einer pulmonalen Stauung verursacht (Dyspnoe). Durch das damit veränderte enddiastolische Volumen kann es zu einem verminderten Schlagvolumen kommen. Symptome eines sogenannten Vorwärtsversagens wie z.B. eine schnellere Ermüdbarkeit sind die Folge. Obwohl das mit einer Verringerung der Kontraktilität einhergehende systolische Herzversagen die „klassische“ Form der chronischen Insuffizienz ist, ließ sich zeigen, dass bei bis zu 50 % der Patienten mit Herzinsuffizienz die diastolische Dysfunktion die wesentliche Veränderung ist (39;55;85;131;173).



**Abb. 2.1 Schematisches Arbeitsdiagramm eines isolierten Herzens.** Darstellung des Herzzyklus: Die Punkte A bis D stehen für zeitlich aufeinanderfolgende Phasen der Herzaktion. Vom Koordinatenpunkt A der Ruhe-Dehnungskurve aus beginnt der systolische isovolumetrische Druckanstieg. AB entspricht der isovolumetrischen Anspannungsphase. Beim Erreichen des diastolischen Aortendrucks B öffnen die Aortenklappen und die Austreibung beginnt unter weiterer Zunahme des Ventrikeldrucks. Bei C ist der Auswurf des Schlagvolumens beendet. Es beginnt die isovolumetrische Relaxation CD, an die sich nach dem Öffnen der Mitralklappe die Füllung DA für die nächste Herzaktion anschließt. In der zweiten Abbildung ist die Anpassung an eine akute Druckbelastung infolge einer Erhöhung des peripheren Strömungswiderstandes, bei gleichbleibenden Schlagvolumen, gezeigt.  $P_{\text{sys}}$  – systolischer Aortendruck,  $P_{\text{diast}}$  – diastolischer Aortendruck, RDK – Ruhedehnungskurve, EDF – enddiastolischer Füllungsdruck, UK – Unterstützungskurve, IVM – isovolumetrische Maxima, ITM – isotonische Maxima

Da sich die Therapie einer diastolischen Herzinsuffizienz wesentlich von der einer systolischen unterscheidet, ist die diagnostische Differenzierung von großer therapeutischer Bedeutung. Hauptursachen der diastolischen Dysfunktion sind die linksventrikuläre Hypertrophie, zumeist Folge einer arteriellen Hypertonie, und die Myokardischämie auf dem Boden einer koronaren Herzkrankheit. Des Weiteren findet man diastolische Dysfunktion bei Aortenstenose, primärer oder sekundärer Kardiomyopathie, konstruktiver Perikarditis, Mitralklappenstenose und infiltrativer Kardiomyopathie (z.B. Amyloidose).

Pathophysiologisch liegt bei der diastolischen Dysfunktion eine normale (z.B. Mitralklappenstenose) und verminderte, muskulär bedingte linksventrikuläre Dehnbarkeit vor. Die Dehnbarkeit wird bestimmt von der aktiven, energieverbrauchenden Relaxation und der Compliance als Maß der passiven elastischen Eigenschaften. Die Geschwindigkeit und das Ausmaß der ventrikulären Relaxation werden von drei wesentlichen Einflussgrößen bestimmt:

- Rückstellkräfte („Restoring forces“): Je ausgeprägter die systolische Kontraktion des Ventrikels ist, um so rascher und vollständiger erfolgt die Relaxation. Die wesentlichen Determinanten der systolischen Kontraktion sind die linksventrikuläre Nachlast und

die Kontraktilität. Eine erhöhte Nachlast und eine verminderte Kontraktilität wirken sich daher negativ auf die linksventrikuläre Relaxation aus (30;67;120).

- Asynchronie: Die zeitlich und/oder räumlich nicht uniforme Inaktivierung der Herzaktion.
- Inaktivierung der Querbrückenverbindungen im Aktin-Myosin-Filament. Durch die cAMP-abhängige Phosphorylierung von Troponin I wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der kontraktilen Proteine gemindert und so die Inaktivierung gefördert. Dieser Mechanismus trägt zur Beschleunigung der Relaxation bei Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration bei. Eine verlangsamte Inaktivierung hingegen, wie z.B. bei einer verzögerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme ins SR, verzögert die Relaxation. Sie wurde bei hypertropher Kardiomyopathie und -ischämie beobachtet (80;139). Bei der Relaxation in der Diastole muss die zytosolische  $[\text{Ca}^{2+}]$  um den Faktor  $10^3$  auf submikromolare Werte reduziert werden. Dies geschieht vorwiegend durch Rückbindung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  in das Lumen des SR, der zentralen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher- und Freisetzungsganelle der Herzmuskelzelle. Dieser Transportprozess wird durch die ATP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe des SR SERCA2a katalysiert, die unter regulatorischem Einfluss des Modulatorproteins PLB steht (132;172).

Die genannten Faktoren können zu einer verzögerten und/oder inkompletten Relaxation führen. Eine Abnahme der Relaxationsgeschwindigkeit ist insbesondere verantwortlich für die Verminderung der frühen diastolischen Füllung und somit für eine Steigerung des linksatrialen Füllungsdrucks (196). Die Compliance wird durch eine verminderte passive Elastizität aufgrund von Strukturänderungen der Matrix oder Verdickung des Myokards erniedrigt. Neben restriktiver und infiltrativer Kardiomyopathie (z.B. Amyloidose) und konstruktiver Perikarditis findet man eine erhöhte Compliance insbesondere bei einer Zunahme der Fibrose (77;184;200) der Ventrikelwand, bei der sowohl quantitative als auch qualitative Veränderungen der extrazellulären Matrix von Bedeutung sind (196).

## 2.2. *Tiermodelle für chronische Herzinsuffizienz*

### 2.2.1. **Hypertrophie-/Insuffizienzmodelle**

Seit 1962 haben verschiedene Arbeitsgruppen Tiermodelle zur Untersuchung der chronischen Herzinsuffizienz generiert. Um die menschliche Herzinsuffizienz so gut wie möglich zu imitieren, sollten entsprechende Tiermodelle:

- die menschliche Herzinsuffizienz so gut wie möglich nachahmen
- gleiche Ursachen der Herzinsuffizienz aufweisen
- Studien in einem chronischen stabilen Stadium der Herzinsuffizienz zulassen
- messbare relevante kardiovaskuläre, biochemische und hämodynamische Parameter haben
- voraussehbare und kontrollierbare Symptome entwickeln
- mit den Tierschutzrichtlinien vereinbar sein

**Tab 2.1: Ausgewählte Rattenmodelle für die Untersuchung der chronischen Herzinsuffizienz**

Ätiologie	Technik/Modell	Quellenangabe
Drucküberlast	Aortenstenose durch mikrochirurgische Einengung des Gefäßlumens ( A. ascendens, A. abdominalis)	Bruckschlegel et al., 1995 (29) Wiesner et al., 1997 (202) Feldmann et al., 1993 (62) Turcani et al., 1997 (189) Muders et al., 1995 (133) Qi M et al., 1997 (152)
Volumenüberlast	Aortocavale Fistel Anämie	Flaim et al., 1979 (64) Datta BN, 1975 (45)
Myokardischämie/ Myokardinfarkt	Ligatur der Koronarien Mikroembolisation	Pfeffer et al., 1979 (148) Medvedev et al., 1993 (127)
Toxische Einwirkungen	Adriamycin Amphetamine Katecholamine Ethanol	Wakasugi et al., 1993 (197) Kuhn et al., 1978 (112) Grimm et al., 1998 (74) Capasso et al., 1992 (34)
Myokarditis	Autoimmunisation Chagas-Krankheit	Koyama et al., 1995 (108) Junqueira et al., 1992 (93)
Bluthochdruck im kleinen Kreislauf	Hypoxie	Rabinovitch et al., 1979 (153)
Endokrine Störung	STZ- induzierter D.m. Hyperthyreose Hypothyreose	Fein et al., 1985 (59) Bartosova et al., 1969 (12) Brandau et al., 1971 (22)
Systemischer Bluthochdruck	Spontanhypertensive Ratte Dahl- Salzsensitive Ratte Hochdruck Herzinsuffiziente Ratten	Bing et al., 1991 (19) Dahl et al., 1962 (43) Park et al., 1997 (143)

Fortsetzung Tabelle 2.1

Ätiologie	Technik/Modell	Quellenangabe
Transgene Tiermodelle	Genüberexpression: Renin/TGR (mREN2) 27 c-Myc Insuline- like growth factor 1	Langheinrich et al., 1996 (113) Jackson et al., 1990 (92) Reiss et al., 1996 (157)
	Genmutation: $\alpha$ -cardiac myosin heavy chain Phospholamban	Geisterfer-Lowranc, 1996 (71) Schmitt et al., 2003 (166)
	Gen-Knockout: Muscle LIM protein Transforming growth factor $\beta$	Arber et al., 1997 (8) Shull et al., 1992 (168)

Bei den Angaben handelt es sich lediglich um eine selektive Auswahl und keine vollständige Liste

Eine Drucküberlasthypertrophie lässt sich durch eine dauerhafte Konstriktion der Aorta erreichen. Dabei kann die Einengung an zwei verschiedenen Orten erfolgen. Zum einen supra-avalvulär, im Bereich der Aorta ascendens (135), zum anderen an der Aorta abdominalis (33). Ein Vorteil der supra-avalvulären Stenose ist, dass der periphere Kreislauf von den schädlichen Folgen der arteriellen Hypertonie weitgehend verschont wird und die Folgen der kardialen Drucküberlastung selektiver untersucht werden können. Die abdominale Einengung hat den Nachteil, dass es bei der Laborratte erst nach einer sehr langen Zeit zu einer Insuffizienz des Herzens kommt und die Auswirkungen der Stenose den gesamten Körper betreffen. Eine Volumenüberlasthypertrophie kann durch die Anlage einer arterio-venösen Fistel zwischen der Aorta abdominalis und der Vena cava inferior erreicht werden, die molekularen Phänotypveränderungen sind im Vergleich zur Drucküberlasthypertrophie wesentlich schwächer ausgeprägt.

### 2.2.2. Endokrine Kardiomyopathiemodelle

Zur Erzeugung einer endokrinen Kardiomyopathie sind eine Reihe verschiedener Tiermodelle entwickelt worden. Die am besten untersuchten Modelle sind Kardiomyopathien bei experimentell induziertem D.m. und Störungen im Schilddrüsenhormonhaushalt (Hyper- und Hypothyreose).

Bereits vor mehr als 20 Jahren wurden die ersten Arbeiten zur kontraktile Dysfunktion bei STZ-induziertem D.m. publiziert (49;60;155). Durch diese experimentellen Untersuchungen und Folgestudien werden heute die kardialen Veränderungen beim D.m. nicht mehr als ein ausschließlich vaskuläres, sondern auch als ein spezifisch myokardiales Problem verstanden (53;73). Störungen der myozytären  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation sind mittlerweile gut belegt und werden als eine mögliche Ursache für kontraktile Funktionsstörungen bei diabetischer Kardiomyopathie favorisiert. Der aktuelle Kenntnisstand basiert vor allem auf Befunden, die an diabetischen Rattenmodellen erhoben wurden. Das am besten untersuchte Rattenmodell ist die STZ-induzierte diabetische Kardiomyopathie. Vier bis sechs Wochen nach einer einmaligen STZ-Injektion entwickeln sich die typischen Kennzeichen einer diabetischen Kardiomyopathie. So werden linksventrikuläre Kontraktilitätsstörungen, eine verlangsamte Relaxation, eine verminderte Compliance und eine abgeschwächte Ansprechbarkeit auf inotrope und chronotrope Interventionen gesehen (60;61;68;110;145). Vergleichbare kontraktile Funktionsstörungen sind auch bei anderen Spezies mit pharmakologisch induziertem D.m. beobachtet worden (58;156). Somit sind die oben genannten Störungen ein charakteristisches, speziesunabhängiges Phänomen bei experimentellen D.m. Neben den ablaufenden hämodynamischen Veränderungen kann man auch eine Reihe von anderen funktionellen und strukturellen Veränderungen beobachten. Dabei ist ein veränderter Myokardstoffwechsel (2), eine abnormale vaskuläre Empfindlichkeit und Reaktivität gegenüber verschiedenen Liganden (3), fibrotische Umbauprozesse (15) und eine Veränderung der Expression und Funktion von Proteinen zu beachten (16).

### 2.3. *Kardiale Calciumregulation*

#### 2.3.1. **Kardiale $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im intakten Myokard**

Bei der elektromechanischen Kopplung am Herzmuskel spielen transmembranäre Bewegungen von verschiedenen Kationen wie  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  eine essentielle Rolle. Die herausragende Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  für die Herzmuskelkontraktion wurde bereits 1893 von Ringer entdeckt (138). Heute ist bekannt, dass an der myokardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase sarkolemmale, retikuläre und mitochondriale Membransysteme sowie verschiedene nicht-membranäre  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine beteiligt sind.

Durch die Erregung der Herzzellmembran kommt es bei jeder Herzaktion zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in den Kardiomyozyten über sarkolemmale L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Dieses  $\text{Ca}^{2+}$  (weniger als 10% der benötigten Aktivator- $\text{Ca}^{2+}$ -Menge), fungiert als Trigger für die Freisetzung großer

Mengen von Aktivator- $\text{Ca}^{2+}$  aus den terminalen Cisternen des SR (57). Das bewirkt einen Anstieg der freien zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  auf ca.  $10^{-6}$  M. Die Höhe der zytoplasmatischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  bestimmt den Aktivierungsgrad des kontraktiven Apparates und somit das Ausmaß von Kontraktion und Relaxation. Der erhöhte zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in der Systole führt dazu, dass  $\text{Ca}^{2+}$  an Troponin C des Aktinfilaments bindet. Bis zu maximal vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen am Troponin C können besetzt werden. Es lösen sich zwischen dem Troponin einerseits und dem Aktinmolekül bzw. dem Tropomyosin andererseits bestehende Bindungen, so dass sich der Tropomyosinfaden zur Mittelachse des Aktinfilaments hin verlagert. Dadurch werden am Aktinmolekül Bindungsstellen für Myosinköpfechen des Myosinmoleküls frei. Myosinköpfechen binden und lösen sich unter ATP-Verbrauch von den freigewordenen Bindungsstellen am perlschnurartigen Aktinfilament. Der ATP-abhängige Kontraktionsprozess kommt in Gang, weil nun die räumlich angeordneten Aktinfäden teleskopartig in das Gerüst der Myosinfilamente hineingezogen werden (Gleitfilamenttheorie). Das Ergebnis ist eine Verkürzung und Kraftentwicklung der Myokardzelle.

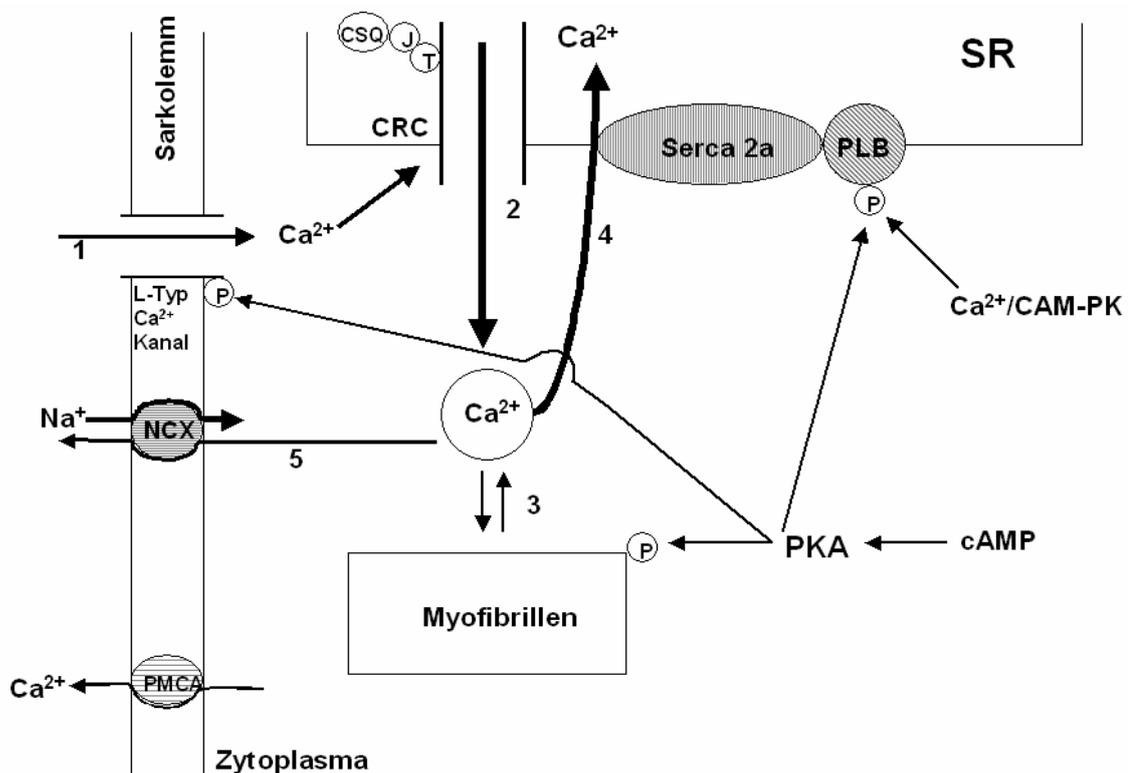
Eine schnelle Inaktivierung des kontraktiven Apparates des Myokards ist Voraussetzung für eine adäquate Füllung der Ventrikel bei niedrigen diastolischen Drücken. Gleichzeitig ist eine effiziente Relaxation auch für eine ausreichende koronare Perfusion notwendig. Letztere erfolgt zumindest im linken Ventrikel wegen des systolisch sehr hohen intramuralen Drucks zum überwiegenden Teil während der Diastole. Es ist gut belegt, dass es zwischen der Geschwindigkeit der diastolischen Absenkung der zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  und der Erschlaffungsgeschwindigkeit einen direkten Zusammenhang gibt (14).

Um die Aktin-Myosin-Wechselwirkung zu inaktivieren, muss der am Anfang der Kontraktion stark erhöhte zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel gesenkt werden. Dies setzt eine Verminderung der zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  um zwei bis drei Zehnerpotenzen voraus. Der Relaxationsprozeß in der Diastole beginnt, wenn  $\text{Ca}^{2+}$  von der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a aktiv in das Lumen des SR zurück gepumpt sowie vom  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschprotein über das Sarkolemm in den extrazellulären Raum transportiert wird. Bei sinkender zytosolischer  $[\text{Ca}^{2+}]$  dissoziiert  $\text{Ca}^{2+}$  vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Troponin C-Komplex und die oben beschriebene Wechselwirkung zwischen Aktin- und Myosinfilament wird inaktiviert. Dadurch relaxiert die Muskelzelle. Der Beitrag des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes in den Extrazellulärraum spielt quantitativ eine wesentlich geringere Rolle als  $\text{Ca}^{2+}$ -Bewegungen über der SR-Membran. Er ist aber essentiell, um eine deletäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Herzmuskelzelle zu vermeiden.

In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, dass die positiv inotrope Wirkung von Digitalis u.a. auf einer indirekten Blockade des  $\text{Ca}^{2+}$ -Auswärtstransports über dem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -

Antiport beruht. Die Folge ist ein stärker  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenes SR, wodurch zusätzliches Aktivator- $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freigesetzt werden kann.

Unter physiologischen Bedingungen erbringt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR den größten Beitrag zur diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Senkung (ca. 90%). Weniger als 10% des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  verlassen die Zelle. Normalerweise ist die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität für die elektromechanische Kopplung von nachgeordneter Bedeutung. Nur bei pathologisch erhöhter  $[\text{Ca}^{2+}]$  fungieren die Mitochondrien als zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (35;172). Aus dem oben genannten ergibt sich, dass eine intakte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation eine fein abgestimmte Koordination der verschiedenen beteiligten transmembranären  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxe erfordert. Störungen einzelner Prozesse können deshalb unterschiedlich ausgeprägte Veränderungen der gesamten zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation bewirken.



**Abb. 2.2 Übersicht über die wesentlich beteiligten Proteine der kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation.** Eine Erhöhung der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  in der Systole wird durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über spannungsabhängige L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle [1] und vor allem durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR über Ryanodin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle verursacht [2]. Dieser Anstieg der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  löst die Kontraktion aus [3]. Zur Relaxation kommt es, wenn wieder niedrige diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel eingestellt werden. Daran beteiligt sind der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-katalysierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Rücktransport in das SR [4], der Auswärtstransport von  $\text{Ca}^{2+}$  über den sarkolemmlen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und der ATP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Auswärtstransport über die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des Sarkolemm [5].

PKA, cAMP-abhängige Proteinkinase;  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMK}$ ,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Calmodulin}$ -abhängige Proteinkinase; SR, sarkoplasmatisches Retikulum; SERCA2a, sarko(end)plasmatisches Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Isoform 2a; PLB, Phospholamban; P, phosphoryliertes Protein; NCX, sarkolemmler  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher; PMCA, Plasmamembran- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; CRC,  $\text{Ca}^{2+}$ - Freisetzungskanal des SR (synonym: RyR, Ryanodin-Rezeptor); T, Triadin; J, Junctin; CSQ, Calsequestrin; FKBF, FK506 bindendes Protein. Die Dicke der Pfeile zeigt den relativen Beitrag des einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportprozesses an der gesamten zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Homöostase an.

**Tab. 2.2 Übersicht über die Leistungsfähigkeit membranärer Ca<sup>2+</sup>-Transportsysteme.**

Parameter	Sarkolemm		SR	Mitochondrium
	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> Austauscher	Ca <sup>2+</sup> -ATPase PMCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase SERCA2a	Uniporter
Anteil an Ca <sup>2+</sup> transportierender Membranfläche (%)	0,8		12,1	87
Ca <sup>2+</sup> Affinität/K <sub>m</sub> (μM)	2 – 20	ca. 0,5	0,1 – 0,5	(ca. 10)/20*
V <sub>max</sub> des Ca <sup>2+</sup> Transports (nmol Ca <sup>2+</sup> /mg Protein/s)	15 – 30	ca. 0,5	20 – 30	(ca. 10)/<5*
Anteil an myozytärer Ca <sup>2+</sup> -Regulation (%) bei [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> = 10 μM Ca <sup>2+</sup>	0,4	3,1	46,5	50
Anteil an myozytärer Ca <sup>2+</sup> -Regulation (%) bei [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> = 10 μM Ca <sup>2+</sup> und [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> = 1 μM 1 bis 3mM Mg <sup>2+</sup>	0,7	4,9	88	6,3

\*: unter physiologischen Bedingungen bei Zusatz von Mg<sup>2+</sup> 1-3 mM; dadurch Hemmung des mitochondrialen elektrophoretischen Uniporters (35)

### 2.3.2. Kardiale Ca<sup>2+</sup>-Homöostase bei Diabetes mellitus

Die zugrunde liegenden Mechanismen einer diabetischen Kardiomyopathie sind bis heute noch nicht aufgeklärt (86;117;160). Störungen der myozytären Ca<sup>2+</sup>-Regulation werden schon seit längerem als eine mögliche Ursache für kontraktile Funktionsstörungen bei diabetischer Kardiomyopathie favorisiert. Dazu könnte eine veränderte Regulation der Ca<sup>2+</sup>-Pumpe des SR durch eine reversible Phospholambanphosphorylierung gehören (206), eine Beeinträchtigung der Lipidmembran (61;82), ein Schaden durch freie Radikale (49), eine unerkannte Proteolyse (38), eine kovalente Veränderung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase (18;158), eine fehlerhafte Energieversorgung der Ca<sup>2+</sup>-Pumpe (203), oder eine verminderte Expression und Menge der SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase (140;163;183). Es konnte gezeigt werden, dass eine verringerte Expression der kardialen SR-Proteine im diabetischen Myokard durch eine Insulintherapie wieder hergestellt werden konnte (183;206). Seit Anfang der 80er Jahre ist außerdem bekannt, dass die kardiale myofibrilläre ATPase-Aktivität bei STZ-induzierter diabetischer Kardiomyopathie der Ratte abnimmt. Ursache dafür ist eine verminderte Expression der schweren Myosinketten-Isoform V<sub>1</sub> (αα-MHC) mit hoher ATPase-Aktivität bei gleichzeitiger Zunahme des Gehaltes an Isomyosin V<sub>3</sub> (ββ-MHC) mit geringer ATP-spaltender Aktivität (50-52;123;126;149-151). Man nimmt an, dass die Veränderungen der schweren Myosinketten in den diabetischen Rattenmodellen zu einer verminderten myokardialen Kraftentwicklung beitragen. Eine veränderte Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität des kontraktiven Apparates könnte in diesem Zusammenhang ebenfalls von funktioneller

Bedeutung sein (2;50-52;123;126;149-151). Die wohl überzeugendsten indirekten Befunde für eine gestörte zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation im diabetischen Myokard wurden bei Kontraktilitätsmessungen an isolierten Herzmuskelpräparaten, beziehungsweise bei linksventrikulären hämodynamischen Untersuchungen erhoben. Besonders das veränderte Verhalten diabetischer Herzmuskelpräparate auf diverse inotrope Interventionen, wie  $\beta$ -Agonisten,  $\text{Ca}^{2+}$ -Agonisten und -Antagonisten spricht für eine gestörte zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation (78;141;164;204). Des Weiteren besteht ein verändertes Antwortverhalten bei spezifischen Frequenzinterventionen (21;107;205) und bei Änderungen der extrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  (90;98;102;118;164;192;204).

### **2.3.3 Kardiale $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase bei Myokardhypertrophie und -insuffizienz**

Durch eine kompensatorische Hypertrophie bei diversen Druck- oder Volumenbelastungen, kann vorübergehend die Kontraktilität und damit die Auswurfleistung des Herzens verbessert werden. Letztlich führt das ventrikuläre „Remodeling“ jedoch zu einer vorwiegend konzentrischen (Druckbelastung) oder exzentrischen (Volumenbelastung) Massenzunahme, zu einer späteren Dilatation der Kammer und anschließend zum Linksherzversagen. Erschwerend kommt hinzu, dass insuffiziente Herzen einem verstärkten Sympathikotonus ausgesetzt sind. Dies führt zu erhöhter Herzfrequenz und damit zu einer Abnahme sowohl der Systolen- als auch Diastolendauer, was sich negativ auf die Ökonomie der Herzarbeit auswirkt. Darüber hinaus steigt der  $\text{O}_2$ -Verbrauch bei zunehmender Frequenz an. Auf zellulärer und molekularer Ebene vollziehen sich verschiedene Veränderungen, wie z.B. Störungen des kontraktilen Apparates, Beeinträchtigungen der Mitochondrien und des Energiestoffwechsels, der Signaltransduktion und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase sowie eine Aktivierung von Wachstumsfaktoren.  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsstörungen sind im entscheidendem Maße für diastolische und systolische Funktionsstörungen in hypertrophierten und insuffizienten Herzen verantwortlich (36;132). Es lassen sich z.B. bei experimenteller Überlasthypertrophie und an terminal insuffizienten Herzen von Herzinsuffizienzpatienten erhöhte intrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]$  bei verminderten systolischen Amplituden nachweisen (81;83;147). Ein diastolisch erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel bedeutet, dass der Kardiomyozyt nicht adäquat relaxieren kann, die Füllung der Ventrikel demnach erschwert abläuft und zusätzlich die Perfusion des Myokards behindert ist. Hauptverantwortlich für die gesteigerte  $[\text{Ca}^{2+}]$  in der Diastole ist sehr wahrscheinlich eine verminderte Rückbindung von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR, die von der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a katalysiert wird. Daraus ergibt sich auch eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher- und Freisetzungorganelle, so dass weniger Akti-

vator- $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt werden kann. Da  $\text{Ca}^{2+}$  aber für die Aktivierung des kontraktiven Apparats unerlässlich ist, erklärt sich, warum zusätzlich zu diastolischen auch systolische Funktionsstörungen auftreten können. Wie Untersuchungen an chronisch drucküberlasteten hypertrophierten Herzen zeigten, ist die SERCA2a Expression bzw. die Transportaktivität vermindert (48) oder den erhöhten Erfordernissen des hypertrophierten Kardiomyozyten nicht adäquat angepasst (134). Geklärt ist, dass keine Schädigung einzelner Transportmoleküle vorliegt. Vielmehr scheint die Dichte von  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Molekülen in der SR-Membran verringert zu sein. Der Mechanismus, der zu einer verminderten SERCA2a-Expression führt, beruht vermutlich auf einer verminderten Aktivierung bzw. Repression des Promotors des SERCA2-Gens. Dies lässt sich anhand verminderter mRNA-Spiegel (48;134) sowie durch Untersuchungen mit Promoter-Reporter-Genkonstruktionen postulieren. Feldman et al. nehmen an, dass der Abfall des  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mRNA-Spiegels ein Marker für den Übergang von kompensierter Hypertrophie zur Insuffizienz darstellt. Diese Vermutung stützt sich auf tierexperimentelle Befunde an hypertrophierten Herzen. Lediglich Tiere mit Zeichen einer Dekompensation wiesen verringerte mRNA-Spiegel auf (62). Neben der SERCA2a ist im Modell der drucküberlasteten Herzen auch PLB (134) und die Anzahl von  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanälen am SR (137) vermindert. Allerdings fallen letztere Veränderungen in der Regel wesentlich geringer aus als die SERCA2a-Abnahme. Wenn man diese Befunde zusammennimmt, lässt sich zumindest ein relativer Verlust von SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen am hypertrophierten Herzen postulieren (48;116;152). Erste Befunde zu Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportfunktion des SR bei experimenteller Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt kommen aus dem Labor von N. S. Dhalla (1). Die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportfunktion in linksventrikulären Membranpräparationen von Ratten nach Myokardinfarkt war signifikant vermindert. Gestützt wurden diese Befunde von de la Bastie et al., die die SERCA2a-mRNA- und Proteinspiegel bei chronischer Herzinsuffizienz nach Aortenstenose am Rattenmodell quantifizierten (48). Am menschlichen insuffizienten Myokard ist bei verringertem SERCA2a-mRNA-Spiegel ein kompensatorischer Anstieg der sarkolemmalen NCX-mRNA-Spiegel und -Aktivität nachgewiesen worden (175). Im gesunden Herzen ist dieser Antiporter entscheidend für den diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Auswärtstransport. Offensichtlich gehören Expressionsveränderungen verschiedener Gene der kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation zum typischen Phänotyp des hypertrophierten Myokards. Vergleichbare Veränderungen der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase-Aktivität und -Expression ließen sich auch am terminal insuffizienten menschlichen Herzen feststellen (7;128). Einschränkend muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass Befunde am Humanmyokard größeren individuellen Schwankungen unterworfen sind. Die Patienten haben häufig koexistente Stimuli für die

Entwicklung einer Herzhypertrophie, wie z.B. arteriellen Hypertonus, D.m. oder Herzklappendysfunktionen. Außerdem gelangen fast nur Herzproben von terminal insuffizienten Patienten (NYHA IV) zur Untersuchung, die zusätzlich mit verschiedensten herzwirksamen Medikamenten therapiert worden sind. Zusammenfassend ist festzustellen, dass es durch die Induktion einer Aortenstenose im Tiermodell zuerst zu einer kompensatorischen Hypertrophie des Myokards kommt, die mit veränderter Expression und Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportproteinen des SR und des Sarkolemm einhergeht. Ein Abfall der SERCA2a-Expression ist vermutlich Folge einer verminderten Aktivierung des SERCA2a-Gens. Im Gegensatz dazu ist die Expression einer großen Anzahl anderer Gene unter dem Einfluss verschiedener neuroendokriner Stimuli und Wachstumsfaktoren gesteigert. Sowohl qualitativ als auch quantitativ zeichnet sich der resultierende kardiale Phänotyp durch die Reexpression eines fötalen Genprogramms und einer Zunahme der linken und/oder rechten Ventrikelmasse aus (190). Warum unter diesen Bedingungen eine Aktivierung der Expression des SERCA2a-Gens ausbleibt, und welche möglichen Faktoren daran beteiligt sind, ist nach wie vor nicht geklärt. Sicher ist aber, dass es im Rattenmyokard zu keiner Expression anderer SERCA Isoformen kommt (134). Dies steht im Gegensatz zu den MHC-Isoformen, bei denen unter pathologischen Bedingungen im Herzmuskel eine Verschiebung im Isoenzymmuster von  $\alpha\alpha$  ( $V_1$ ) nach  $\beta\beta$  ( $V_3$ ) zu beobachten ist (167).

## 2.4. *Die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums*

### 2.4.1. **Molekulare Heterogenität und Struktur**

Es sind bisher fünf verschiedene SERCA-Isoformen beschrieben worden. Diese werden von drei unterschiedlichen Genen kodiert. Im Myokard wird ausschließlich die Isoform SERCA2a exprimiert. Das Membranprotein SERCA2a hat ein Molekulargewicht von 110 kDa und besteht aus 997 Aminosäuren. Es repräsentiert über 40 % der Gesamtproteinmenge aller SR-Proteine (181). Für die Sekundär- und Tertiärstruktur sind zehn transmembranäre und fünf extramembranäre Helices postuliert worden (23;124). Diese bilden Domänen für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP und die Wechselwirkung mit dem Regulatorprotein Phospholamban (124).

Tab. 2.3: SERCA- Isoformen und deren Vorkommen

Gen	Isoform	Vorkommen
<b>SERCA1</b>	SERCA1a	Adulter weißer und roter Skelettmuskel
	SERCA1b	Neonataler weißer Skelettmuskel
<b>SERCA2</b>	SERCA2a	Neonatales und adultes Myokard, roter Skelettmuskel
	SERCA2b	Glatte Muskelzellen
<b>SERCA3</b>	Bisher nur eine Isoform bekannt	Endothelzellen, Epithelzellen, Thrombozyten, u.a.

SERCA- Sarko(-Endoplasmatisches) Retikulum Calcium ATPase; SERCA 1a + b und SERCA 2a + b sind gespleißte Varianten der Transkripte des SERCA1 bzw. SERCA2 Gens. Angaben nach (23;24;116;174)

#### 2.4.2. Regulation der kardialen $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a

Wesentlich für die neuroendokrine Kurzzeitregulation der SERCA2a ist das Modulatorprotein PLB (179;180). PLB ist, wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, vorwiegend in der Membran des longitudinalen SR lokalisiert und hat im unphosphorylierten Zustand eine inhibitorische Wirkung auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (87). Es ist ein transmembranäres Homopentamer mit einem Molekulargewicht von 27,5 kDa (40). Jedes Monomer besteht aus 52 Aminosäureresten. Durch Phosphorylierung von PLB wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der SERCA2a erhöht, und damit die Transportrate für  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR gesteigert (177). Die Phosphorylierung erfolgt durch die cAMP-abhängige PKA. Jedes PLB-Monomer kann auch durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängig (**Abb. 2.2**) und *in vitro* durch Proteinkinase C, sowie durch cGMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert werden (104;114;154;178). Die Phosphorylierung des PLB-Monomers erfolgt an den Aminosäureresten Serin-16 (durch cAMP-abhängige Proteinkinase) und Threonin-17 ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Kinase) (170). Physiologisch besonders bedeutsam ist die Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige PKA. So ist gut belegt, dass die  $\beta$ -adrenerg vermittelte Beschleunigung der Relaxation im wesentlichen über eine  $G_s$ /Adenylylcyclase- vermittelte cAMP-abhängige Phosphorylierung von PLB gesteuert wird (100;136;201). Dieser Vorgang ist unter physiologischen Bedingungen ein wesentlicher Mechanismus für die Anpassung der Herzfunktion an veränderte periphere Erfordernisse.

#### 2.5. *Transgene Tiermodelle mit veränderter Transportfunktion der $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums*

Untersuchungen an Gewebeproben aus terminal insuffizienten menschlichen Herzen und aus tierexperimentellen Studien haben bereits gezeigt, dass eine Imbalance der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase zur

kontraktilen Dysfunktion der Herzinsuffizienz beisteuert (132). Seitdem beschrieben wurde, dass die Genexpression der SERCA2a bei terminaler Herzinsuffizienz bei Patienten (132) und in Rattenmodellen mit Drucküberlastherzinsuffizienz reduziert ist (48;106), wird vermutet, dass Veränderungen der SERCA2a-Expression zur kontraktilen Dysfunktion bei humaner und experimenteller Herzinsuffizienz beitragen. Um die pathogenetische Wertigkeit der SERCA2a Expressions- und Aktivitätsveränderungen besser zu verstehen, wurden verschiedene gentechnisch veränderte Tiermodelle erstellt, an denen die Herzfunktion bei Herzhypertrophie und -Insuffizienz untersucht wurde. Die gentechnischen Interventionen zielten hauptsächlich auf eine Beeinflussung der Expression von SERCA2a oder des Regulatorprotein PLB ab. Es konnten somit *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen über die Aktivität der SERCA2a unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt werden, die zum besseren Verständnis des komplexen Geschehens der kontraktilen Dysfunktion bei einer Herzinsuffizienz führten.

So generierte z.B. die Arbeitsgruppe um W.H. Dillmann ein transgenes Mäusemodell mit moderater SERCA2a-Überexpression. Bei diesen Tieren wurde die Expression des SERCA2a-Transgens durch einen konstitutiv aktiven Cytomegalovirus (CMV)-Enhancer/Chicken  $\beta$ -Actin-Promotor reguliert. Die transgenen Tiere zeigten einen erhöhten mRNA-Gehalt und einen um 20% höheren SERCA2a-Gehalt (84). Die Herzen dieser Tiere wiesen insbesondere eine beschleunigte Relaxation auf.

Die Arbeitsgruppe um R. J. Hajjar stellte eine Überexpression der SERCA2a her, indem sie adulte Kaninchenkardiomyozyten mit einem Adenovirus, das die SERCA2a beinhaltet, infizierten (46). Dabei konnten sie zeigen, dass erhöhte SERCA2a-Spiegel zu einer Verbesserung der systolischen und diastolischen Herzfunktion führen und das Auftreten von arrhythmischen Nachkontraktionen vermindert war. Die gleiche Gruppe führte ähnliche Versuche an Rattenmyozyten mit einem adenoviralen PLB-Vektor durch, um die sich daraus ergebenden funktionellen Konsequenzen für die kontraktile Funktion zu untersuchen. So konnte der PLB-Gehalt der Kardiomyozyten um das 2,7fache gesteigert werden, bei gleichbleibendem SERCA2a-Spiegel (47). Es kam dabei zu einem Abfall der maximalen Kontraktionsamplitude der Zellen bzw. zu einer Senkung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit.

Periasamy et al. überexprimierten die kardiale SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in Mäuseherzen, indem sie einen  $\alpha$ -myosin heavy chain (MHC) Promotor zur Generierung der transgenen Tiere benutzten (10). Sie zeigten so an einem Working-Heart-Modell, dass ein Anstieg der SERCA2a-Pumpen direkt die kontraktile Funktion des Herzens durch einen ansteigenden SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport erhöhen kann. In einem anderen Mäusemodell wurden der Promotor und das 5' Ende des SERCA2-Gens ausgeschaltet (146). Bei heterozygoten Tieren waren die mRNA-Spiegel für SERCA2 um

45 % reduziert. Die Funktionsparameter des Herzens waren alle erniedrigt. Die aufgeführten Arbeiten zeigen die wichtige funktionelle Rolle von SERCA2a und ihrem Modulatorprotein PLB für den Relaxations- und Kontraktionsprozess.

## 2.6. *Zielstellung der Arbeit*

In Kardiomyozyten insuffizienter Herzen mit systolischer und diastolischer Dysfunktion sind die diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel erhöht, der Zeitverlauf der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Senkung verlangsamt und die Amplitude des systolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals erniedrigt. Auf molekularer Ebene findet sich gleichzeitig eine verminderte Expression der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums SERCA2a. Da dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportprotein von erstrangiger Bedeutung für die Kontrolle der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  in der Herzmuskelzelle ist, war es Ziel dieser Arbeit, neue Erkenntnisse zur Funktion und Expression dieses Proteins unter spezifischen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zu gewinnen. Als experimentelles Modell für diese Untersuchungen wurden transgene Ratten mit kardialer SERCA2a-Überexpression genutzt deren primärer Phänotyp bekannt war. An diesen Tieren wurde entweder eine diabetische Kardiomyopathie oder eine Drucküberlasthypertrophie induziert, um anschließend den sekundären kardialen Phänotyp zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere geklärt werden, ob durch eine gesteigerte SERCA2a-Expression und eine damit verbundene verbesserte Ausstattung des SR mit  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen im intakten Myokard transgener Versuchstiere, das Entstehen kontraktile Funktionsstörungen bei experimentell ausgelöster Kardiomyopathie „präventiv“ verhindert werden kann.

Für die vergleichenden Untersuchungen des sekundären Phänotyps wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende tierexperimentelle Techniken im Labor der Abteilung Toxikologie etabliert:

1. STZ-induzierte diabetische Kardiomyopathie mit kontraktile Dysfunktion an Ratten.
2. chirurgische Methode der graduellen supra-avalvulären Aortenstenosierung an narkotisierten Ratten, zur Erzeugung einer definierten linksventrikulären Drucküberlasthypertrophie.
3. Bestimmung linksventrikulärer Funktionsparameter an narkotisierten Ratten mit Millar<sup>®</sup>-Tipkathetertechnik.