

5 Diskussion

Die vom SERCA2-Gen kodierte kardiale Isoform 2a der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA2a) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der zytoplasmatischen $[\text{Ca}^{2+}]$ in Herzmuskelzellen. Dieses membranäre Ca^{2+} -Transportprotein leistet die Hauptarbeit bei der Senkung des Ca^{2+} -Spiegels während der kardialen Relaxation (13) und beeinflusst die Beladung des SR mit Ca^{2+} . Eine erniedrigte Expression des SERCA2a-Gens kann eine verminderte Pumpfunktion des Herzens verursachen. In der Regel resultiert daraus primär eine diastolische Dysfunktion, die sekundär mit einer systolischen Funktionsstörung assoziiert sein kann. Das belegen viele Befunde, die sowohl an verschiedenen Tiermodellen als auch am terminal insuffizienten Herzen von Patienten erhoben wurden (130). Allerdings sind nicht alle funktionellen Folgen und ihre Ursachen, die sich aus einer verminderten oder dem pathologischen Prozess nicht adäquat angepassten Expression des SERCA2-Gens ergeben, aufgeklärt. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob durch geeignete Interventionen zur Steigerung der Expression von SERCA2a-Molekülen typische diastolische und systolische Funktionsstörungen unter pathologischen Bedingungen verhindert bzw. verbessert werden können. In dieser experimentellen Arbeit wurde deshalb an transgenen Ratten mit moderater kardialer SERCA2a-Überexpression untersucht, ob eine verbesserte Ausstattung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und -Freisetzungorganelle SR mit Ca^{2+} -ATPasen systolische und diastolische Funktionsstörungen bei experimentell erzeugter diabetischer Kardiomyopathie und chronischer Drucküberlasthypertrophie „präventiv“ verhindern kann.

Bei den vergleichenden Untersuchungen an SERCA2a-transgenen und nicht-transgenen Ratten wurde folgendes gefunden: 1) Die kardiale Expression eines SERCA2a-Transgens verursacht im intakten Rattenherzen eine Steigerung der SERCA2a-katalysierten Ca^{2+} -Transportaktivität des SR um 30 – 40 %. 2) SERCA2a-transgene Ratten mit einem STZ-induzierten D.m. zeigten einen geringeren Verlust an kardialer SR Ca^{2+} -Transportaktivität als diabetischen Ratten vom Wildtyp mit alleiniger Expression des endogenen SERCA2a-Gens. Offensichtlich kann die diabetesbedingte, verminderte Expression des endogenen SERCA2a-Gens durch Expression des SERCA2a-Transgens zumindest teilweise kompensiert werden. 3) Isolierte Papillarmuskeln von diabetischen und nicht-diabetischen transgenen Tieren zeigten basal und unter Belastungsbedingungen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen verbesserte Relaxations- und Kontraktionsparameter. Die Ergebnisse von hämodynamischen Messungen im linken Ventrikel narkotisierter diabetischer Versuchstiere mit/ohne transgene SERCA2a-Expression bestätigen diese Befunde, während bei nicht-diabetischen Versuchstieren *in vivo* hämodynamisch

keine signifikanten Unterschiede zwischen TGR und WT festgestellt werden konnten. 4) Im Vergleich zu nicht-transgenen Versuchstieren mit linksventrikulärer Drucküberlasthypertrophie und beginnender Dekompensation wurde bei SERCA2a-transgenen Ratten mit vergleichbarer linksventrikulärer Hypertrophie *in situ* eine geringer ausgeprägte Verschlechterung der linksventrikulären Funktion beobachtet. So traten typische frühe Dekompensationszeichen wie Anstieg des LVEDP und Abnahme der linksventrikulären Druckabfallgeschwindigkeit entweder nicht auf oder waren sehr gering ausgeprägt. 5) Auf molekularer Ebene fanden sich bei transgenen Ratten mit und ohne linksventrikulärer Hypertrophie im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen erhöhte SERCA2a-mRNA-Spiegel. Im Gegensatz dazu konnten auf SERCA2a-Proteinebene nach 6-wöchiger linksventrikulärer Drucküberlast funktionell keine signifikanten Unterschiede zwischen TGR und WT nachgewiesen werden. Im folgenden Text werden die einzelnen erhobenen Befunde und Ergebnisse detailliert diskutiert.

5.1 Allgemeine Charakteristika der Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues transgenes Rattenmodell mit moderater kardialer Überexpression der SERCA2a genutzt (195), um die Auswirkung einer transgenen SERCA2a-Expression auf die Ca^{2+} -Transportfunktion des SR sowie die linksventrikuläre Funktion von diabetischen bzw. drucküberlasteten, hypertrophierten Herzen zu untersuchen. Die transgenen Ratten zeigten unter normalen physiologischen Bedingungen außer biochemischen und funktionellen Veränderungen am Herzen keinen auffälligen allgemeinen Phänotyp im Vergleich zu Sprague-Dawley-Ratten vom Wildtyp. Für die SERCA2a-transgene Rattenlinie wurde in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe um R. Vetter gezeigt, dass der kardiale SERCA2a-mRNA-Spiegel im Vergleich zu nicht-transgenen Ratten vom Wildtyp um das 1,5-fache erhöht ist, was von einer Erhöhung des SERCA2a-Proteinspiegels um 26 % begleitet war (68;195). Das entspricht Befunden an SERCA2a-transgenen Mäusen, die von der Arbeitsgruppe um W. Dillmann (San Diego) mit Hilfe des gleichen transgenen SERCA2a-Konstruktes generiert wurden (84). So wurde für das SERCA2a-transgene Mausmodell ein 1,6-facher Anstieg des SERCA2a-mRNA-Spiegels und eine 20%-ige Erhöhung des SERCA2a-Proteins beschrieben (84). Die Ursachen für die unterschiedliche Erhöhung von SERCA2a-mRNA und -Protein in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten transgenen Tieren bleiben unklar. Möglicherweise liegt eine ineffiziente Translation der vom SERCA2-Transgen kodierten SERCA2a-mRNA oder ein beschleunigter Abbau des im Überschuss gebildeten SERCA2a-Proteins vor. Es ist auch denkbar, dass eine begrenzte Anzahl freier Insertionsstellen für Ca^{2+} -ATPase-Moleküle in der

SR-Membran einen kompletten Einbau aller neu gebildeten SERCA2a-Moleküle in diese Membran verhindert. Für die letzte Option sprechen Befunde von He et al., die belegen, dass die SERCA2a-Proteinsyntheserate in Herzen SERCA2a-transgener Mäuse im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollen um 82 % erhöht ist (84).

Um zu überprüfen, ob in transgenen Tieren mit erhöhter SERCA2a-Expression die Ca^{2+} -Transportfunktion des kardialen SR verbessert ist, wurde die Oxalat-unterstützte $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR linksventrikulärer Homogenate bestimmt. Diese Methode wurde bereits mehrfach erfolgreich zur Untersuchung der SR Ca^{2+} -Transportfunktion intakter und pathologisch veränderter Herzen eingesetzt (162). Dabei werden mögliche Einflüsse auf die Ca^{2+} -Transportaktivität durch eine veränderte *in vitro* Phosphorylierung des SERCA2a-Modulatorproteins PLB durch die Zugabe von 2 $\mu\text{Mol/l}$ eines spezifischen Proteinkinase A-Peptidinhibitors in den Reaktionsansatz unterbunden. Durch Messung des SR Ca^{2+} -Transportes bei verschiedenen submikromolaren freien $[\text{Ca}^{2+}]$ konnte gezeigt werden, dass die SERCA2a-katalysierte kardiale Ca^{2+} -Transportaktivität SERCA2a-transgener Ratten deutlich größer war als die von Wildtyp-Ratten (**Abb. 4.3**). Das zeigt, dass die transgene Expression zusätzlicher SERCA2a-Moleküle im intakten Herz offensichtlich funktionell zu einer Erhöhung der SR Ca^{2+} -Aufnahmeaktivität führt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit an dem SERCA2a-transgenen Rattenmodell untersucht, ob eine verbesserte Ausstattung des kardialen SR mit Ca^{2+} -Pumpen vor bekannten Störungen der Ca^{2+} -Homöostase und kontraktile Dysfunktion bei experimentell-induzierter diabetischer Kardiomyopathie und Drucküberlasthypertrophie schützt.

5.2 Diabetische Kardiomyopathie

Die diabetische Kardiomyopathie ist durch eine linksventrikuläre Dysfunktion gekennzeichnet. Klinisch wird diese als Herzinsuffizienz manifest. Insbesondere eine verlangsamte Relaxationsgeschwindigkeit spielt eine bedeutende Rolle für eine verminderte kardiale Leistung bei diabetischer Kardiomyopathie (61;68;144). Klinische Daten zeigen, dass bereits bei asymptomatischen Diabetikern eine isolierte diastolische Dysfunktion nachweisbar ist, die durch eine frühdiastolische Relaxationsstörung und/oder eine Compliancestörung im Sinne einer erhöhten Ventrikelsteifigkeit mit erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Drücken gekennzeichnet ist (165).

In dieser Arbeit konnten diese auch an diabetischen Rattenherzen mehrfach beobachteten typischen Veränderungen bestätigt werden. Nach intraperitonealer Gabe von STZ kam es zu cha-

rakteristischen, den gesamten Organismus betreffenden, diabetes-typischen Veränderungen sowohl bei WT (61;63) als auch bei TGR. Die diabetischen Tiere zeigten eine signifikante Reduktion der Körper und Herzgewichte. Auch andere diabetespezifische Zeichen wie erhöhte Blutglukosespiegel, Polydipsie und Polyurie wurden sowohl bei diabetischen WT als auch bei diabetischen TGR gefunden. Das zeigt, dass die transgene Expression des SERCA2a-Gens keinen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf eines STZ-induzierten diabetischen Stoffwechsellage hat. Makroskopisch konnte eine Atrophie des diabetischen Herzmuskels sowohl von TGR als auch von WT beobachtet werden, die mikroskopisch durch eine Reduktion der Myokardzellendurchmesser bestätigt werden konnte. Diese Ergebnisse bestätigen bekannte Befunde, die allerdings nur für nicht-transgene diabetische Ratten erhoben wurden (63;198). Bezüglich des Kardiomyozytendurchmessers bestand zwischen TGR und WT mit diabetischer Stoffwechsellage kein signifikanter Unterschied. Das lässt vermuten, dass ein verändertes Myozytenwachstum bei diabetischer Stoffwechsellage durch eine gesteigerte SERCA2a-Expression nicht beeinflusst wird.

Durch Untersuchungen im Rahmen von Autopsien an Patientenherzen mit langjährigem Diabetes mellitus ist belegt, dass sich bei diabetischer Stoffwechsellage eine signifikante kardiale Fibrose ausbildet (68;191). Da sich auch bei STZ-induzierten D.m. im Rattenmodell eine interstitielle und perivaskuläre kardiale Fibrose ausbildet (75;75;142;188;198), wurden mögliche Veränderungen der extrazellulären Matrix bei diabetischen WT und TGR vergleichend untersucht. Sowohl bei TGR als auch bei WT mit D.m. wurde eine signifikante Zunahme der extrazellulären Kollagenmatrix beobachtet. Diese fällt bei diabetischen TGR tendenziell geringer aus als bei diabetischen WT. Allerdings erwiesen sich diese Unterschiede als statistisch nicht signifikant. Da nicht-diabetische Kontrolltiere (WT und TGR) eine deutlich geringere, aber identische Ausprägung der extrazellulären Kollagenmatrix aufwiesen, stellt sich die Frage, ob eine kardiale SERCA2a-Überexpression und die damit verbundenen funktionellen Auswirkungen indirekt einen Einfluss auf die Ausbildung der kardialen extrazellulären Kollagenmatrix haben. Das lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht beantworten. Um eine valide Aussage zu treffen, wären zusätzliche Experimente mit großen Versuchsgruppen notwendig.

Da sich gesunde TGR durch erhöhte kardiale SERCA2a-Proteinspiegel (165) und eine beschleunigte Ca^{2+} -Aufnahme in das kardiale SR auszeichnen, wurde des Weiteren untersucht, ob das Auswirkungen auf die linksventrikuläre Pumpfunktion hat. An anästhesierten WT und TGR wurde mittels eines in den linken Ventrikel eingeführten 2 F Millar Tip-Katheters® *in vivo* die Kinetik der linksventrikulären Pumpfunktion untersucht. Durch diese Untersuchungen sollte

insbesondere herausgefunden werden, ob eine kardiale SERCA2a-Überexpression unter pathophysiologischen Bedingungen Vorteile für die Herzleistung der Versuchstiere hat. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf Relaxationsparameter gelegt, da der Prozess der Relaxation von der Funktion und Aktivität der Ca^{2+} -ATPase des SR entscheidend abhängt. Wie diabetische WT zeigten auch diabetische TGR im Vergleich zu nicht-diabetischen WT bzw. TGR verschlechterte systolische und insbesondere diastolische Funktionsparameter. Bei diabetischen TGR fielen diese ungünstigen Veränderungen allerdings wesentlich geringer aus als bei diabetischen WT. So unterschied sich der dimensionslose Index $+dP/dt_{\max}/-dP/dt_{\max}$ diabetischer TGR nicht von nicht-diabetischen WT und TGR, während dieser Index bei diabetischen WT durch die Verlangsamung der Relaxation signifikant erhöht war. Die linksventrikuläre Pumpfunktion nicht-diabetischer WT und TGR unterschied sich dagegen nicht. Deshalb kann geschlossen werden, dass eine moderate kardiale SERCA2a-Überexpression unter normalen physiologischen Bedingungen *in vivo* keinen signifikanten Einfluss auf die Pumpfunktion des linken Ventrikels hat, während sich unter den pathologischen Bedingungen einer diabetischen Stoffwechsellege günstige Auswirkungen einer selektiven kardialen SERCA2a-Überexpression insbesondere für die beeinträchtigte diastolische Funktion ergeben. Die beobachteten Veränderungen systolischer und diastolischer hämodynamischer Parameter bei diabetischen WT-Ratten bestätigen einerseits frühere Befunde anderer Arbeitsgruppen (65;115) und ähneln andererseits Befunden, die bei Patienten mit D.m. erhoben wurden (60). Es kann deshalb vermutet werden, dass mit geeigneten Interventionen zur Steigerung der SERCA2a-Expression im Herzen von Diabetikern mit eingeschränkter Herzfunktion eine Verbesserung der Pumpfunktion des Herzens erreichbar sein sollte. Derartige Therapieansätze zusätzlich zur konventionellen Behandlung von Diabetikern existieren jedoch gegenwärtig nicht.

Um die Ergebnisse der hämodynamischen Untersuchungen an narkotisierten Ratten, bei denen linksventrikuläre Volumenveränderungen methodenbedingt nicht kontrolliert werden können, weiter zu verifizieren, wurden zusätzlich isometrische Kontraktionsmessungen am isolierten Papillarmuskel durchgeführt. Dabei konnte bei diabetischen WT eine deutliche Reduktion der entwickelten Kraft sowie der maximalen Druckanstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeiten gemessen werden. Bei diabetischen SERCA2a-transgenen Ratten waren die untersuchten Werte vergleichbar mit denen unbehandelter WT und erwiesen sich im Vergleich zu den diabetischen WT als deutlich erhöht. Vergleichbare Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe um Dillmann an dem o.g. SERCA2-Mausmodell nach D.m.-Induktion beschrieben (187). Offensichtlich wird durch die transgene SERCA2a-Überexpression die Ca^{2+} -Transportreserve und die funktionell gekoppelte kontraktile Reserve des Myokard erhöht, so dass das Ausmaß Diabetes-bedingter

negativer Auswirkungen auf die diastolische und systolische Funktion des Myokards mit SERCA2a-Überexpression geringer ausfällt als bei WT.

Relaxations- und Kontraktionsstörungen diabetischer Herzen von Ratten beruhen sicherlich nicht allein auf Veränderungen der myozytären Ca^{2+} -Regulation. So könnten die beobachteten kontraktile Funktionsstörungen zumindest teilweise durch zusätzliche subzelluläre Veränderungen hervorgerufen werden. Von Bedeutung könnten zum Beispiel diabetes-induzierte Veränderungen der Expression von Isoformen schwerer Myosinketten sein. Es ist bekannt, dass im diabetischen Herz bevorzugt die „langsame“ Isoform V_3 ($\beta\beta$) mit geringer ATPase-Aktivität vorliegt (50;151). Wir haben in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, ob es in diabetischen Herzen SERCA2a-transgener Ratten zur einer vergleichbaren Verschiebung des Isomyosinspektrums von V_1 ($\alpha\alpha$) nach V_3 ($\beta\beta$) wie bekanntermaßen bei diabetischen nicht-transgenen Ratten kommt. Außerdem tragen sehr wahrscheinlich verschiedene metabolische Veränderungen im diabetischen Myokard wie z.B. eine geringere Glukoseaufnahme in der Abwesenheit von Insulin oder eine gesteigerte Oxydation freier Fettsäuren zu einer Beeinträchtigung der kontraktile Eigenschaften bei (50).

Ein funktionell bedeutsamer Teilaspekt des chronischen, STZ-induzierten D.m. ist eine erniedrigte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR der Kardiomyozyten (68;119;144). Eine verminderte Expression der SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) führt zu einer deutlichen Reduktion der Ca^{2+} -Transport-ATPasen in der SR-Membran und das scheint einer der wichtigsten Faktoren bei der Ausbildung einer diastolischen Dysfunktion zu sein (140;163;183;206). Die Beobachtung einer erniedrigten SERCA2a-katalysierten Ca^{2+} -Transportaktivität in diabetischen WT entspricht diesen früheren Befunden. Durch transgene SERCA2a-Expression konnte in dieser Arbeit eine partielle Wiederherstellung einer normalen Ca^{2+} -Transportaktivität gezeigt werden. Bemerkenswerterweise wurde das trotz bestehender diabetischer Stoffwechsellaage erreicht. Des weiteren konnte an dem untersuchten insulindefizitären, diabetischen Rattenmodell gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Erniedrigung der kardialen SERCA2a-Proteinspiegel kommt und dass dies mit einer Abnahme der SERCA2a katalysierten SR Ca^{2+} -Aufnahme korreliert. Das trifft sowohl auf WT- als auch TGR-STZ-Tiere zu. Allerdings erwiesen sich sowohl die SERCA2a-Proteinspiegel, als auch die SR Ca^{2+} -Aufnahmegeschwindigkeit als signifikant höher als bei WT-STZ. Es ist zu vermuten, dass das die molekulare Ursache für die teilweise Wiederherstellung der kardialen Relaxationsgeschwindigkeit bei diabetischen TGR ist. Die gefundenen Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass eine reduzierte SERCA2a-Expression bei chronischem, STZ-induzierten D.m. zu einer Verminderung der SR Ca^{2+} -Transportaktivität beiträgt. Des weiteren konnte damit erstmals experimentell gezeigt werden,

dass durch transgene SERCA2a-Expression eine Verbesserung des Ca^{2+} -Transportes in das kardiale SR diabetischer Ratten erreicht werden kann. Bemerkenswert ist, dass dieser günstige Effekt trotz einer manifesten diabetischen Stoffwechsellaage eintrat. Dies zeigt, dass eine gezielte, direkt auf die SERCA2a-Expression gerichtete Intervention, zur Verbesserung der beeinträchtigten SR Ca^{2+} -Transportfunktion eine therapeutische Option ist, mit der die kontraktilen Funktionen diabetischer Herzen im Experiment verbessert werden kann, obwohl die diabetische Stoffwechsellaage weiter besteht.

Sollten diese experimentellen Ergebnisse auf die Situation von Patienten mit D.m. übertragbar sein, wären zusätzlich zur konventionellen Diabetestherapie bisher nicht verfügbare Interventionen zur spezifischen Stimulierung der Expression des kardialen SERCA2a-Gens für die Aufrechterhaltung einer intakten Herzfunktion vorteilhaft.

5.3 Drucküberlasthypertrophie durch Einengung der Aorta ascendens

Eine verminderte Expression und Aktivität der Ca^{2+} -ATPase SERCA2a des SR scheint eine molekulare Hauptursache für diastolische Funktionsstörungen bei schwerer linksventrikulärer Drucküberlasthypertrophie zu sein. Es wurde deshalb untersucht, ob transgene Ratten mit moderater kardialer SERCA2a-Überexpression gegen diastolische Funktionsstörungen bei experimentell-induzierter linksventrikulärer Drucküberlasthypertrophie geschützt sind.

Bei der Etablierung des in dieser Arbeit untersuchten Drucküberlasthypertrophie-modells wurde zuerst untersucht, welchen Einfluss der Grad der Einengung der Aorta ascendens auf das Ausmaß der Myokardhypertrophie hat. Dabei wurde wie bei Wiesner et al. (202) und Feldman et al. (62) eine Hemoclip[®]-Technik benutzt. Die benutzte Hemoclip[®]-Anlegezange wurde für die Durchführung der Versuche speziell umgebaut (s. 3.7 Methoden). Da eine chronische Drucküberlasthypertrophie induziert werden sollte, die mehr eine Herzhypertrophie im Alter simuliert (29;62;62), wurde die Stenosierung bei sehr jungen Tieren vorgenommen. Der Grad der Einengung der Aorta ist determinierend für die Entwicklung und das Ausmaß einer Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz. Je stärker die Stenose der Aorta ascendens ausgeprägt ist, desto stärker muss der linke Ventrikel gegen diesen Widerstand pumpen und hypertrophiert entsprechend schnell und stark. Durch das Einbringen des Hemoclips bei sehr jungen Tieren wurde primär eine nur geringgradige Stenose verursacht. Da sich die Tiere noch im Wachstum befanden, sind sie sozusagen in die stärkere Stenose hineingewachsen, wodurch es zu keiner akuten postoperativen Belastung des Herzens kam und somit keine Gefahr für die Entwicklung des klinischen Bildes einer akuten Herzinsuffizienz bestand. Die geringe peri-

operative Sterblichkeit von 3,2 % spricht für diese Annahme. Die Myokardhypertrophie entwickelte sich langsam und simuliert somit besser die Verhältnisse beim Menschen, bei dem es in der Regel zu einer langsamen langjährigen Ausbildung einer Herzinsuffizienz kommt (101;129). Im untersuchten Tiermodell unterschieden sich die linksventrikulären Feuchtgewichte, ein Maß für den Hypertrophiegrad, zwischen den einzelnen Kollektiven mit unterschiedlichen Stenosegrad deutlich.

Die Ergebnisse belegen, dass in Abhängigkeit vom gewählten Ausmaß der Aorteneinengung eine unterschiedlich stark ausgeprägte Hypertrophie des linken Ventrikels ausgelöst werden kann. Als Zeichen einer beginnenden Linksherzinsuffizienz können insbesondere der Anstieg der Feuchtgewichte des rechten Ventrikels bis zu 48 %, der Vorhöfe um bis zu 126 % und der Lungenfeuchtgewichte bei TGR- und WT-AS 0.4 gewertet werden. Die Verdopplung des Lungenfeuchtgewichts bei TGR- und WT-AS 0.4 ist auf eine gesteigerte Flüssigkeitseinlagerung im Lungengewebe zurückzuführen (70). Dieses vorliegende Lungenödem weist zusammen mit der Massenzunahme des Vorhofmyokards ganz klar auf das Vorliegen einer Stauungssymptomatik im kleinen Kreislauf hin. Im Gegensatz dazu wurden im großen Kreislauf keine Stauungssymptome festgestellt. Dafür sprechen die unveränderten Leberfeuchtgewichte bei TGR-AS 0.4 und WT-AS 0.4. Die in dieser Arbeit angegebenen Vorhofgewichte beziehen sich auf die Summe der Muskelmasse vom linken und rechten Atrium. Leider wurden diese Werte nicht separat für das linke und rechte Atrium bestimmt. Aufgrund der oben genannten Lungen- und Lebergewichtscharakteristik ist allerdings davon auszugehen, dass die beobachtete stenosebedingte Massenzunahme des Vorhofmyokards vorrangig durch eine Hypertrophie des rechten Vorhof zustande gekommen ist. Bemerkenswert ist, dass die relative Gewichtszunahme der Vorhöfe insgesamt wesentlich stärker ausgeprägt war als die des linken Ventrikels. Folgende Erklärungsmöglichkeiten sind dafür denkbar:

- a) Durch den Blutrückstau kam es im rechten Ventrikel und den Vorhöfen zu einer Wanddehnung und zu einer Zunahme der Wandspannung. Dieser Wachstumsreiz bewirkte ein hypertrophes Wachstum. Das stark erhöhte Lungengewicht bei der stärksten Aorteneinengung lässt auf eine erhöhte Mitbelastung des rechten Ventrikels und der Atrien schließen.
- b) Wachstumsreize können über endokrine, parakrine, autokrine oder nervale Mechanismen vermittelt werden. So ist z.B. gut belegt, dass bei Herzinsuffizienz der Sympathikotonus erhöht und die Herzfrequenz im Vergleich zum normalen physiologischen Zustand gesteigert ist (68;72). Es ist auch nachgewiesen worden, dass eine alleinige chronische Erhöhung der Herzfrequenz eine Myokardhypertrophie und -Insuffizienz auslösen kann (69). An dem von

uns untersuchten Drucküberlastmodell kann dies mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Entscheidend dürfte ein gesteigerter Sympathikotonus sein.

- c) Im normalen, nicht pathologisch belasteten Herzen sind Gewicht und Myozytendurchmesser des rechten Ventrikels und der Atrien (31;66) bedeutend geringer als im linken Ventrikel. Aufgrund dieser Tatsache fallen relative Gewichtszunahmen im Atrium größer aus als im Ventrikelmyokard. Tatsächlich besitzen die kleineren rechtsventrikulären und atrialen Myozyten ein größeres Wachstumspotential als die Kardiomyozyten des linken Ventrikels (32).

Insgesamt wurden bei den Gewichtsparametern keine signifikanten Unterschiede zwischen TGR und WT mit Aortenkonstriktion gefunden. Das lässt vermuten, dass Unterschiede in der SERCA2a-Expression und damit möglicherweise verbundenen Veränderungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase ohne Einfluss auf dieses Modell sind.

Die durch Gewichtsbestimmung belegte Massenzunahme des linken Ventrikels konnte auf zellulärer Ebene durch den Nachweis vergrößerter Kardiomyozytendurchmesser histologisch bestätigt werden (5;44). Ebenso kam es unter der Drucküberlasthypertrophie zu einer Zunahme der extrazellulären Kollagenmatrix. Eine Assoziation von myokardialer Fibrose, erhöhter myokardialer Steifigkeit und einer erniedrigten systolischen Funktion ist für das hypertrophierte und insuffiziente Herz mehrfach beschrieben worden (41;199). Interessanterweise wurden bei WT-AS 0.4 im Vergleich zu hypertrophierten Herzen SERCA2a-transgener Tiere größere Kardiomyozytendurchmesser und eine vermehrte extrazelluläre Fibrose beobachtet, obwohl sich die linksventrikulären Feuchtgewichte in beiden Gruppen nicht unterschieden. Die Ursache für diese Diskrepanz ist unklar. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Unterschiede der Myozytendurchmesser von hypertrophierten TGR und WT methodisch durch die benutzte Diffusionsfixierung von LV-Myokardproben bedingt ist. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass eine prozentual nur sehr geringen Gesamterhöhung des Herzgewichtes aufgrund der individuellen Streuung der Tiere nicht zum Tragen kommt.

Die vergrößerte linksventrikuläre Muskelmasse spiegelte sich auch in einer Zunahme des entwickelten systolischen Drucks des linken Ventrikels wieder (54;91). Der Anstieg dieses Druckes ist mit dem erhöhten Widerstand in der stenosierten Aorta ascendens zu erklären, den das hypertrophierte Myokard bei jeder Pumpaktion überwinden muss. Der erhöhte entwickelte LVP bei TGR-AS 0.4 und WT-AS 0.4 sechs Wochen nach Stenosierung weist auf eine kompensierte linksventrikuläre Hypertrophie mit intakter systolischer Funktion hin. Es ist deshalb davon auszugehen, dass es bei dem vorliegenden Tiermodell erst nach wesentlich längeren Zeiträumen

zur Entwicklung einer systolischen Dysfunktion kommt. Erst dann ist mit verminderten LVP-Werten zu rechnen (54;91). Im Gegensatz dazu liegt sechs Wochen nach Aortenstenosierung bei WT-AS 0.4 eine diastolische Funktionsstörung vor. Die Erhöhung des LVEDP ist ein Indiz für diese Annahme. Diese Ergebnisse bestätigen Befunde anderer Arbeitsgruppen (62). Interessanterweise wurde ein Anstieg des LVEDP bei SERCA2a-transgenen Tieren mit 0.4er Aortenstenose nicht beobachtet. Auch der normierte Relaxationsparameter $-dP/dt_{\max}/LVP$ zeigt einen starken Abfall bei WT-AS-0.4, der bei TGR-AS-0.4 aufgehoben ist und keinen Unterschied zu Werten von TGR- und WT-Sh zeigt. Somit konnte erstmalig an einem Drucküberlasthypertrophie-Rattenmodell gezeigt werden, dass eine SERCA2a-Überexpression bei gesunden Tieren und nachfolgend induzierter chronischer Drucküberlasthypertrophie vor der Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion schützt. Ausgehend von diesen Ergebnissen muss allerdings offen bleiben, ob eine verbesserte Ausstattung des SR mit Ca^{2+} -Pumpen die Ausbildung einer diastolischen Dysfunktion bei nachfolgend induzierter LV-Drucküberlasthypertrophie grundsätzlich verhindert; oder ob die Prozesse, die zu diesen Funktionsstörungen führen, nur verlangsamt werden. Zur Beantwortung dieser Frage wären zusätzliche Verlaufsexperimente erforderlich, die denen in dieser Arbeit gewählten Versuchszeitraum von sechs Wochen deutlich übersteigen. Da zu vermuten war, dass die oben genannten hämodynamischen Unterschiede mit einer verbesserten Ca^{2+} -Transportfunktion des kardialen SR SERCA2a-transgener Tiere beruhen, wurde die Ca^{2+} -Transportaktivität *in vitro* untersucht. Wie erwartet lagen die Werte des SERCA2a-katalysierten Ca^{2+} -Transportes in linksventrikulären Homogenaten von scheinoperierten TGR über denen von scheinoperierten WT (+28 %, $p < 0,05$). Dieser Unterschied entspricht dem zwischen WT und TGR ohne vorherigen operativen Eingriff (siehe Ergebnisse 4.4.4) (195).

Bemerkenswert ist, dass im hypertrophierten Myokard von SERCA2a-TGR und WT im Vergleich zu scheinoperierten Ratten selbst bei der stärksten Aortenstenose von 0.4 mm nach 6-wöchiger Versuchsdauer keine signifikante Abnahme des *in vitro* gemessenen SR Ca^{2+} -Transportes beobachtet werden konnte. Das widerspricht früheren Befunden die bei Untersuchungen an Herzen mit dekompensierter Myokardhypertrophie beschrieben wurden (79). Es lässt vermuten, dass *in vitro* eine Funktionseinschränkung des Ca^{2+} -Transportsystems des SR nur bei dekompensierter Hypertrophie nachweisbar ist. Ergebnisse von Feldman und Mitarbeitern unterstützen diese Annahme(62). Da mögliche hypertrophiebedingte Veränderungen der SERCA2a-Aktivitätsveränderungen auf Proteinebene hier nicht feststellbar waren, wurden zusätzlich die SERCA2a-mRNA-Spiegel analysiert. Wie bereits früher für nicht operierte SERCA2a-TGR berichtet (195), lagen die SERCA2a-mRNA-Spiegel scheinoperierter TGR deutlich über denen

scheinoperierter WT. In hypertrophierten Herzen von WT fanden sich nach 6-wöchiger Drucküberlast im Vergleich zu scheinoperierten Tieren signifikant verminderte SERCA2a-mRNA-Spiegel (159), nicht jedoch bei TGR mit linksventrikulärer Hypertrophie. Wurden diese Werte auf GAPDH normiert, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede des SERCA2/GAPDH-Quotienten zwischen scheinoperierten und hypertrophierten WT, sowie zwischen scheinoperierten und hypertrophierten TGR, obwohl eine tendenzielle Verringerung des Quotienten von WT und TGR mit Drucküberlasthypertrophie beobachtet wurde. Insgesamt entsprechen somit die Befunde zur SERCA2a-Expression auf mRNA-Ebene den Ergebnissen auf Proteinebene. Dies entspricht den Befunden von Feldman et al. (62) zur SERCA2a-Expression auf mRNA-Ebene bei Ratten mit kompensierter linksventrikulärer Hypertrophie. Somit kann geschlossen werden, dass sich hypertrophierte Herzen von WT und TGR trotz einer Einengung der Aorta mit einem 0.4 mm Clip nach 6 Wochen zumindest bezüglich der systolischen Funktionsparameter noch in einem kompensierten Stadium befanden. Mit einem Abfall der SERCA2a-mRNA und -Proteinspiegel ist deshalb sehr wahrscheinlich erst bei einer länger bestehenden Aortenstenose zu rechnen (83). Tatsächlich wurden sowohl bei Herzinsuffizienz infolge dekomensierter Drucküberlasthypertrophie im Nagermode (62;62;91;152) als auch bei terminaler Herzinsuffizienz von humanen Herzen um bis zu 30 % verminderte (162) SERCA2a-Protein- und -mRNA-Spiegel von verschiedenen Gruppen nachgewiesen (83;83).