

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

DISSERTATION

Vergleich der kontraktilen Funktion isolierter perfundierter Herzen  
mRen2 transgener und mRen2/SERCA2 doppelt transgener Ratten bei  
Normoxie, globaler Ischämie und Reperfusion

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Kluge

aus Lutherstadt Wittenberg

Datum der Promotion: 04. September 2015

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abstracts</b>		<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>		<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>		<b>XI</b>
<b>1. Einleitung</b>		<b>12</b>
1.1	Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation im gesunden Myokard	13
1.2	Veränderungen der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase bei kardialer Hypertrophie und Insuffizienz	15
1.3	Das Renin-transgene Rattenmodell – pathophysiologische Prinzipien der Renin induzierten arteriellen Hypertonie, Myokardhypertrophie und kardialer Fibrose	17
1.4	Veränderung des $\text{Ca}^{2+}$ -Transports durch Ischämie-Reperfusion	19
1.5	SERCA2a als mögliches Ziel gentherapeutischer Ansätze zur Therapie und Prophylaxe kardialer Hypertrophie und Insuffizienz	19
1.6	Zielsetzung der Arbeit	21
<b>2. Methoden</b>		<b>23</b>
2.1	Haltung der Versuchstiere	23
2.2	Genotypisierung	23
2.3	Bestimmung der SERCA-mRNA-Spiegel	24
2.3.1	RNA-Isolierung	24
2.3.2	RNA-Dot Blot	25
2.4	Hydroxyprolinbestimmung	27
2.5	$\text{Na}^+$ -Gradient getriebener $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transport über den $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher des Sarkolemm	28
2.5.1	Herstellung von Grobmembranpräparaten	28
2.5.2	Bestimmung des $\text{Na}^+$ -Gradient getriebenen $\text{Ca}^{2+}$ -Transports über den sarkolemmalen $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher	29
2.6	Isoliertes, retrograd perfundiertes Rattenherz	31
2.6.1	Perfusionsapparatur	31
2.6.2	Krebs-Henseleit-Perfusionslösung	32
2.6.3	Perfusion mit Isoproterenol	32
2.6.4	Isolation und Präparation der Rattenherzen	32
2.6.5	Versuchsprotokoll	34
2.6.6	Datenverarbeitung	34
2.7	Statistik	36

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Tiermodelle	37
3.2	SERCA2a-mRNA-Spiegel mit Dot Blot-Analyse	38
3.3	Allgemeine Charakterisierung der Versuchstiere	39
3.3.1	Linksventrikulärer Hydroxyprolinegehalt	40
3.3.2	Na <sup>+</sup> -Gradient getriebener <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> -Transport über den Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher des Sarkolemm	40
3.4	Linksventrikuläre kontraktile Funktion unter basalen Bedingungen	41
3.4.1	Systolische Funktionsparameter	41
3.4.1.1	Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP)	41
3.4.1.2	Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt <sub>max</sub> )	43
3.4.1.3	Druck-Frequenz-Produkt (rate*pressure)	45
3.4.1.4	Zeitspanne bis zur maximalen Druckentwicklung (time to peak)	45
3.4.2	Diastolische Funktionsparameter	46
3.4.2.1	Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (-dP/dt <sub>max</sub> )	46
3.4.2.2	Zeitspanne bis zum 50%igen linksventrikulären Druckabfall (pressure-halftime)	48
3.4.2.3	Zeitkonstante der zweiten Hälfte der Relaxationsphase (Tau)	48
3.5	Linksventrikuläre kontraktile Funktion unter globaler Ischämie	49
3.5.1	LVdP	49
3.5.2	+dP/dt <sub>max</sub>	50
3.5.3	-dP/dt <sub>max</sub>	50
3.5.4	LVEDP	51
3.6	Linksventrikuläre kontraktile Funktion während 40 Minuten Reperfusionzeit	52
3.6.1	LVdP	52
3.6.2	Rate*pressure	53
3.6.3	+dP/dt <sub>max</sub>	54
3.6.4	-dP/dt <sub>max</sub>	55
3.6.5	LVEDP	56
3.6.6	Herzfrequenz	57
3.6.7	Time to peak	58
3.6.8	Pressure-halftime	59
3.6.9	Tau	59
3.7	Linksventrikuläre kontraktile Funktion unter β-adrenerger Stimulation mit Isoproterenol	60
3.7.1	LVdP	60
3.7.2	+dP/dt <sub>max</sub>	61
3.7.3	-dP/dtmax	62
3.7.4	LVEDP	63
3.7.5	Herzfrequenz	64
3.7.6	Time to peak	64
3.7.7	Pressure-halftime	65
3.7.8	Tau	66
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1	Einleitung	67
4.2	Das (mRen2) 27-transgene Rattenmodell – myokardiale Hypertrophie und Fibrose	68

4.3	SERCA2a/ Ren2-doppelt transgene Ratten – Einfluss des SERCA2a-Transgens auf myokardiales Remodeling	70
4.4	Kontraktile Funktion von Ren2- und SERCA2a/ Ren2-transgenen Ratten unter Normoxie	71
4.5	Na <sup>+</sup> / Ca <sup>2+</sup> -Austauscher-Aktivität	75
4.6	Veränderung kardialer Eigenschaften unter globaler Ischämie und Reperfusion	77
4.7	β-adrenerge Stimulierbarkeit nach Ischämie – Reperfusion	82
5.	Zusammenfassung	85
6.	Literaturverzeichnis	87
7.	Anhang	94
7.1	Eidesstattliche Versicherung	94
7.2	Lebenslauf	95
7.3	Veröffentlichung	97
7.4	Danksagung	98

## Abstracts

### Vergleich der kontraktilen Funktion isolierter perfundierter Herzen mRen2 transgener und mRen2/ SERCA2 doppelt transgener Ratten bei Normoxie, globaler Ischämie und Reperfusion

**Einleitung:** Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, insbesondere ein herabgesetzter SERCA2 vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das Sarkoplasmatische Retikulum, tragen zu einer verminderten kontraktilen Funktion in hypertrophierten Herzen bei. Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die zusätzliche Expression eines SERCA2a-Transgens in hypertensive (mRen2)27-transgene Ratten (Ren2) die kontraktile Funktion und das kardiale Remodelling positiv beeinflussen können.

**Methodik:** Ren2 und doppelt transgene Ren2/ SERCA2 Ratten (SERen) wurden durch Verpaarung heterozygoter SERCA2 transgener weiblicher Ratten mit homozygoten männlichen Ren2-Tieren generiert. Wildtyp Sprague-Dawley-Ratten wurden als Kontrollen (NTG) herangezogen. Der linksventrikuläre (LV) Druck von isolierten, retrograd nach Langendorff perfundierten Herzen von 30-34 Wochen alten männlichen Ratten wurde unter konstanter Flussrate gefolgt von 20 min globaler Ischämie (I) und 40 min Reperfusion (R) gemessen. Anschließend wurden die Herzen präpariert, gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Druckmessung wurde ein flüssigkeitsgefüllter Ballon (Füllungsdruck 10-12mmHg), verbunden mit einem PC-basierten Aufzeichnungssystem, verwendet.

**Ergebnisse:** Die kardialen SERCA2a mRNA-Spiegel waren in SERen 1,7-fach höher als in Ren2 und NTG ( $p < 0,05$  vs. NTG und Ren2). Im Vergleich zu NTG wurden in SERen und NTG erhöhte Werte der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher-Aktivitäten von +78% und +96%, der relativen LV-Feuchtwichte von +33% und +29% sowie der Hydroxyprolinegehalte von +34% und +48% ermittelt ( $p < 0,05$  vs. NTG). Die Herzen von SERen und Ren2 entwickelten einen 1,2-fach höheren maximalen LV-Druck (LVDP), jedoch unterschieden sich die Werte für  $+dP/dt_{\max}/LVdP$  zwischen allen Gruppen nicht. Die  $-dP/dt_{\max}/LVdP$ -Werte zeigten sich dagegen in SERen und Ren2 um 14% erniedrigt ( $p < 0,05$  vs. NTG) und wiesen auf eine diastolische Dysfunktion hin. Dieses Ergebnis wurde unter einheitlicher, stimulierter Herzfrequenz von 5Hz bestätigt. Die Herzen beider transgener Versuchsgruppen waren im Vergleich zu NTG weniger anfällig für I/R-Schäden. So stellte sich die maximale ischämische Kontraktur von NTG im Vergleich zu SERen und Ren2 entsprechend um 2,2 und 2,4-fach erhöht dar. Im Laufe der Reperfusion erreichten die transgenen Versuchsgruppen hinsichtlich des LVdP die präischämischen Werte während NTG das 75%-Niveau nicht überstieg. Dagegen entwickelten die NTG-Herzen nach I/R-Exposition unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit 20nM Isoproterenol eine ausgeprägte positiv-inotrope Reaktion, die bei den transgenen Herzen nicht zu verzeichnen war.

**Schlussfolgerung:** Die zusätzliche Expression eines SERCA2a-Transgens hat keinen Einfluss auf die LV Hypertrophie, Fibrose und diastolische Dysfunktion Transgens in hypertensiven, nach Langendorf perfundierten Ren2-Herzen. Dies zeigt sich sowohl unter konstantem Fluss als auch unter den Bedingungen einer globalen Ischämie und Reperfusion.

**Contractile function of isolated hearts from mRen2 transgenic and mRen2/SERCA2 double transgenic rats in normoxia and ischemia/reperfusion**

**Objectives:** Altered SERCA2-mediated sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -transport may contribute to impaired  $\text{Ca}^{2+}$  cycling and contractile dysfunction in hypertension-induced heart hypertrophy. The aim of the study was to examine whether additional expression of a SERCA2a transgene in hypertensive (mRen2)<sup>27</sup>-transgenic rats (Ren2) is capable of modifying both cardiac function and remodelling.

**Methods:** Ren2 and double transgenic Ren2/SERCA2 rats (SERen) were generated by interbreeding of homozygous Ren2 males and heterozygous SERCA2-transgenic females. Wild-type Sprague-Dawley rats (NTG) were used as controls. The pressure (P) in the left ventricle (LV) of isolated Langendorff-perfused hearts of 30-34 weeks old males was measured during constant perfusate flow and a subsequent 20 min lasting global (zero-flow) ischemia (I) followed by 40 min of reperfusion (R). Thereafter, hearts were then dissected, weighted, frozen in liquid  $\text{N}_2$  and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for later analyses. For P measurements, a liquid filled balloon (filling pressure 10-12 mmHg) connected to a pressure recording PC-based system was used.

**Results:** Cardiac SERCA2a mRNA levels were 1.7-fold higher in SERen compared to Ren2 ( $p < 0.05$ ). The latter levels did not differ from NTG. Compared to NTG, increased sarcolemmal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  activities of +78% and +96%, relative LV wet weights of +33% and +29% as well as LV OH-proline of +34% and +48% were found in SERen and Ren2, respectively ( $p < 0.05$  vs. NTG each). The hearts of SERen and Ren2 developed a 1.2-fold higher maximal LV pressure (LVdP) but  $+\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}/\text{LVdP}$  values did not differ between all groups. Notably,  $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}/\text{LVdP}$  values were reduced by 14% in both SERen and Ren2 ( $p < 0.05$  vs. NTG) indicating diastolic dysfunction. This finding was confirmed in 5 Hz-paced hearts. The hearts of both transgenic groups were less susceptible to I/R injury than those of NTG. Thus, the maximum ischemic contracture of NTG was 2.2- and 2.4-fold higher than in SERen and Ren2, respectively. During reperfusion, the latter reached pre-ischemic LVdP values, but LVdP did not exceed 75% of the pre-ischemic level in reperfused NTG hearts. By contrast, I/R-injured hearts of NTG exhibited a distinct positive inotropic response to  $\beta$ -adrenergic stimulation with 20 nM isoproterenol which was lacking in SERen and Ren2.

**Conclusion:** Thus, additional expression of a SERCA2a transgene in hypertensive Ren2 does not modify the degree of LV hypertrophy, fibrosis and diastolic dysfunction. This holds also true for the attenuated functional I/R injury of Langendorff-perfused Ren2 hearts.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AT1	Angiotensin Typ I-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BW	linksventrikuläres Gewicht
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> / Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalie-Virus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphaten
+dP/dt <sub>max</sub>	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit der Systole
-dP/dt <sub>max</sub>	maximale Druckabfallgeschwindigkeit der Diastole
dsDNA	Doppelstrang Desoxyribonucleinsäure
ECC	elektromechanische Kopplung
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie
FKBP12.6	Protein Calstabin2
GTC	Guanidinisothiocyanat
Hf	Herzfrequenz
HI	Herzinsuffizienz
I <sub>ca</sub>	Trigger-Ca <sup>2+</sup>
I-R-Versuche	Ischämie-Reperusionsversuche
K <sup>+</sup>	Kaliumion
LV	linksventrikulär
LVdP	maximaler linksventrikulärer Druck



LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVW	linksventrikuläres Feuchtgewicht
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
MEF2	myocyte enhancer factor 2
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
Na <sup>+</sup>	Natriumion
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NCX	sarkolemmaler Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
NCX <sub>F</sub>	forward mode sarkolemmaler Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
NCX <sub>R</sub>	reverse mode sarkolemmaler Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NTG	transgen negative Ratten
OD	optische Dichte
o. g.	oben genannt
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
p-DAB	p-Dimethylaminobenzaldehyd
PHT	pressure halftime
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
RAS	Renin-Angiotensin-System
Ren2	(mRen2)27-transgenes Rattenmodell
RNA	Ribonukleinsäure
RyR	Ryanodinrezeptor
RyR2	kardiale Isoform des Ryanodinrezeptors
SD	Sprague Dawley
SERCA2a	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SERen	SERCA2a/(mRen2)27-doppelt transgenes Rattenmodell
SHR	spontan hypertensive Ratten
sog.	so genannt
SR	Sarkoplasmatischen Retikulums
ssDNA	Einzelstrang Desoxyribonucleinsäure
Tab	Tabelle

TtP	time to peak
vs.	versus
$\alpha$ -MHC	$\alpha$ -Myosin Schwere Ketten
$\beta$ -MHC	$\beta$ -Myosin Schwere Ketten

## Abbildungsverzeichnis

Nummer	Abbildungsbezeichnung	Seite
1	Schematischer Überblick der an der elektromechanischen Kopplung beteiligten $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-Prozesse und ausgewählte Regulierungsmechanismen	15
2	Darstellung der extinktionsphotometrischen Bestimmung einer Standardreihe mit bekannten Hydroxyprolinkonzentrationen	28
3	Perfusionsanlage	31
4	Protokoll des Ischämie-Reperfusionsversuchs	34
5	Darstellung der Ergebnisse der quantitativen Northern-Dotblot-Analyse der linksventrikulären SERCA2a-mRNA-Spiegel von Renin-transgenen (Ren2), SERCA2a/Ren2 doppelt transgenen (SERen) und nicht transgenen Kontrolltieren (NTG).	38
6	Hydroxyprolingehalte im linken Ventrikel Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.	40
7	Sarkolemmale $\text{Na}^+$ -abhängige $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität in quantitativ isolierten linksventrikulären Grobmembranpräparaten	41
8	Darstellung des maximal entwickelten linksventrikulären systolischen Druckes isovolumetrisch kontrahierender isolierter Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.	42
9	Beziehung zwischen relativem linksventrikulären Feuchtgewicht (LVW/ BW) und maximal entwickeltem linksventrikulären systolischen Druck (LVdP) isovolumetrisch kontrahierender isolierter Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Perfusionsbedingungen ohne elektrische Stimulation.	43
10	Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.	44
11	Darstellung des Zusammenhangs zwischen maximal entwickeltem linksventrikulären systolischen Druck (LVdP) und maximaler linksventrikulärer Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $+\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ ) isovolumetrisch kontrahierender isolierter Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.	44
12	Druck-Frequenz-Produkt isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.	45
13	Zeitspanne ausgehend vom basalen linksventrikulären diastolischen Druck bis zum Erreichen des maximalen linksventrikulären systolischen Drucks (time to peak) isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.	45

<b>14</b>	Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.	<b>46</b>
<b>15</b>	Darstellung des Zusammenhangs zwischen maximal entwickeltem linksventrikulären systolischen Druck (LVdP) und maximaler linksventrikulärer Druckabfallsgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{max}$ ) isovolumetrisch kontrahierender isolierter Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.	<b>47</b>
<b>16</b>	Zeit des linksventrikulären Druckabfalls von 100% auf 50% des maximalen linksventrikulären systolischen Drucks (pressure-halftime) von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) unter basalen Bedingungen.	<b>48</b>
<b>17</b>	Zeitkonstante Tau des linksventrikulären Druckabfalls ausgehend von 50% des maximalen linksventrikulären systolischen Drucks bis zum Erreichen des basalen diastolischen Drucks von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.	<b>48</b>
<b>18</b>	Entwicklung des maximalen linksventrikulären Drucks während der ersten vier Minuten der Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten ausgehend vom basalen linksventrikulären Druck.	<b>49</b>
<b>19</b>	Entwicklung der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit während der ersten vier Minuten der Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten ausgehend vom Basalwert der Druckanstiegsgeschwindigkeit.	<b>50</b>
<b>20</b>	Entwicklung der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit während der ersten vier Minuten der Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten ausgehend vom Basalwert der Druckabfallsgeschwindigkeit.	<b>51</b>
<b>21</b>	Entwicklung des basalen linksventrikulären diastolischen Drucks während 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten ausgehend vom Basalwert des linksventrikulären diastolischen Drucks.	<b>51</b>
<b>22</b>	Entwicklung des maximalen linksventrikulären Drucks während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.	<b>53</b>
<b>23</b>	Entwicklung des Druck-Frequenz-Produkts während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.	<b>54</b>

<b>24</b>	Entwicklung der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.	<b>55</b>
<b>25</b>	Entwicklung der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.	<b>56</b>
<b>26</b>	Entwicklung des basalen linksventrikulären diastolischen Drucks während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.	<b>57</b>
<b>27</b>	Entwicklung der Herzfrequenz während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.	<b>58</b>
<b>28</b>	Entwicklung der time to peak während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.	<b>58</b>
<b>29</b>	Entwicklung der pressure-halftime während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.	<b>59</b>
<b>30</b>	Entwicklung von Tau während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.	<b>59</b>
<b>31</b>	Entwicklung des maximalen linksventrikulären Drucks unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfu-sionsversuch.	<b>60</b>
<b>32</b>	Entwicklung der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfu-sionsversuch.	<b>62</b>
<b>33</b>	Entwicklung der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfu-sionsversuch.	<b>62</b>
<b>34</b>	Entwicklung des basalen linksventrikulären diastolischen Drucks unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfu-sionsversuch.	<b>63</b>
<b>35</b>	Entwicklung der Herzfrequenz unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfu-sionsversuch.	<b>64</b>

<b>36</b>	Entwicklung von time to peak unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfusionversuch.	<b>65</b>
<b>37</b>	Entwicklung von pressure-half-time unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfusionversuch.	<b>65</b>
<b>38</b>	Entwicklung von Tau unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfusionversuch.	<b>66</b>

## Tabellenverzeichnis

Nummer	Tabellenbezeichnung	Seite
1	Absolute und relative Feuchtgewichte des linken und rechten Ventrikels, Körpergewichte sowie basale Herzfrequenzen retrograd perfundierter isolierter Herzen von 30 Wochen alten nichttransgenen (NTG), Renintransgenen (Ren2) und SERCA2a/ Renin-doppelt transgenen (SERen) männlichen Ratten.	39

## 1. Einleitung

In den Industriestaaten stellt die Herzinsuffizienz (HI) mit der Verschiebung der Altersstruktur der Gesellschaft und dem medizinisch-technischen Fortschritt eine Diagnose von wachsender medizinischer und gesundheitsökonomischer Bedeutung dar. Im Jahr 2012 erfolgte in Deutschland bei 386548 Patienten eine stationäre Behandlung aufgrund der Diagnose Herzinsuffizienz. Im Jahr 2000 wurden lediglich 239694 Patienten mit der Diagnose HI stationär behandelt <sup>1</sup>. Die Europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC) geht von einer Prävalenz von 2-3 % in der Gesamtbevölkerung aus, die nach dem 65igsten Lebensjahr drastisch zunimmt. So wird in der Altersgruppe zwischen 70 und 80 Jahren eine Prävalenz zwischen 10 % und 20 % erreicht <sup>2</sup>.

Obwohl in den letzten Jahren durch moderne Therapiemöglichkeiten die Morbidität und Mortalität der HI deutlich gesenkt werden konnte, wird die 5-Jahressterblichkeit unabhängig von Schweregrad und Therapie mit 62,5 % beziffert <sup>3-5</sup>.

Die HI bezeichnet ein klinisches Syndrom, dessen Definition von verschiedenen kardiologischen Gesellschaften uneinheitlich vorgenommen wird. Die ESC benennt folgenden Kriterien für die Diagnosestellung: typische Symptome einer HI (z. B. Dyspnoe in Ruhe oder Belastung, rasche Ermüdbarkeit, Schwellung im Bereich der Sprunggelenke), typische klinische Zeichen einer HI (z. B. Tachykardie, Tachypnoe, Pleuraergüsse, Hepatomegalie, periphere Ödeme) und objektivierbare Befunde struktureller oder funktioneller kardialer Veränderungen (z. B. Kardiomegalie, Herzgeräusche) <sup>2</sup>.

Eine Vielzahl von kausalen Faktoren, darunter Koronare Herzkrankheit, insbesondere akuter Myokardinfarkt, arterieller Hypertonus, Diabetes, Adipositas und Kardiomyopathien, kann die Entstehung einer HI bedingen <sup>2, 6</sup>. Die resultierende Schädigung des Myokards führt zu einer Reihe maladaptiver Mechanismen, die zur Entwicklung einer HI führen. In Folge der herabgesetzten kardialen Pumpleistung kommt es zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und des sympathischen Nervensystems. Dadurch werden eine Reihe von strukturellen und funktionellen Veränderungen ausgelöst, bei der die Entwicklung einer Hypertrophie und die kontraktile Dysfunktion die entscheidenden Pathomechanismen für die HI darstellen <sup>6, 7</sup>. Die kontraktile Funktion wird dabei entscheidend von der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Homöostase beeinflusst. Im insuffizienten Herzen sind Störungen des  $Ca^{2+}$ -Transports über das Sarkolemm und die Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) vielfach beschrieben worden. Diese Störungen werden durch veränderte Funktion und Expression von  $Ca^{2+}$  transportierenden Proteinen vermittelt. In diesem Zusammenhang konnte in vielen tierexperimentellen Untersuchungen und an humanen Herzen eine verminderte Expression der kardialen SR- $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) und eine gestei-



gerte Expression, bzw. Funktion des sarkolemmalen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) nachgewiesen werden<sup>8-11</sup>.

Für die Untersuchung von kontraktile Funktion und  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportprozessen hypertrophierter Herzen können verschiedene Tiermodelle mit kardialer Hypertrophie herangezogen werden, darunter spontan-hypertensive Rattenmodelle, operativ-induzierte Drucküberlastmodelle durch Aortenligatur und monogenetische Hypertoniemodelle, wie z.B. das Renin transgene Rattenmodell. In der vorliegenden Arbeit wird das monogenetische (mRen2)27-transgene Rattenmodell (Ren2) untersucht. Durch die zusätzliche Implementierung eines SERCA2a-Transgens in dem doppelt transgenen SERCA2a/ Ren2-transgenen Modell (SERen) soll untersucht werden, inwieweit eine SERCA2a-Überexpression die kontraktile Funktion der hypertrophierten Herzen beeinflusst. Dazu werden die Herzen isoliert und retrograd nach Langendorff perfundiert. Neben der allgemeinen Charakterisierung der kontraktile Funktion der Ren2 und SERen Tiere unter Normoxie wird auch die kardiale Funktion nach globaler Ischämie und Reperfusion untersucht. Auch bei Ischämie-Reperfusionsschäden spielen veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportmechanismen mit folgender intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung eine entscheidende Rolle<sup>12-14</sup>. So soll auch hier der Einfluss der SERCA2a-Überexpression auf die kontraktile Funktion während der Reperfusion überprüft werden.

## 1.1 Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation im gesunden Myokard

$\text{Ca}^{2+}$  stellt in der Herzmuskelzelle einen wichtigen intrazellulären second messenger dar, der neben der Transduktion elektrischer Signale und der Modulation der Transkription verschiedener Gene auch für die Aktivierung der Myofilamente verantwortlich ist.

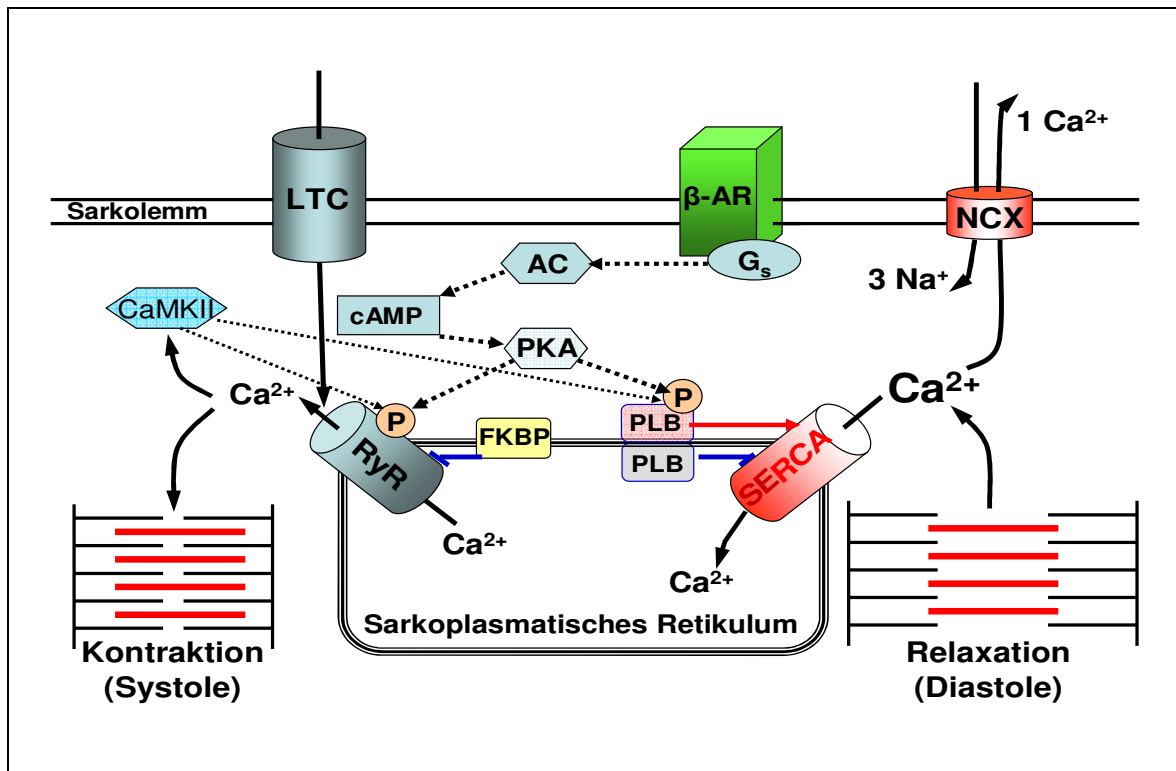
Der Kontraktionsablauf wird durch die elektromechanische Kopplung (ECC) reguliert. So erfolgt während der Membrandepolarisation der Einstrom des sog. Trigger- $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) über die Aktivierung von spannungsabhängigen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in den T-Tubuli des Sarkolemms. Dieser  $I_{\text{Ca}}$  trägt entscheidend zur Platteauphase des Aktionspotentials bei. Durch die räumliche Nähe der sarkolemmalen T-Tubuli und der SR-Membran sind die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle, die kardialen Isoformen der Ryanodinrezeptoren (RyR), in Clustern assoziiert. Der  $I_{\text{Ca}}$ -vermittelte Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Bereich der Cluster auf 10-20  $\mu\text{M}$  aktiviert die RyR und es kommt somit zur Freisetzung des Aktivator- $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR mit einem 10-fachen Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration<sup>15</sup>. Die kardiale Isoform RyR2 ist ein großer homotetramerer Kanal in der SR-Membran an dessen zytoplasmatische Domäne Kinasen und Phosphatasen, darunter Proteinkinase A (PKA),  $\text{Ca}^{2+}$ / Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) und Proteinphosphatase 1 und 2A (PP1 und PP2A) direkt assoziiert sind. Die

Phosphorylierung des RyR durch die cAMP abhängige PKA steigert die RyR-Aktivität während der frühen Phase des ECC. Die Phosphorylierung durch CaMKII erhöht ebenfalls die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals. Die Bedeutung der PP1 wird kontrovers diskutiert, da sowohl steigernde als auch verminderte Effekte auf die Aktivität des RyR nachgewiesen wurden. Ein wichtiges, ebenfalls an den RyR assoziiertes Protein ist FKBP12.6, das auch als Calstabin2 bezeichnet wird. Dieses Protein stabilisiert den geschlossenen Zustand des RyR und verhindert somit diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Verluste aus dem SR. Anders als die CaMKII bewirkt die PKA-vermittelte Phosphorylierung des Kanals eine Dissoziation von FKBP12.6 von RyR und damit eine erhöhte Offenheitswahrscheinlichkeit<sup>16, 17</sup>.

Durch die Bindung des Aktivator- $\text{Ca}^{2+}$  an das Sensorprotein Troponin C wird die Inhibition der Aktin-Myosin-Interaktion durch Troponin I aufgehoben und es erfolgt die Kontraktion des Kardiomyozyten<sup>18</sup>. Die Inaktivierung von  $I_{\text{Ca}}$  geschieht spannungs- aber vor allem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Steigt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgt die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Calmodulin und dieser Komplex inaktiviert  $I_{\text{Ca}}$ <sup>19</sup>. Die Inaktivierung der RyR2 scheint in bestimmendem Maße über die sinkende SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ausgelöst zu werden<sup>20</sup>. Die diastolische Relaxation wird über eine Senkung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über den Transport in extra- und intrazelluläre Kompartimente und eine Dissoziation von  $\text{Ca}^{2+}$  von Troponin C ausgelöst. Der Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR über die die kardiale Isoform der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) trägt im humanen Herzen mit ca. 70 %, der sarkolemmale  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) mit ca. 28 % zur diastolischen Senkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei. Ein geringer Teil des  $\text{Ca}^{2+}$ , ca. 1 %, wird über die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter in den Extrazellularraum und in die Mitochondrien befördert<sup>15</sup>.

Die SERCA2a erhält einen 1000-fachen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsgradienten über die Membran des SR aufrecht. Die Funktion und Aktivierung wird durch zahlreiche Mechanismen beeinflusst. Die wichtigste Modulation der SERCA2a-Funktion erfolgt über das Phosphoprotein Phospholamban (PLB), ein integrales transmembranäres Protein. Der dephosphorylierte Zustand von PLB senkt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der SERCA2a. Durch  $\beta$ -adrenerge Stimuli und Aktivierung der cAMP abhängigen PKA erfolgt die Phosphorylierung von PLB und der inhibitorische Einfluss auf die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wird aufgehoben. Auch über die direkte Phosphorylierung von SERCA2a durch die CaMKII wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate in das SR gesteigert.

Innerhalb des SR wird über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeproteine, vor allem über Calsequestrin die Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelt. Um in der frühen Systole eine möglichst schnelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung zu ermöglichen, wird über die Proteine Triadin und Junctin  $\text{Ca}^{2+}$  in unmittelbarer Nähe der RyR gespeichert<sup>9</sup>. Abbildung 1 zeigt eine Synopsis der transmembranären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportvorgänge, die an der Entstehung der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind.



**Abb. 1: Schematischer Überblick der an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Ca<sup>2+</sup>-Transport-Prozesse und ausgewählte Regulationsmechanismen**

Systolische Erhöhung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über spannungsabhängige L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (LTC) bei Depolarisation des Sarkolemm und durch Ca<sup>2+</sup>-getriggerte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über Ryanodin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (RyR). Diastolische Senkung der Ca<sup>2+</sup>-Spiegel überwiegend durch SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2a)-katalysierten Ca<sup>2+</sup>-Rücktransport in das SR und durch Auswärtstransport von Ca<sup>2+</sup> über den sarkolemmalen Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX). β-AR - β-Adrenorezeptor, AC - Adenylatcyclase, G<sub>s</sub> - stimulierendes G-Protein, PKA - cAMP-abhängige Proteinkinase, CaMKII - Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, PLB - Phospholamban, P - phosphoryliertes Protein, NCX - sarkolemmaler Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher, RYR - Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungskanal des SR, FKBP - RYR-stabilisierendes Protein (Calstabin)

## 1.2 Veränderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase bei kardialer Hypertrophie und Insuffizienz

Die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Zirkulation stellt sich in hypertrophierten Kardiomyozyten deutlich verändert dar und trägt entscheidend zur Beeinträchtigung der elektromechanischen Kopplung und somit zur Verminderung der Kontraktilität bei. Dabei sind die reduzierte SR-Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, die verminderte Amplitude der Ca<sup>2+</sup>-Transienten und ein erhöhter diastolischer Ca<sup>2+</sup>-Spiegel von besonderer Bedeutung.

In der Vergangenheit konnten Veränderungen der Ca<sup>2+</sup>-Transportproteine in Funktion und Expression identifiziert werden, die für den gestörten Ca<sup>2+</sup>-Transport verantwortlich sind.

In zahlreichen Untersuchungen sowohl an Tiermodellen mit kardialer Hypertrophie als auch an humanen insuffizienten Herzen konnte eine herabgesetzte SERCA2a-Aktivität nachgewiesen werden. Diese verringerte Aktivität wird hauptsächlich auf eine reduzierte SERCA2a Expression auf mRNA- und/ oder Proteinebene zurückgeführt. Aus der resultierenden verminderten Ca<sup>2+</sup>-

Aufnahme in das SR und damit einer geringeren SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration resultiert eine herabgesetzte systolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Somit steht weniger zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  für die elektromechanische Kopplung zur Verfügung, so dass eine verminderte Kontraktilität die Folge ist<sup>8-10, 21-23</sup>. Die für die Relaxation der Kardiomyozyten notwendige rasche Absenkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, hauptsächlich durch die Aufnahme in das SR ist durch die verminderte Zahl der SERCA2a-Proteine ebenfalls reduziert. Die Relaxation läuft somit verlangsamt ab und es resultiert eine diastolische Dysfunktion<sup>24</sup>.

Eine entscheidende Einflussgröße auf die SERCA2a-Aktivität stellt PLB dar, welches in unphosphoryliertem Zustand einen inhibitorischen Effekt ausübt. In insuffizienten Herzen konnte gezeigt werden, dass eine geringere Herunterregulierung der PLB-Proteine im Verhältnis zu SERCA2a eine Erniedrigung des SERCA2a/PLB-Quotienten zur Folge hat. So kann daraus ein erhöhter inhibitorischer Einfluss von PLB erklärt werden<sup>8</sup>. In Tiermodellen mit kardialer Hypertrophie sowie an insuffizienten humanen Herzen besteht eine chronische Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Dieser pathologische Sympathikotonus führt zu einer adaptiven Herunterregulierung der myokardialen  $\beta$ -Adrenorezeptoren mit nachfolgender verminderter cAMP-Synthese. Damit kommt es zu einer Hypophosphorylierung von PLB. Dieser Mechanismus trägt ebenfalls zu einer verminderten SERCA2a-Aktivität bei<sup>10</sup>.

Trotz der adaptiven Prozesse des  $\beta$ -adrenergen Transduktionswegs konnte in mehreren Arbeiten eine Hyperphosphorylierung des RyR2 durch PKA und/ oder CaMKII nachgewiesen werden. Durch die Dissoziation von Calstabin2 vom RyR2 kann eine erhöhte Öffnungsrate und damit diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung induziert werden und zur Senkung des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts beitragen<sup>10, 24</sup>.

In humanen Kardiomyozyten geschieht die Senkung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu ca. 70 % über die SERCA2a und zu ca. 28 % über den NCX. Im Rattenmyokard beträgt der Anteil des NCX an der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Entfernung lediglich 10 %<sup>17</sup>. Unter den Bedingungen einer Myokardhypertrophie konnte in tierexperimentellen Arbeiten überwiegend eine Steigerung der NCX-Expression nachgewiesen werden<sup>11, 17, 23, 25</sup>. Der NCX kann sowohl  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle, d.h. im forward mode ( $\text{NCX}_F$ ), als auch in die Zelle, im reverse mode ( $\text{NCX}_R$ ) transportieren. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt überwiegend ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Auswärtstransport über  $\text{NCX}_F$ . In hypertrophierten Herzen konnte gezeigt werden, dass bedingt durch die erniedrigten Amplituden der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme, die höhere intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration und die verlängerte Aktionspotentialdauer eine vermehrte Umkehr der Arbeitsrichtung hin zum  $\text{NCX}_R$  erfolgt. So kann eine Abnahme der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung durch den gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über  $\text{NCX}_R$  teilweise kompensiert werden<sup>11, 15, 26</sup>. Andererseits konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom eine verlangsamte diastolische Senkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -

Konzentration bedingt und somit die Relaxation verzögert. Damit kann die Entstehung einer diastolischen Dysfunktion begünstigt werden<sup>27, 28</sup>.

### **1.3 Das Renin-transgene Rattenmodell – pathophysiologische Prinzipien der Renin induzierten arteriellen Hypertonie, Myokardhypertrophie und kardialer Fibrose**

Die durch das Einbringen des Maus-Ren2-Gens entstandene mRen2-transgene Ratte stellt ein etabliertes monogenetisches Modell der arteriellen Hypertension und kardialen Hypertrophie dar. Dabei scheint vor allem die verstärkte Expression des Renin-Transgens in extrarenalem Gewebe wie Nebennieren, Blutgefäßen, Schilddrüse und Myokard für die Pathogenese verantwortlich zu sein<sup>10</sup>. Flesch et al. konnten in diesem Zusammenhang bei männlichen 12-14 Wochen alten Ren2-Ratten erhöhte myokardiale mRNA-Spiegel für Renin und Angiotensin nachweisen<sup>29</sup>. Hingegen wurden überwiegend erniedrigte Serumspiegel von Renin, Angiotensin I und Angiotensin II gemessen<sup>30</sup>.

Bishop et al. zeigten an männlichen Ren2-Tieren, dass ein Maximum der arteriellen Hypertension bei ca. 8 Wochen erreicht ist, und anschließend ein geringer gradueller Abfall erfolgt. Darüber hinaus konnten sie bereits nach 10 Wochen eine linksventrikuläre Hypertrophie feststellen. Nach 16 Wochen wurde auch eine signifikante Zunahme linksventrikulärer Fibrose der Ren2-Ratten gegenüber den Kontrolltieren gezeigt<sup>31</sup>.

Das erhöhte Angiotensin II im Gewebe scheint über verschiedene Mechanismen vor allem über die Wirkung am Angiotensin Typ I-Rezeptor (AT1) an der Pathogenese beteiligt zu sein. Angiotensin II steigert die Aldosteronsekretion in der Nebennierenrinde. Aldosteron kann zusammen mit Angiotensin II die Kollagensynthese steigern. Dazu trägt auch die Aktivierung der Transkription des prepro ET1-Gens durch Angiotensin II und damit die Steigerung der Endothelin 1-Synthese bei. Endothelin 1 kann über den Endothelin Typ A-Rezeptor ebenfalls die Kollagensynthese induzieren<sup>32</sup>.

Myokardiale Hypertrophie ist verbunden mit einer Reexpression von einigen fetalen Genen wie Atriales natriuretisches Peptid (ANP),  $\beta$ -Myosin Schwere Ketten ( $\beta$ -MHC) sowie skelettmuskuläres  $\alpha$ -Aktin. Dieses veränderte Expressionsmuster kann u. a. über die Angiotensin II-Wirkung am AT1-Rezeptor vermittelt werden. Hierbei spielt mechanischer Stress im Rahmen der kardialen Drucküberlast eine wichtige Rolle. Die dadurch induzierte Angiotensin II-Sekretion löst die Aktivierung des Phosphatidylinositol-Transduktionswegs mit nachfolgender Aktivierung der Protein-kinase C und Raf-1 Kinase aus, die an der Reexpression der myozytären Proteine beteiligt sind<sup>33</sup>.

In diesem Zusammenhang konnte an 12 Wochen alten Ren2-Tieren ein signifikant höherer  $\beta$ -MHC/  $\alpha$ -MHC-Quotient nachgewiesen werden <sup>29</sup>.

Über die Stimulation präsynaptischer AT1-Rezeptoren kann Angiotensin II die Freisetzung von Noradrenalin an sympathischen Nervenendigungen bewirken. Darüber hinaus können auch sympathische zentrale Strukturen über AT1-Rezeptoren stimuliert werden. Sowohl über  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktionswege kann eine Steigerung der Proteinsynthese mit Induktion des fetalen Genexpressionsmusters hervorgerufen und so die Entwicklung einer Myokardhypertrophie begünstigt werden <sup>10</sup>.

Auch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der Kardiomyozyten ist durch die Transgen-bedingte Aktivierung des lokalen RAS beeinträchtigt. In Folge des chronisch erhöhten Sympathikotonus kommt es zu einer Herunterregulierung der  $\beta$ -Rezeptoren und zu einer Desensitisierung der Adenylatcyclase mit verminderten intrazellulären cAMP-Spiegeln. Somit kommt es zu einer Hypophosphorylierung von PLB, so dass, bedingt durch den inhibitorischen Einfluss von PLB auf SERCA2a, eine abgeschwächte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR resultiert <sup>10</sup>.

In einer Untersuchung von männlichen Ren2-Tieren im Alter von 14 Wochen konnten Fleisch et al. signifikant erniedrigte Expressionslevel für SERCA2a und PLB auf mRNA- und Proteinebene nachweisen. Dabei war die Senkung des SERCA2a-Proteinlevels um 77 % stärker ausgeprägt als die Senkung des PLB mit 67 %. Diese transgenen Tiere wurden mittels Kontraktionsmessung an isolierten Papilarmuskelpräparaten auch hinsichtlich der linksventrikulären kontraktile Funktion untersucht. Hier zeigten sich eindeutige Hinweise für eine bereits bestehende systolische und diastolische Dysfunktion <sup>29</sup>.

Rothermund et al. untersuchten Ren2-transgene Ratten im Alter von 30 Wochen und zeigten eine signifikante Abnahme des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transports im Vergleich zu nichttransgenen Kontrolltieren. Parallel dazu wurde eine signifikant verminderte linksventrikuläre systolische und diastolische Funktion mittels kathetergestützter in vivo-Messung des linksventrikulären Drucks nachgewiesen. Unter Gabe eines AT1-Rezeptorblockers in nicht-antihypertensiver Dosierung konnte die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate normalisiert werden, so dass von einem direkten Angiotensin II-Effekt bei der Herunterregulierung von SERCA2a auszugehen ist <sup>34</sup>.

Die verminderte SERCA2a-Aktivität in Ren2 wird verursacht durch verminderte SERCA2a-Expression, Vergrößerung des SERCA2a /PLB-Quotienten sowie die Hypophosphorylierung des PLB. Diese Faktoren wirken somit synergistisch auf eine reduzierte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung. In der Folge resultiert eine diastolische und systolische kontraktile Dysfunktion.

## 1.4 Veränderung des $\text{Ca}^{2+}$ -Transports durch Ischämie-Reperfusion

Störungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation sind auch an der Entstehung myokardialer Schädigungen durch Ischämie-Reperfusion-Episoden beteiligt. Unter ischämischen Bedingungen entwickeln Kardiomyozyten eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung. Voraussetzung hierfür sind die Ischämie-bedingten Veränderungen des Membranpotentials mit folgender Erhöhung der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration. Somit wird der reverse mode des sarkolemmalen NCX getriggert, woraus ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx mit folgender zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung resultiert. Nach Beginn der Reperfusion und Resynthese energiereicher Phosphate kommt es zu unkontrollierten Kontraktionen bedingt durch hohe zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spitzenkonzentrationen. Diese hohen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -peaks werden durch einen zu Beginn der Reperfusion weiterhin als  $\text{NCX}_R$  arbeitenden  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austausch mitbestimmt. Die so entstehende myokardiale Kontraktur trägt maßgeblich zur irreversiblen Zellschädigung bei <sup>14, 35</sup>.

In diesem Zusammenhang konnten anhand einiger Tiermodelle unter Ischämie-Reperusionsbedingungen verringerte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten nachgewiesen werden <sup>13, 36-39</sup>. Untersuchungen an isolierten Hundeherzen ergaben diesbezüglich eine direkte Proportionalität der Ischämiedauer zur auftretenden Verminderung des Oxalat-stimulierten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transports <sup>37</sup>. Osada et al. zeigten an isoliert perfundierten Herzen von Sprague Dawley-Ratten verminderte SERCA2a-Proteinlevel sowie RyR-Proteinlevel. Des Weiteren fanden sie einen geringeren Phosphorylierungsgrad durch CaMK von SERCA2a, RyR und PLB, so dass insgesamt von einer Verminderung der SR- $\text{Ca}^{2+}$ - Aufnahme auszugehen ist <sup>13</sup>. Diese Veränderungen des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transports können die durch Ischämie und Reperfusion entstehende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung mitbedingen.

## 1.5 SERCA2a als mögliches Ziel gentherapeutischer Ansätze zur Therapie und Prophylaxe kardialer Hypertrophie und Insuffizienz

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden zahlreiche Erfolg versprechende Untersuchungen zur Beeinflussung des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transports mit Hilfe sich ständig weiterentwickelnder gentechnischer Methoden vorgenommen. Dabei sind vor allem PLB und SERCA2a die Hauptangriffspunkte. Eine Verminderung der PLB-Expression und damit des inhibitorischen Einflusses von PLB auf die SERCA2a-Funktion stellt einen möglichen Ansatz zur Verbesserung der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate dar. In diesem Zusammenhang entwickelten Luo et al. ein PLB-knockout-Mausmodell dessen kontraktile Funktion an isolierten, retrograd perfundierten Herzen untersucht wurde. Es zeigten sich in der PLB-knockout-Gruppe eine, sowohl diastolisch als auch systolisch, signifikant gesteigerte kontraktile Funktion. Des Weiteren konnte eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der

SERCA2a nachgewiesen werden<sup>40</sup>. Vergleichbare Ergebnisse ließen sich auch an isolierten Kardiomyozyten von PLB-knockout-Mäusen erzielen<sup>41</sup>. He et al. untersuchten neonatale Kardiomyozyten von Ratten nach adenoviralem Gentransfer mutierter- oder antisense-RNA von PLB. Auch hier zeigte sich eine erhöhte SERCA2a-Aktivität und Kontraktilität<sup>42</sup>.

Über die Ausschaltung des inhibitorischen Einflusses auf die SERCA2a-Aktivität kann lediglich die Aktivität der vorhandenen SERCA2a-Proteine gesteigert werden. Gerade im Hinblick auf die bereits beschriebene Verringerung der SERCA2a-Expression bei Herzinsuffizienz erscheint die Ausstattung des SR mit zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen nahe liegend. Bisher wurden zahlreiche Tiermodelle mit SERCA2a-Überexpression in gesunden und/ oder hypertrophierten, bzw. insuffizienten Herzen untersucht. Bereits 1997 wurde von He et al. unter Verwendung eines Hühner- $\beta$ -Aktin-Promoters ein SERCA2a-transgenes Mausmodell entwickelt. Hier konnte eine Steigerung der SERCA2a-Expression um das 2,6-fache auf mRNA-Ebene und um das 1,2 fache auf Proteinebene gemessen werden. An isolierten Kardiomyozyten dieses Modells konnte eine signifikant beschleunigte Kontraktion und Relaxation sowie eine erhöhte SERCA2a-Aktivität nachgewiesen werden<sup>43</sup>. In einem vergleichbaren Modell wurde mittels kathetergestützter linksventrikulärer Druckmessung in vivo ebenfalls eine signifikant erhöhte Kontraktilität und beschleunigte Relaxation bestimmt<sup>44</sup>. In verschiedenen Arbeiten wurde der Effekt der SERCA2a-Überexpression unter Verwendung von Tiermodellen mit operativ induzierter Drucküberlasthypertrophie mittels Aortenstenose untersucht. Müller et al. bestimmten an retrograd perfundierten isolierten Herzen und isolierten Kardiomyozyten von SERCA2a transgenen Ratten mit linksventrikulärer Hypertrophie sowohl die kontraktile Funktion als auch die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten. Hierbei zeigten sich bei den SERCA2a transgenen Tieren deutlich bessere kontraktile Eigenschaften und beschleunigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten sowie eine verminderte linksventrikuläre Hypertrophie gegenüber der nichttransgenen Kontrollgruppe mit kardialer Hypertrophie<sup>45</sup>. In einer Untersuchung isolierter Kardiomyozyten SERCA2a-transgener Ratten konnte eine frequenzabhängige Zunahme der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung der transgenen Tiere beobachtet werden. So wurde lediglich unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation ein signifikant stärkerer inotroper Effekt der transgenen Tiere erreicht<sup>46</sup>. Diese Ergebnisse konnten in Untersuchungen von Vetter et al bestätigt werden<sup>47</sup>. Inwieweit eine bereits bestehende linksventrikuläre Hypertrophie und/ oder Insuffizienz durch eine SERCA2a-Überexpression beeinflusst werden kann, untersuchten Suraz et al. in einem Mausmodell mit Drucküberlasthypertrophie und Tetracyclin-induzierbarer SERCA2a-Überexpression. Hier wurden nach Doxycyclingabe um 45 % erhöhte SERCA2a-Proteinspiegel gemessen. Nach Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie konnte durch Induktion der transgenen SERCA2a-Expression eine verbesserte Kontraktilität und ein gesteigerter SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transport im Vergleich zu Kontrolltieren ohne SERCA2a-Überexpression festgestellt werden<sup>48</sup>.



Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung des Effekts einer SERCA2a-Überexpression auf bereits bestehende pathologische kardiale Bedingungen, und somit der Einschätzung des therapeutischen Potentials, stellt die Induktion der Überexpression mittels Gentransfer dar. In diesem Zusammenhang untersuchten del Monte et al. ein Rattenmodell mit induzierter Drucküberlasthypertrophie mittels operativer Aortenstenose und adenoviralem SERCA2a-Gentransfer nach 26-28 Wochen. Hier zeigte sich gegenüber der hypertrophierten Versuchsgruppe ohne stattgehabten Gentransfer ein Anstieg der SERCA2a-Proteinlevel sowie der SERCA2a-Aktivität auf das Niveau der nicht hypertrophierten Kontrolltiere ohne SERCA2a-Überexpression<sup>49</sup>. In isolierten Kardiomyozyten von explantierten, hochgradig insuffizienten humanen Herzen konnte nach adenoviralem SERCA2a-Gentransfer ebenfalls ein Anstieg des SERCA2a-Proteinlevels mit gesteigerter SERCA2a-Aktivität nachgewiesen werden. Darüber hinaus ließ sich eine gesteigerte Kontraktilität sowie eine Verringerung der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verifizieren<sup>50</sup>. Kawase et al. arbeiteten 2008 an einem Schweinemodell mit Volumenüberlast-induzierter Herzinsuffizienz, die sich während acht Wochen nach Sprengung der Mitralklappe in kompensierter Ausprägung entwickelte. Nach erfolgtem intrakoronarem SERCA2a-Gentransfer erfolgte die erneute Bestimmung hämodynamischer Parameter nach weiteren 8 Wochen mittels kathetergestützter linksventrikulärer Druckmessung sowie Echokardiographie. Es zeigte sich eine signifikant größere linksventrikuläre Auswurfleistung sowie Druckanstiegsgeschwindigkeit im Vergleich mit Tieren ohne SERCA2a-Überexpression. Des Weiteren wurde ein deutlich geringerer linksventrikulärer Durchmesser in der Gruppe mit SERCA2a-Überexpression ermittelt<sup>51</sup>.

In Zusammenschau der bisher veröffentlichten Arbeiten zur Verbesserung des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transports scheint die SERCA2a-Überexpression ein viel versprechender Ansatz zur Verbesserung der kontraktilen Funktion sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen zu sein.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Entwicklung einer kontraktilen Dysfunktion im Rahmen einer Herzinsuffizienz spielt die herabgesetzte SERCA2a-Expression und damit ein verminderter  $\text{Ca}^{2+}$ -Rücktransport in das SR eine pathogenetisch entscheidende Rolle.

Auch an der Entstehung myokardialer Ischämie-Reperfusionsschäden mit konsekutiver Abnahme der Kontraktilität sind Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase mit einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung und verminderter SERCA2a-Aktivität maßgeblich beteiligt.

Zur Einschätzung der Effekte einer vermehrten Ausstattung des SR mit SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen im Rahmen einer Herzinsuffizienz können SERCA2a-transgene Tiermodelle eingesetzt werden. Bis-

her wurden Tiermodelle mit operativ induzierter Druck- oder Volumenlasthypertrophie sowie spontan hypertensive Modelle hinsichtlich der Effekte einer SERCA2a-Überexpression untersucht.

Mit dem Ren2-transgenen Rattenmodell steht ein etabliertes Modell arterieller Hypertension und kardialer Hypertrophie zur Verfügung bei der die Grundlagen der pathophysiologischen Veränderungen bekannt sind. Durch die Integration eines zusätzlichen SERCA2a-Transgens in das Genom der hypertensiven Ren2-transgenen Ratte konnte ein neues doppelt transgenes Modell zur Untersuchung der Auswirkungen einer zusätzlichen SERCA2a-Expression auf die kontraktile Funktion bei kardialer Hypertrophie entwickelt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung des kontraktiven Phänotyps des doppelt (mRen2) 27/SERCA2a (SERen)-transgenen Rattenmodells im isolierten, nach Langendorff retrograd perfundierten Herzen unter Normoxie und Ischämie-Reperusionsbedingungen. Dabei soll untersucht werden, ob eine verbesserte Ausstattung des kardialen sarkoplasmatischen Retikulum (SR) mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPasen (SERCA2a) vor der Entwicklung von kontraktile Dysfunktion bei Hypertonie-bedingter linksventrikulärer Hypertrophie schützt. Dabei werden zunächst die Auswirkungen der SERCA2a-Überexpression auf die hämodynamische Funktion der hypertrophen Renin-transgenen Herzen unter Normoxie dargestellt. Darüber hinaus soll mittels Ischämie-Reperusionsversuch gezeigt werden, inwieweit durch die zusätzliche Expression des SERCA2a-Transgens eine kontraktile Dysfunktion im Rahmen einer Ischämie-Reperusions-Episode beeinflusst werden kann.

Weiterhin soll der Einfluss der SERCA2a-Überexpression auf die Entwicklung des myokardialen Remodelings der Ren2-transgenen Versuchstiere untersucht werden.

Da auch der sarkolemmale  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher unter der Entwicklung einer Herzinsuffizienz charakteristischen Veränderungen unterliegt und bei der Entstehung myokardialer Ischämie-Reperfusionsschäden eine Rolle spielt wird auch dieser Transportmechanismus hinsichtlich seiner Aktivität am hypertrophen Herzen und der Beeinflussung durch das SERCA2a-Transgen untersucht.

## 2. Methoden

### 2.1 Haltung der Versuchstiere

Die Tiere für die Ischämie-Reperfusionenversuche wurden im Tierhaus des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin gehalten und von den zuständigen Fachtierpflegern und Veterinärmedizinern versorgt. Dabei waren maximal drei Ratten in einem gedeckelten Makrolonkäfig (EBECO, L-B-H: 590-380-200 mm), ausgestreut mit Weichholzspänen, untergebracht.

Bei einer konstanten Temperatur von  $22 \pm 1$  °C und einer relativen Luftfeuchte von  $55 \pm 5$  % erfolgte ca. alle 6 min eine Frischluftzufuhr mit einer mittleren Raumluftgeschwindigkeit von 0,3 m/ s. Es wurde ein natürlicher Hell-Dunkel-Rhythmus (Beleuchtungsstärke 150-200 lx) sichergestellt.

Die Fütterung erfolgte mit der Standardrattennahrung Altromin C1000 (Fa. Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum. Die zur Zucht der Reihe 1127 verwendeten männlichen homozygoten (mRen2) 27 Ratten erhielten mit Ramipril (3 µg/ l) versetztes Trinkwasser.

### 2.2 Genotypisierung

Die verwendeten Versuchstiere wurden in der Arbeitsgruppe Vetter bereits im Vorfeld dieser Arbeit hinsichtlich der transgenen DNA-Sequenzen genotypisiert. Hierzu wurden die entsprechenden transgenen DNA-Abschnitte mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

Dabei erfolgte exemplarisch der Nachweis einer spezifischen Sequenz des Maus-Renin-Gens (mREN2) 27 unter Verwendung folgender Primer: forward Primer „mRen2-forward“, reverse Primer „mRen2-reverse“ (Fa. TIB MOLBIO Berlin, Deutschland).

Zum sicheren Nachweis des SERCA2a-Transgens wurde die transgenspezifische Sequenz des humanen Cytomegalie-Virus immediate-early Enhancers amplifiziert. Hierfür wurden die „forward“- bzw. „reverse Primer“ (Fa. TIB MOLBIO Berlin, Deutschland) herangezogen.

Da diese Untersuchungen nicht Gegenstand dieser Arbeit sind wird auf nähere Ausführungen verzichtet.

## 2.3 Bestimmung der SERCA-mRNA-Spiegel

### 2.3.1 RNA-Isolierung

Aus ca. 100 mg linksventrikulären Gewebeproben erfolgte die Isolierung der zellulären RNA nach der sog. Einschrittmethode nach Chomczynski und Sacchi. Hierbei wurde die monophasische Lösung TRIzol<sup>®</sup> (Fa. InVitrogen) verwendet, die neben Guanidinisothiocyanat (GTC) Phenol enthält. Das chaotrope GTC vermittelt die Denaturierung von Proteinen, die Lyse von Gewebsbestandteilen und die Inaktivierung von RNAsen. Das Phenol dient im sauren Milieu zur Entfernung kleinerer DNA-Fragmente und denaturierter Proteine aus dem Lysat.

Zunächst wurden die Gewebeproben in sterile Polypropylenröhrchen (Ø18 mm/ Länge 95 mm; Fa. Greiner) überführt und in 1 l TRIzol<sup>®</sup> mit einem Polytron-Homogenisator (Polytron PT 10/35 mit Schaft PT-DA 3007/ 2; Fa. Kinematica AG, Littau-Luzern, Schweiz) drei mal 10 s bei 15000/ min homogenisiert. Um eine vollständige Lyse der Homogenate sicherzustellen erfolgte im Anschluss eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Der Röhrcheninhalt wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt, 0,2 ml Chloroform (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt, durchmischt und erneut für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 15 min bei 10000 und 4 °C in einer Biofuge „Fresco“ (Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland). Für die RNA-Ausfällung wurde die obere klare, wässrige, RNA-haltige Phase in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verbracht, mit 0,5 ml –20 °C kaltem Isopropanol versetzt, für 20 min bei –20 °C inkubiert und bei 4 °C für 10 min wie zuvor zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand abgenommen und das entstandene gallertartige Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol (–20 °C) gewaschen werden. Nach erneuter Zentrifugation mit den o. g. Parametern und Dekantierung des Überstandes erfolgte die fünfminütige Trocknung des RNA-Pellet bei Raumtemperatur. Das Pellet konnte nun in 30 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem 2-fach autoklaviertem H<sub>2</sub>O vollständig gelöst werden.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration der 1:50 verdünnten Proben wurden die Extinktionswerte in einem Spektrophotometer (UV-VIS Spektrophotometer UV 1202, Fa. Shimadzu, Duisburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gegen einen H<sub>2</sub>O-Leerwert gemessen. Um die die RNA-Konzentration der RNA-Originallösung ( $C_{\text{RNA}}$ ) zu ermitteln, wurde folgende Formel verwendet:

$$C_{\text{RNA}} = E_{260} * 40a * V.$$

$E_{260}$  ist dabei die Extinktion bei 260 nm,  $a$  der Multiplikationsfaktor für RNA (1 µg/ ml  $\hat{=}$  Extinktion von 1) und  $V$  der Verdünnungsfaktor [µg/ µl].

### 2.3.2 RNA-Dot Blot

Die zuvor aus den linken Ventrikeln der Versuchstiere extrahierte RNA wurde nach der oben beschriebenen Konzentrationsbestimmung zu einer Lösung mit 1 µg RNA/ µl verdünnt. 10 µl dieser RNA-Lösung wurden mit 30 µl einer denaturierenden RNA-Pufferlösung (500 µl deionisiertes Formamid, 162 µl 37 %-iges Formaldehyd, 100 µl Pufferlösung (200 nM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,0)) versetzt. Zur vollständigen Denaturierung der enthaltenen RNA wurde dieses Gemisch 15 min bei 65 °C inkubiert. Nach rascher Abkühlung im Eiswasserbad wurden 10 µl 20 xSSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0) hinzugegeben. Die weiteren Schritte wurden in einer Bio-Dot-Apparatur (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Diese Apparatur sah 96 einzelne Vertiefungen in einer Mikrotiterplatte vor. Die zuvor für 10 min in 10 x SSC getränkte, 9 x 12 cm messende, Transfermembran (Nylon, Hybond™-N+, Fa. Amersham, Braunschweig, Deutschland) wurde über der Mikrotiterplatte fest verspannt. Daraus ergab sich eine einheitliche Kontaktfläche jeder Vertiefung mit der Nylonmembran von 7 mm<sup>2</sup>. Bei angelegtem Vakuum wurde die Membran jeder Mikrotitervertiefung zunächst mit 100 µl 10 x SSC gewaschen. Das angelegte Vakuum wurde so eingestellt, dass 100 µl/ min vakuumfiltriert wurden. In den vorbereiteten Vertiefungen wurden anschließend 7,5 bzw. 15 µl der Probenlösung pipettiert, was einer RNA-Menge von 1,5 bzw. 3 µg pro Einheit entsprach, und langsam filtriert. Danach wurde jede Mikrotitervertiefung 3 x mit je 500 µl 10 x SSC gewaschen. Die durch elektrostatische Wechselwirkungen an der Membran haftende RNA wurde aus der Apparatur entfernt. Nach der Trocknung der Membran auf Whatman 2 MM-Papier wurde diese 2-mal für 52 s mit 120 mJ in einem UV-Stratalinker 1800 (Fa. Stratagene, LaJolla, USA) bestrahlt um eine kovalente Vernetzung der RNA mit der Membranoberfläche zu erreichen. Anschließend wurde immer nur eine Membran wie im Folgenden beschrieben mit der <sup>32</sup>P-markierten SERCA2a-cDNA Sonde (durch random priming detektierte transgen-spezifische 1,2 kb Sonde) hybridisiert. Die Spezifität der verwendeten Sonde wurde zuvor durch einen Northern Blot bestätigt. In Vorbereitung der Hybridisierung wurde die Membran in ein Hybridisierungsrohr (Hybridisierungsglasrohre 19,5 x 4 cm; Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland) mit 10 ml Prähybridisierungsmix (2,5 ml 30% v/v 20 x SSC, 0,5 ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0, 0,5 ml 100 x Denhardt's-Lösung, 5 ml deionisiertes Formamid, 0,5 ml 20 % SDS sowie 1 ml 500 mg Heringssperma-DNA) in einen Hybridisierungssofen gegeben und für 60 min bei 64 °C inkubiert (Mini-Hybridisierungssofen OV 3, Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland). Die zuvor bei 95 °C denaturierte (Thermoblock DB-2D, Fa. Techne, Duxford, UK) und anschließend abgekühlte Heringssperma-DNA diente zur Blockierung unspezifischer Nukleinsäure-Bindungsstellen. Für diese Arbeitsschritte wurde ausschließlich deionisiertes Formamid benutzt. Die Deionisierung erfolgte durch 4-stündiges Rühren von 50 ml Formamid (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 5 g Mi-

xed Bed Resin AG<sup>®</sup> 501-X8 (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland) bei Raumtemperatur in einem mit Alufolie abgedunkelten 100 ml Becherglas auf einem Magnetrührer.

Nach Entfernen der Prähybridisierungslösung wurde die Membran mit 10 ml Hybridisierungslösung welche nun auch 20-40 ng der spezifischen cDNA-Sonde enthielt bei 65 °C über 16 h im Hybridisierungssofen inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Hybridisierung der <sup>32</sup>P-markierten einzelsträngigen cDNA der SERCA2a-Sonde an die membrangebundene RNA transgen-positiver Tiere. Die Markierung der Sonden wurde durch Verwendung eines Prime-It<sup>®</sup> II Random Primer Labeling Kit der Fa. Stratagene sichergestellt. Bei dieser Markierungsmethode dienen im Reaktionsgemisch gebildete Komplexe zwischen sog. Random-Nonamerprimern und der entsprechenden Sonden-DNA als Substrat für das Klenowfragment der DNA-Polymerase I Exo(-)Klenow. Das Enzym synthetisiert neue DNA-Stränge indem an freien 3'-OH-Gruppen der komplexierten Primer Nukleotidmonophosphate eingebaut werden. Die <sup>32</sup>P-Markierung der neu synthetisierten DNA-Stränge in Gegenwart von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP erfolgt durch Austausch eines nichtradioaktiven Desoxycytosinnukleotids durch ein <sup>32</sup>P-markiertes Desoxycytosinnukleotid. In 50  $\mu$ l des Markierungsansatzes waren enthalten 23  $\mu$ l SERCA2a-Sonden-DNA (20-40 ng), 10  $\mu$ l Random-Nonamerprimer, 10  $\mu$ l 5 x dCTP-Primerpuffer mit 0,1 mM dATP, 0,1 mM dGTP, 1 mM dTTP, 5  $\mu$ l [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (ca. 5  $\mu$ Ci) und 2  $\mu$ l gepufferte Glycerollösung mit 10 U Exo(-)Klenow. Die 23  $\mu$ l SERCA2a-Sonden-DNA und 10  $\mu$ l Random-nonameprimer wurden zuerst gemischt, 5 min bei 95 °C inkubiert und 5 min im Eisbad abgekühlt. Danach wurden die restlichen Komponenten des o. g. Markierungsansatzes zugegeben. Dieser Ansatz wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf Sephadex<sup>®</sup>-Quick Spin<sup>TM</sup>-Säulen (Fa. Roche/Boehringer, Mannheim, Deutschland) an Hand der Vorschrift des Herstellers aufgetragen, um nicht in DNA eingebaute Nukleotide zu entfernen. Die Radioaktivität des <sup>32</sup>P-markierten DNA enthaltenden Eluates betrug 2-3  $\mu$ Ci. Zur Bestimmung der spezifischen Sondenaktivität wurde 1  $\mu$ l Eluat entnommen, in 10 ml H<sub>2</sub>O verdünnt und im  $\beta$ -Szintillationsmessgerät nach Cerenkov gemessen. Das Eluat wurde 5 min bei 95 °C inkubiert, 5 min in Eisbad angekühlt und zum Prähybridisierungsmix wie oben beschrieben pipettiert.

Nach Abschluss der Hybridisierungsphase wurde die hybridisierte Membran außerhalb der Mischung in einer Kunststoffschale (20 x 20 cm) gewaschen. Dazu wurde die Membran 3-mal bei Raumtemperatur für 30 min in jeweils 1000 ml Waschlösung (1. Durchlauf: 2 x SSC/ 0,1 % SDS, 2. Durchlauf: 0,5 x SSC/ 0,1 % SDS, 3. Durchlauf: 0,1 x SSC/ 0,1 % SDS) gewaschen. Abschließend erfolgte die Inkubation der Membran bei 64 °C für 15 min in 1000 ml Waschlösung (0,1 x SSC/ 1,0 % SDS). Um nun die Quantifizierung der RNA durch Bestimmung der Aktivität der einzelnen Blots zu ermöglichen, wurde die Membran mittels der „storage phosphor“-Methode unter Zuhilfenahme einer Entwicklerkassette (PhosphorImager-Platte Typ BAS-III, Fa. Fuji Foto

Film) in einem PhosphorImager (BAS Reader 1500, Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) untersucht. Nach 2-stündiger Exposition mit der Probenmembran wurde die exponierte Platte mit Laserlicht definierter Wellenlänge angeregt. Das nun emittierte Lichtsignal wurde durch einen Bildwandler grafisch dargestellt und mit der Software PhosphorImager BAS 2.05 und AIDA 2.11 (Fa. Raytest, Straubenhardt, Deutschland) analysiert.

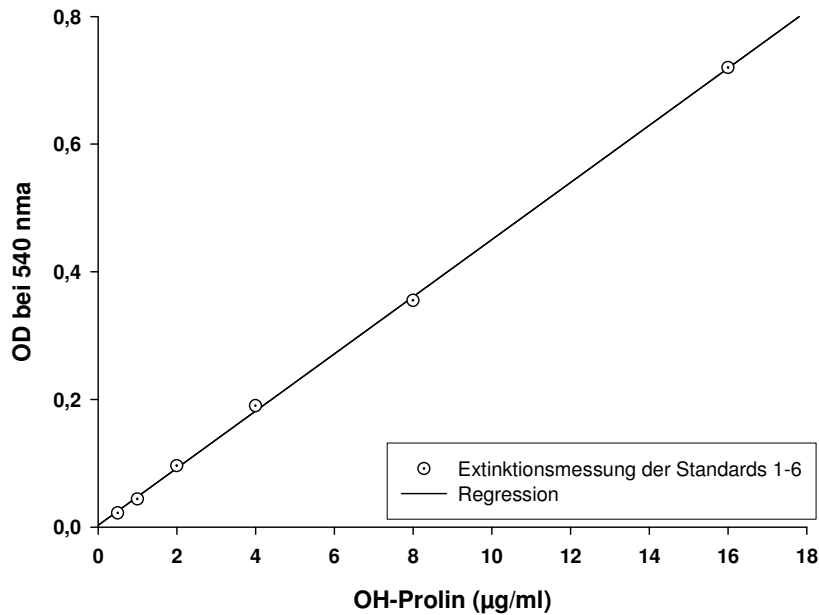
## 2.4 Hydroxyprolinbestimmung

Als repräsentativer Marker für den Kollagengehalt des linksventrikulären Gewebes wurde der Hydroxyprolingehalt nach einer Methode von Woessner (1961), modifiziert nach Stegemann und Stalter (1967) bestimmt. Das Prinzip besteht in der sauren Hydrolyse des Hydroxyprolins, der Oxidation zu Pyroderivaten und der anschließenden Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (p-DAB), woraus ein rötlicher Farbstoff resultiert. Dieser wird extinktionsphotometrisch quantifiziert.

Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen. 25 mg linksventrikulären Gewebes wurden in hitzebeständige 15 ml Polypropylenröhrchen gegeben. Nach Zugabe von 500 µl 10 M HCl und 500 µl Aqua bidest wurde der Ansatz unter einem Abzug für 16 h in einem Heizblock auf 105 °C erhitzt. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben wurden je zwei Kontrollen (Kontrolle 1: 500 µl OH-Prolin (0,5 mg) + 500 µl 10 M HCl; Kontrolle 2: 500 µl Gelatine (2,5 mg) + 500 µl 10 M HCl) inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis abgekühlt und durch Zugabe von 4 ml 1 M NaOH neutralisiert. Um verbliebene Gewebepartikel zu entfernen wurden die Proben durch Mullkompressen filtriert und zu jeweils drei Portionen in 2 ml Eppendorf-Röhrchen (Safe-Lock™) pipettiert.

Um die OH-Prolin-Konzentration der Proben aus der Extinktion berechnen zu können, wurde zunächst eine Standardreihe mit gegebenen OH-Prolin-Konzentrationen photometrisch gemessen und eine Eichkurve erstellt. Dazu wurde folgende Verdünnungsreihe angefertigt.

	[OH-Prolin]	Lösungen
Standard 1	16 µg/ ml	16 µl Stock (1 mg/ ml) + 984 µl 10 mM HCl
Standard 2	8 µg/ ml	500 µl Standard 1 + 500 µl 10 mM HCl
Standard 3	4 µg/ ml	500 µl Standard 2 + 500 µl 10 mM HCl
Standard 4	2 µg/ ml	500 µl Standard 3 + 500 µl 10 mM HCl
Standard 5	1 µg/ ml	500 µl Standard 4 + 500 µl 10 mM HCl
Standard 6	0,5 µg/ ml	500 µl Standard 5 + 500 µl 10 mM HCl



**Abb. 2: Darstellung der extinktionsphotometrischen Bestimmung einer Standardreihe mit bekannten Hydroxyprolinkonzentrationen**

Nun wurden jeweils dreimal 50 µl der einzelnen Proben, bzw. des Standards und der Leerprobe, auf eine 96 Well-Platte pipettiert. Nach Hinzugabe von 100 µl Oxidationslösung (22,7 ml Isopropylalkohol, 12,5 ml Aqua bidest, 14,8 ml Citrat-Acetat-Puffer und 300 ml Chloramin-T) erfolgte die schrittweise Oxidation des OH-Prolins zu Pyrol. Die Lösung wurde nun für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl Ehrlich's Reagenz (6 g p-DAB, 52 ml Isopropylalkohol und 16 ml 50 % Perchlorsäure) dazugemischt. Die Platte wurde sorgfältig mit Parafilm verschlossen, und für 45 min im Wärmeschrank auf 60 °C erhitzt. Nun wurde die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 540 nm im Elisa-Reader gemessen. Der Hydroxyprolinegehalt konnte nun mittels der Eichkurve (vgl. Abb. 2) errechnet werden.

## 2.5 Na<sup>+</sup>-Gradient getriebener <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Transport über den Na<sup>+</sup>/ Ca<sup>2+</sup>-Austauscher des Sarkolemm

### 2.5.1 Herstellung von Grobmembranpräparaten

Eine Voraussetzung für die in vitro-Bestimmung der sarkolemmalen Na-Ca-Austausch (NCX)-Aktivität war die Präparation von Membranen, da die NCX-Aktivität in Homogenaten von Rattenherzen unterhalb der Nachweisgrenze der in dieser Arbeit beschriebenen Methode zur Messung des Na<sup>+</sup>-Gradient-getriebenen <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Transports lag. Durch die hier angewendeten Zentrifugationsschritte bei über 100000 g konnte die Isolation von partikulärem Membranmaterial sowie von sarkolemmalen Membranvesikeln verlustfrei sichergestellt und eine drei- bis fünffache



Konzentrierung sarkolemmaler Membranfragmente erreicht werden. Dabei wurden zytosolische Proteine und gelöste kontraktile Proteine vollständig und mitochondriale Proteine teilweise entfernt. Diese Methode erlaubte eine verlässliche Messung der sarkolemmalen NCX-Aktivität.

Im Folgenden wird das Vorgehen im Einzelnen beschrieben.

Das gefrorene, pulverisierte linksventrikuläre Gewebe (0,2 g) wurde in ein Polypropylenreagenzglas (12 x 75 mm) mit 1 ml eiskalten Homogenisationspuffer (0,75 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, 5 mM Histidin-HCl, pH 7,4) gegeben und drei mal 15 sec mit einem Polytron-Homogenisator PT 10/35 (Schaft PTA 10S, Fa. Kinematica AG, Littau-Lutzern, Schweiz) bei 21000 U/ min homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenate (1 ml) in Ultrazentrifugationsröhrchen (Fa. Beckmann, München, Deutschland) überführt und mit 1,5 ml Homogenisationspuffer, der zuvor zur Spülung des Homogenisationsröhrchens und des Polytronschafts verwendet wurde, aufgefüllt. Danach erfolgte die zweimalige Zentrifugation in einer TL 100 Ultrazentrifuge (Fa. Beckmann Instruments, München, Deutschland) mit einem Rotor TI 100,3 bei 148000 g für 20 min bei 2 °C. Zwischen den beiden Zentrifugationsdurchläufen wurde der erhaltene Überstand verworfen und das Pellet im Ultrazentrifugenröhrchen wie vorher beschrieben homogenisiert.

Nach dem Verwerfen des zweiten Überstands wurde das Pellet in einen Glas-Teflon-Potter-Homogenisator (2 ml Fassungsvermögen) eingebracht. Die Resuspension erfolgte nach Zugabe von 1,5 ml eines hypotonen Puffers mit 0,1 mM PMSF und 10 mM Histidin-HCl (pH 7,4) durch zweimal 10-faches Auf- und Abbewegen des Pellets im Eisbad. Der Potter-Homogenisator wurde anschließend mit zweimal 0,5 ml hypotonem Puffer gespült und diese Spüllösung zusammen mit der Suspension in Ultrazentrifugenröhrchen wie vorher beschrieben zentrifugiert. Danach erfolgte die Resuspension des angereicherten und von Myofibrillen befreiten Membranmaterials in 1 ml einer Lösung mit 0,25 M Saccharose und 10 mM Histidin-HCl (pH 7,4) im Glas-Teflon-Potter-Homogenisator. Die zu 100 µl, bzw. für die Proteinbestimmung zu 10 µl portionierten Membransuspensionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C eingelagert.

### **2.5.2 Bestimmung des Na<sup>+</sup>-Gradient getriebenen Ca<sup>2+</sup>-Transports über den sarkolemmalen Na<sup>+</sup>/ Ca<sup>2+</sup>-Austauscher**

Die, wie unter 2.5.1 beschrieben, angereicherten linksventrikulären Herzmembranpräparate wurden zunächst auf Eis aufgetaut und in einem Beladungsansatz entweder mit 2,5 M NaCl oder 2,5 M KCl beladen. Dabei betrug die Proteinkonzentration des Ansatzes 5 mg/ ml. Für jede Probe wurden achtfach-Bestimmungen durchgeführt.

Die Beladungsansätze wurden für 60 min bei 30 °C in einem Thermomixer (Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte sofort die Messung des  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transports nach folgender Vorgehensweise. 200  $\mu\text{l}$  des  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transportmediums (50  $\mu\text{M}$   $^{45}\text{CaCl}_2$ , 250 mM Saccharose, 160 mM KCl, 2  $\mu\text{M}$  Valinomycin, 20 mM HEPES/ Tris, pH 7,4) wurden in einem Plastikröhrchen (Falcon 2025, 12 x 75 mm, Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA) für zwei Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad (Wasserbad SW mit Thermoaufsatz U3, Julabo, Labortechnik, Seelbach, Deutschland) vorinkubiert. Die mit  $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$  beladenen Membranen wurden jeweils zu 5  $\mu\text{l}$  mit einer abgeschnittenen Gel-Loaderpipettenspitze (20  $\mu\text{l}$  epT.I.P.S., Eppendorf, Hamburg, Deutschland) kurz oberhalb des  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmemediums an die Innenseite des Plastikröhrchens pipettiert und sofort mit einem Vortexer (Vibrafix VF1, Jahnke & Kunkel, IKA Labortechnik) gemixt. Nach 2 sec Vortexen mit einer zeitgesteuerten Start-Stopp-Automatik erfolgte die sofortige Zugabe einer Stopplösung (20  $\mu\text{l}$  20 mM  $\text{LaCl}_3$ ) mit einer Eppendorf Multipette mit aufgesetztem 1,25 ml Dispenser. Durch das  $\text{LaCl}_3$  wird das gesamte extravasikulär gebundene  $\text{Ca}^{2+}$  verdrängt und so die NCX-Aktivität schlagartig unterbunden.

Danach wurde dem Röhrcheninhalt unverzüglich 3 ml eiskalte Waschlösung (2 mM  $\text{LaCl}_3$ , 250 mM Saccharose, 160 mM KCl, 20 mM HEPES/ Tris, pH 7,4) mit einem Dispenser (Varispenser Plus 4961 2-10 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zugesetzt und der Inhalt sofort durch einen Nitrocellulose-Membranfilter (ME 25, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) vakuumfiltriert. Nach nochmaligem Waschen der Filter mit 3 ml eiskalter Waschlösung erfolgte mittels einer flachen Pinzette die Überführung in eine Szintillationsküvette (Super Polyethylen Vial, Packard Instrument Company) und die Trocknung bei 60 °C im Wärmeschrank (OV3, Biometra, Göttingen, Deutschland). Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Liquid Scintillator Irgasafe Plus, Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) wurde nach 8-12 Stunden die  $\beta$ -Strahlung im Flüssigkeits-Szintillationszähler (Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB 2200CA, Fa. Packard BioScience GmbH, Dreieich, Deutschland) gegen  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Standard gemessen. Die im Filter verbleibende und anschließend gemessene  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Menge stellt ein Maß für die durch den NCX in die Membranvesikel transportierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dar. Um die unspezifisch an die Membranvesikel gebundene  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Menge zu berücksichtigen wurden die Messergebnisse nach Versuchsdurchführung mit  $\text{K}^+$ -beladenen Vesikeln von den Versuchen mit  $\text{Na}^+$ -haltigem Beladungsansatz subtrahiert.

## 2.6 Isoliertes, retrograd perfundiertes Rattenherz

### 2.6.1 Perfusionsapparatur

Zur Erfassung der kontraktiven Funktionsparameter wurden die isolierten Rattenherzen in einer Perfusionsanlage retrograd nach Langendorff (Eigenbau) perfundiert (vgl. Abb. 3). Die Perfusion erfolgte mittels einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung, die in einem Vorratsgefäß zunächst erwärmt und begast wurde. Die Perfusion wurde in einem flusskonstanten Modus (10 ml/ min) über eine Schlauchpumpe (Perimax 12, Förderbereich bis 25 ml/ min; Fa. Spetec, Erding, Deutschland) sichergestellt. Das Perfusat gelangte über einen 0,45 µm Filter (Einmalfilterhalter FP 030, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) zunächst in eine Blasenfalle. Der Filter diente zur Verhinderung von koronaren Mikroembolisationen durch Verunreinigungen wie Salzkristalle oder bakterielle Rückstände. Anschließend wurde das Perfusat über einen Wärmetauscher in eine Edelstahlkanüle geleitet. Über diese Kanüle erfolgte die retrograde Perfusion in die Aorta ascendens des isolierten Rattenherzen. Um eine konstante Temperatur von 37 °C sowohl der Perfusionslösung als auch des isolierten Herzen zu gewährleisten, wurden die doppelwandigen Vorratsgefäße, der Wärmetauscher und die Wärmekammer permanent mit 37 °C warmen Wasser thermostatiert.

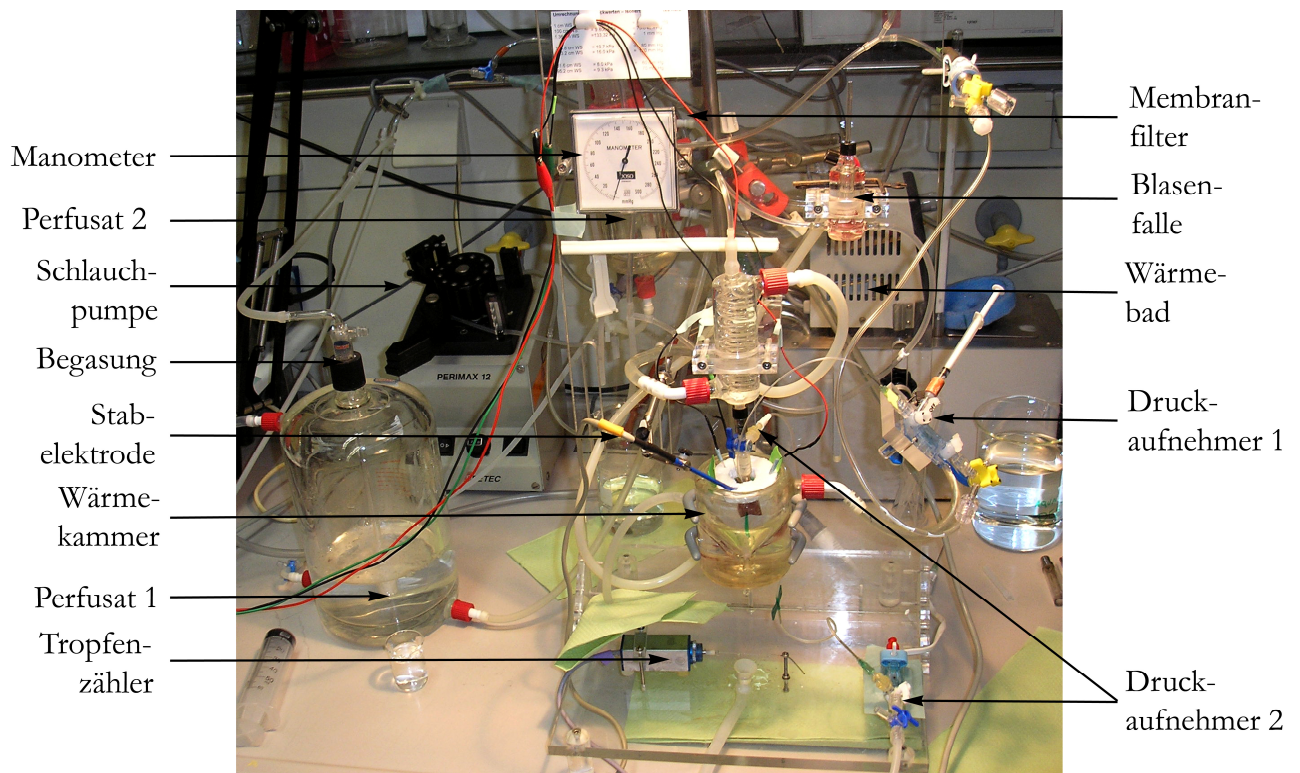


Abb. 3: Perfusionsanlage

Aufgrund des retrograd gerichteten Flusses in der ascendierenden Aorta bleibt die Aortenklappe geschlossen und die Perfusionslösung gelangt über die Koronarostien in das koronare Gefäßsystem und wird anschließend über die Koronarvenen und den Sinus coronarius in das rechte Atrium abgeleitet.

Zur Bestimmung des Koronarflusses wurde das aus dem Herzen abfließende Perfusat unterhalb der Wärmekammer auf einen Tropfenzähler, bestehend aus einem Kraftaufnehmer und einem eingespannten Faden, geleitet.

### **2.6.2 Krebs-Henseleit-Perfusionslösung**

Die für die Ischämie-Reperfusionversuche angewendete Perfusionslösung enthielt 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,1 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,06 mM EDTA, 24,7 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 10 mM HEPES. Darüber hinaus wurden direkt am Versuchstag 11,1 mM D-(+)-Glucose, d. h. 2g D-(+)-Glucose pro Liter Perfusat, als Stoffwechselsubstrat zugesetzt. Die Perfusionslösung wurde im Vorratsgefäß auf 37 °C erwärmt. Um einen physiologischen pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten, erfolgte vor Versuchsbeginn die Begasung der Lösung mit Carbogengas (95 %  $\text{O}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) über eine Glasfritte.

### **2.6.3 Perfusion mit Isoproterenol**

Im Anschluss an den Ischämie-Reperfusionversuch erfolgte die Stimulation der isolierten Herzen mittels des  $\beta$ -adrenergen Agonisten Isoproterenol in einer Konzentration von  $2 \times 10^{-8}$  M. Bei der verwendeten Isoproterenolkonzentration von  $2 \times 10^{-8}$  M wurde in Voruntersuchungen mit entsprechenden Konzentrationsreihen eine maximale linksventrikuläre Druckentwicklung erreicht. Zur Vorbereitung wurden jeweils 50 ml Perfusat in einem separaten Gefäß erwärmt und begast. Kurz vor Beginn der Isoproterenolperfusion wurden 5  $\mu\text{l}$  einer  $2 \times 10^{-4}$  M Isoproterenol-Stammlösung hinzugegeben und gründlich durchmischt. Die Perfusion erfolgte ebenfalls flusskonstant (10 ml/ min) für 5 min. Die Isoproterenol-Stammlösungen wurden in  $\text{N}_2$  begastem Wasser hergestellt und für maximal 2 Wochen bei -80 °C gelagert.

### **2.6.4 Isolation und Präparation der Rattenherzen**

Für die Durchführung der Ischämie-Reperfusionversuche wurden männliche Tiere der Linie 1167 und SERCA2a-Transgen negative Tiere der Zuchtreihe 1127 im Alter von ca. 30 Wochen ausgewählt. Die Herzentnahme erfolgte dabei entsprechend der Ruhephasen des künstlichen Tagesrhythmus der Ratten am Vormittag oder Nachmittag. Die Narkotisierung der Versuchstiere

sowie die Organentnahme von diesen Tieren war vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Tierversuchsnummer 00139/ 05 registriert und genehmigt. Vor der Narkotisierung wurden die Tiere gewogen und anschließend in einen Narkosekäfig gesetzt, der sich in der Abzugseinrichtung des Labors befand. Die Einleitung der Inhalationsnarkose erfolgte für drei Minuten mit 5 Vol.% Isofluran/ 95 Vol.% O<sub>2</sub>, das mittels eines Isofluranverdampfers in den Narkosekäfig geleitet wurde. Zur Erhaltung der Narkose wurden 3 Vol.% Isofluran/ 97 Vol.% O<sub>2</sub> gewählt. Der Gasfluß betrug sowohl für die Einleitung als auch für die Erhaltung der Narkose 800 ml/ min.

Unter adäquater Narkose wurde die Peritonealhöhle kurz unterhalb des Diaphragmas eröffnet und dieses transversal durchtrennt. Mit transcostalen Schnitten, die zur linken und rechten Axilla geführt wurden, erfolgte die Eröffnung des Thorax und die vordere Thoraxwand wurde mit einer Klemme gefasst und nach oben aufgeklappt. Nach der Identifikation des Abgangs des Truncus brachiocephalicus wurde die Aorta ascendens proximal dieses Gefäßabgangs mit einer gebogenen anatomischen Pinzette umfasst und mit einer Schere durchtrennt. Mit einer feinen Schere wurde das Herz aus den verbliebenen mediastinalen Strukturen herausgelöst und sofort in eiskalte unbegaste Krebs-Henseleit-Lösung getaucht. Durch die vor dem Herstillstand auftretenden, spontanen Kontraktionen wurde das im Herzen befindliche Restblut ausgeworfen, so dass das Risiko einer Thrombenbildung dadurch erheblich minimiert wurde. Die Kühlung bewirkte zudem eine Verlangsamung der Stoffwechselprozesse und somit eine Reduktion von hypoxischen Gewebeschäden. Die Aorta ascendens wurde mit Hilfe zweier anatomischer Pinzetten dargestellt und mittels einer Fadenligatur an der Kanüle der Perfusionsanlage fixiert.

Die Koronarperfusion nach Langendorff wurde zugleich begonnen und etwaige Gewebsreste des Mediastinums wurden entfernt. Durch dieses Vorgehen konnte von der Eröffnung der Bauchhöhle bis zum Beginn der retrograden Perfusion eine Zeit zwischen 60 und 90 Sekunden erreicht werden.

Da das Perfusat über das rechte Herz abgeleitet wurde, erfolgte zur Druckentlastung des rechten Ventrikels mittels eines kleinen Schnitts eine Erweiterung im Bereich des Pulmonalarterienstamms.

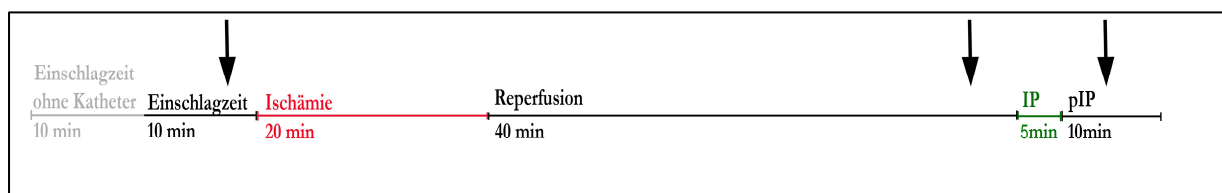
Zunächst wurde jedes Herz ohne weitere Intervention für 10 min perfundiert. Anschließend erfolgte durch einen kleinen Schnitt die Eröffnung des linken Atriums im Bereich der Pulmonalvenenmündung. Der eigens hergestellte Ballonkatheter (Ballonvolumen ca. 80 µl) wurde dann durch diese Öffnung über die Mitralklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben. Das flüssigkeitsgefüllte System aus Ballon, Katheterschlauch und Druckaufnehmer (Transducer TBD 1222, Fa. FMI GmbH, Seeheim-Oberbeerbach, Deutschland) war mit einem 1:1-Gemisch aus Ethanol 80 % und Wasser befüllt, um die Löslichkeit von Luft und damit das Auftreten von Luftblasen in die-

sem System zu vermindern. An der Katheter-Druckaufnehmer-Einheit war eine ebenfalls mit Äthanol-Wasser-Gemisch befüllte Spritze angeschlossen, über die unter den linksventrikulären Kontraktionen stufenweise eine Vorlast von 8-10 mmHg eingestellt wurde.

Die Registrierung der linksventrikulären Druckverläufe erfolgte über einen Analog-Digitalwandler (Powerlab 4/ 20, Fa. ADInstruments, Milford, MA, USA), der an das Katheter-Druckaufnehmer-System angeschlossen war.

### 2.6.5 Versuchsprotokoll

Nach einer zehnmütigen retrograden Perfusion ohne Intervention wurde der Katheter in den linken Ventrikel vorgeschoben, die Aufzeichnung der Druckkurven gestartet und erneut eine Einschlagzeit von 10 min abgewartet. Die nach dieser Einschlagphase registrierten Daten wurden als basale Parameter für die Auswertung herangezogen. Anschließend erfolgte mittels Stabelektrode, die an einen Brückenverstärker angeschlossen war (Fa. HSE, March-Hugstetten, Deutschland), im Bereich des rechten Vorhofs eine elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 5 Hz. Danach wurde für die Perfusion unterbrochen und somit die 20-minütige Phase der globalen Ischämie eingeleitet. Hier wurden die registrierten Daten zu den Zeitpunkten 30 sec, 1 min, 2 min, 4 min, 10 min und 20 min ausgewertet. Durch erneuten Start der Perfusion begann die 40-minütige Reperfusionphase, wobei die Daten zu den Zeitpunkten 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min ausgewertet wurden. Anschließend erfolgte erneut eine elektrische Stimulation bei 5 Hz. Nun folgte die Perfusion mit 50 ml Isoproterenollösung ( $2 \times 10^{-8}$  M) für ca. 5 min. Für die Auswertung während der Isoproterenolwirkung wurden Daten aus dem peak- und steady state-Bereich ausgewählt. Es schloss sich nun die Isoproterenol-Auswaschphase an, wobei nach 5 min wiederum eine elektrische Stimulation mit 5 Hz erfolgte. Abbildung 4 zeigt schematisch das Versuchsprotokoll.



**Abb. 4: Protokoll des Ischämie-Reperfuionsversuchs**

IP - Perfusion mit Isoproterenol ( $2 \times 10^{-8}$ M), pIP – Isoproterenol-Auswaschphase, Pfeile markieren Zeitpunkte der elektrischen Stimulation mit 300 bpm.

### 2.6.6 Datenverarbeitung

Für die kontinuierliche Aufzeichnung und Weiterverarbeitung der über den Analog-Digitalwandler (Powerlab 4/ 20, Fa. ADInstruments, Milford, MA, USA) registrierten Daten wurde die Software Chart v 5.5.4 (Fa. Wisstech, Oberhausen, Deutschland) verwendet. Dabei

betrug die Aufzeichnungsrate 400 Messwerte pro Sekunde. Aus diesen aufgezeichneten Daten wurden von der Software folgende linksventrikuläre Parameter berechnet und ausgegeben:

- Herzfrequenz (Hf),
- enddiastolischer Druck (LVEDP),
- maximal entwickelter Druck (LVdP),
- maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $+dP/dt_{\max}$ ),
- maximale Druckabfallsgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{\max}$ ),
- Zeit bis zum Erreichen des Druckmaximums – time to peak (TtP),
- Zeit des Druckabfalls auf 50% des maximalen Drucks – pressure half time (PHT),
- Zeitkonstante für die späte Relaxation Tau ( $\tau$ ),
- Druck-Frequenz-Produkt (rate\*pressure).

Für die Auswertung der aufgezeichneten Daten mit der Chart-Software wurden zu entsprechend gewählten Zeitpunkten des Versuchsablaufs jeweils sechs Kontraktionen ausgewählt und anschließend gemittelt.

Die aus dem registrierten Druckverlauf errechneten Parameter ermöglichen dabei eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Phasen des Kontraktionsablaufs.

Im Folgenden werden die einzelnen Funktionsparameter näher beschrieben. Die Herzfrequenz (Hf) wird von der Software durch Bestimmung der Zeitabstände zwischen den Maxima der einzelnen Kontraktionsamplituden berechnet. Für die Beurteilung des diastolischen Druckverlaufs wird der enddiastolische linksventrikuläre Druck (LVEDP) unmittelbar vor Beginn des systolischen Druckanstiegs ermittelt. Dieser Wert wurde zum Beginn der Versuche auf 8-10 mmHg eingestellt. Aus der Differenz von maximal und minimal gemessenem Druck lässt sich der maximal (aktiv) entwickelte linksventrikuläre Druck (LVdP) herleiten. Zur weiteren Einschätzung der kontraktilen Funktion dient systolisch die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $+dP/dt_{\max}$ ) und diastolisch die maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{\max}$ ). Diese Parameter stellen den maximalen Anstieg ( $+dP/dt_{\max}$ ), bzw. den maximalen Abfall ( $-dP/dt_{\max}$ ), entsprechend der 1. Ableitung der aufgezeichneten Druckkurve dar. Als Zeitparameter für den systolischen Teil des Kurvenverlaufs dient time to peak (TtP), wobei die Zeitspanne ausgehend vom basalen linksventrikulären diastolischen Druck bis zum Erreichen des maximalen Drucks gemessen wird. Pressure half time (PHT) und die Zeitkonstante Tau ( $\tau$ ) stellen Zeitparameter der Relaxation dar. Für die frühe Relaxation wird PHT als 50 %iger Abfall der Druckkurve ausgehend vom Druckmaximum ermittelt. Die späte, isovolumetrische Phase der Relaxation wird durch Tau repräsentiert. Die isovolumetrische Relaxation beginnt dabei zum Zeitpunkt der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit. Die Beschreibung der an die Druckkurve

angenäherten Exponentialfunktion erfolgt mit der Formel  $X_t = T_1 \exp (t-t^0/\tau) + n$  ( $T_1$  - Druck zum Zeitpunkt von  $-dP/dt_{\max}$ ,  $n$  - Schnittpunkt der variablen Asymptote mit der Ordinate,  $X_t$  - beliebiger Druck nach  $T_1$ ,  $t^0$  und  $t$  - die entsprechenden Zeiten von  $T_1$  und  $X$ ). Die Zeitkonstante  $\tau$  kann so von der Software errechnet werden.

## 2.7 Statistik

Für statistische Analysen wurde die Statistik-Software SigmaStat 3.5.0 (Fa. SYSTAT Software Inc., Chicago, Illinois, USA) benutzt. Bei normalverteilten Daten der Versuchsgruppen wurden zunächst mit der Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) auf signifikante Gruppenunterschiede getestet. Im positiven Falle wurde anschließend der Holm Sidak-Test verwendet, um auf signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen zu prüfen. Analog dazu wurde im Falle von nicht normal verteilten Messwerten bzw. bei ungleichen Varianzen zuerst eine Kruskal-Wallis-Varianzanalyse von Rängen durchgeführt, gefolgt vom Dunn-Test. Zur Analyse abhängiger Verteilungen diente der gepaarte t-Test. Für lineare Regressionsanalysen wurde die herkömmliche Methode der kleinsten Quadrate genutzt. Falls nicht anders angegeben, sind alle Werte als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Existenz eines statistisch signifikanten Gruppenunterschiedes wurde bei  $p < 0.05$  angenommen.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Tiermodelle

Die Untersuchung des kardialen Erscheinungsbilds der Versuchstiere mit Renin2- und SERCA2a-Überexpression erfolgte unter Verwendung verschiedener transgener Tiermodelle.

Das für diese Arbeit verwendete (mRen2) 27-transgene Rattenmodell wurde am Deutschen Institut für Bluthochdruckforschung Heidelberg u. a. von Prof. Dr. Ganten entwickelt.

Ein ursprünglich aus dem Mausgenom extrahiertes DBA/2J Ren2-Gen wird in diesem Modell zusätzlich zum endogenen Renin-Gen exprimiert. Aufgrund dieser Ren2-Überexpression weisen diese Tiere einen erhöhten Plasmapreninspiegel auf, so dass eine arterielle Hypertension sowie eine linksventrikuläre Hypertrophie resultiert<sup>30</sup>. Des Weiteren wurde eine SERCA2a-transgene Rattenlinie (1167) verwendet, die u. a. von Dr. Vetter am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin generiert wurde. Diese Linie wurde anschließend im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin in Zusammenarbeit mit den zuständigen Fachtierpflegern weitergezüchtet. Dieses Tiermodell exprimiert neben dem endogenen SERCA2a-Gen ein in das Genom integriertes SERCA2a-Transgen, das über einen humanen CMV-Enhancer und einen Hühnchen- $\beta$ -Aktin-Promoter reguliert wird.

Die Verpaarung heterozygoter SERCA2a-transgener weiblicher (Linie 1167) mit homozygoten (mRen2) 27-transgenen männlichen Tieren brachte neben einfach transgenen heterozygoten (mRen2) 27 (Ren2)- Tieren auch doppelt transgene (mRen2) 27/ SERCA2a (SERen) Nachkommen hervor. Diese waren für das entsprechende Transgen jeweils heterozygot.

Dieses SERen-Tiermodell (Nachkommenreihe 1127) stellt die Grundlage der vorliegenden Arbeit dar.

Die aus der Zucht der SERCA2a-transgenen Linie 1167 hervorgegangenen SERCA2a negativen Tiere wurden in dieser Arbeit als Kontrollgruppe verwendet, da in vorausgegangenen Arbeiten keine phänotypischen Unterschiede gegenüber Wildtypen gefunden wurden<sup>47</sup>.

Für die Identifizierung des (mRen2) 27-Transgens sowie die Differenzierung zwischen SERCA2a-positiven, bzw. -negativen Versuchstieren erfolgte drei bis vier Wochen post partum eine Genotypisierung mittels PCR, Gelelektrophorese und Dot-Blot-Analyse.

Im beobachteten Zeitraum von April 2005 bis Juli 2007 brachte die Zucht der Reihe 1127 insgesamt 369 Tiere hervor. Dabei ergab sich eine Geschlechterverteilung von 182 männlichen und 187 weiblichen Nachkommen. Unter den weiblichen Nachkommen fanden sich 104 (56 %) einfach (mRen2) 27-transgene Tiere und 83 (44 %) doppelt transgene (mRen2) 27/ SERCA2a Tiere.

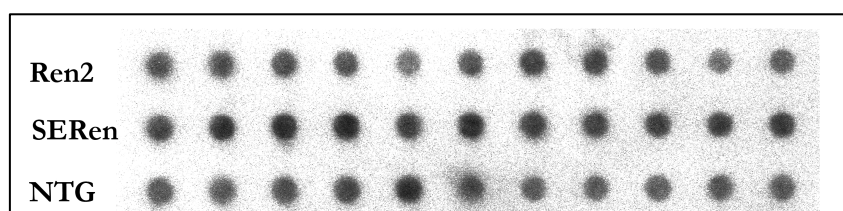
Die Genotypisierung der männlichen Versuchstiere ergab für die Ren2-Gruppe 95 (52 %) und für die SERen-Gruppe 87 (48 %) Tiere.

Aus der Zucht der SERCA2a-transgenen Linie 1167 gingen 943 (50,3 %) weibliche und 933 (49,7 %) männliche Nachkommen hervor. Unter den weiblichen Ratten waren 463 (49 %) SERCA2a-transgen negative und 480 (51 %) heterozygote SERCA2a transgene Tiere. Bei den männlichen Nachkommen ergab sich ein Verhältnis von 447 (48 %) SERCA2a-transgen negativen, 486 (52 %) einfach transgenen Tieren. Doppelt SERCA2a-transgene Nachkommen konnten bei dieser Zucht nicht nachgewiesen werden.

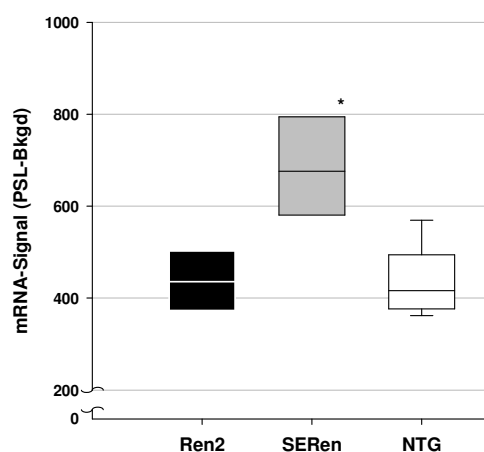
### 3.2 SERCA2a-mRNA-Spiegel mit Dot Blot-Analyse

Zum quantitativen Nachweis der kardialen mRNA-Spiegel von SERCA2a in den SERCA2a/Ren2-doppelt transgenen Tieren wurde eine Dot Blot-Analyse mit linksventrikulärer RNA vorgenommen.

**A**



**B**



**Abb. 5:** Darstellung der Ergebnisse der quantitativen Northern-Dotblot-Analyse der linksventrikulären SERCA2a-mRNA-Spiegel von Renin-transgenen (Ren2), SERCA2a/Ren2 doppelt transgenen (SERen) und nicht transgenen Kontrolltieren (NTG).

**A** Autoradiogramm des Northern-Dotblots (1,5 µg totale mRNA pro Dot).

**B** Ergebnisse der quantitativen Auswertung der SERCA2a-mRNA-Signalstärke der einzelnen Dots für jeweils 8 Tiere pro Gruppe. \* $p < 0,05$  vs. NTG und Ren2. PSL, Pixel; Bkgd, Hintergrund. Die Entnahme notwendiger Gewebeproben aus dem linken Ventrikel der isoliert perfundierten Herzen erfolgte nach Beendigung der Ischämie-Reperfusionversuche.

Wie Abbildung 5 zeigt, ergeben sich für die SERen-Gruppe um 63 % höhere SERCA2a-mRNA-Spiegel im Vergleich zur NTG Gruppe. Ein vergleichbares Ergebnis (+69 % vs. NTG) wurde für

die SERCA2a-transgene Kontrollgruppe (SERCA2a) ermittelt. Erwartungsgemäß sind die SERCA2a-mRNA-Spiegel der Ren2-Tiere und der nichttransgenen Versuchsgruppe vergleichbar.

### 3.3 Allgemeine Charakterisierung der Versuchstiere

Tabelle 1 zeigt die Körper- und Herzgewichte sowie die spontanen Herzfrequenzen der isoliert perfundierten Herzen der drei Versuchsgruppen.

**Tab. 1:** Absolute und relative Feuchtgewichte des linken und rechten Ventrikels, Körpergewichte sowie basale Herzfrequenzen retrograd perfundierter isolierter Herzen von 30 Wochen alten nichttransgenen (NTG), Renin-transgenen (Ren2) und SERCA2a/ Renin-doppelt transgenen (SERen) männlichen Ratten

Parameter	NTG n=10	Ren2 n=18	SERen n=13
<b>BW</b> (mg)	492 ± 10	529 ± 8* (+7)	505 ± 11 (+3)
<b>LVW</b> (mg)	1411 ± 38	1958 ± 63* (+39)	1918 ± 39* (+36)
<b>RVW</b> (mg)	373 ± 16	358 ± 26 (-4)	380 ± 20 (+2)
<b>HW</b> (mg)	1784 ± 48	2317 ± 72* (+30)	2299 ± 51* (+29)
<b>LVW/BW</b> (mg/g)	2,87 ± 0,07	3,71 ± 0,12* (+29)	3,82 ± 0,12* (+33)
<b>RVW/BW</b> (mg/g)	0,76 ± 0,10	0,68 ± 0,05 (-11)	0,76 ± 0,04 (±0)
<b>Hf</b> (1/min)	259 ± 16	208 ± 6* (-20)	218 ± 8 (-16)

Das linksventrikuläre Feuchtgewicht (LVW) und das rechtsventrikuläre Feuchtgewicht (RVW) wurden nach Beendigung des Perfusionsexperimentes ermittelt. Die relativen links- (LVW / BW) und rechtsventrikulären (RVW / BW) Herzgewichte wurden durch Normierung auf das entsprechende Körpergewicht errechnet. Die Herzfrequenz (Hf) der isolierten, perfundierten und spontan schlagenden Herzen wurde nach einer Äquilibrationsphase von 20 min gemessen. Mittelwerte ± SEM für n Tiere pro Versuchsgruppe. \*p<0,05 vs. NTG. Die Zahlen in Klammer zeigen den prozentualen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe NTG.

Die hypertensiven Renin-transgenen (Ren2) und SERCA2a/ Renin-doppelt transgenen (SERen) Tiere weisen eine ca. 30 %-ige linksventrikuläre Hypertrophie auf. Dies belegt der Vergleich der absoluten und relativen linksventrikulären Feuchtgewichte, die nach Beendigung der Herzperfusion bestimmt wurden. Rechtsventrikulär unterscheiden sich diese Parameter

zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nicht. Die Bestimmung der anteiligen linksventrikulären Trockenmassen der einzelnen Versuchsgruppen ergab im Vergleich zu NTG für Ren2 um ca. 11 % und für SERen um ca. 7 % höhere Werte (ohne statistische Signifikanz). Interessanterweise erreicht die spontane Herzfrequenz der isoliert perfundierten Herzen mit linksventrikulärer Hypertrophie nur 80 (Ren2) bzw. 84 % (SERen) der Herzfrequenz der nicht-transgenen Kontrollgruppe. Zwischen relativer linksventrikulärer Masse und der spontanen Herzfrequenz besteht eine inverse lineare Korrelation (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.1 Linksventrikulärer Hydroxyprolingehalt

Zur weiteren Differenzierung des myokardialen Remodelings erfolgte die Bestimmung des linksventrikulären Hydroxyprolingehaltes als Maß für den Kollagengehalt des Gewebes (Abb. 6). Dabei ist der Hydroxyprolingehalt der Ren2-Versuchsgruppe um 48% gegenüber der NTG-Gruppe erhöht. Die Hydroxyprolinwerte für SERen liegen im Vergleich zu NTG um 34 % höher.

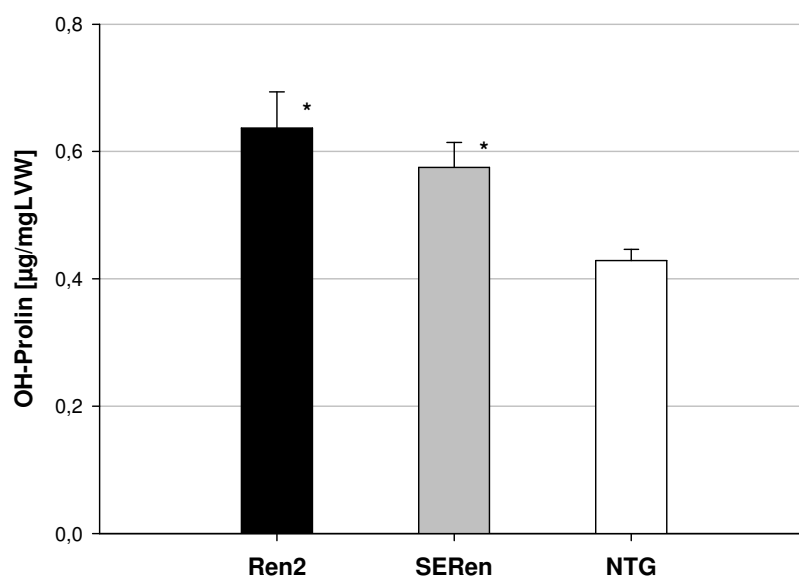


Abb. 6 Hydroxyprolingehalte im linken Ventrikel Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 8 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  vs. NTG.

### 3.3.2 $\text{Na}^+$ -Gradient getriebener $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transport über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher des Sarkolemm

Um eine Einschätzung der kardialen NCX-Aktivität der drei Versuchsgruppen vornehmen zu können, erfolgte die Bestimmung des  $\text{Na}^+$ -Gradient getriebenen vesikulären Influx von  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  an quantitativ isolierten linksventrikulären Membranpräparaten. Wie in Abb. 7 gezeigt, weisen die beiden hypertensiven transgenen Versuchsgruppen im Vergleich zur normotensiven nicht trans-

genen Kontrollgruppe signifikant höhere linksventrikuläre NCX-Aktivitäten auf. Für Ren2 ergibt sich eine Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität um 96 %, für SERen um 78 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwischen beiden hypertensiven Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied (Abb. 7).

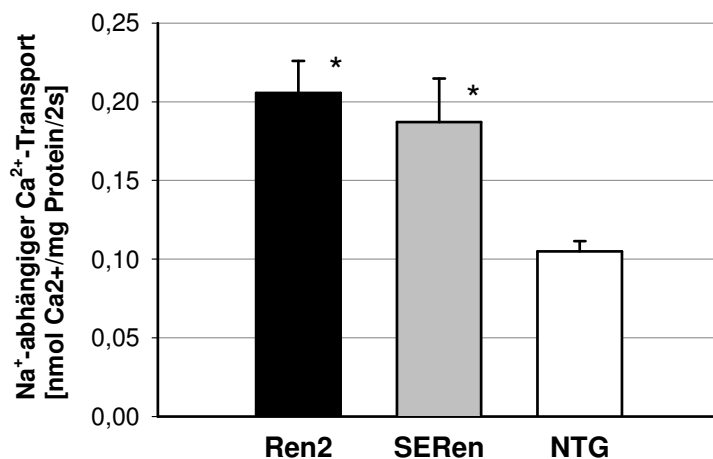


Abb. 7: Sarkolemmale  $\text{Na}^+$ -abhängige  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität in quantitativ isolierten linksventrikulären Grobmembranpräparaten von Renin-transgenen (Ren2), Renin-SERCA2a-doppelt transgenen (SERen) und nicht-transgenen (NTG) Ratten.

Die  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme wurde in einem Ansatz mit  $50 \mu\text{M}$   $^{45}\text{Ca}^{2+}$  in Gegenwart von  $2 \mu\text{M}$  Valinomycin durchgeführt und nach einer Reaktionszeit von zwei Sekunden gestoppt. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=10$  pro Gruppe,  $+p<0,05$  vs. NTG. Die Gewinnung der linksventrikulären Gewebeprobe für die Membranpräparation erfolgte nach Beendigung der Ischämie-/ Reperfusionsexperimente (s. unter Methoden).

### 3.4 Linksventrikuläre kontraktile Funktion unter basalen Bedingungen

Für eine vergleichende Analyse der linksventrikulären Kontraktionsparameter isovolumetrisch kontrahierender, nach Langendorff retrograd perfundierter Herzen von Ren2-, SERen- und NTG Versuchstieren erfolgt zunächst eine Darstellung der systolischen und anschließend der diastolischen Funktionsparameter unter basalen Bedingungen nach 20 min Äquilibration.

#### 3.4.1 Systolische Funktionsparameter

##### 3.4.1.1 Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP)

Wie Abbildung 8A zeigt, ergeben sich für die isovolumetrisch kontrahierenden Ventrikel spontan schlagender Herzen von hypertensiven Ren2 und SERen-Tieren um 19,1 % bzw. 19,9 % höhere Werte des maximal entwickelten linksventrikulären systolischen Drucks (LVdP) gegenüber der NTG-Gruppe. Zwischen der einfach Renin-transgenen und der doppelt transgenen SERCA2a/ Renin Gruppe bestehen jedoch keine Unterschiede. Um den Einfluss der Herzfrequenz beurteilen zu können, erfolgte die elektrische Stimulierung der Herzen mit 5

Hz. Bei dieser einheitlichen Kontraktionsfrequenz wird der in Abbildung 8A gezeigte Unterschied nicht nachgewiesen. Dabei besteht zwischen der spontanen Herzfrequenz und dem LVdP eine inverse Beziehung im Sinne einer negativen Frequenz-Inotropie (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu sind die auf die entsprechende linksventrikuläre Muskelmasse normierten LVdP-Werte in der nichttransgenen Kontrollgruppe deutlich größer als in den beiden transgenen Versuchsgruppen. Bei einheitlicher Kontraktionsfrequenz von  $300 \text{ min}^{-1}$  erreichen die normierten LVdP-Werte der Ren2-Gruppe 68,2 % und die der SERen-Gruppe 69,3 % der entsprechenden Werte der NTG-Gruppe (Abb. 8D). Auch hier sind keine Unterschiede zwischen der Ren2- und der SERen- Gruppe festzustellen.

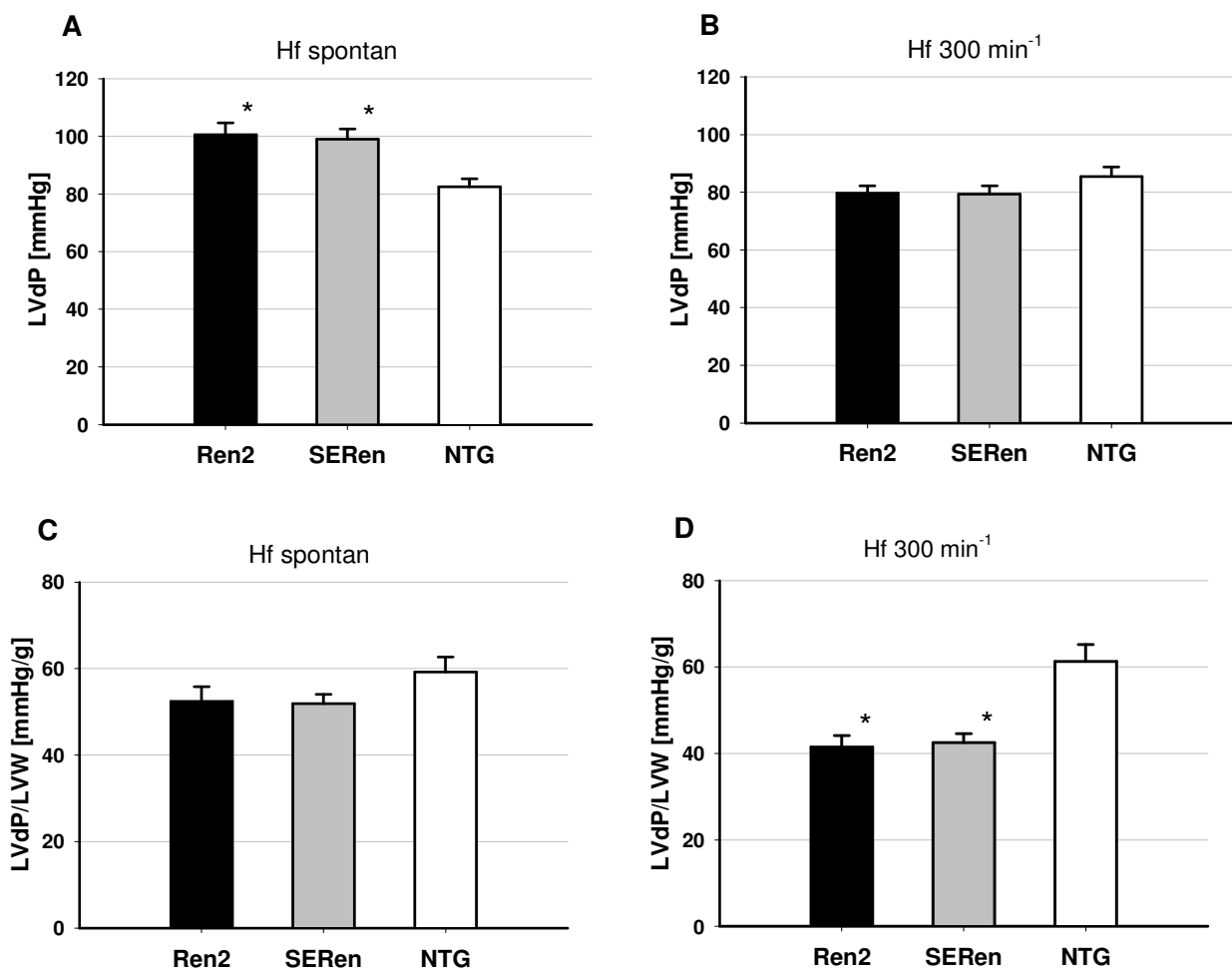


Abb. 8: Darstellung des maximal entwickelten linksventrikulären systolischen Druckes isovolumetrisch kontrahierender isolierter Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.

A Maximal entwickelter linksventrikulärer systolischer Druck (LVdP) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

B LVdP bei Hf von 300/min.

C LVdP normiert auf linksventrikuläres Gewicht (LVW) bei spontaner Hf.

D LVdP normiert auf LVW bei Hf von 300/min. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  vs. NTG.

Zwischen dem relativen linksventrikulären Feuchtgewicht und LVdP besteht dabei eine positive Beziehung (Abb. 9). Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass in den Ren2-Tieren eine

relative linksventrikuläre Kontraktionsschwäche vorliegt, die durch zusätzliche Expression des SERCA2a-Transgens nicht verbessert wird. Bezogen auf den gesamten linken Ventrikel der Ren2- und SERen-Tiere wird das beschriebene kontraktile Defizit durch die vermehrte linksventrikuläre Muskelmasse komplett kompensiert.

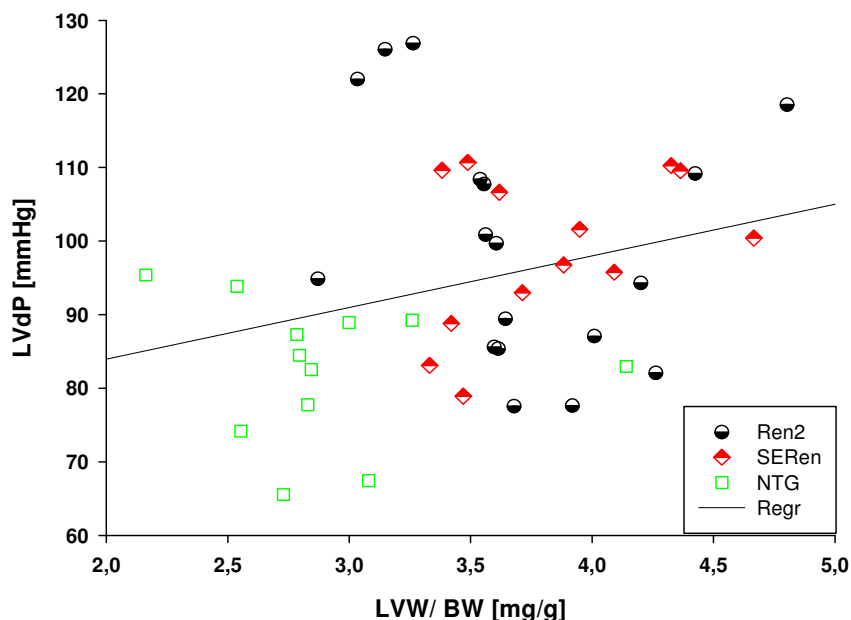


Abb. 9: Beziehung zwischen relativem linksventrikulären Feuchtgewicht (LVW/ BW) und maximal entwickeltem linksventrikulären systolischem Druck (LVdP) isovolumetrisch kontrahierender isolierter Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Perfusionsbedingungen ohne elektrische Stimulation. Daten für insgesamt 43 Tiere der drei Versuchsgruppen.  $r=0,30$ ,  $p=0,0630$ . BW, Körpergewicht; LVW, Feuchtgewicht des linken Ventrikels am Ende des Perfusionsexperimentes.

### 3.4.1.2 Maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ( $+dP/dt_{max}$ )

Zur weiteren Charakterisierung der systolischen Funktion erfolgt im Folgenden die Darstellung der maximalen linksventrikulären Druckerhöhungsgeschwindigkeit ( $+dP/dt_{max}$ ).

Wie Abbildung 10A zeigt, betragen die  $+dP/dt_{max}$ -Werte spontan schlagender Herzen der Ren2-Gruppe sowie der doppelt transgenen SERen-Gruppe jeweils das 1,2-fache der nichttransgenen Kontrollgruppe. Um zu überprüfen, ob dieser Befund durch die geringere spontane Kontraktionsfrequenz von Ren2 und SERen bedingt ist (vgl. Tab. 1), wurde  $+dP/dt_{max}$  zusätzlich aus Druck-Zeit-Kurven elektrisch stimulierter Herzen bestimmt. Tatsächlich unterschieden sich die mittleren  $+dP/dt_{max}$ -Werte der drei Versuchsgruppen bei einer einheitlichen Kontraktionsfrequenz von 5 Hz nicht signifikant voneinander (Abb. 10B). Ein vergleichbares Bild zeigte sich, wenn die normierten Druckerhöhungsgeschwindigkeiten ( $+dP/dt_{max}/LVdP$ ) spontan kontrahierender (Abb. 10C) und elektrisch stimulierter (Abb. 10D) Herzen der drei Versuchsgruppen miteinander verglichen wurden. Abbildung 11 zeigt eine starke positive Korrelation zwischen  $+dP/dt_{max}$  und LVdP.

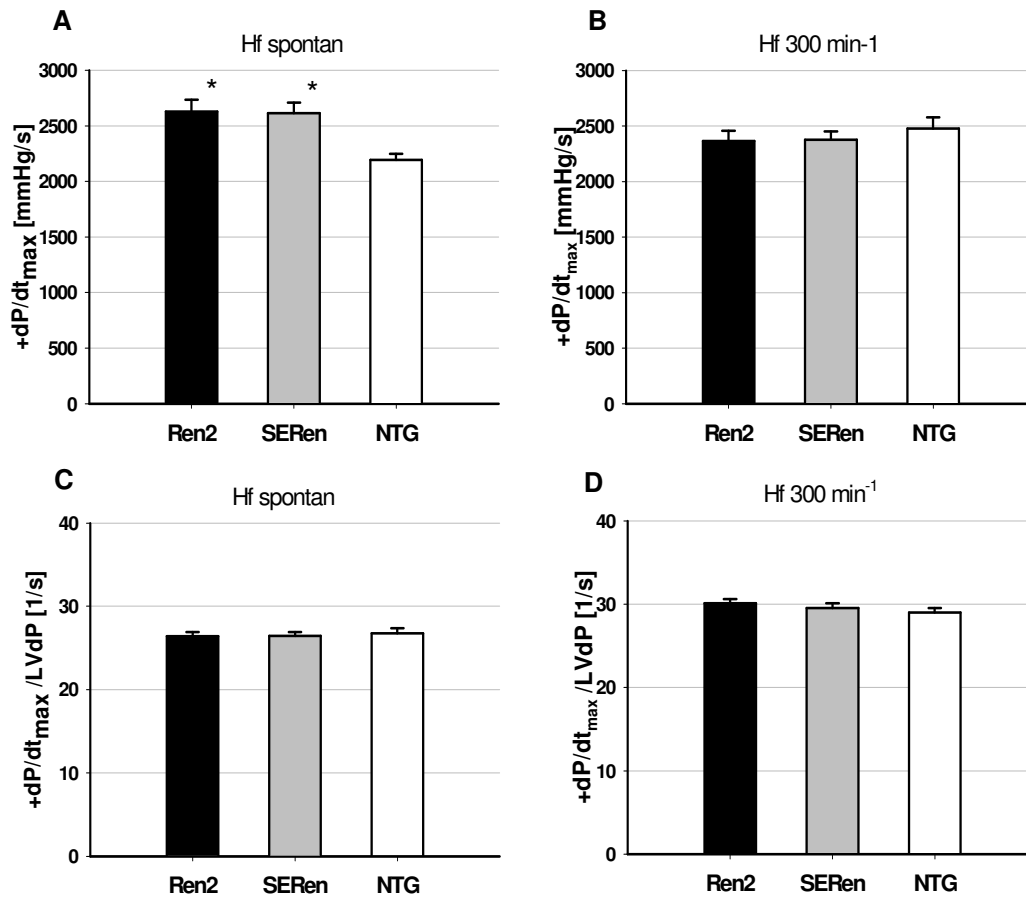


Abb. 10: Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen

A Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt<sub>max</sub>) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

B +dP/dt<sub>max</sub> bei elektrischer Stimulation mit 300 min<sup>-1</sup>.

C +dP/dt<sub>max</sub> normiert auf maximal entwickelten Druck (LVdP) bei spontaner Hf.

D +dP/dt<sub>max</sub> normiert auf LVdP bei Hf von 300/min. Daten sind Mittelwerte ± SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \* p<0,05 vs. NTG.

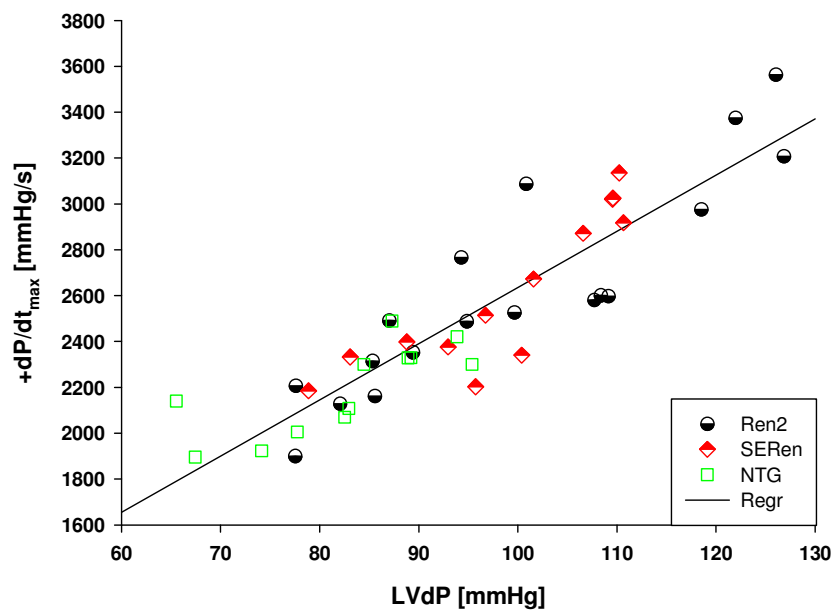


Abb. 11: Darstellung des Zusammenhangs zwischen maximal entwickeltem linksventrikulären systolischen Druck (LVdP) und maximaler linksventrikulärer Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt<sub>max</sub>) isovolumetrisch kontrahierender isolierter Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen. Daten sind Absolutwerte für 43 Tiere aller drei Versuchsgruppen.  $r = 0,90$ ,  $p < 0,05$ .



### 3.4.1.3 Druck-Frequenz-Produkt (rate\*pressure)

Um den in den vorausgegangenen Analysen aufgetretenen deutlichen Frequenzeffekt näher zu untersuchen ist in Abbildung 12 das Druck-Frequenz-Produkt (rate\*pressure) aufgetragen.

Wie in Abbildung 12A gezeigt, unterscheiden sich die rate\*pressure-Werte der drei Versuchsgruppen bei Darstellung des absoluten Produkts nur geringfügig. Unter Normierung von rate\*pressure auf das linksventrikuläre Feuchtgewicht (rate\*pressure/ LVW) ergeben sich signifikant niedrigere Quotienten für Ren2 mit -31,5 % und SERen mit -26,7 % gegenüber NTG. Dies zeigt, wie schon Abbildung 8, eine relative linksventrikuläre Kontraktionsschwäche der beiden transgenen Tiergruppen, die durch die ca. 30% ige linksventrikuläre Hypertrophie vollständig kompensiert werden kann.

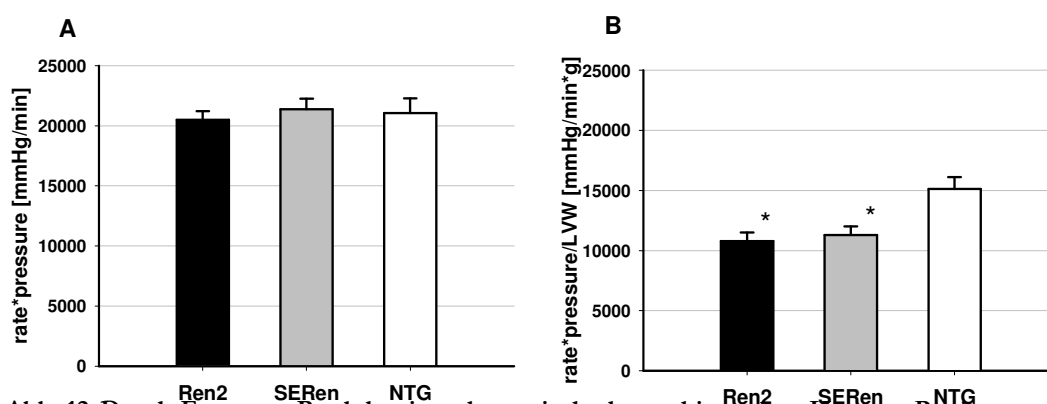


Abb. 12: Druck-Frequenz-Produkt isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.

A Produkt aus maximal entwickeltem linksventrikulären systolischen Druck und spontaner Herzfrequenz (rate\*pressure).

B rate\*pressure normiert auf linksventrikuläres Feuchtgewicht. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*p<0,05 vs. NTG.

### 3.4.1.4 Zeitspanne bis zur maximalen Druckentwicklung (time to peak)

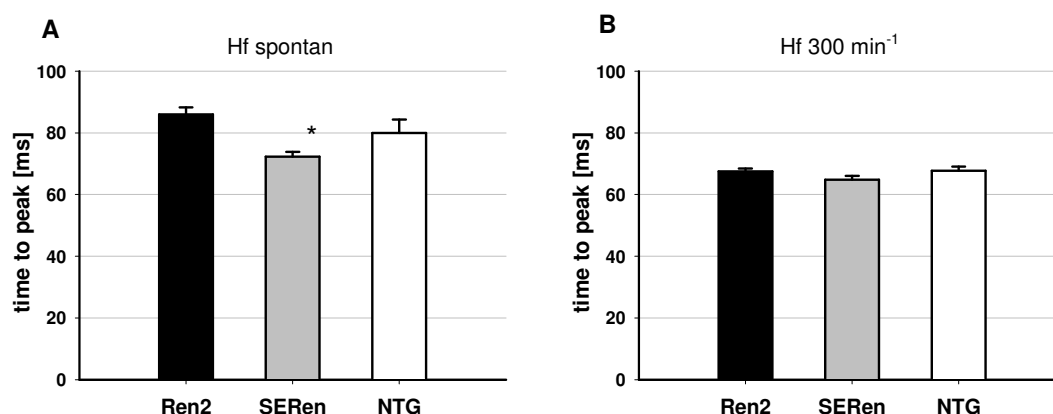


Abb. 13: Zeitspanne ausgehend vom basalen linksventrikulären diastolischen Druck bis zum Erreichen des maximalen linksventrikulären systolischen Drucks (time to peak) isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.

A time to peak (TtP) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

B TtP bei Hf von 300/min. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \* p<0,05 vs. Ren2.

Die Darstellung von time to peak in Abbildung 13 zeigt bei Spontanherzfrequenz einen signifikant geringeren Wert von -15,9 % für SERen gegenüber Ren2. Bei einheitlicher Kontraktionsfrequenz von  $300 \text{ min}^{-1}$  zeigt sich dieser Unterschied dagegen nicht. Somit fällt bei elektrisch getriebener Kontraktionsfrequenz die Verkürzung von TtP in der Ren2-Gruppe gegenüber der SERen-Gruppe bei vergleichbaren Spontanherzfrequenzen deutlich stärker aus.

### 3.4.2 Diastolische Funktionsparameter

Da bei kompensierter linksventrikulärer Hypertrophie mit adäquater linksventrikulärer systolischer Funktion häufig diastolische Funktionsstörungen vorliegen können, werden zusätzlich verschiedene Parameter zur Charakterisierung der diastolischen Funktion dargestellt.

#### 3.4.2.1 Maximale Druckabfallgeschwindigkeit ( $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ )

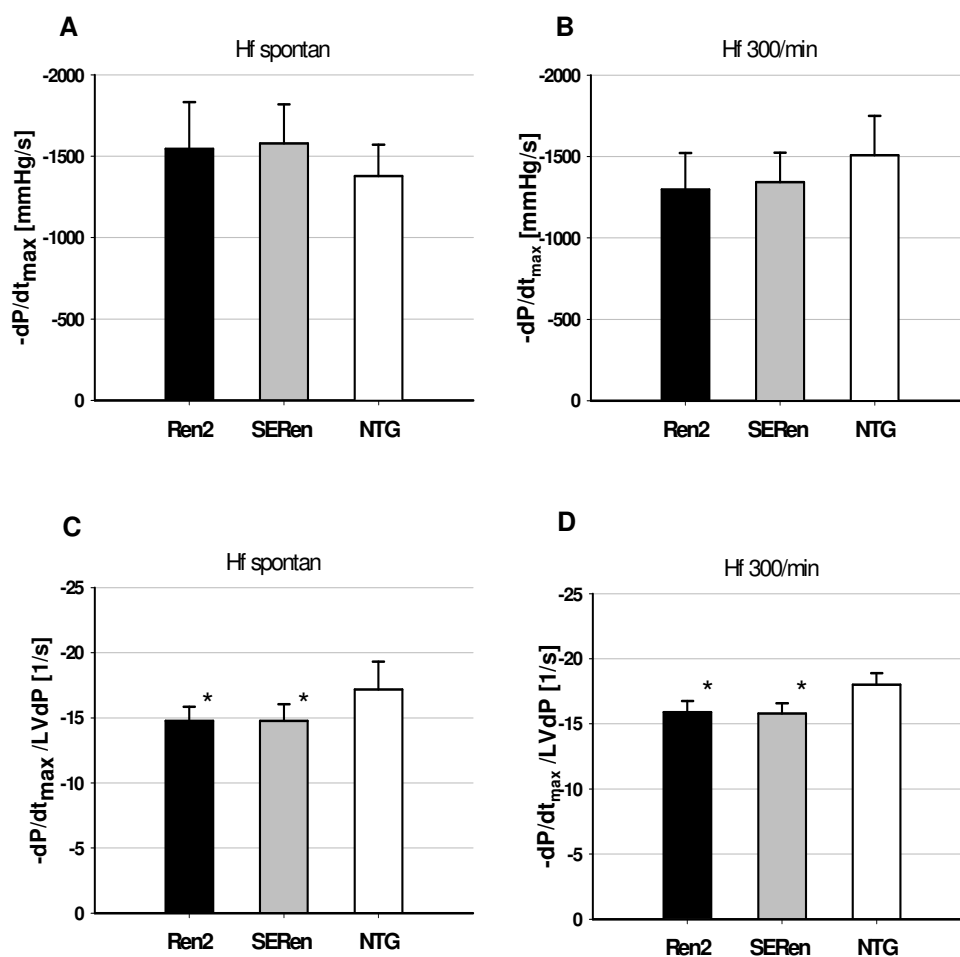


Abb. 14: Maximale Druckabfallgeschwindigkeit isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renintransgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.

A Maximale Druckabfallgeschwindigkeit ( $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ ) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

B  $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$  bei Hf von 300/min.

C  $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$  normiert auf maximal entwickelten Druck (LVdP) bei spontaner Hf.

D  $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$  normiert auf LVdP bei Hf von 300/min.

Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  vs. NTG.

Die in Abbildung 14 gezeigte maximale Druckabfallgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{\max}$ ) ergibt sowohl bei Spontanherzfrequenz als auch unter elektrisch stimulierter Herzfrequenz keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen. Die beiden transgenen Gruppen zeigen im Vergleich zur NTG-Gruppe bei spontaner Herzfrequenz lediglich einen Trend zu höheren Druckabfallgeschwindigkeiten.

Ausgehend von deutlich niedrigen Spontanfrequenzen von Ren2 und SERen (vgl. Tab. 1) ergibt sich bei stimulierter Frequenz eine Umkehr dieses Verhältnisses.

Aufgrund größerer kontraktiven Herzmassen und damit verbundenen höheren Kontraktionsamplituden von Ren2 und SERen (vgl. Abb. 9) erfolgte eine Normierung von  $-dP/dt_{\max}$  auf LVdP. Hier erreichen die Ren2- und die SERen-Gruppe gegenüber der NTG-Gruppe signifikant geringere Druckabfallgeschwindigkeiten sowohl bei spontaner Herzfrequenz (Ren2 und SERen -14 % vs. NTG) als auch bei einheitlicher Kontraktionsfrequenz von 5 Hz (Ren2 -11,7 % und SERen -12,3 % vs. NTG). Dabei besteht zwischen LVdP und dem Betrag von  $-dP/dt_{\max}$  eine deutlich positive Korrelation (Abb. 15). Die nahezu einheitlichen  $-dP/dt_{\max}$ -Werte der beiden transgenen Versuchsgruppen in Abbildung 14 zeigen, dass die Expression des SERCA2a-Transgens in den Herzen der hypertensiven Ren2-Tiere keinen Einfluss auf die Druckabfallgeschwindigkeit hat.

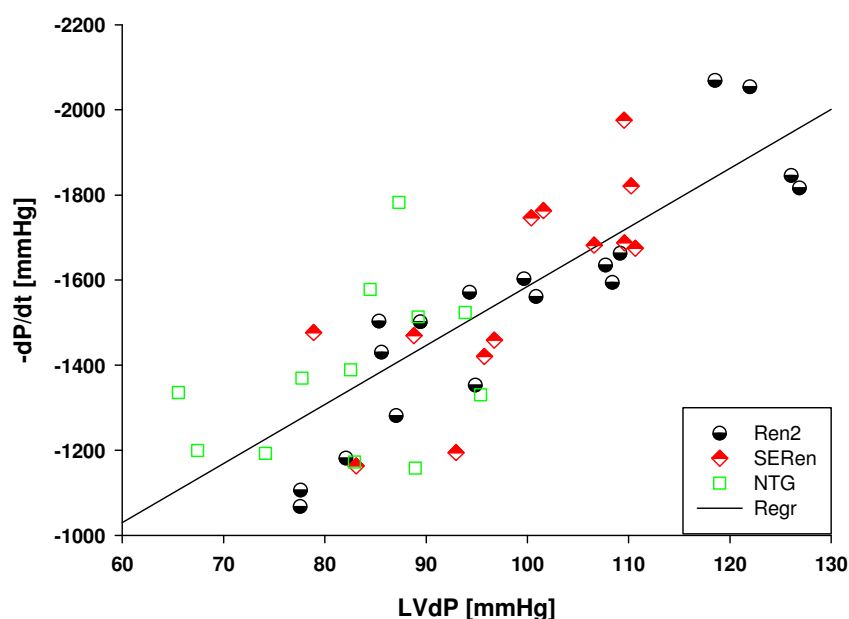


Abb. 15: Darstellung des Zusammenhangs zwischen maximal entwickeltem linksventrikulären systolischem Druck (LVdP) und maximaler linksventrikulärer Druckabfallgeschwindigkeit ( $-dP/dt$ ) isovolumentrisch kontrahierender isolierter Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen. Daten sind Absolutwerte für 43 Tiere aller drei Versuchsgruppen.  $r=0,80$ ,  $p<0,05$ .

### 3.4.2.2 Zeitspanne bis zum 50%igen linksventrikulären Druckabfall (pressure-halftime)

Die in Abbildung 16 dargestellte pressure-halftime spontan schlagender Herzen ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen. Gleiches Bild entsteht bei einheitlicher Kontraktionsfrequenz von  $300 \text{ min}^{-1}$ .

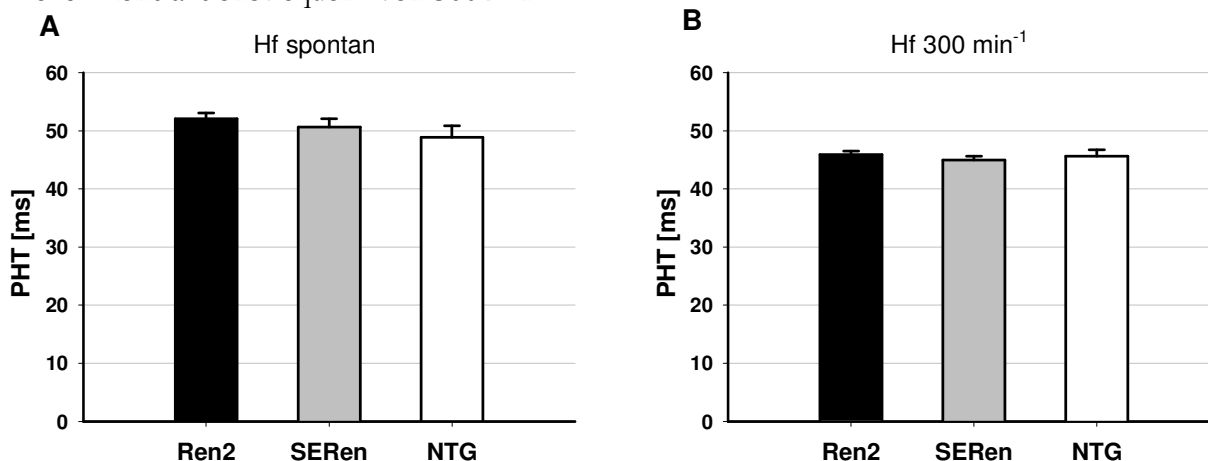


Abb. 16: Zeit des linksventrikulären Druckabfalls von 100 % auf 50 % des maximalen linksventrikulären systolischen Drucks (pressure-halftime) von isovolumentrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.

A Pressure-halftime (PHT) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

B PHT bei Hf von 300/min. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe.

### 3.4.2.3 Zeitkonstante der zweiten Hälfte der Relaxationsphase (Tau)

Zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der zweiten Hälfte der Relaxation ist in Abbildung 17 die Zeitkonstante Tau aufgetragen.

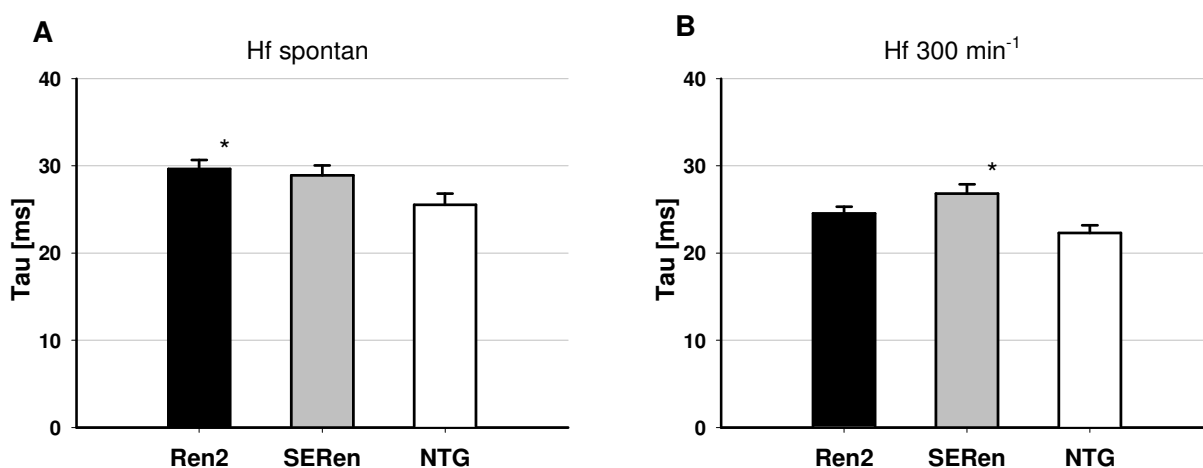


Abb. 17: Zeitkonstante Tau des linksventrikulären Druckabfalls ausgehend von 50 % des maximalen linksventrikulären systolischen Drucks bis zum Erreichen des basalen diastolischen Drucks von isovolumentrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten unter basalen Bedingungen.

A Tau bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

B Tau bei Hf von 300/min. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  vs. NTG.

Unter spontaner Herzfrequenz zeigt die Ren2-Gruppe ein signifikant höheres Tau (+13,7 %) im Vergleich zur NTG-Gruppe. Unter einheitlicher Herzfrequenz von  $300 \text{ min}^{-1}$  (Abb. 17B) kann dieser Unterschied nicht gezeigt werden. Hier ergibt sich ein signifikanter Unterschied von +16,8 % der SERen-Gruppe gegenüber NTG.

### 3.5 Linksventrikuläre kontraktile Funktion unter globaler Ischämie

Zur Verdeutlichung des Ischämieverhaltens der einzelnen Versuchsgruppen erfolgt die Darstellung eines Zeitverlaufs der wichtigsten systolischen und diastolischen Funktionsparameter während der ersten vier von insgesamt 20 Minuten Ischämiezeit. Nach vier Minuten globaler Ischämie konnten keine aktiven Kontraktionen mehr aufgezeichnet werden. Eine Ausnahme bildet der LVEDP, der sich über den gesamten Verlauf der Ischämie entscheidend verändert und somit auch für die gesamte Länge der Ischämiezeit dargestellt wird.

Zur Verdeutlichung der Entwicklung der einzelnen Versuchsgruppen im Vergleich zu ihren Ausgangswerten werden neben den jeweiligen Absolutwerten auch die relativen Änderungen bezogen auf die entsprechenden Basalwerte gezeigt.

#### 3.5.1 LVdP

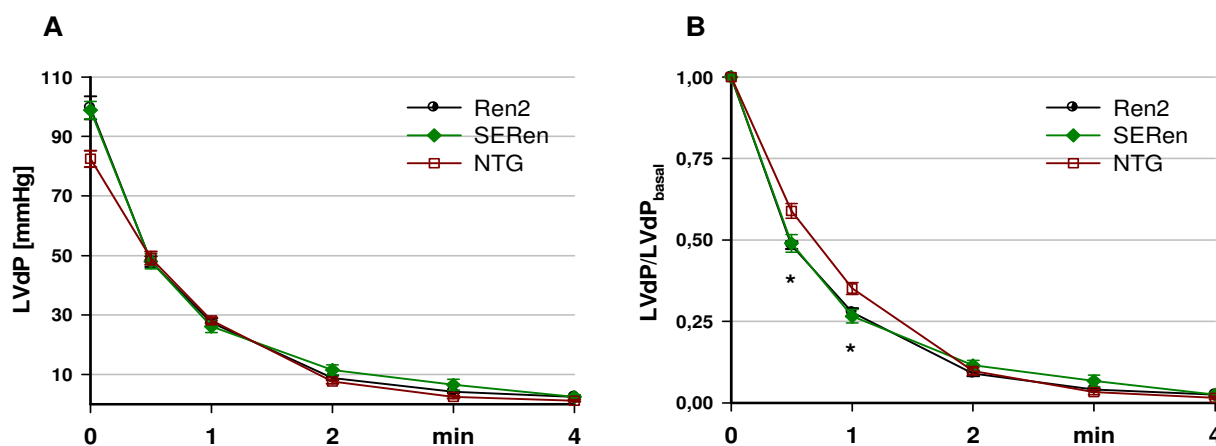


Abb. 18: Entwicklung des maximalen linksventrikulären Drucks während der ersten vier Minuten der Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SER-CA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten ausgehend vom basalen linksventrikulären Druck.

A Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

B LVdP relativ zum Basalwert des LVdP bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG.

Die drei Versuchsgruppen zeigen in Abbildung 18A einen vergleichbaren Abfall des LVdP ohne signifikante Unterschiede. Nach vier Minuten findet bei allen Gruppen keine aktive Druckentwicklung mehr statt. In Abbildung 18B wird deutlich, dass der relative Abfall des LVdP beider transgener Tiergruppen im Verhältnis zu den Ausgangswerten bei 30 Sekunden (Ren2 -16,1%

und SERen -23,1% vs. NTG) und einer Minute (Ren2 -20% und SERen-22,9%) Ischämiezeit gegenüber der NTG-Gruppe deutlich stärker ausfällt. Im weiteren Verlauf gleichen sich die Werte der drei Gruppen an.

### 3.5.2 $+dP/dt_{\max}$

Die Darstellung der Absolutwerte des  $+dP/dt_{\max}$  in Abbildung 19A zeigt zwischen den drei Versuchsgruppen einen homogenen Verlauf. Abbildung 19B zeigt eine signifikant stärkere relative Abnahme des zu den Zeitpunkten 30 Sekunden und einer Minute Ischämiezeit ermittelten  $+dP/dt_{\max}$  in der Ren2- und SERen-Gruppe gegenüber der NTG-Gruppe. Für Ren2 ergibt sich damit eine stärkere relative Abnahme des  $+dP/dt_{\max}$  von 16,1 % bei 30 Sekunden und 20,8 % bei einer Minute verglichen mit NTG. Die SERen-Gruppe zeigt eine verstärkte relative Abnahme des  $+dP/dt_{\max}$  von 22,9 % bei 30 Sekunden und 24,4 % bei einer Minute gegenüber NTG.

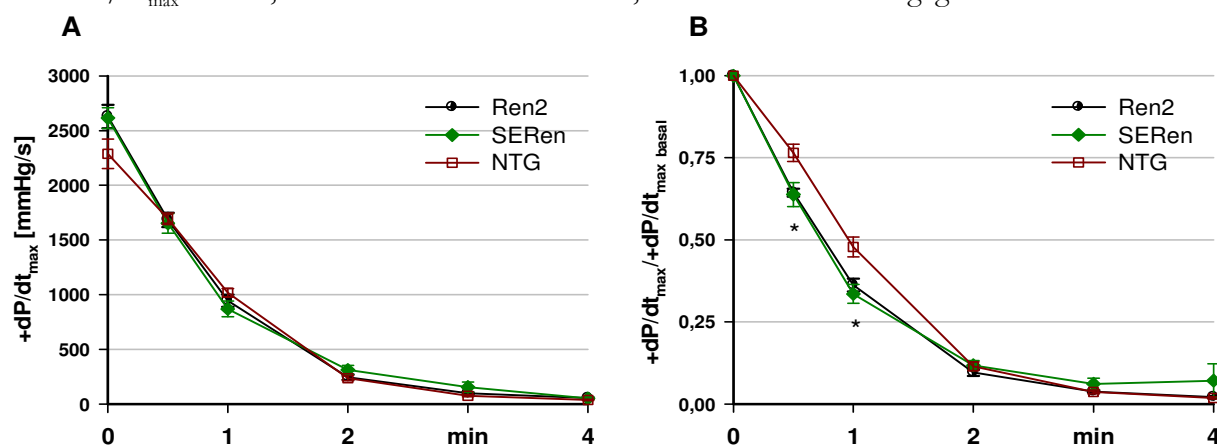


Abb. 19: Entwicklung der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit während der ersten vier Minuten der Globalischämie von isovolumentrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SER-CA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten ausgehend vom Basalwert der Druckanstiegsgeschwindigkeit.

A Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $+dP/dt_{\max}$ ) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

B  $+dP/dt_{\max}$  relativ zum Basalwert von  $+dP/dt_{\max}$  bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG.

### 3.5.3 $-dP/dt_{\max}$

Für die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit ergeben sich lediglich bei der Betrachtung der Relativwerte in Abbildung 20B signifikante Unterschiede zwischen beiden transgenen Versuchsgruppen und der NTG-Gruppe. Nach 30 Sekunden Ischämie zeigt Ren2 einen um 13,4 % stärkeren relativen Abfall von  $-dP/dt_{\max}$  gegenüber NTG. Nach Ablauf einer Minute ist für Ren2 ein um 22,2 % und SERen um 28,8 % deutlich größerer relativer Abfall im Vergleich zu NTG zu verzeichnen.

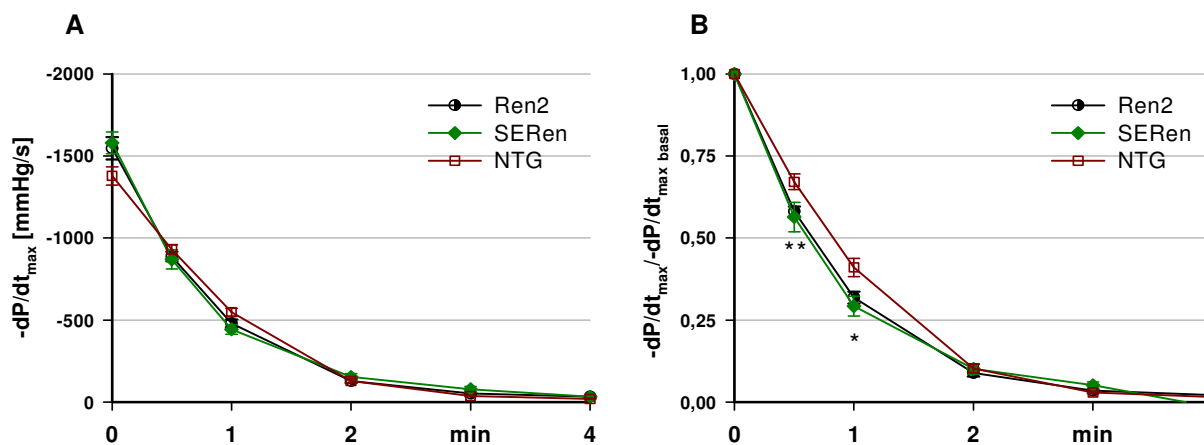


Abb. 20: Entwicklung der maximalen Druckabfallgeschwindigkeit während der ersten vier Minuten der Globalischämie von isovolumentrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SER-CA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten ausgehend vom Basalwert der Druckabfallgeschwindigkeit.

**A** Maximale Druckabfallgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{\max}$ ) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

**B**  $-dP/dt_{\max}$  relativ zum Basalwert von  $-dP/dt_{\max}$  bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG. \*\*  $p < 0,05$  Ren2 vs. NTG.

### 3.5.4 LVEDP

Wie aus Abbildung 21A hervorgeht, steigt der basale linksventrikuläre diastolische Druck (LVEDP) in der 20-minütigen Ischämiephase in allen drei Versuchsgruppen kontinuierlich an. Dieser Anstieg ist in der zweiten Hälfte der Ischämiephase ausgeprägter als in der ersten Hälfte. Besonders auffällig ist der deutliche Unterschied in der Entwicklung des LVEDP zwischen beiden transgenen Gruppen und NTG ab einer Ischämiezeit von 10 Minuten. Dabei erreicht die NTG-Gruppe nach 20 Minuten einen LVEDP von 70,3 mmHg während Ren2 bzw. SERen Werte von 35,6 mmHg bzw. 33,5 mmHg erreichen. Dies entspricht einem ca. 50 % höheren LVEDP der NTG-Gruppe im Vergleich zu beiden transgenen Versuchsgruppen.

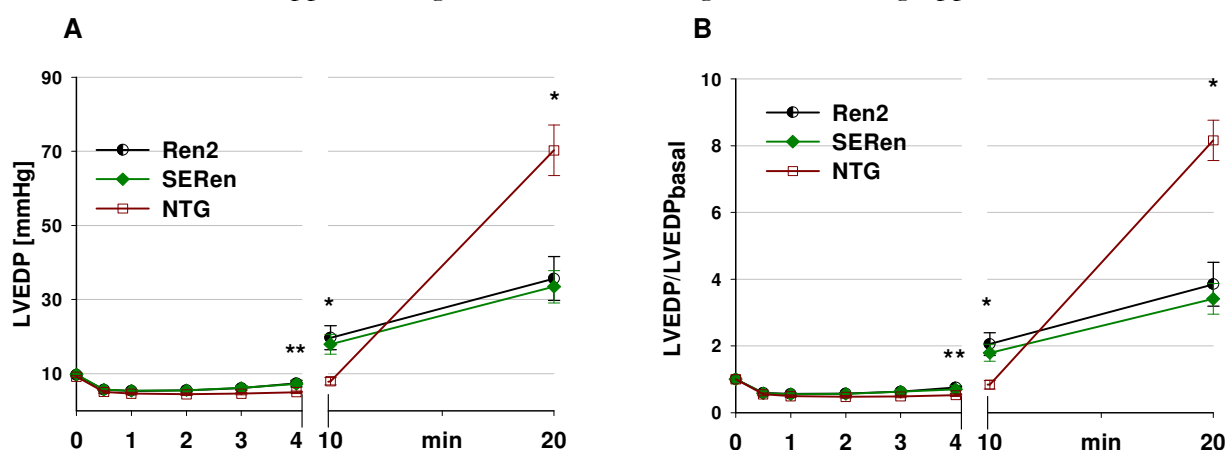


Abb. 21: Entwicklung des basalen linksventrikulären diastolischen Drucks während 20 Minuten Globalischämie von isovolumentrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SER-CA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten ausgehend vom Basalwert des linksventrikulären diastolischen Drucks.

**A** Linksventrikulärer diastolischer Druck (LVEDP) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

**B** LVEDP relativ zum Basalwert von LVEDP bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG. \*\*  $p < 0,05$  Ren2 vs. NTG.

Die Darstellung der Relativwerte in Abbildung 21B verdeutlicht diesen Sachverhalt. Die NTG-Gruppe zeigt hier nach 20 Minuten Ischämie eine 8,2-fache Zunahme des LVEDP gegenüber ihrem Ausgangswert während Ren2 eine 3,8-fache und SERen eine 3,4-fache relative Zunahme erreichen. Die deutlich geringere passive Zunahme (Kontraktur) des basalen linksventrikulären diastolischen Drucks der transgenen Tiergruppen mit linksventrikulärer Hypertrophie ist ein Hinweis auf eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber globaler Ischämie im Vergleich zur nichttransgenen Kontrollgruppe mit normaler linksventrikulärer Herzmasse.

### **3.6 Linksventrikuläre kontraktile Funktion während 40 Minuten Reperfusionzeit**

Die Wiedergabe der Reaktion wichtiger systolischer und diastolischer Funktionsparameter der drei Versuchsgruppen während der 40 Minuten Reperfusionzeit erfolgt ebenfalls anhand eines Zeitverlaufs. Es werden sowohl Absolutwerte als auch Relativwerte, bezogen auf den jeweiligen Ausgangswert, dargestellt.

#### **3.6.1 LVdP**

Wie Abbildung 22A zeigt, verläuft die Entwicklung des LVdP während der gesamten Reperfusionzeit für die SERen- und Ren2-Gruppe auf vergleichbarem Niveau. Dabei ergeben sich signifikant höhere Werte gegenüber der nichttransgenen Kontrollgruppe. Nach 40 Minuten Reperfusion beträgt der LVdP beider transgenen Versuchsgruppen den 1,9 fachen Wert der nichttransgenen Kontrollgruppe.

In Abbildung 22B wird deutlich, dass sowohl die Ren2- als auch die SERen-Gruppe bereits nach 20 Minuten Reperfusion ihre präischämischen Ausgangswerte erreichen, während die NTG-Gruppe auch nach 40 Minuten Reperfusion unterhalb der 75 %-Schwelle der entsprechenden Ausgangswerte bleibt. Auch bei Normierung des LVdP auf die linksventrikulären Feuchtgewichte (Abb. 22C) erreichen beide transgenen Tiergruppen ab einer Reperfusionzeit von 10 Minuten signifikant höhere Werte, die nach 40 Minuten etwa das 1,4-fache der nichttransgenen Kontrollgruppe betragen. Die beiden transgenen Versuchsgruppen zeigen somit hinsichtlich der maximalen linksventrikulären Druckentwicklung eine deutlich schnellere und vollständigere postischämische Regeneration im Vergleich zur nichttransgenen Kontrollgruppe.



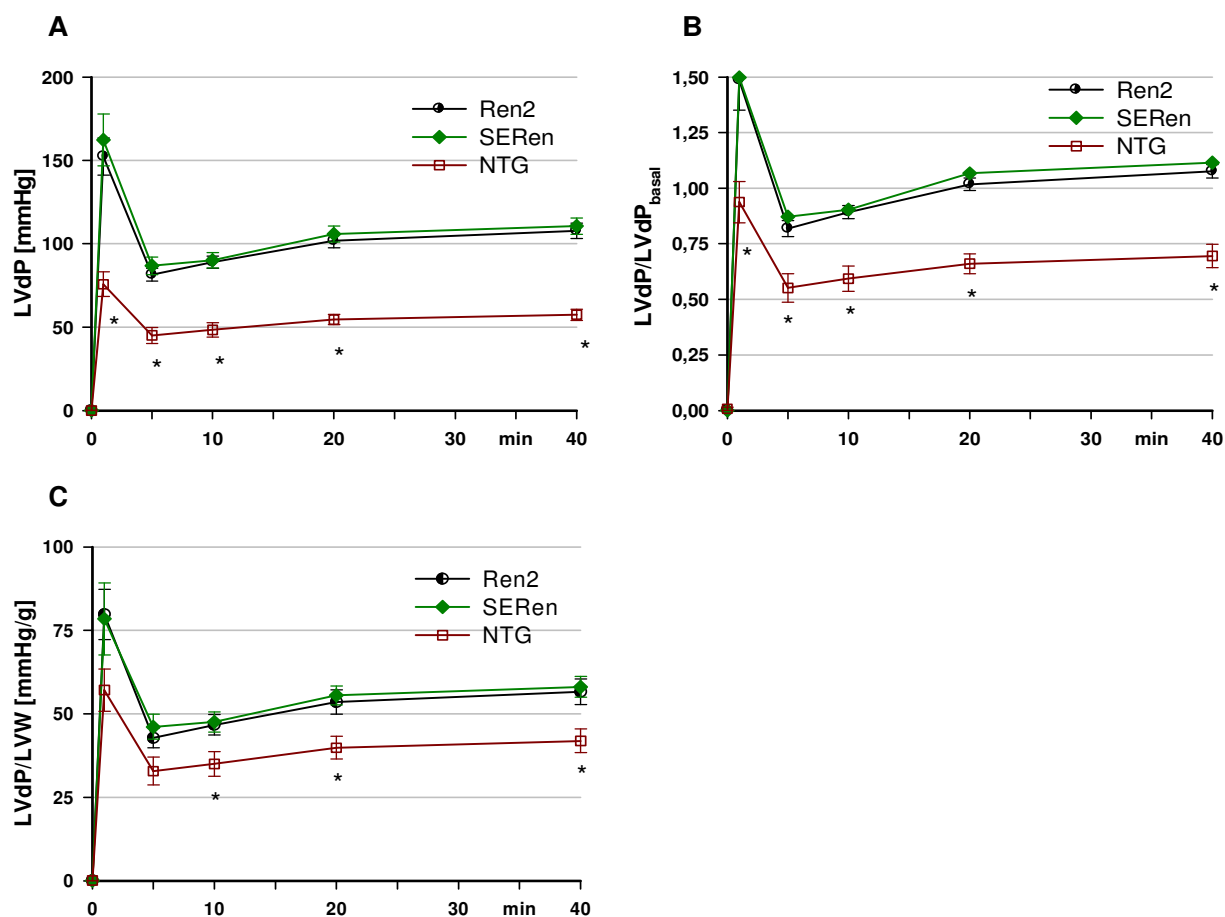


Abb. 22: Entwicklung des maximalen linksventrikulären Drucks während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumentrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.  
 A Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).  
 B LVdP relativ zum Basalwert des LVdP bei spontaner Hf.  
 C LVdP normiert auf LVW bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe.  
 \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG.

### 3.6.2 Rate\*pressure

Das in Abbildung 23A dargestellte Druck-Frequenz-Produkt beträgt für die transgene Ren2 und die doppelt transgene SERen- Gruppe während der Reperfusion signifikant höhere Werte gegenüber der nichttransgenen Kontrollgruppe. Nach einer Reperfusionzeit von 40 Minuten erreichen Ren2 und SERen um 1,4-fach höhere Werte als NTG. Am Ende der Reperfusionzeit erreichen beide transgene Versuchsgruppen ihre präischämischen Ausgangswerte, NTG dagegen lediglich 75 % (Abb 23B). Unter Normierung von rate\*pressure auf LVdP erfolgt über den gesamten Verlauf eine Angleichung der Werte der drei Versuchsgruppen, es sind keine signifikanten Unterschiede mehr feststellbar.

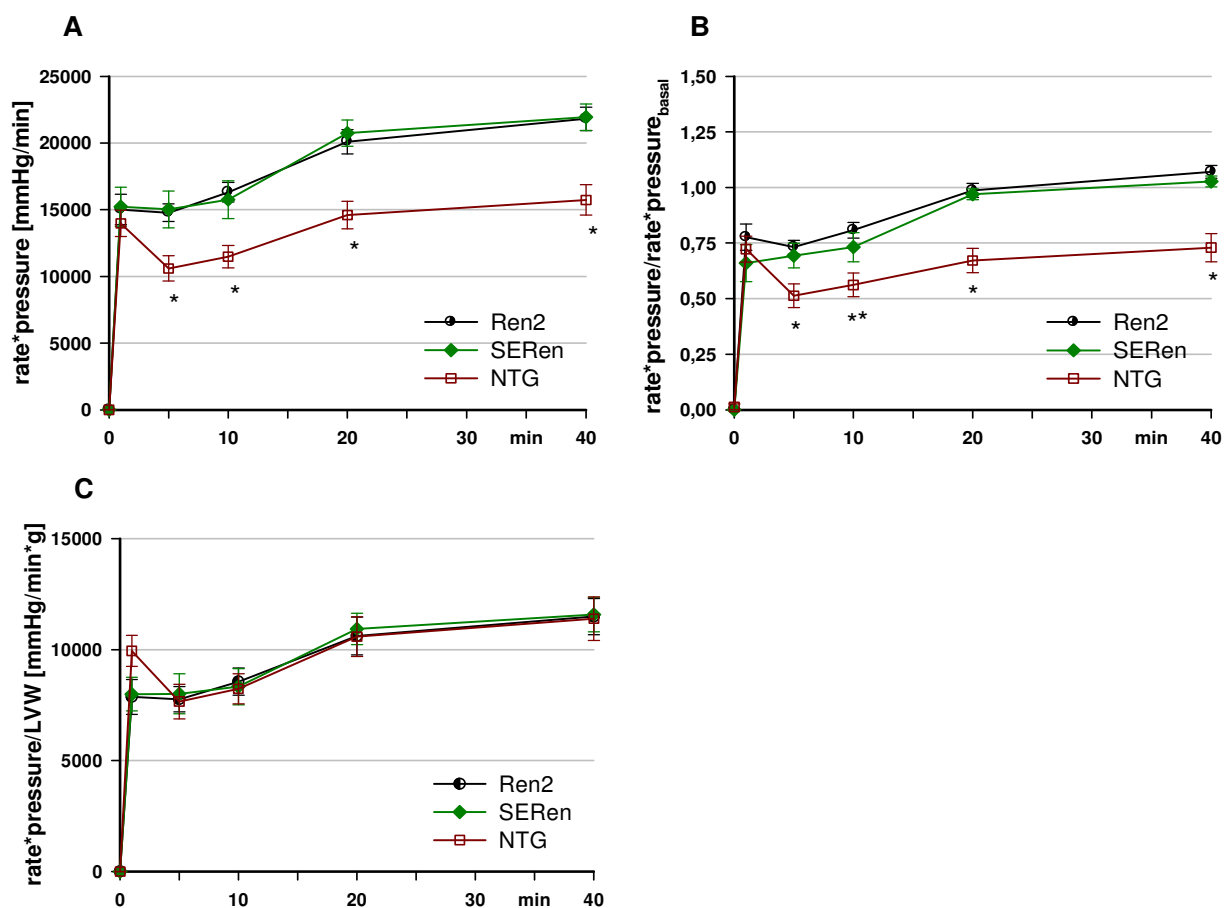


Abb. 23: Entwicklung des Druck-Frequenz-Produkts während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.

A Produkt aus maximal entwickeltem Druck und spontaner Herzfrequenz (rate\*pressure).

B rate\*pressure relativ zum Basalwert von rate\*pressure.

C rate\*pressure normiert auf LVdP bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG. \*\*  $p < 0,05$  Ren2 vs. NTG.

### 3.6.3 $+dP/dt_{max}$

Die Absolutwerte der maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit, gezeigt in Abbildung 24A, ergeben für die Ren2- und SERen-Gruppe während der gesamten Reperfusionzeit signifikant höhere Werte gegenüber der NTG-Gruppe. So erreichen die beiden transgenen Versuchsgruppen nach 40 Minuten Reperfusion jeweils das 1,9-fache der  $+dP/dt_{max}$ -Werte der nichttransgenen Kontrollgruppe. Sowohl die Ren2-Gruppe als auch die SERen-Gruppe haben nach 20 Minuten Reperfusionzeit ihr jeweiliges präischämisches Ausgangsniveau erlangt, wohingegen die NTG-Gruppe nach 40 Minuten Reperfusion lediglich 75 % der Ausgangswerte erzielen (Abb. 24B). Unter Normierung von  $+dP/dt_{max}$  auf LVdP (Abb. 24C) entstehen lediglich für die erste Hälfte der Reperfusionzeit signifikante Unterschiede. So beträgt der Quotient 10 Minuten nach Beginn der Reperfusion für Ren2 und SERen das 1,2-fache der Werte der Kon-

trollgruppe. Bereits nach 20 Minuten haben sich die Werte aller drei Gruppen weitestgehend angeglichen.

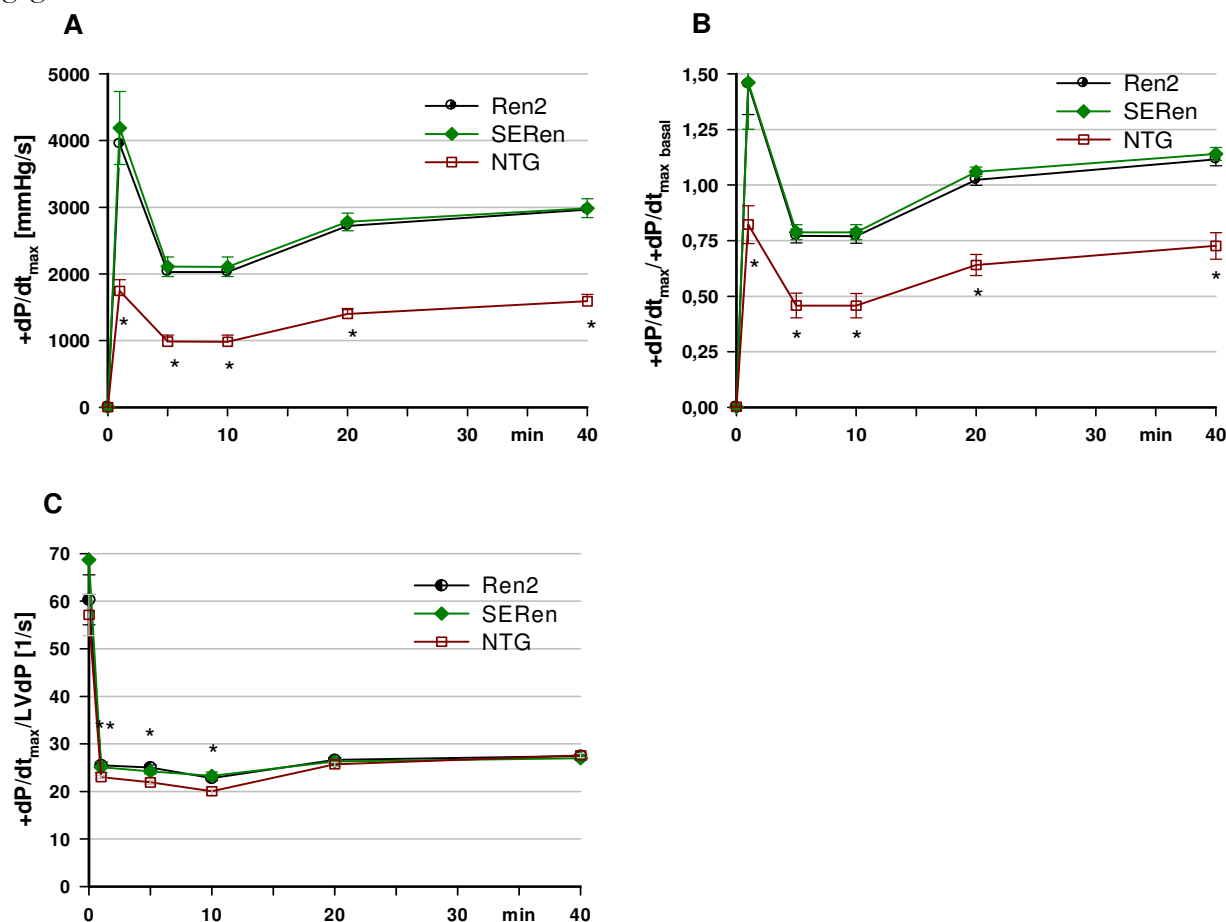


Abb. 24: Entwicklung der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumentrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.

**A** Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt<sub>max</sub>) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

**B** +dP/dt<sub>max</sub> relativ zum Basalwert von +dP/dt<sub>max</sub> bei spontaner Hf.

**C** +dP/dt<sub>max</sub> normiert auf LVdP bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte ± SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \* p<0,05 Ren2, SERen vs. NTG. \*\* p<0,05 Ren2 vs. NTG.

### 3.6.4 -dP/dt<sub>max</sub>

Die Entwicklung der maximalen linksventrikulären Druckabfallsgeschwindigkeit der drei Versuchsgruppen während der Reperfusion zeigt ein vergleichbares Bild zur maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit (vgl. Abb. 24)

Wie in Abbildung 25A dargestellt sind die absoluten maximalen linksventrikulären Druckabfallsgeschwindigkeiten der Ren2- und SERen-Gruppe im Vergleich zur NTG-Gruppe über den gesamten Reperfuionsverlauf signifikant höher und erreichen nach 40 Minuten Reperfusion das ca. 1,6-, bzw. 1,7-fache der -dP/dt<sub>max</sub>-Werte gegenüber NTG. Die relative Entwicklung der -dP/dt<sub>max</sub>-Werte während der Reperfusion (Abb. 25B) verläuft ebenfalls durchgängig auf signifikant höherem Niveau. Die beiden transgenen Versuchsgruppen liegen nach 20 Minuten bereits deutlich über ihren jeweiligen präischämischen Ausgangswerten, während die nichttransgene

Kontrollgruppe lediglich 75 % erreicht. Nach 40 Minuten Reperfusion betragen die  $-dP/dt_{\max}$ -Werte der Ren2- und SERen-Gruppe das 1,2-fache der entsprechenden Ausgangswerte, während die NTG-Gruppe lediglich das 0,79-fache erreicht. Unter Normierung des  $-dP/dt_{\max}$  auf LVdP (Abb. 25C) sind lediglich für die zweite Reperfusionshälfte signifikante Unterschiede zu verzeichnen, wobei sich hier signifikant höhere Quotienten für die nichttransgene Kontrollgruppe gegenüber der Ren2- und SERen-Gruppe ergeben. Nach 40 Minuten Reperfusion besteht so ein um das 1,1-fache höherer Quotient für NTG im Vergleich zu Ren2 und SERen.

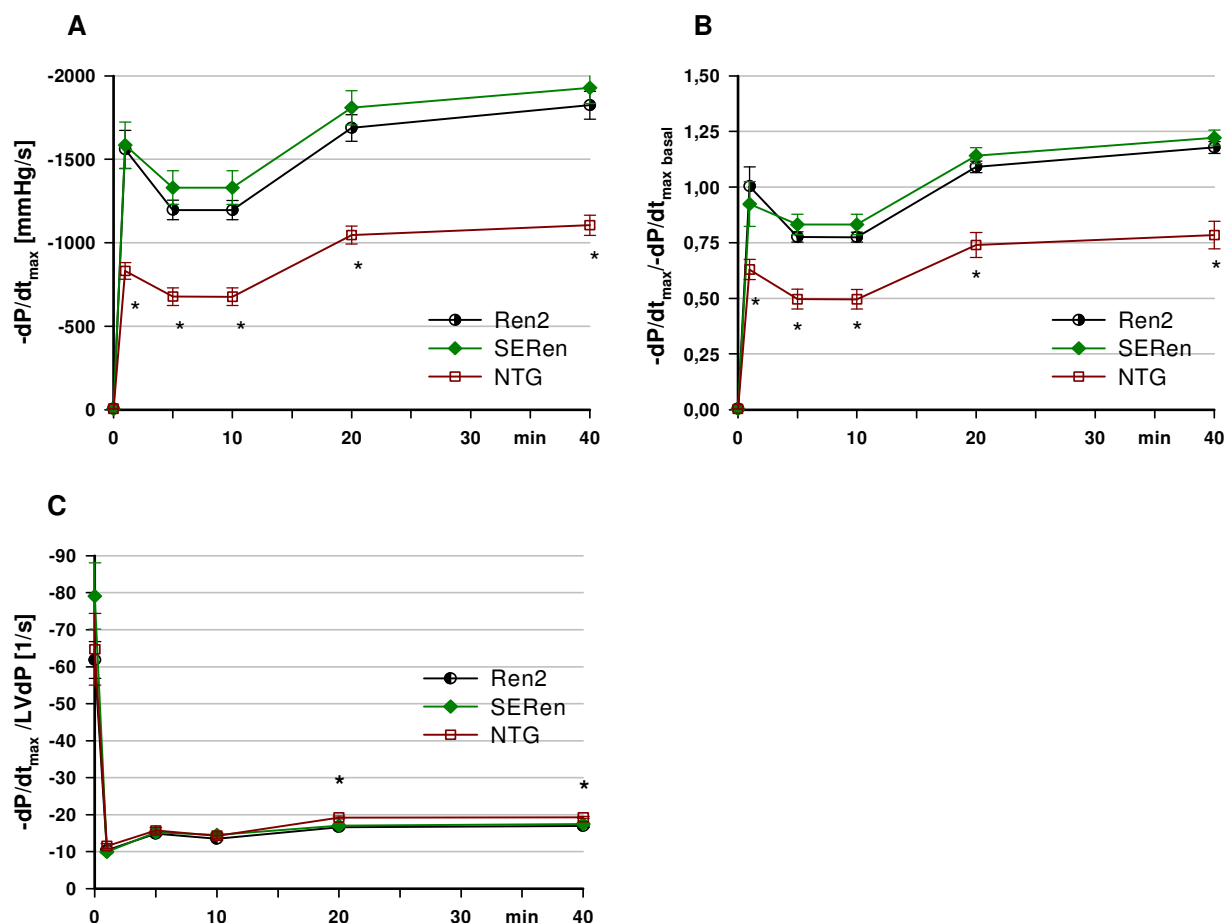
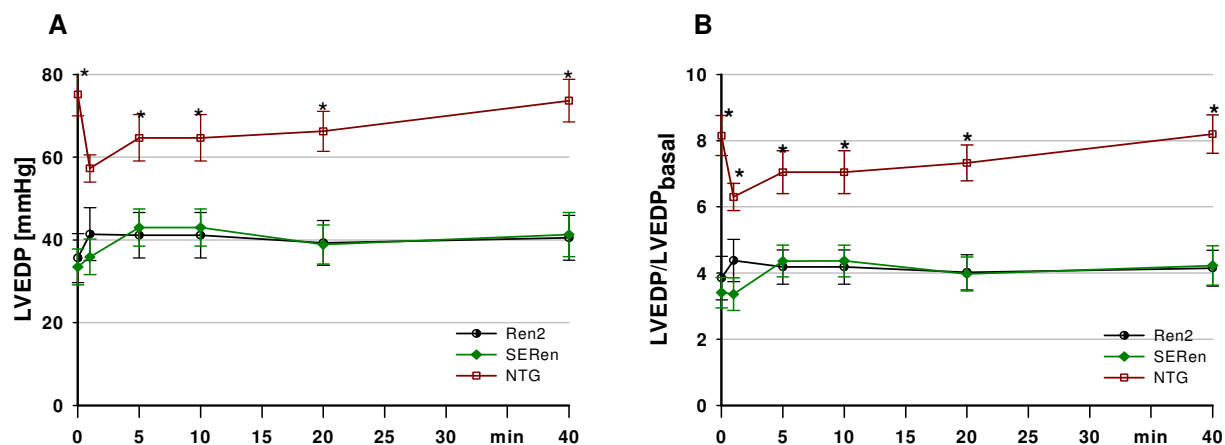


Abb. 25: Entwicklung der maximalen Druckabfallgeschwindigkeit während 40 Minuten Reperusionszeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.  
**A** Maximale Druckabfallgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{\max}$ ) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).  
**B**  $-dP/dt_{\max}$  relativ zum Basalwert von  $-dP/dt_{\max}$  bei spontaner Hf.  
**C**  $-dP/dt_{\max}$  normiert auf LVdP bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG.

### 3.6.5 LVEDP

Während der Reperfusion setzen sich die deutlichen Veränderungen des LVEDP, dargestellt in Abbildung 26A, die während der Ischämiephase (vgl. Abb. 21) beobachtet werden konnten fort. Der LVEDP der NTG-Gruppe nimmt über den gesamten Verlauf signifikant höhere Werte an,

so dass nach 40 Minuten Reperfusion ein um 1,8-fach höherer Wert gegenüber der Ren2- und SERen-Gruppe besteht.



**Abb. 26:** Entwicklung des basalen linksventrikulären diastolischen Drucks während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumentrisch kontrahierenden Herzen Renintransgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.

**A** Linksventrikulärer diastolischer Druck (LVEDP) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

**B** LVEDP relativ zum Basalwert von LVEDP bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG. \*\*  $p < 0,05$  Ren2 vs. NTG.

Auch der Kurvenverlauf zeigt in Abbildung 26A ein unterschiedliches Bild. Die NTG-Gruppe zeigt nach ca. einer Minute Reperfusion eine deutliche Senkung des LVEDP auf 54 mmHg und steigt anschließend relativ gleichmäßig an, um nach 40 Minuten Reperfusion wieder das Niveau des Ischämieendes zu erreichen. Für die Ren2- und SERen-Gruppe stellt sich der Verlauf relativ gleichmäßig dar, die Werte nach 40 Minuten liegen nur geringgradig über denen des Ischämieendes. Bei Betrachtung der Relativwerte in Abbildung 26B verdeutlicht sich dieses Bild. Die relative Änderung des LVEDP verläuft für die NTG-Gruppe auf signifikant höherem Niveau im Vergleich zur Ren2- und SERen-Gruppe. Nach 40 Minuten ergibt sich eine um 8,2-fache relative Zunahme des LVEDP für NTG, während für Ren2 und SERen eine um 4,2-fache Zunahme zu verzeichnen ist.

### 3.6.6 Herzfrequenz

Wie Abbildung 27A zeigt, erfolgt bis zum Zeitpunkt fünf Minuten Reperfusion für alle Versuchsgruppen ein recht steiler Anstieg der Herzfrequenzen, während im weiteren Verlauf eine Abflachung der Kurven zu beobachten ist. Für die nichttransgene Kontrollgruppe werden, entsprechend den höheren Basalwerten (vgl. Tab. 1), im gesamten Reperfuptionsverlauf signifikant höhere Herzfrequenzen gegenüber den beiden transgenen Gruppen ermittelt. Nach 40 Minuten Reperfusion ist eine um 1,3-fach höhere Herzfrequenz der NTG-Gruppe im Vergleich zu Ren2 und SERen zu verzeichnen. Bei Betrachtung der relativen Entwicklung der Herzfrequenzen in

Abbildung 27B sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen feststellbar. Es werden für alle Gruppen näherungsweise die präischämischen Ausgangswerte erreicht.

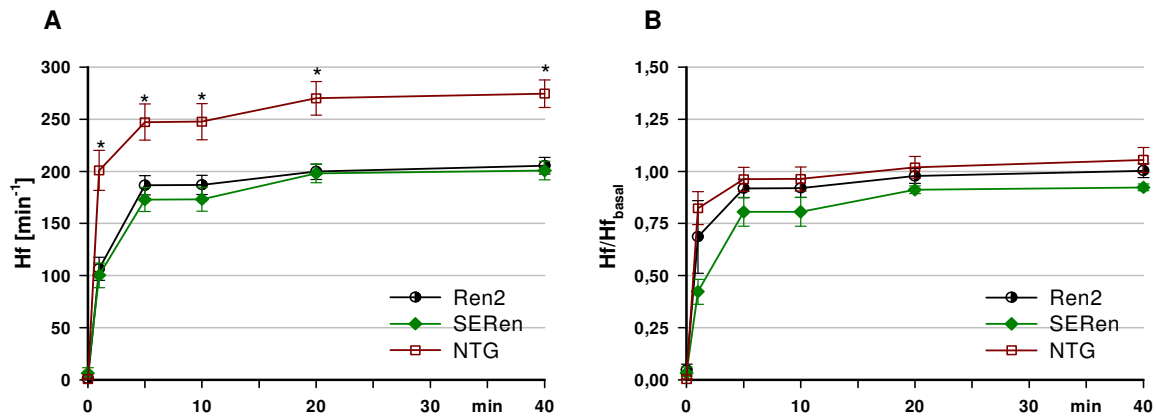


Abb. 27: Entwicklung der Herzfrequenz während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SER-CA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.

A Herzfrequenz (Hf).

B Hf relativ zum Basalwert von Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG.

### 3.6.7 Time to peak

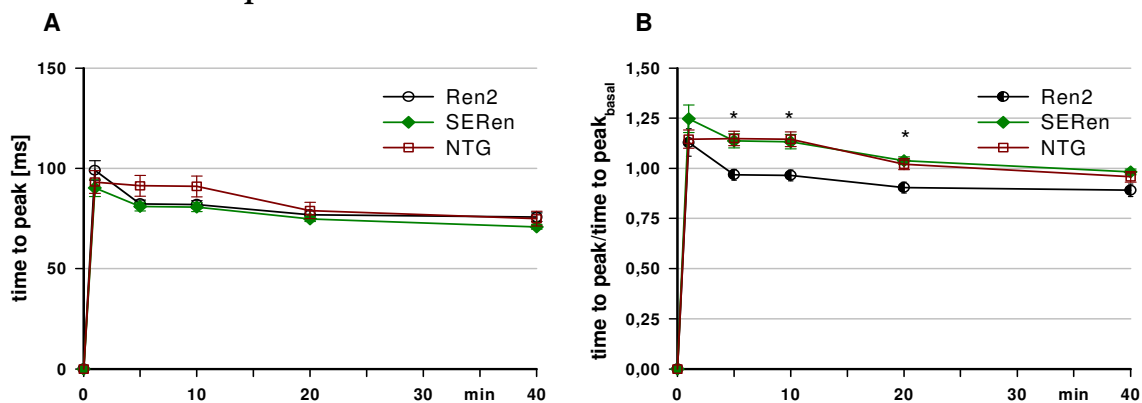


Abb. 28: Entwicklung der time to peak während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SER-CA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.

A time to peak bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

B time to peak relativ zum Basalwert von time to peak bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2 vs. SERen und NTG.

Während der Reperfusion zeigt die Darstellung von time to peak in Abbildung 28A vergleichbare Absolutwerte in allen drei Versuchsgruppen. Die Entwicklung von time to peak im Vergleich zu den präischämischen Ausgangswerten in Abbildung 28B ergibt für die Zeitpunkte fünf, zehn und 20 Minuten signifikant niedrigere Relativwerte der Ren2-Gruppe im Vergleich zu SERen und NTG bei höherem präischämischen Ausgangswert der Ren2-Gruppe (vgl. Abb. 13). Im weiteren Reperfuverlauf erfolgt ein Angleich der Relativwerte der drei Gruppen.

### 3.6.8 Pressure-halftime

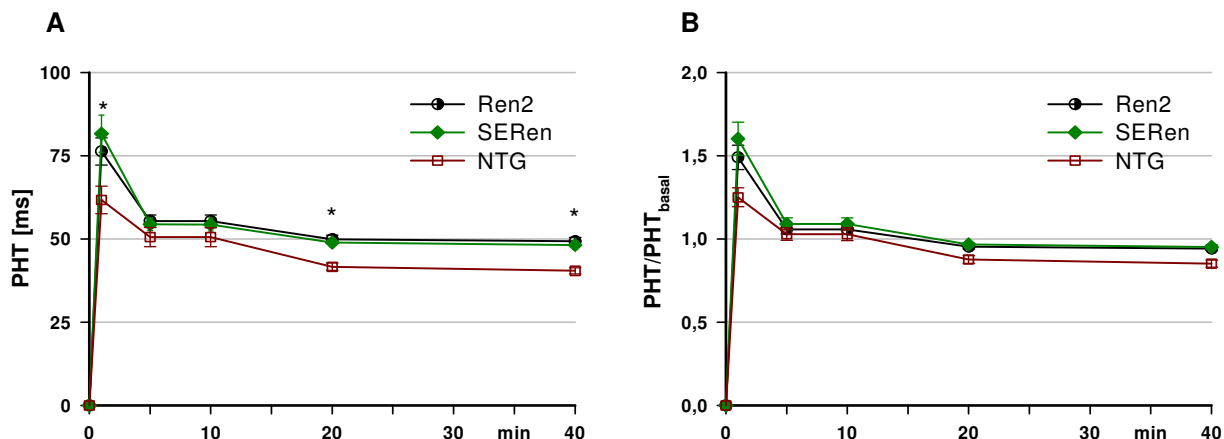


Abb. 29: Entwicklung der pressure-halftime während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumentrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.

**A** pressure-halftime (PHT) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

**B** PHT relativ zum Basalwert von PHT bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG.

Die in Abbildung 29A dargestellte PHT nimmt für alle drei Versuchsgruppen nach einem zu Beginn der Reperfusion bestehenden peak kontinuierlich ab. Dabei erreichen beide transgenen Gruppen vor allem im zweiten Abschnitt der Reperfusion signifikant höhere Werte gegenüber der nichttransgenen Kontrollgruppe. Nach 40 Minuten Reperfusion lässt sich somit ein um 1,2-fach höherer Wert für die Ren2- und SERen-Gruppe im Vergleich zur NTG-Gruppe ermitteln. Bei Darstellung der relativen Veränderungen der PHT in Abbildung 29B sind keine signifikanten Unterschiede darstellbar.

### 3.6.9 Tau

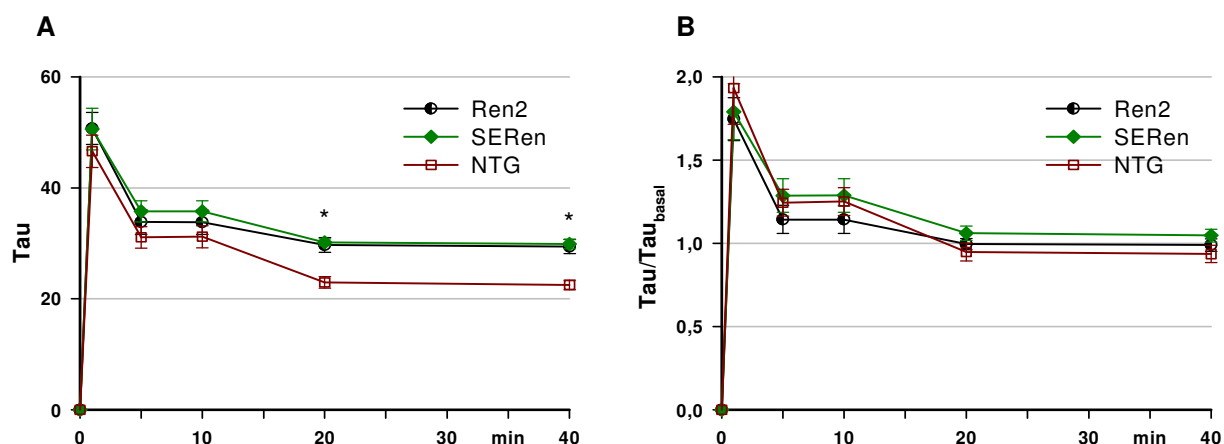


Abb. 30: Entwicklung von Tau während 40 Minuten Reperfusionzeit nach 20 Minuten Globalischämie von isovolumentrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten.

**A** Tau bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

**B** Tau relativ zum Basalwert von Tau bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG.

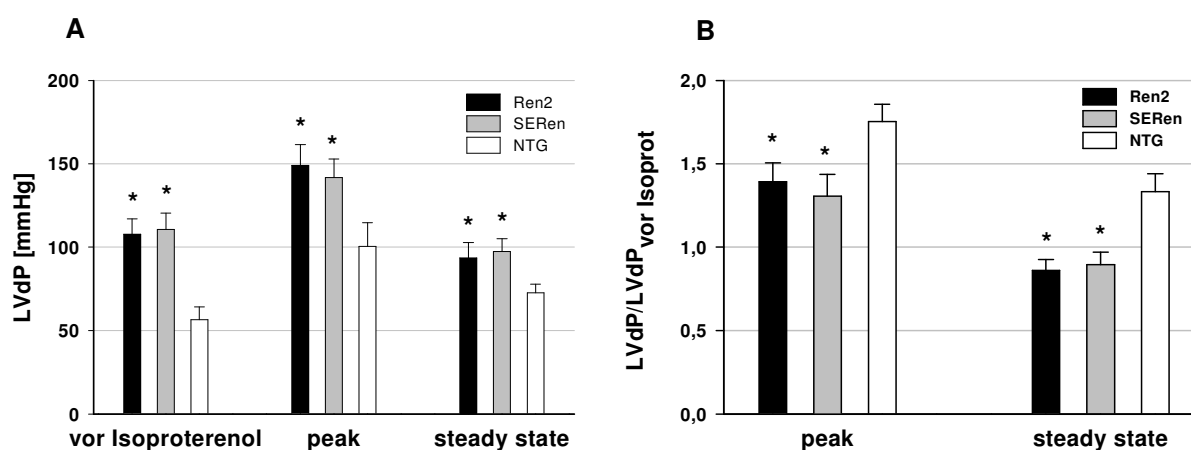
Der Kurvenverlauf der Zeitkonstante  $\tau$  während der Reperfusion ist mit dem der pressure-half-time (vgl. Abb. 29) vergleichbar.

Während der zweiten Hälfte der Reperfusion erreichen sowohl die Ren2- als auch die SERen-Gruppe signifikant höhere absolute  $\tau$ -Werte (Abb. 30A). So betragen die Werte von Ren2 und SERen nach 40 Minuten Reperfusion das 1,3-fache der NTG-Gruppe. Die Darstellung der Relativwerte in Abbildung 30B zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen.

### 3.7 Linksventrikuläre kontraktile Funktion unter $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol

Zur Einschätzung der linksventrikulären  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit der einzelnen Versuchsgruppen erfolgte nach Ablauf des Ischämie-Reperfuionsversuchs die Perfusion mit dem  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten Isoproterenol (Isoprenalin) in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-8}$  mol/l. Die Darstellung der Messwerte aus den Druck-Zeit-Kurven erfolgt für drei verschiedene Zeitpunkte: vor Beginn der Isoproterenolgabe, zum Zeitpunkt der größten Druckentwicklung (peak) unter Isoproterenolwirkung und nach Erreichen eines stabilen Gleichgewichts (steady state) unter Isoproterenolwirkung.

#### 3.7.1 LVdP



**Abb. 31: Entwicklung des maximalen linksventrikulären Drucks unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfuionsversuch.**

**A** Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVdP) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

**B** LVdP relativ zum Ausgangswert vor Isoproterenol-Perfusion bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG.

Unter Isoproterenolwirkung erfolgt ein deutlicher Anstieg des LVdP aller drei Versuchsgruppen, dargestellt in Abbildung 31A. Dabei bleibt die vor Isoproterenolgabe bestehende signifikante Differenz zwischen beiden transgenen Versuchsgruppen und der NTG-Gruppe bestehen, nimmt



jedoch während der  $\beta$ -adrenergen Stimulation deutlich ab. Während vor Isoproterenol-Perfusion die Ren2- und SERen-Gruppe einen ca. 1,9-fachen LVdP im Vergleich zur NTG-Gruppe aufweisen, verringert sich der Unterschied im Isoproterenol-peak auf das 1,5-fache für Ren2 und das 1,4-fache für SERen gegenüber NTG. Im steady state erreichen die beiden transgenen Versuchsgruppen den 1,3-fachen LVdP im Vergleich zur nichttransgenen Kontrollgruppe. Die Relativwerte, gezeigt in Abbildung 31B, bestätigen diese Ergebnisse. Die relative Zunahme des LVdP unter Isoproterenolwirkung fällt für die NTG-Gruppe deutlich stärker aus, so dass im Isoproterenol-peak eine relative Zunahme auf das 1,8-fache für NTG einer relativen Zunahme auf das 1,4-fache für Ren2 und das 1,3-fache für SERen gegenübersteht. Im steady state erreichen beide transgene Gruppen nicht mehr die entsprechenden Werte vor Isoproterenolgabe, während die NTG-Gruppe einen 1,3-fach höheren LVdP-Wert gegenüber dem Ausgangswert aufweist. Bei Normierung des LVdP auf das linksventrikuläre Feuchtgewicht sind unter Isoproterenolwirkung die signifikanten Unterschiede der Absolutwerte entsprechend den höheren linksventrikulären Gewichten der Ren2- und SERen-Gruppe gegenüber NTG (vgl. Tab. 1) nicht mehr nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sprechen für eine deutlich schlechtere  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit des Myokards der hypertensiven Ren2- und SERen Gruppe im Vergleich zur nichttransgenen Kontrollgruppe. Die SERCA2a-Überexpression der doppelt transgenen SERen-Gruppe hat in Anbetracht der zur Ren2-Gruppe vergleichbaren LVdP-Werte keinen Einfluss auf die  $\beta_1$ -Rezeptor vermittelte Isoproterenolwirkung am Myokard.

### 3.7.2 $+dP/dt_{\max}$

Die Entwicklung der  $+dP/dt_{\max}$ -Werte unter Isoproterenolwirkung ist mit den Ergebnissen des LVdP (vgl. Abb. 31) vergleichbar. Es ergeben sich signifikant höhere Werte für die Ren2- und SERen-Gruppe gegenüber NTG (Abb. 32A). Durch die Isoproterenolgabe wird dieser Unterschied jedoch deutlich kleiner, so dass ausgehend von einem 1,9-fach höheren Wert der beiden transgenen Versuchsgruppen vor Isoproterenolgabe im steady state lediglich ein um 1,4-fach höherer Wert gegenüber NTG zu verzeichnen ist. Unter Normierung des  $+dP/dt_{\max}$  auf LVdP, sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar (Daten nicht gezeigt).

Die Darstellung der Relativwerte in Abbildung 32B zeigt auch hier eine signifikant größere relative Zunahme des LVdP unter Isoproterenolwirkung für die nichttransgene Kontrollgruppe gegenüber den beiden transgenen Gruppen. Im peak erreicht die NTG-Gruppe das 2,1-fache der entsprechenden Ausgangswerte, für Ren2 ergibt sich eine 1,7-fache, für SERen eine 1,6-fache relative Zunahme des  $+dP/dt_{\max}$ .

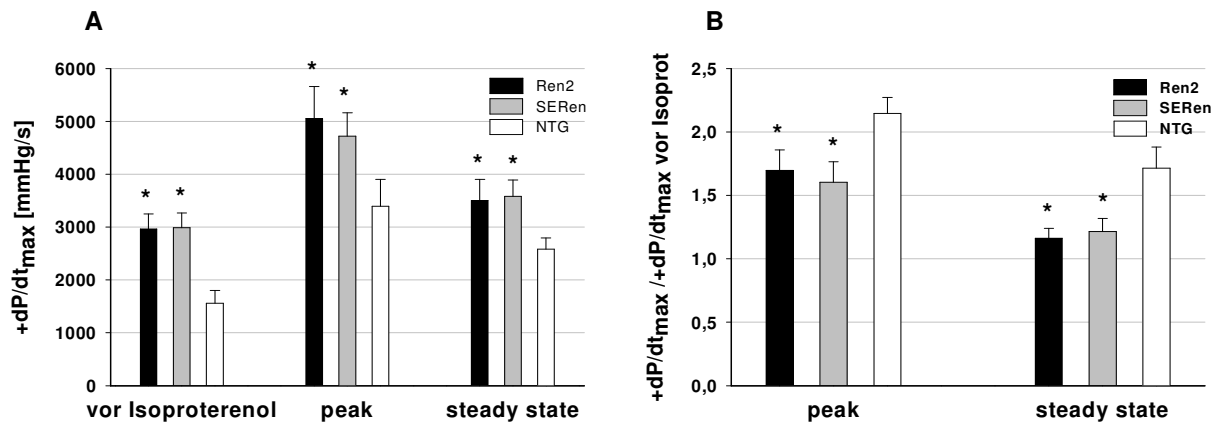


Abb. 32: Entwicklung der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfusionversuch.

**A** Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $+dP/dt_{max}$ ) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

**B**  $+dP/dt_{max}$  relativ zum Ausgangswert von  $+dP/dt_{max}$  vor Isoproterenol-Perfusion bei spontaner Hf.

Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG.

### 3.7.3 $-dP/dt_{max}$

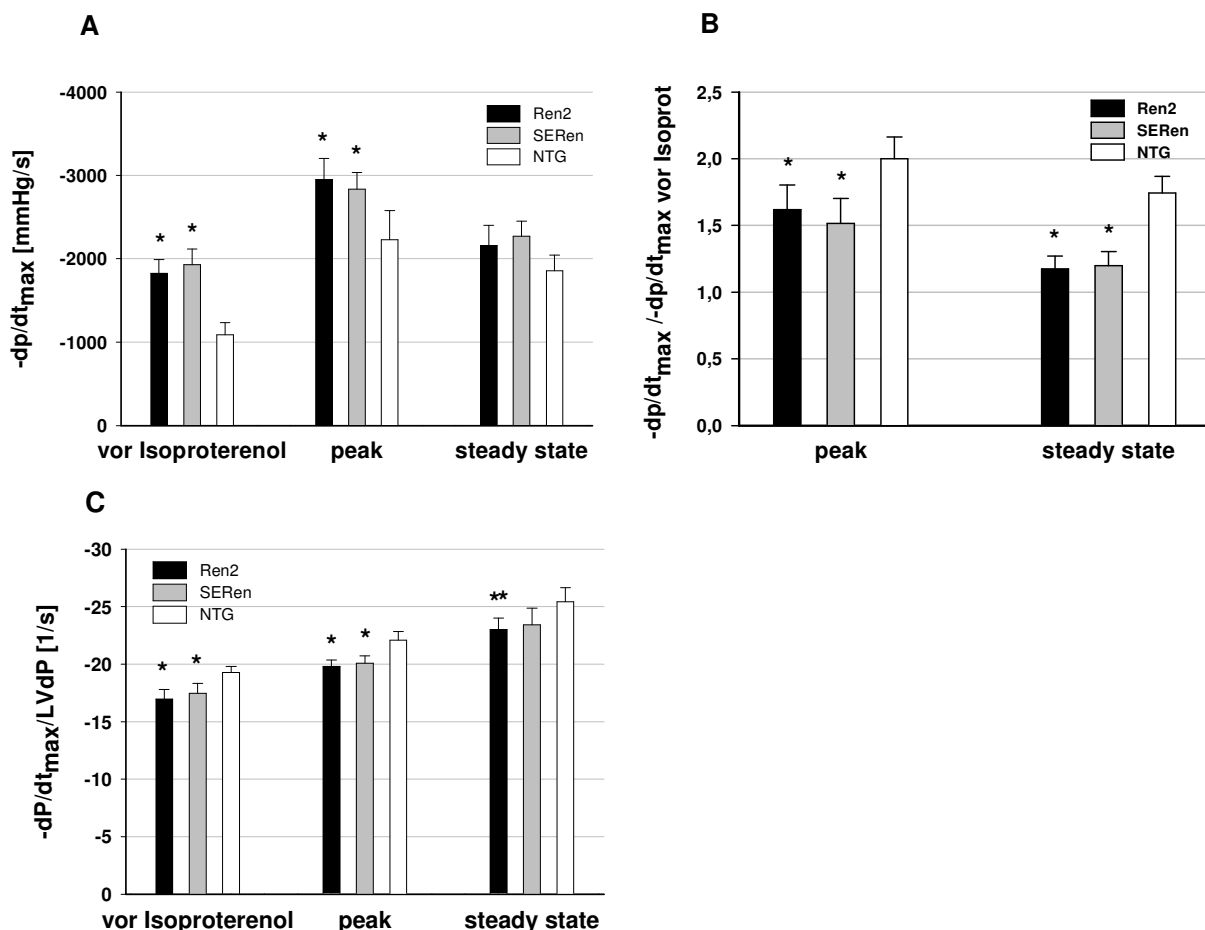


Abb. 33: Entwicklung der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfusionversuch.

**A** Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{max}$ ) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

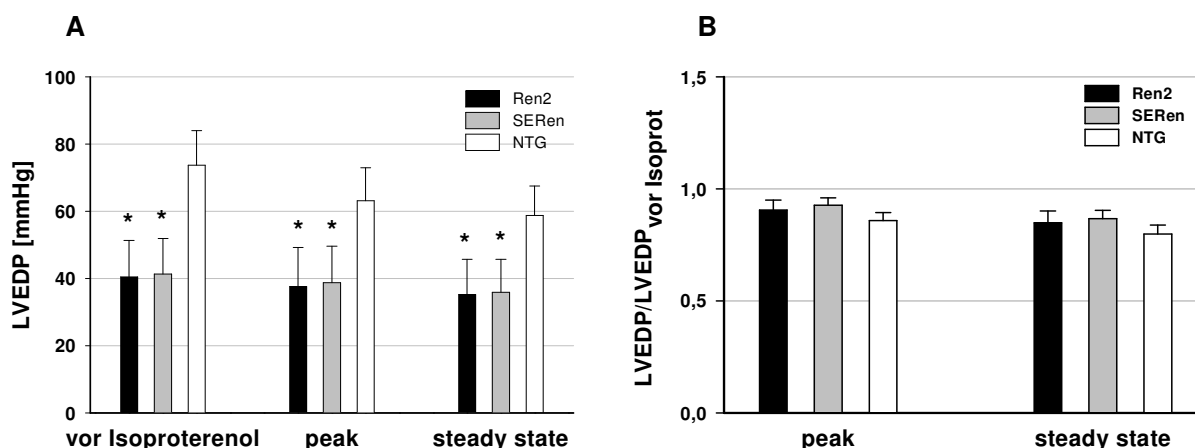
**B**  $-dP/dt_{max}$  relativ zum Ausgangswert von  $-dP/dt_{max}$  vor Isoproterenol-Perfusion bei spontaner Hf.

**C**  $-dP/dt_{max}$  normiert auf LVdP bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG. \*\*  $p < 0,05$  Ren2 vs. NTG.

Bei Betrachtung des  $-dp/dt_{max}$  in Abbildung 33A wird deutlich, dass die Reaktion auf die Isoproterenolgabe mit den Veränderungen des LVdP und des  $+dp/dt_{max}$  unter Isoproterenolwirkung vergleichbar ist. Die signifikanten Unterschiede der maximalen linksventrikulären Druckabfallsgeschwindigkeiten zwischen beiden transgenen Gruppen und NTG nehmen unter Isoproterenolwirkung ab und sind im steady state schließlich nicht mehr nachweisbar. Die Relativwerte in Abbildung 33B zeigen eine deutlich stärkere relative Zunahme des  $-dp/dt_{max}$  für die NTG-Gruppe mit einer Verdopplung des Ausgangswertes gegenüber einer lediglich 1,6-, bzw. 1,5-fachen relativen Zunahme für die Ren2-, bzw. SERen-Gruppe im Isoproterenol-peak. Bei Normierung des  $-dp/dt_{max}$  auf LVdP (Abb. 33C) ist, im Unterschied zu den Ergebnissen des  $+dp/dt_{max}$  (vgl. Abb. 32C) im Isoproterenol-peak ein signifikant höherer Quotient für NTG nachweisbar, der einen um 1,1-fach höheren Wert gegenüber Ren2 und SERen annimmt. Im steady state kann lediglich für die Ren2-Gruppe ein signifikant höherer Wert gegenüber der nichttransgenen Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse sind ebenfalls hinweisend auf eine stärkere  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit des Myokards der nichttransgenen Kontrollgruppe im Vergleich zur Ren2- und SERen-Gruppe.

### 3.7.4 LVEDP



**Abb. 34:** Entwicklung des basalen linksventrikulären diastolischen Drucks unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfuionsversuch.

**A** Linksventrikulärer diastolischer Druck (LVEDP) bei spontaner Herzfrequenz (Hf).

**B** LVEDP relativ zum Ausgangswert von LVEDP vor Isoproterenol-Perfusion bei spontaner Hf. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG.

Die  $\beta$ -adrenerge Stimulation hat einen gering senkenden Einfluss auf die während der Ischämie deutlich angestiegenen LVEDP-Werte (vgl. Abb. 21) der einzelnen Versuchsgruppen (Abb. 34A, B). Dabei erfährt der LVEDP der nichttransgenen Kontrollgruppe ein deutlicheres Absinken gegenüber beiden transgenen Gruppen. Der um 1,8-fach höhere LVEDP der NTG-Gruppe verringert sich unter Isoproterenolwirkung im steady state auf einen 1,7-fach höheren Wert gegen-

über Ren2 und SERen. Wie Abbildung 34B zeigt ergeben sich bei Betrachtung der relativen Veränderungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen.

### 3.7.5 Herzfrequenz

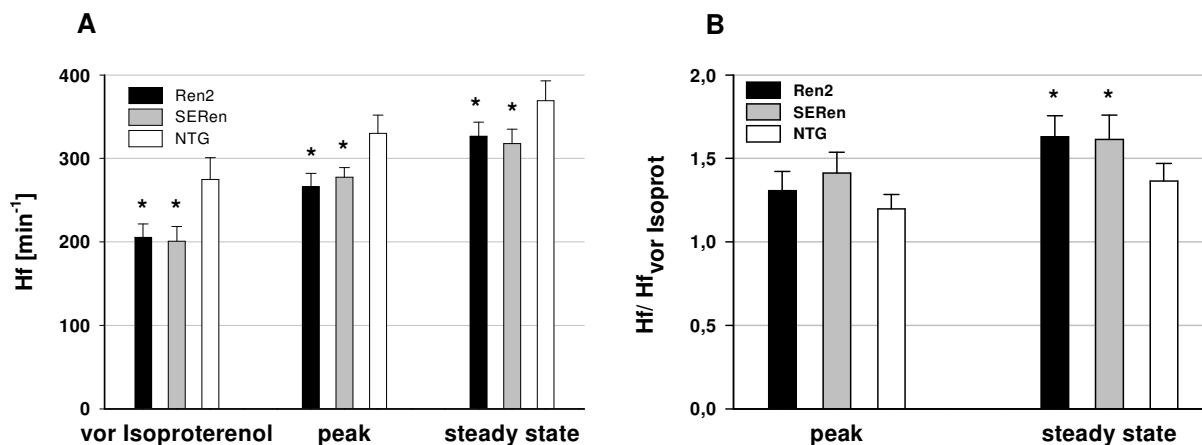


Abb. 35: Entwicklung der Herzfrequenz unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung von isovolumetrisch kontrahierenden Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfusionversuch.

A Herzfrequenz (Hf).

B Hf relativ zum Ausgangswert von Hf vor Isoproterenol-Perfusion. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  Ren2, SERen vs. NTG.

Die Herzfrequenz zeigt unter Isoproterenolwirkung erwartungsgemäß einen deutlichen Anstieg bei allen Versuchsgruppen (Abb. 35A). Ausgehend von deutlich höheren Kontraktionsfrequenzen der NTG-Gruppe gegenüber der Ren2- und SERen-Gruppe vor Isoproterenolgabe verringert sich dieser Unterschied unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation, bleibt jedoch auch im steady state signifikant. Dieses Ergebnis wird durch die Darstellung der relativen Veränderungen in Abbildung 35B verdeutlicht. Die transgene Ren2-Gruppe sowie die doppelt transgene SERen-Gruppe zeigen im steady state der Isoproterenolgabe einen signifikant höheren relativen Anstieg der Herzfrequenzen mit einer um 1,6-fachen Steigerung der jeweiligen Ausgangswerte gegenüber einer 1,4-fachen Steigerung der Kontraktionsfrequenzen der NTG-Gruppe.

### 3.7.6 Time to peak

Wie Abbildung 36A zeigt, verringern sich die time to peak-Werte aller drei Versuchsgruppen entsprechend höherer Kontraktionsfrequenzen (vgl. Abb. 35) unter Isoproterenolwirkung deutlich. Dabei besteht lediglich für den steady state unter Isoproterenolgabe ein signifikanter Unterschied mit einem um 11,4 %, bzw. 13 % niedrigeren Wert der Ren2- bzw. SERen-Gruppe gegenüber der nichttransgenen Kontrollgruppe. Der Einfluss der  $\beta$ -adrenergen Stimulation auf die Dauer des systolischen Abschnitts der Druck-Zeit-Kurve ist somit bei beiden hypertensiven transgenen Versuchsgruppen größer als bei der nicht transgenen Kontrollgruppe. Die Darstellung

der relativen Veränderungen in Abbildung 36B zeigt keine signifikanten Unterschiede, wobei im steady state eine stärkere relative Abnahme der time to peak-Werte für Ren2 und SERen auf Werte um 0,7 im Gegensatz zu einer relativen Abnahme auf ca. 0,8 für NTG zu verzeichnen ist.

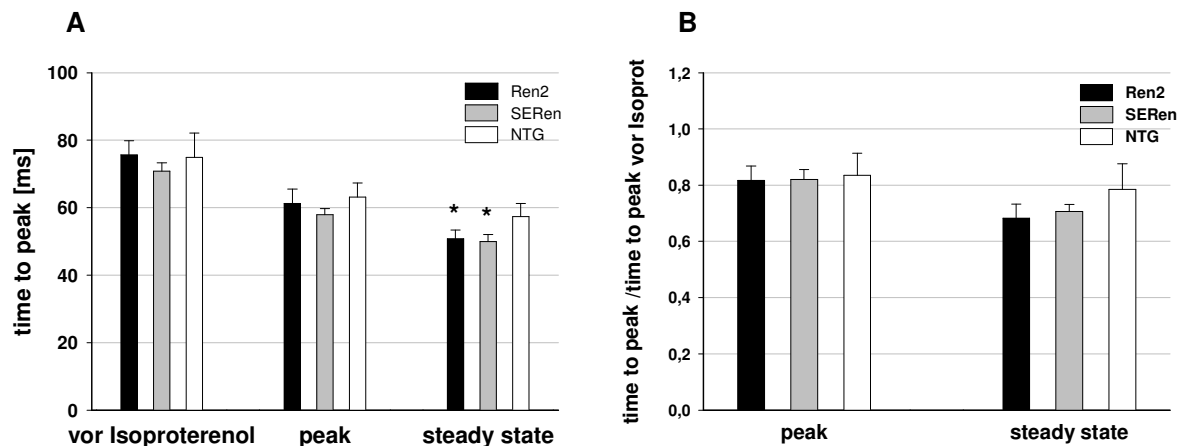


Abb. 36: Entwicklung von time to peak unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfusionversuch.

**A** time to peak bei spontaner Herzfrequenz.

**B** time to peak relativ zum Ausgangswert vor Isoproterenol-Perfusion. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  vs. Ren2.

### 3.7.7 Pressure-halftime

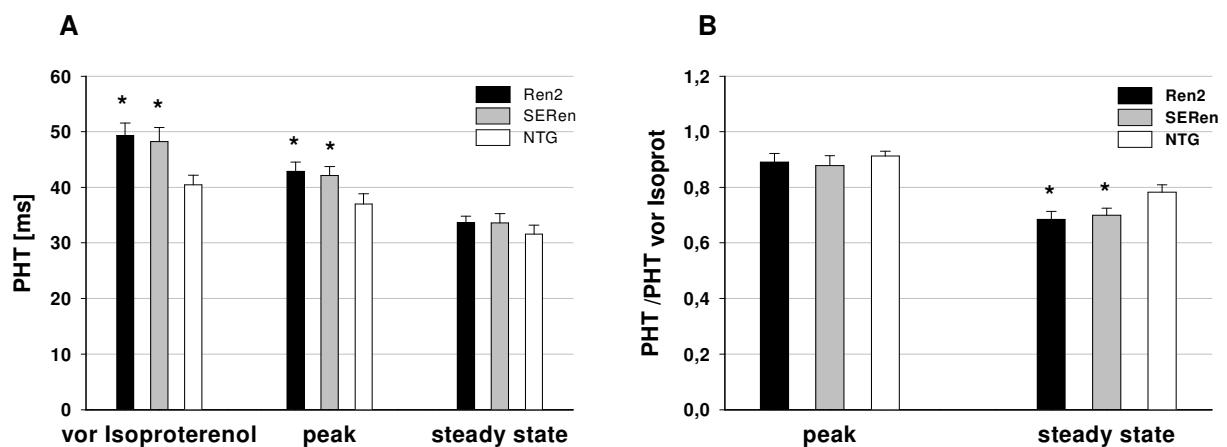


Abb. 37: Entwicklung von pressure-halftime unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfusionversuch.

**A** pressure-halftime (PHT) bei spontaner Herzfrequenz.

**B** PHT relativ zum Ausgangswert vor Isoproterenol-Perfusion. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  vs. Ren2.

Die Darstellung der pressure-halftime in Abbildung 37A zeigt nach abgelaufenem Ischämie-Reperfusionversuch einen deutlich signifikanten Unterschied mit einem um das 1,2-fach höheren Wert der beiden transgenen Versuchsgruppen gegenüber der nichttransgenen Kontrollgruppe. Unter Isoproterenolwirkung nimmt dieser Unterschied jedoch ab, so dass im steady state keine signifikanten Unterschiede mehr bestehen. Sowohl die Ren2- als auch die SERen-Gruppe reagieren unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation folglich mit einer deutlicheren Verkürzung der ersten

Hälfte der Relaxation. Dieses Ergebnis wird bei Betrachtung der relativen Änderungen der pressure-halftime verdeutlicht. Während sich für Ren2 und SERen im steady state eine Verkürzung auf das 0,7-fache der jeweiligen Ausgangswerte ergibt, erreicht die NTG-Gruppe lediglich eine 0,8-fache relative Verkürzung (Abb. 37B).

### 3.7.8 Tau

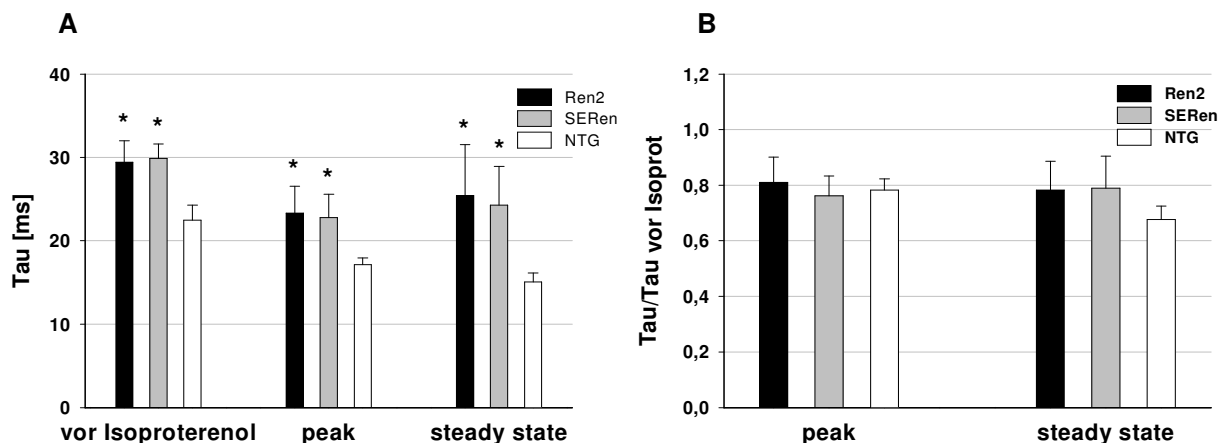


Abb. 38: Entwicklung von Tau unter Perfusion mit Isoproterenol-Lösung isovolumetrisch kontrahierender Herzen Renin-transgener (Ren2), SERCA2a/Renin-doppelt transgener (SERen) und nicht transgener (NTG) Ratten nach Ischämie-Reperfuionsversuch.

**A** Tau bei spontaner Herzfrequenz.

**B** Tau relativ zum Ausgangswert vor Isoproterenol-Perfusion. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für 10-18 Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,05$  vs. Ren2.

Die in Abbildung 38A dargestellte Zeitkonstante Tau nimmt unter Isoproterenolwirkung für Ren2 und SERen im Vergleich zu NTG durchgehend signifikant höhere Werte an. Dabei nimmt hier, im Gegensatz zur pressure-halftime (vgl. Abb. 37), der Unterschied zu, so dass im peak ein um 1,3-fach und im steady state ein 1,4-fach höherer Wert der beiden transgenen Gruppen gegenüber der nichttransgenen Kontrollgruppe erreicht wird. Die Darstellung der Relativwerte in Abbildung 38B zeigt keine signifikanten Unterschiede, jedoch erreichen die Ren2- und SERen-Gruppe höhere Werte als die NTG-Gruppe. Im Unterschied zur pressure-halftime reagiert die NTG-Gruppe unter Isoproterenolwirkung gegenüber der Ren2- und SERen-Gruppe mit einer deutlicheren Verringerung des Tau-Wertes und damit der Dauer der zweiten Hälfte der Relaxation.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einleitung

Die zyklische Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration stellt einen essentiellen Faktor für die systolische Aktivierung und die diastolische Inaktivierung der Myofilamente und damit der elektromechanischen Kopplung dar.

In hypertrophierten, insuffizienten Herzen sind Störungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase maßgeblich an der Abnahme der kontraktilen Funktion beteiligt <sup>8</sup>.

Eine wichtige Rolle für die Regulierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration spielt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) durch die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a). Dieses in die SR-Membran eingebundene  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportprotein erhält einen bis zu 1000 fachen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsgradienten über die Membran des SR aufrecht. Die Funktion der SERCA2a ist in hypertrophierten und insuffizienten Herzen deutlich herabgesetzt. Dabei werden einerseits veränderte Modulationen der SERCA2a-Aktivität, andererseits verminderte SERCA2a-mRNA- und/ oder Proteinlevel als ursächlich diskutiert <sup>8-10</sup>.

Folglich stellt die Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ein viel versprechenden Angriffspunkt für die Therapie der Herzinsuffizienz dar. Insbesondere ruft die Gentherapie, begründet in verbesserter Vektortechnik, optimierter kardialer Genapplikation und besserem Verständnis der molekularen Grundlagen der Herzinsuffizienz, zunehmendes Interesse hervor <sup>9</sup>.

Die arterielle Hypertonie ist in der Pathogenese einer hypertrophischen Kardiomyopathie maßgeblich <sup>52</sup>. Diese pathophysiologischen Bedingungen können in dem monogenetischen Renin-induzierten Hypertoniemodell der (mRen2) 27-transgenen Ratte gefunden werden.

In dieser Arbeit wird der Einfluss einer SERCA2a-Überexpression auf die kontraktile Funktion von Herzen mit hypertoniebedingter kardialer Hypertrophie anhand eines neuen (mRen2) 27/SERCA2a-doppelt transgenen Rattenmodells untersucht.

Dabei erfolgt an den nach Langendorff retrograd perfundierten, isolierten Herzen zunächst die Charakterisierung der kardialen Funktion unter Normoxie.

Unter hypoxischem Stress, d. h. myokardialer Ischämie, kommt es ebenfalls zu deutlichen Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation, die durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung eine kritische Rolle in der Pathophysiologie von Ischämie-Reperfusionsschäden spielt. Auch hier zeigt sich unter anderem eine Abnahme der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme <sup>12, 13</sup>. Auf Grund dieser Beobachtungen soll anhand der durchgeführten Ischämie-Reperfusionsversuche gezeigt werden, inwieweit

die SERCA2a-Überexpression einer durch Ischämie-Reperfusionsschäden verursachten kontraktilen Dysfunktion entgegenwirkt.

## 4.2 Das (mRen2) 27-transgene Rattenmodell – myokardiale Hypertrophie und Fibrose

Die mRen2-transgene Ratte wurde erstmals von Mullins et al. durch Einbringen des Maus-Ren2-Gens von DBA/2-Mäusen in das Genom eines Stamms normotensiver Sprague Dawley (SD) Ratten mittels Mikroinjektionstechnik generiert<sup>53</sup>.

Anders als andere weit verbreitete hypertensive Modelle, wie spontan hypertensive Ratten (SHR), stellt die mRen2-transgene Ratte ein monogenetisches Modell dar. Somit ist die genetische Basis der pathophysiologischen Veränderungen bekannt und eine bessere Vergleichbarkeit mit transgenen negativen, normotensiven Kontrolltieren gegeben. Die Ren2-transgene Ratte ist damit ein etabliertes Modell arterieller Hypertension und kardialer Hypertrophie.

Die männlichen heterozygoten Ren2-Ratten entwickeln bereits sehr früh eine arterielle Hypertension, die im Alter von 9 Wochen ein Maximum mit systolischen Blutdruckwerten um 240 mmHg gegenüber 130 mmHg bei SD-Kontrolltieren erreicht<sup>53</sup>. Darüber hinaus manifestiert sich ebenfalls bereits im jungen Alter eine kardiale Hypertrophie<sup>10, 54</sup>.

Bei den für diese Arbeit herangezogenen 30 Wochen alten Tieren wurden signifikant höhere linksventrikuläre Feuchtgewichte (+39 %) und Feuchtgewicht/ Körpergewicht-Relationen (+29 %) der Ren2-Gruppe gegenüber der nichttransgenen Kontrollgruppe ermittelt (vgl. 3.3).

Diese Ergebnisse weisen auf eine deutliche linksventrikuläre Hypertrophie der hypertensiven Ren2-Tiere hin. Wichtige morphologische Veränderungen des hypertrophierten Herzen sind die Manifestationen von perivaskulärer und myokardialer Fibrose<sup>55</sup>.

Die Bestimmung des linksventrikulären Hydroxyprolinegehaltes erbrachte signifikant erhöhte Werte der Ren2-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ren2 0,64 µg/ mg LVW vs. NTG 0,43 µg/ mg LVW) und ist somit hinweisend auf eine deutliche linksventrikuläre Vermehrung der extrazellulären Matrix der Ren2-Tiere.

Die pathogenetischen Mechanismen, die bei den Ren2-transgenen Tieren zu arterieller Hypertension und kardialer Hypertrophie führen, werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine verstärkte Expression des Ren2-Transgens kann vor allem in extrarenalen Gewebslokalisationen wie Nebennieren, Blutgefäßen, Schilddrüse und Myokard nachgewiesen werden. Dabei sind die Renin-Level in der Nebenniere am höchsten<sup>53</sup>. Die Serumspiegel von Renin, Angiotensin I und Angiotensin II sind bei erhöhten Plasma-Proreninspiegeln normal oder erniedrigt<sup>30</sup>. Peters et al. konnten an einem cyp1a1ren-2-transgenen Rattenmodell mit stark erhöhten Plasma-



Proreninspiegeln und deutlich reduziertem Plasma-Renin die Entwicklung einer Myokardhypertrophie und eines arteriellen Hypertonus ohne Nachweis einer Fibroseentwicklung zeigen<sup>56</sup>. Daneben scheinen lokale, gewebspezifische Renin-Angiotensin-Systeme (RAS), insbesondere im Myokard und vaskulärem Gewebe, für die Entwicklung der kardialen Hypertrophie von übergeordneter Bedeutung zu sein. Sowohl in Gefäßpräparationen als auch im linksventrikulären Myokard von Ren2-transgenen Ratten konnten signifikant erhöhte Angiotensin II-Konzentrationen gegenüber SD-Kontrollen bestimmt werden<sup>57, 58</sup>. Durch Angiotensin II ausgelöste Effekte wie Erhöhung des Blutdrucks, Hypertrophie der Kardiomyozyten und Steigerung der Kollagensynthese werden über den Angiotensin-1-Rezeptor (AT1) vermittelt<sup>10</sup>.

Durch die Angiotensin II-Wirkung erfolgt eine Aktivierung des kardialen Sympathikotonus. Dabei spielen sowohl die Aktivierung zentraler und peripherer sympathischer Zentren, als auch die exozytotische Freisetzung von Noradrenalin an sympathischen Nervenendigungen über die Vermittlung durch präsynaptische AT1-Rezeptoren eine Rolle<sup>10, 59</sup>. Diese verstärkte Noradrenalinfreisetzung kann über  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Effekte das Zellwachstum stimulieren<sup>10</sup>. Dostal et al. konnten zeigen, dass Angiotensin II als direkter Mediator für Hypertrophie und Fibrose fungiert<sup>60</sup>. In Verbindung mit erhöhtem mechanischen Stress durch Drucküberlastung steht auch hier die Angiotensin II-Wirkung am AT1-Rezeptor im Vordergrund. Über verschiedene komplexe Signaltransduktionswege wird die Reexpression von fetalen Proteinen wie atriales natriuretisches Peptid, skelettales  $\alpha$ -Aktin und  $\beta$ -Myosin-schwere Ketten vermittelt und so die Entstehung von Hypertrophie und Fibrose initiiert<sup>33</sup>.

Böhm et al. stellten heraus, dass durch die Gabe von AT1-Rezeptor-Blockern und Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)-Hemmern sowohl in antihypertensiven, als auch in nicht antihypertensiven Dosen eine Verminderung der kardialen Hypertrophie erreicht wird, während die Gabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten und  $\beta$ -Blockern diesen Effekt nicht auslöste<sup>61, 62</sup>. Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung des RAS für die Entstehung der kardialen Veränderungen. Im Widerspruch dazu konnten Bishop et al. nur bei antihypertensiven Dosen eines ACE-Hemmers eine Reduktion von Hypertrophie und Fibrose nachweisen, die auch durch Gabe eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten erreicht wurde und folgerten daraus eine übergeordnete Rolle des erhöhten Blutdrucks<sup>31</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass neben einer Aktivierung des lokalen RAS andere hormonelle Regulationen in Verbindung mit erhöhter mechanischer Beanspruchung der Kardiomyozyten durch Drucküberlast an der Pathogenese von Hypertrophie und Fibrose beteiligt sind.

### 4.3 SERCA2a/ Ren2-doppelt transgene Ratten – Einfluss des SERCA2a-Transgens auf myokardiales Remodeling

Das doppelt transgene SERCA2a/ Ren2 (SERen)-Rattenmodell verfügt neben dem Ren2-Transgen über ein zusätzlich in das Genom integriertes SERCA2a-Transgen, welches unter der Kontrolle eines humanen CMV-Enhancers/ Hühnchen- $\beta$ -Aktin-Promoters steht. In der Dot Blot-Analyse linksventrikulärer RNA wurden bei den SERen-Tieren um 63 % höhere mRNA-Spiegel im Vergleich zu nicht transgenen Kontrolltieren bestimmt. Die SERCA2a-Proteinspiegel wurden in der vorliegenden Arbeit nicht quantifiziert. In vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Vetter konnten bei nicht hypertrophierten SERCA2a-transgenen Ratten bei 1,5-fach erhöhten mRNA-Spiegeln lediglich um 24 % erhöhte Proteinspiegel nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in Untersuchungen von SERCA2a-transgenen Mausmodellen gefunden<sup>63, 64</sup>. Diese Befunde weisen auf komplexe Regulationsmechanismen des SERCA2a-Proteins auf Translations- und Prozessierungsebene hin. Dabei sind variierende Inkorporationsstellen des Transgens in das Genom, unvollständiger Einbau der Proteine in das Genom sowie vermehrte Abbauprozesse des zusätzlich gebildeten SERCA2a-Proteins in Betracht zu ziehen. Müller et al. konnten in SERCA2a-transgenen homozygoten Ratten unter Verwendung eines kardialen Myosin-Leichte-Ketten-2-Promoters um bis zu 70 % erhöhte Proteinlevel im Vergleich zu nicht transgenen Kontrolltieren nachweisen<sup>66</sup>, so dass auch ein Einfluss des jeweils verwendeten Promoters auf die SERCA2a-Proteinlevel nahe liegt. Jedoch ist bei homozygot-transgenen Tiermodellen ohnehin von einer deutlich erhöhten Proteinexpression auszugehen.

Die kontraktile Dysfunktion bei Herzinsuffizienz konnte sowohl bei Tiermodellen, als auch in humanen Herzen mit einer reduzierten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und damit auch einer verminderten systolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Verbindung gebracht werden<sup>23, 65</sup>.

Die Störungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase können durch veränderte Expression, Funktion oder Modulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierenden Proteine erklärt werden. Dabei wurde in vielen tierexperimentellen Untersuchungen eine Herunterregulierung des SERCA2a-Proteins auf mRNA- und Proteinebene sowie eine Hochregulation des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers nachgewiesen. In humanen, schwer insuffizienten Herzen wurden widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der SERCA2a-Expression gezeigt<sup>8-10, 46</sup>. Die Expressionslevel des SERCA2a-Inhibitorproteins Phospholamban wurden in der Mehrzahl der Untersuchungen als unverändert beschrieben<sup>9</sup>. Im Gegensatz zu Flesch et al., die im linksventrikulären, hypertrophierten Myokard von Ren2-transgenen Ratten eine signifikante Reduktion der mRNA- und Proteinspiegel von SERCA2a nachwiesen, konnten bei den für diese Arbeit untersuchten Ren2-transgenen Ratten keine veränderten mRNA-Spiegel im Vergleich zu nicht transgenen Kontrolltieren gefunden werden<sup>29</sup>.

Die untersuchten doppelt transgenen SERen-Tiere wiesen im Vergleich zur NTG-Gruppe um +36 % erhöhte linksventrikuläre Feuchtgewichte und um 33 % höhere Feuchtgewicht/ Körpergewicht-Relationen auf. Somit besteht eine zur Ren2-Gruppe vergleichbare linksventrikuläre Hypertrophie. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Untersuchungen von Müller et al. an SERCA2a-transgenen Ratten mit Aortenstenose-induzierter kardialer Hypertrophie bei denen ebenfalls keine Veränderungen der kardialen Morphologie der hypertrophierten Herzen durch das SERCA2a-Transgen gefunden wurden <sup>45</sup>. Die Ermittlung des linksventrikulären Hydroxyprolingehalts ergab für die doppelt transgene Versuchsgruppe um 35 % signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur NTG-Gruppe. Zwischen der Ren2- und der SERen-Gruppe bestanden hinsichtlich der Hydroxyprolinwerte nur geringe, nichtsignifikante Unterschiede, so dass von einem vergleichbaren Maß an kardialer Fibrose auszugehen ist. Die SERCA2a-Überexpression scheint somit keinen Einfluss auf die Hypertonie-induzierte Hypertrophie und Fibrose des Ren2-transgenen Rattenmodells zu haben. Dabei ist gerade in den letzten Jahren der Zusammenhang zwischen gestörter  $Ca^{2+}$ -Homöostase und der Entstehung einer Myokardhypertrophie zunehmend in den Vordergrund gerückt. Hier sind verschiedene  $Ca^{2+}$ -abhängige Transduktionswege von Bedeutung, die über eine Bindung von  $Ca^{2+}$  an das  $Ca^{2+}$ -Sensorprotein Calmodulin aktiviert werden. Es konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass über die  $Ca^{2+}$ / Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMK II) und Aktivierung des myocyte enhancer factor 2 (MEF2) sowie über die ebenfalls  $Ca^{2+}$ / Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin und Aktivierung des nuclear factor of activated T-cells (NFAT) eine kardiale Hypertrophie induziert werden kann. Hier sind weitere Untersuchungen, unter anderem hinsichtlich der bestimmenden Faktoren der Aktivierung von Calmodulin durch  $Ca^{2+}$  notwendig <sup>66-68</sup>. Eine alleinige SERCA2a-Überexpression ohne Beeinflussung der zahlreichen weiteren Mechanismen zur Regulation der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration kann, zumindest in dem hier verwendeten Modell mit moderater linksventrikulärer Hypertrophie und moderater diastolischer Dysfunktion, offensichtlich keinen protektiven Einfluss auf die Entwicklung der kardialen Hypertrophie nehmen.

#### **4.4 Kontraktile Funktion von Ren2- und SERCA2a/ Ren2-transgenen Ratten unter Normoxie**

Die Registrierung der kontraktile Parameter der isolierten, retrograd perfundierten Herzen erfolgte unter konstantem koronarem Fluss bei einem linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP) von 8-10 mmHg. Die spontanen Herzfrequenzen Ren2-transgener Rattenherzen zeigten mit  $208 \pm 6$  bpm im Vergleich zur nichttransgenen Kontrollgruppe mit  $259 \pm 16$  bpm signifikant niedrigere Ausgangswerte. Die doppelt transgenen SERen-Tiere erreichten mit  $218 \pm 8$

bpm ebenfalls deutlich niedrigere Herzfrequenzen gegenüber der nicht transgenen Kontrollgruppe. Hier ergab sich aufgrund der großen Varianz keine statistische Signifikanz. Zwischen der Herzfrequenz und dem relativen linksventrikulären Gewicht (LVW/ BW) bestand eine inverse Korrelation. Dies bestätigt die Ergebnisse einer Arbeit von Randall et al., der ebenfalls eine signifikante Bradykardie der Ren2-Tiere bei deutlich erhöhtem LVW/ BW im Vergleich zu nichthypertensiven Kontrollen nachwies <sup>69</sup>.

Unter den Bedingungen der kardialen Hypertrophie im humanen Herzen kommt es zu einer Umkehr des physiologischen Kraftzuwachses unter Frequenzanstieg - hin zu einer negativen Kraft-Frequenz-Beziehung <sup>70</sup>. Dazu tragen unter anderem die verlangsamten  $Ca^{2+}$ - Konzentrationsänderungen in Verbindung mit einem geringeren SR- $Ca^{2+}$ -Gehalt bei. Darüber hinaus können veränderte sarkolemme  $Na^{+}$ - und  $K^{+}$ -Ströme, mit nachfolgender Verlängerung des Aktionspotentials zur Erklärung von erniedrigten Herzfrequenzen bei Myokardhypertrophie herangezogen werden <sup>8</sup>. Die inverse Korrelation zwischen Herzfrequenz und LVdP ist bei Ratten physiologischerweise vorhanden, und konnte bei den in dieser Arbeit untersuchten Tieren anhand der negativen Beziehung zwischen spontaner Herzfrequenz und LVdP bei Betrachtung aller drei Versuchsgruppen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die niedrigeren Herzfrequenzen der hypertrophierten Herzen können daher als Kompensationsmechanismus einer kontraktiven Dysfunktion interpretiert werden.

Unter basalen Bedingungen der retrograden Perfusion zeigten die Absolutwerte des maximal entwickelten linksventrikulären Drucks (LVdP) zunächst keine Hinweise auf eine linksventrikuläre systolische Insuffizienz der hypertrophierten Ren2- und SERen Herzen. Die LVdP-Werte von Ren2 und SERen lagen auf vergleichbarem Niveau und waren gegenüber der NTG-Gruppe signifikant erhöht. Im Sinne der oben beschriebenen negativen Frequenz-Inotropie-Beziehung wurde dieses Verhältnis zwischen den Gruppen bei simultaner Schrittmacherfrequenz von 300 bpm aufgehoben. Hier zeigt sich, anders als bei der Kontrollgruppe, eine signifikante Senkung der LVdP-Werte der beiden hypertensiven Versuchsgruppen im Vergleich zu den jeweiligen Werten bei Spontanfrequenz. Dies weist auf eine verstärkte negative Kraft-Frequenz-Beziehung von Ren2 und SERen hin. Bei Messung der Herzfrequenzen an der Ratte dürften die Werte der hypertensiven Tiere durch den erhöhten Sympathikotonus auf dem Niveau der Kontrolltiere liegen. Dies konnte von Fleisch et al. bestätigt werden, der bei intravasaler Blutdruckregistrierung keine Unterschiede der Herzfrequenzen von Ren2-Tieren gegenüber Kontrollen feststellte <sup>71</sup>. Der gleiche Effekt ließ sich auch durch die Relativierung des LVdP auf das linksventrikuläre Feuchtgewicht (LVdP/ LVW) erzielen. Dieser Befund weist auf einen deutlichen Einfluss des linksventrikulären Feuchtgewichts und damit der kontraktiven Masse hin. Unter einheitlicher Schlagfrequenz

von  $300 \text{ min}^{-1}$  ergaben sich für die Ren2- und SERen-Gruppe signifikant niedrigere LVdP/ LVW-Quotienten gegenüber NTG.

Dies kann als Zeichen einer bestehenden, kompensierten systolischen Dysfunktion gewertet werden.

Für die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $+dP/dt_{\text{max}}$ ) wurden unter Spontanfrequenz signifikant höhere  $+dP/dt_{\text{max}}$ -Werte von Ren2 und SERen im Vergleich zu NTG ermittelt. Bei einheitlicher Kontraktionsfrequenz, bzw. bei Normierung von  $+dP/dt_{\text{max}}$  auf LVdP glichen sich die Werte denen der NTG-Gruppe an. Ein Einfluss der Expression des SERCA2a-Transgens auf die linksventrikuläre Druckentwicklung der hypertrophierten Herzen konnte nicht festgestellt werden. Auch die negative Frequenz-Inotropie-Beziehung wurde durch die SERCA2a-Überexpression nicht beeinflusst.

Die Bestimmung der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{\text{max}}$ ) zeigte in den Ren2- und SERen-transgenen Herzen gleichermaßen eine Verringerung der Werte bei simultaner Herzfrequenz und anders als bei den  $+dP/dt_{\text{max}}$ -Werten eine signifikante Erniedrigung der  $-dP/dt_{\text{max}}$ /LVdP-Quotienten im Vergleich zu NTG. Diese Veränderungen sprechen insbesondere im Hinblick auf die Unterschiede zwischen  $+dP/dt_{\text{max}}$  und  $-dP/dt_{\text{max}}$  für eine deutlichere Einschränkung der diastolischen Funktion der beiden hypertensiven Versuchsgruppen.

Die Messungen der diastolischen Zeitparameter pressure-halftime (PHT) und Tau ( $\tau$ ) lassen die Vermutung zu, dass sich die diastolische Dysfunktion vorwiegend auf die späte Phase der Relaxation auswirkt. Bei in allen drei Versuchsgruppen vergleichbaren PHT-Werten wurde bei den spontan schlagenden Herzen der Ren2-Gruppe eine signifikante Erhöhung von Tau und damit eine Verlängerung des späten diastolischen Druckabfalls im Vergleich zu NTG bestimmt.

Überraschenderweise ergaben sich für Tau bei angeglicher Herzfrequenz von 300bpm signifikant höhere Werte für SERen gegenüber NTG. Gerade hier sollte sich eine schnellere Senkung der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase positiv auf die Relaxation auswirken. Ein benefitärer Effekt der SERCA2a-Überexpression auf den diastolischen Teil des Kontraktionsverlaufs ist somit ebenfalls auszuschließen.

Die systolischen Parameter LVdP und  $+dP/dt_{\text{max}}$  werden entscheidend über den SR-  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt beeinflusst, der überwiegend durch die Aktivität der SR-  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase bestimmt wird. Auch die diastolischen Parameter  $-dP/dt_{\text{max}}$ , PHT und  $\tau$  sind in hohem Maße abhängig von der Funktion des SERCA2a-Proteins. Die beschriebenen Ergebnisse werfen die Frage nach den Ursachen der fehlenden funktionellen Konsequenzen des SERCA2a-Transgens auf die kontraktile Funktion im SERCA2a/ Ren2 doppelt transgenen Rattenmodell unter basalen Bedingungen auf. Sowohl in isolierten SERCA2a-transgenen Mauserzen als auch in isolierten Kardiomyozyten SERCA2a-transgener Ratten ohne Hypertrophie konnte eine verbesserte systolische und diastolische kon-

traktile Funktion nachgewiesen werden<sup>46, 64</sup>. In einem mittels Aortenligatur erzeugtem Hypertrophie-Modell konnte durch SERCA2a-Überexpression ebenfalls eine verbesserte Kontraktilität erreicht werden. Hier wurde allerdings eine 1,7-fache Erhöhung der SERCA2a-Proteinspiegel im Vergleich zu Kontrolltieren bestimmt<sup>45</sup>. Wie in Kapitel 4.4 beschrieben, ist im hier verwendeten SERen-Modell von einer niedrigeren SERCA2a Proteinkonzentration auszugehen und somit die Vergleichbarkeit der Arbeiten als problematisch einzuschätzen. Des Weiteren sind auch die Unterschiede in der Methode der Induktion einer Herzhypertrophie zu berücksichtigen. Neben der Hypertonie-induzierten Drucküberlast sind bei dem Ren2-transgenen Tiermodell auch neurohumorale Faktoren in Form lokaler RAS in der Regulation der kontraktilen Funktion beteiligt. So konnte in adulten Kardiomyozyten der Ratte durch Angiotensin II-Wirkung eine Herunterregulierung der SERCA2a-Expression auf mRNA-Ebene induziert werden<sup>10</sup>. Flesh et al. zeigten in diesem Zusammenhang eine Normalisierung der SERCA2a-mRNA-Spiegel in Ren2-transgenen Ratten durch AT1-Rezeptor Blockade<sup>71</sup>. Dieser Effekt ist als Ursache für den fehlenden SERCA2a-Transgen-Einfluss in SERen jedoch zu vernachlässigen, da sich die veränderte Expression nicht selektiv auf das SERCA2a-Transgen auswirken würde und so die Ren2-Gruppe im gleichen Maße betroffen wäre.

Im Unterschied zum humanen Herzen verfügt das Rattenherz über eine sehr hohe basale SERCA2a-Aktivität mit einem über 90%igen Anteil an der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Senkung<sup>17</sup>. Daraus ergibt sich eine hohe SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportkapazität. Da bei den untersuchten hypertrophierten Ren2-Herzen keine Verminderung der SERCA2a-mRNA-Spiegel gemessen wurde, könnten die Transgen-kodierten SERCA2a-Proteine in SERen unter basalen Bedingungen ohne funktionelle Bedeutung für den SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transport bleiben.

Die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität durch SERCA2a wird sowohl über die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als auch über den hemmenden Einfluss von Phospholamban (PLB) reguliert. Durch Phosphorylierung von PLB über Proteinkinasen wird der hemmende Einfluss herabgesetzt<sup>72</sup>. Dieser Mechanismus wird über  $\beta$ -adrenerge Stimuli ausgelöst. Bei fehlendem neuroendokrinen Einfluss auf die isolierten Herzen ist von einem verminderten Phosphorylierungsgrad von PLB auszugehen. Jedoch konnte an einem Mausmodell gezeigt werden, dass nur ca. 40% der SERCA2a-Proteine unter inhibitorischem Einfluss von PLB stehen<sup>73</sup>. Unter Annahme vergleichbarer Verhältnisse im Rattenherzen liegt die Vermutung nahe, dass die Transgen-kodierten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen nicht unter dem inhibitorischen Einfluss von PLB stehen. Darüber hinaus erfolgt, abhängig von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, eine SERCA2a-Aktivierung auch über die direkte Phosphorylierung durch CaMKII<sup>9</sup>. Daher scheint die Regulation durch PLB nicht ausschlaggebend für die ausgebliebenen Effekte der SERCA2a-Überexpression auf die kontraktile Funktion der SERen Tiere zu sein.

In Untersuchungen der Arbeitsgruppe Vetter konnten keine signifikant erhöhten Oxalat-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten von SERen-Tieren im Vergleich zu Ren2- und NTG-Tieren gefunden werden. Dieses Ergebnis in Verbindung mit den am isolierten Herzen ermittelten, vergleichbaren kontraktile Funktionsparametern der SERen und Ren2-Gruppe und der Diskrepanz zwischen SERCA2a-mRNA- und Proteinspiegeln lassen die Frage zu, in wie weit die SERCA2a-Überexpression den Einbau zusätzlicher, funktionstüchtiger SERCA2a-Proteine ins SR gewährleistet.

#### 4.5 $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher-Aktivität

Der sarkolemmale  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) ist unter physiologischen Bedingungen mit einem Anteil von ca. 30 % im humanen und ca. 10 % im Rattenherzen an der Senkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beteiligt<sup>74</sup>. Der NCX kann sowohl im forward mode ( $\text{NCX}_f$ ) mit resultierendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux als auch im reverse mode ( $\text{NCX}_r$ ) mit resultierendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx arbeiten. In insuffizienten Herzen findet während des Aktionspotentials eine verstärkte Aktivierung des  $\text{NCX}_r$  statt. Diese Umstellung wird durch verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Spitzenkonzentrationen, verlängerte Aktionspotentialdauer und erhöhte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen im hypertrophierten Kardiomyozyten verursacht. In der Mehrzahl der Tiermodelle der Herzinsuffizienz und in humanen terminal insuffizienten Herzen konnte eine gesteigerte Expression und Funktion des NCX nachgewiesen werden<sup>11, 23</sup>. Dies konnte bei der für diese Arbeit durchgeführten Messungen der NCX-Aktivitäten an Grobmembranpräparaten von SERen und Ren2 bestätigt werden. Dabei wurden signifikant höhere NCX-Aktivitäten in der Ren2 und SERen-Gruppe im Vergleich zu NTG gemessen. Vetter et al. konnten in diesem Zusammenhang in neonatalem Rattenmyokard eine inverse Beziehung zwischen SERCA2a- und NCX-Expression nachweisen und folgerten daraus eine komplexe prätranslationale Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportproteine<sup>75</sup>. Für hypertrophierte Herzen mit herunterregulierter SERCA2a-Expression wäre somit eine reaktive Steigerung der NCX-Expression zu erwarten. Darüber hinaus könnte aus einer SERCA2a-Überexpression eine Herunterregulierung der NCX-Expression resultieren. Diese Mechanismen konnten anhand der Aktivitätsbestimmung des NCX hier nicht bestätigt werden. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Ren2- und SERen-Versuchsgruppe. Allerdings wurden keine Untersuchungen der Expressionslevel des NCX durchgeführt. Die Transportaktivität des NCX kann nur Hinweise auf eine eventuell vorliegende Expressionsveränderung geben, da ohne mRNA- oder Proteinspiegelbestimmung keine Differenzierung zwischen veränderter Aktivierung und Expression möglich ist.

Die Auswirkungen einer gesteigerten NCX-Aktivität werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Weber et al. konnten an isolierten Myozyten aus terminal insuffizienten humanen Herzen zeigen, dass der  $\text{NCX}_R$  und der damit verbundene  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom die kontraktile systolische Dysfunktion limitieren kann. Gleichzeitig wiesen sie auf die Möglichkeit einer verlangsamten Relaxation durch vermehrtes intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  hin<sup>28</sup>. Auch andere Arbeiten bestätigten, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über den  $\text{NCX}_R$  zu einer verlangsamten diastolischen Senkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beiträgt<sup>27</sup>. In einem Kaninchenmodell mit NCX-Überexpression konnten an isolierten Kardiomyozyten ein geringerer SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt durch vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux und eine damit verbundene verminderte Kontraktilität nachgewiesen werden<sup>25</sup>. Dagegen wurden bei mehreren Mausmodellen mit NCX-Überexpression keinerlei Zeichen einer kontraktilen Dysfunktion nachgewiesen<sup>23</sup>. Bers et al. zeigten in einem Kaninchenmodell mit moderater Herzinsuffizienz, dass die hochregulierte NCX-Expression hinsichtlich der Kontraktilität kompensatorisch auf die verminderte SERCA2a-Expression wirkt. Negative Auswirkungen auf die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die Relaxation waren nicht nachweisbar<sup>8</sup>.

Bei den für diese Arbeit untersuchten hypertrophierten Herzen der Ren2- und SERen-Gruppe konnte eine kompensierte kardiale Insuffizienz, mit Überwiegen der diastolischen Dysfunktion herausgestellt werden. Im Zusammenhang mit den oben beschriebenen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen kann die gesteigerte NCX-Aktivität als Kompensationsmechanismus der systolischen Dysfunktion interpretiert werden. Über den  $\text{NCX}_R$  kann während des Aktionspotentials somit mehr  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle gelangen und zur Kontraktion beitragen. Andererseits weist die deutlichere Störung der Relaxation darauf hin, dass die höhere intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Belastung diastolisch durch  $\text{NCX}_F$  und die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nicht vollständig kompensiert werden kann.

Während der Ischämie-Reperfusionen war ein deutlich geringerer Anstieg des LVEDP in der Ren2- und SERen-Versuchsgruppe im Vergleich zu NTG zu verzeichnen. Damit verbunden war eine signifikant schwächere kontraktile Funktion in der NTG-Gruppe gegenüber den beiden hypertensiven Versuchsgruppen. Diese Ergebnisse sind in Anbetracht der höheren NCX-Aktivitäten von Ren2 und SERen nur ungenügend erklärbar. Eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate über den  $\text{NCX}_R$  führt während der Ischämie zu einer stärkeren intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung. Die Aktivierung des  $\text{NCX}_R$  erfolgt dabei über die steigende intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration, die vor allem über den sarkolemmalen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher bei sinkenden pH-Werten in der Ischämie vermittelt wird<sup>76</sup>. Diese Mechanismen tragen während der Reperfusion entscheidend zur Kontrakturstörung und kontraktilen Dysfunktion bei<sup>14</sup>. Somit wäre im Gegensatz zu den hier gewonnenen Ergebnissen von einer Erhöhung der LVEDP-Werte und einer abgeschwächten Kontraktilität der hypertensiven Versuchsgruppen mit gesteigerter NCX-Aktivität im Vergleich zur nicht transgenen Kontrollgruppe auszugehen. Ein möglicher Ansatzpunkt für eine Erklärung



der Befunde könnten die Ergebnisse von Philipson et al. sein, die an Membranpräparaten aus Hundeherzen einen inhibitorischen Einfluss hoher intrazellulärer  $H^+$ -Konzentrationen auf die NCX-Aktivität nachweisen konnten. Unter der Annahme einer gesteigerten anaeroben Glykolyseaktivität in den hypertrophierten Herzen von Ren2 und SERen wäre eine Herabsetzung der NCX-Aktivität während der Ischämie und der frühen Reperfusion somit denkbar. Allerdings ist zu bemerken, dass die Perfusionslösung die Puffersubstanz HEPES enthält und somit eine intrazelluläre Pufferwirkung im Verlauf der Reperfusion möglich ist. Da nach dem Ischämie-Reperfuionsversuch signifikant höhere NCX-Aktivitäten für Ren2 und SERen im Vergleich zu NTG bestimmt wurden, ist davon auszugehen, dass dieser hemmende Einfluss reversibel ist und nicht ausschließlich für die durchgehend signifikant größere Kontraktilität und signifikant geringeren LVEDP-Werte in SERen und Ren2 während der Reperfusion verantwortlich ist. Daher müssen insbesondere zur Erklärung der deutlich schwächeren kontraktile Funktion in der NTG-Gruppe auch irreversible Schädigungen des kontraktile Apparats, bzw. der Kardiomyozyten herangezogen werden. Diese könnten unter anderem durch die hohe intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Belastung während der Ischämie verursacht worden sein. Dabei spielen proteolytische Schädigungen von Strukturproteinen durch  $Ca^{2+}$ -aktivierbare Proteasen eine wichtige Rolle<sup>35</sup>.

#### **4.6 Veränderung kardialer Eigenschaften unter globaler Ischämie und Reperfusion**

Intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Überladung spielt bei der Entwicklung von myokardialen Ischämie-Reperfusionsschäden eine entscheidende Rolle. Die kontraktile Dysfunktion unter Ischämie-Bedingungen wird dabei hauptsächlich über eine reduzierte SR-Funktion bestimmt. In verschiedenen I-R-Versuchen an Rattenherzen konnten in diesem Zusammenhang verminderte Aktivitäten von SERCA2a und RyR gefunden werden. Diese herabgesetzte Aktivität konnte mit einer geringeren CaMK II-vermittelten Phosphorylierung von RyR, SERCA2a und PLB in Verbindung gebracht werden. Darüber hinaus wurden nach I-R reduzierte mRNA-Spiegel von SERCA2a und RyR gemessen. Dabei werden zum einen die Angiotensin II-Wirkung auf hochregulierte AT1-Rezeptoren und zum anderen die Degradation der SR-Proteine über Sauerstoffradikale, vor allem während der Reperfusion, als ursächlich diskutiert<sup>12, 13</sup>. In dieser Arbeit soll anhand des SERen-Tiermodells untersucht werden, inwieweit sich die zusätzliche SERCA2a-Expression hinsichtlich der Entstehung von Ischämie-Reperfusionsschäden in dem Ren2-Hypertrophiemodell protektiv auswirkt.

Das Versuchsprotokoll sah für alle drei Versuchsgruppen 20 min Einschlagzeit, eine 20minütige Ischämiephase und anschließend 45 min Reperfusion vor. Die Wahl der Länge der Ischämiezeit

erfolgte auf Grundlage der Ergebnisse von Untersuchungen von Wang et al. und Jennings et al. an isolierten Maus-, bzw. Kaninchenherzen. Hier konnte gezeigt werden, dass bis zu einer Ischämiezeit von 20 min eine reversible Schädigung des Myokards auftritt und sich so die kardiale Funktion während der Reperfusion den Ausgangswerten vor Ischämie annähert. An den Mausherzen wurden so nach zunächst signifikant reduzierten LVdP- und  $+dP/dt_{\max}$ -Werten nach 40 min Reperfusion die Werte der retrograd perfundierten Herzen ohne Ischämiephase annähernd erreicht. Diese Effekte werden in der Literatur als *stunning* beschrieben. Stunning bezeichnet dabei eine moderate, reversible postischämische ventrikuläre Dysfunktion des Myokards ohne Auftreten von Nekrosen oder Apoptosen<sup>77, 78</sup>. So konnte davon ausgegangen werden, dass die nicht transgenen Kontrolltiere am Ende der Reperfusionszeit bezüglich der kontraktilen Funktion wieder das Ausgangsniveau erreichen und so der Entwicklung der Kontraktilität bei den hypertensiven Ren-2 und SERen-Tieren gegenübergestellt werden können.

Neben der gesteigerten Bildung freier Radikale werden als ursächliche Faktoren für die stunning-Effekte auch Veränderungen der  $Ca^{2+}$ -Homöostase mit resultierender zellulärer  $Ca^{2+}$ -Überladung diskutiert. Die Einschätzung von Effekten einer zusätzlichen SERCA2a-Expression sollte unter diesen Bedingungen besser möglich sein als bei den komplexen Veränderungen bei irreversibler Zellschädigung während und nach prolongierter Ischämie. Bei den für diese Arbeit vorgenommenen Vorversuchen wurde bezüglich der linksventrikulären Druckentwicklung nach einer Reperfusionsdauer von 40 min die Einstellung eines steady state beobachtet. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Reperfusionsdauer auf 40 min festgesetzt.

Nach Einleitung der globalen Ischämie waren bei allen drei Versuchsgruppen nach ca. vier Minuten keine linksventrikulären Kontraktionen mehr nachweisbar. Im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten fiel während der ersten Minute ein signifikant steileres Absinken der kontraktilen Parameter LVdP,  $+dP/dt_{\max}$ , und  $-dP/dt_{\max}$  der beiden hypertensiven Tiergruppen gegenüber NTG auf. Schon während der frühen Phase der Ischämie kommt es zu einer Reduktion des oxidativen Metabolismus und einem Anstieg der anaeroben Glykolyse. Der oxidative Metabolismus wird sowohl bei nicht-hypertrophen als auch bei hypertrophen Herzen unter normoxischen Bedingungen vor allem durch die mitochondriale Oxidation langkettiger Fettsäuren und zu einem geringeren Teil durch aerobe Glykolyse aufrechterhalten<sup>79</sup>. In der verwendeten Perfusionslösung wurde den isolierten Herzen lediglich Glucose als energiereiches Substrat angeboten. Somit konnten nur die aus gespeicherten Triacylglycerinen freigesetzten Fettsäuren für die Fettsäureoxidation eingesetzt werden.

Nach Anhalten der Perfusion stand keine exogene Glucose mehr für die Energiegewinnung zur Verfügung. In hypertrophierten Herzen konnte eine verlangsamte Fettsäureoxidation nachgewiesen werden, die mit veränderten Expressionsspiegeln von Fettsäure-transportierenden Proteinen

assoziiert ist <sup>80</sup>. Somit ist es, unter Voraussetzung von noch vorhandener Restoxygenierung, denkbar, dass die hypertrophierten Herzen in der frühen Phase der Ischämie während der Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel weniger energiereiche Phosphate aus gespeicherten Fetten generieren können und es so zu einem schnelleren Verlust der kontraktile Funktion kommt. Von besonderem Interesse während der Ischämie- und Reperfusionphase ist die Entwicklung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP). Hier fiel während der zweiten Hälfte der Ischämie überraschenderweise ein stärkerer Anstieg der Werte der nicht transgenen Kontrollgruppe auf ca. 70 mmHg im Vergleich zu Werten um 35 mmHg der beiden hypertensiven Versuchsgruppen auf. Während der Reperfusion entwickelten sich die LVEDP-Werte nach einer initialen, geringgradigen Absenkung hin zu den Werten am Ende der Ischämie. Somit bestand am Ende der Reperfusion im Vergleich zu den präischämischen Ausgangswerten in der NTG-Gruppe ein um das 8-fache gesteigerter LVEDP. In Ren2 und SERen wurde jeweils ca. der 4-fache Ausgangswert erreicht. Diese deutlich höheren LVEDP-Werte der NTG-Gruppe entsprechen nicht den Ergebnissen bisheriger Untersuchungen. So zeigten Randall et al. bei I-R-Versuchen an Ren2-Ratten signifikant erhöhte enddiastolische Drücke während der Reperfusion gegenüber nicht transgenen Kontrolltieren <sup>69</sup>. Für die Entwicklung der Kontraktur werden zwei unterschiedliche Mechanismen verantwortlich gemacht. Der Rigor-Typ verursacht zum überwiegenden Teil die Kontraktur unter ischämischen Bedingungen. Hier wird die myofibrilläre Verkürzung aufgrund verbrauchter intrazellulärer Reserven von Adenosintriphosphat (ATP) angeführt. Der zweite Mechanismus der Kontraktorentwicklung wird als  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung-induzierte Kontraktur beschrieben und spielt insbesondere während der Reperfusion eine übergeordnete Rolle. Dabei kommt es während der Ischämie zu einer erhöhten intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration folgendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den reverse mode des NCX. Mit der Reoxygenierung und der Bereitstellung von energiereichen Phosphaten kommt es zu unkontrollierten Kontraktionen durch vergrößerte Oszillationen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Diese Effekte werden durch den in der frühen Phase der Reperfusion weiterhin bestehenden, reduzierten transsarcolemmalen  $\text{Na}^+$ -Gradient und den damit im reverse mode arbeitenden NCX agraviert <sup>14, 81</sup>. Untersuchungen an hypertrophierten Rattenherzen haben gezeigt, dass die basale, nicht Insulinvermittelte Glukoseaufnahme in die Kardiomyozyten gesteigert ist. Des Weiteren ist der Glykogenumsatz unter Ischämiebedingungen in hypertrophierten Kardiomyozyten erhöht <sup>79</sup>. In Verbindung mit erhöhter anaerober Glykolyseaktivität kann somit nach Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel auf eine erhöhte Bereitstellung von energiereichen Phosphaten im Verlauf der Ischämie gefolgert werden. Dies könnte die verminderten ischämischen LVEDP-Werte, bzw. eine geringere Rigorkontraktur der hypertrophierten Herzen erklären. Allerdings sind diese Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels mit einer verstärkten intrazellulären Azidose assoziiert.

Dies führt über den sarkolemmalen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher zu vermehrtem  $\text{Na}^+$ -Einstrom und diesem folgend wiederum zu erhöhtem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  über den NCX. Die resultierende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung geht mit erhöhter Kontraktur und kontraktile Dysfunktion während der Reperfusion einher<sup>82</sup>. Auch die bei SERen und Ren2 gemessenen, signifikant höheren Aktivitäten des NCX (vgl. 3.3.2) würden über die oben beschriebene Aktivierung des reverse mode eine stärkere  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung im Vergleich zu NTG erwarten lassen. Diese Erkenntnisse sind nicht konsistent mit den Ergebnissen der hier untersuchten Ratten. Die deutlich niedrigeren enddiastolischen linksventrikulären Drücke der hypertrophierten Herzen von Ren2 und SERen im Vergleich zu NTG während der Reperfusion lassen sich, insbesondere unter der Annahme einer ursächlichen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung, nicht hinreichend erklären. Einen möglichen Erklärungsansatz könnten die Ergebnisse von Parsons et al. liefern. Sie konnten zeigen, dass die Erniedrigung des pH von 7 auf 6,5 eine signifikante Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität von Troponin C in isolierten Kardiomyozyten vom Schwein herbeiführt<sup>83</sup>. Wie bereits beschrieben führt die höhere anaerobe Glykolyseaktivität in hypertrophierten Herzen zu einer Absenkung des pH-Wertes im Vergleich zu gesunden Herzen. Dies könnte sich in einer verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung-induzierten Kontraktur auswirken. Ein Effekt auf die Entwicklung des LVEDP durch vermehrten SERCA2a-katalysierten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in der SERen-Gruppe ließ sich angesichts der vergleichbaren Werte der beiden hypertensiven Gruppen nicht nachweisen.

Hier stellt sich die Frage, inwieweit die kontraktile Parameter während der Reperfusion von den unphysiologisch hohen LVEDP-Werten, insbesondere der NTG-Gruppe beeinflusst werden.

Miklos et al. konnten bei ihren I-R-Untersuchungen an isolierten Rattenherzen den Zusammenhang zwischen intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung, erhöhtem enddiastolischen Druck und einer verminderten linksventrikulären Druckentwicklung während der Reperfusion darstellen. Dabei wurden während der Reperfusion deutlich erhöhte basale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen gemessen, die mit erniedrigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten verbunden waren. Der LVEDP blieb während der Reperfusion signifikant erhöht, wobei der entwickelte Druck und die maximalen Druckanstiegs- und Abfallgeschwindigkeiten gegenüber den präischämischen Ausgangswerten signifikant erniedrigt waren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die erhöhte basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über die Bindung an Troponin C während des gesamten Kontraktionszyklus eine verminderte Relaxation der Myozyten bewirkt<sup>84</sup>. Darüber hinaus muss eine irreversible Schädigung von einzelnen Myofilamenten und/ oder Myozyten durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung-induzierte Kontraktur in Betracht gezogen werden<sup>14</sup>.

Während des gesamten Reperfuionsverlaufs zeigten die NTG-Tiere signifikant niedrigere LVdP-Werte gegenüber Ren2 und SERen. Nach 40 min Reperfusion erreichten die NTG-Herzen lediglich 70 % ihrer Ausgangswerte, während die Werte von Ren2 und SERen dem Ausgangsniveau

entsprachen. Insbesondere fallen die, im Unterschied zu den präischämischen Werten, ebenfalls signifikant erniedrigten LVdP/ LVW-Werte von NTG im Vergleich zu SERen und Ren2 auf. Hier ist von einem deutlichen Einfluss des stark erhöhten LVEDP in der NTG-Gruppe auszugehen. Eine, wenn auch kompensierte, linksventrikuläre Insuffizienz der Ren2- und SERen-Versuchsgruppe ließ sich während der Reperfusion nicht mehr nachweisen. Die Herzfrequenzen der drei Versuchsgruppen näherten sich bereits nach 20 min Reperfusionsdauer ihren jeweiligen präischämischen Ausgangswerten an. Ein Einfluss der Herzfrequenz auf die veränderte Druckentwicklung im Vergleich zu den präischämischen Werten kann somit nahezu ausgeschlossen werden.

Die relativ gleichförmige Entwicklung der maximalen Druckanstiegs- und Abfallgeschwindigkeiten lassen den Rückschluss zu, dass der systolische und diastolische Teil der Druckkurve gleichermaßen durch die Ischämie und Reperfusion beeinflusst werden. Auch hier ergaben sich signifikant niedrigere Werte in der NTG-Gruppe im Vergleich zu Ren2 und SERen. Nach 40 min betrug die  $+dP/dt_{max}$  und  $-dP/dt_{max}$ -Werte der nicht transgenen Kontrollgruppe um 75 % und die der beiden hypertensiven Gruppen sogar Werte über 100 % gegenüber den jeweiligen präischämischen Ausgangswerten. Bei der deutlich positiven Korrelation von LVdP und  $+dP/dt_{max}$  sowie  $-dP/dt_{max}$  ist auch hier der Einfluss des erhöhten enddiastolischen linksventrikulären Drucks der NTG-Gruppe auf diese Ergebnisse als ursächlich zu diskutieren. Anders als für  $+dP/dt_{max}$  waren in der zweiten Hälfte der Reperfusion für  $-dP/dt_{max}$  bei Normierung auf den LVdP signifikant geringere Werte in Ren2 und SERen gegenüber NTG zu verzeichnen. Dieser Befund deckt sich mit den präischämischen Ergebnissen und deutet auf eine stärkere Beeinträchtigung der diastolischen als der systolischen Funktion der hypertensiven Versuchsgruppen auch nach der Ischämie hin. Dies wird durch die in Ren2 und SERen signifikant höheren PHT- und Tau-Werte in der zweiten Hälfte der Reperfusion bestätigt.

Das Erreichen der Ausgangswerte der Ren2- und SERen-Gruppe für die beschriebenen kontraktilen Parameter deutet darauf hin, dass die Störungen der kontraktilen Funktion, die durch Ischämie und Reperfusion ausgelöst werden und mit einem gesteigerten LVEDP einhergehen im Vergleich zur NTG-Gruppe besser toleriert werden. Dabei konnte bei nahezu simultanem Verlauf der Werte der beiden hypertensiven Versuchsgruppen kein Effekt der Transgen-kodierten SERCA2a in der SERen-Gruppe festgestellt werden. Auch hier wäre durch eine verbesserte SR- $Ca^{2+}$ -Transportaktivität eine optimierte Reduktion der basalen intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu erwarten. Dies hätte niedrigere LVEDP-Werte und eine verbesserte kontraktile Funktion zur Folge. Die Gründe für den fehlenden Effekt der SERCA2a-Überexpression können auch anhand der Befunde der Ischämie-Reperfusionssequenz nicht geklärt werden. Wie schon unter normoxi-

schen Bedingungen muss auch hier eine ungenügende Menge an funktionellem SERCA2a-Protein in Betracht gezogen werden.

#### 4.7 $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit nach Ischämie – Reperfusion

Der  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktionsweg spielt eine entscheidende Rolle in der Regulierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und der Kontraktilität der Kardiomyozyten *in vivo*. Die Bindung von Noradrenalin an  $\beta$ 1-Rezeptoren, löst über ein stimulatorisches G-Protein eine Signalkaskade aus, die über die Aktivierung der Adenylatzyklase und konsekutiver Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die PKA phosphoryliert und aktiviert zahlreiche Proteine im Sarkolemm und SR, wie den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, den RyR und Phospholamban<sup>10</sup>. So werden über eine beschleunigte systolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und diastolische Wiederaufnahme ins SR über  $\beta$ -adrenerge Stimulation positiv inotrope und lusitrope Effekte vermittelt.

Es ist allgemein anerkannt, dass sowohl Patienten mit Herzinsuffizienz als auch Tiermodelle der kardialen Hypertrophie eine erhöhte sympathische Aktivität aufweisen<sup>85</sup>. Eine chronisch überhöhte Katecholaminwirkung führt zu Veränderungen der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion. In diesem Zusammenhang konnten herunterregulierte  $\beta$ -Rezeptoren, einer Desensitivierung der Adenylatcyclase und eine verstärkte Expression des inhibitorischen G-Proteins, welches zur Senkung intrazellulärer cAMP-Spiegel führt nachgewiesen werden<sup>86</sup>. Diese Veränderungen fanden sich auch in Ren2-transgenen Ratten<sup>10</sup>. Die beschriebenen Befunde in hypertrophierten und insuffizienten Herzen sind verantwortlich für eine abgeschwächte Reaktion auf  $\beta$ -adrenerge Stimuli<sup>87</sup>.

Auch unter ischämischen Bedingungen wurden Veränderungen des  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktionswegs beschrieben. In isolierten Ratten- und Meerschweinherzen konnten nach 15-35 minütiger Koronararterien-Okklusion eine erhöhte myokardiale  $\beta$ -Rezeptordichte mit einer intakten Kopplung an die Adenylatzyklase und erhöhte cAMP-Spiegel nachgewiesen werden. Diese Veränderungen können zur Entstehung von ventrikulären Arrhythmien und ischämiebedingten Schädigung der Kardiomyozyten während Ischämie und Reperfusion beitragen<sup>88</sup>.

Um die postischämische Reaktion der hypertrophierten Ren2- und SERen-Herzen und der Kontrollgruppe auf  $\beta$ -adrenerge Stimuli vergleichend zu untersuchen, erfolgte nach den Ischämie-Reperfusionsversuchen die Perfusion mit dem  $\beta$ -Rezeptoragonisten Isoproterenol.

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe Vetter konnte eine sigmoidale Abhängigkeit zwischen Isoproterenolkonzentration und den LVdP-Werten gezeigt werden. Mit der hier verwendeten

Isoproterenol-Konzentration von  $2 \cdot 10^{-8} \text{M}$  näherten sich die LVdP-Werte dem Maximaleffekt unter Isoproterenol an.

Die  $\beta$ -adrenerge Reaktion auf den LVEDP zeigte eine geringe, aber signifikante, Senkung der Werte in allen Versuchsgruppen auf Werte um 85 % für Ren2 und SERen und 80 % für NTG. Daraus wird deutlich, dass die vor Isoproterenolperfusion bestehenden stark erhöhten LVEDP-Werte, insbesondere der NTG-Herzen, auch unter Aktivierung der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion nur gering gesenkt werden konnten. Da unter  $\beta$ -adrenerge Aktivierung von einer beschleunigten Senkung der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und damit einer optimierten Relaxation auszugehen ist, könnten diese nur geringe Reaktionen des LVEDP auf eine irreversible Schädigung des kontraktiven Apparates hindeuten.

Unter Isoproterenolwirkung zeigte sich ein signifikant geringerer Anstieg der LVdP-Werte in Ren2 und SERen, sowohl im peak als auch im steady state, im Vergleich zur NTG-Gruppe. Dies deutet auf eine abgeschwächte  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit der beiden hypertensiven Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe hin. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den oben beschriebenen Veränderungen der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion. Anders als in der NTG-Gruppe, ergab sich für Ren2 und SERen im steady state eine signifikante Abnahme des LVdP im Vergleich zu den Werten vor Isoproterenol-Perfusion. Dieser Befund scheint im Zusammenhang mit den Veränderungen der Herzfrequenzen unter Isoproterenol-Wirkung zu stehen. Hier zeigte sich im steady state überraschenderweise eine signifikant größere relative Zunahme der Herzfrequenzen in beiden transgenen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die relative Abnahme des LVdP in der Ren2- und SERen-Gruppe im steady state aus einer stärker negativen Kraft-Frequenz-Beziehung im Vergleich zur NTG-Gruppe resultiert. Die Gründe für die stärkere Frequenzzunahme der Ren2- und SERen-Herzen im steady state kann, insbesondere unter der Annahme einer abgeschwächten  $\beta$ -adrenergen Ansprechbarkeit hypertrophierter Herzen, hier nicht geklärt werden.

Passend zu den LVdP-Werten wurden auch für die maximalen Druckanstiegs- und Druckabfallsgeschwindigkeiten im peak und im steady state signifikant größere Zunahmen in der NTG-Gruppe im Vergleich zu Ren2- und SERen unter Isoproterenol-Wirkung ermittelt.

Für den Zeitparameter PHT ergab sich bei vergleichbaren Absolutwerten im steady state eine signifikant größere, relative Abnahme in den beiden hypertensiven Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Befund muss im Zusammenhang mit der stärkeren Zunahme der Herzfrequenzen der Ren2- und SERen-Gruppe während der Isoproterenol-Perfusion betrachtet werden.

Unter der Annahme zusätzlicher funktioneller SERCA2a-Proteine im SR hätte eine  $\beta$ -adrenerge Aktivierung mit folgender gesteigerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und höherer  $\text{Ca}^{2+}$ -Belastung des SR einen

positiven Einfluss auf die kontraktile Funktion der SERCA2a-transgenen Herzen. Dieser Effekt konnte von Vetter et al. an gesunden SERCA2a-transgenen Sprague-Dawley-Ratten bei vergleichbaren Isoproterenolkonzentrationen nachgewiesen werden <sup>47</sup>. In den hypertrophierten SERCA2a-transgenen Herzen wurde im Rahmen dieser Arbeit kein Einfluss der SERCA2a-Überexpression auf die kontraktile Funktion unter der Wirkung des  $\beta$ -Rezeptoragonisten Isoproterenol beobachtet.



## 5. Zusammenfassung

Störungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, insbesondere der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport über die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) in das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport über das Sarkolemm durch den  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) sind maßgeblich für die Entwicklung einer kontraktile Dysfunktion in hypertrophierten und insuffizienten Herzen verantwortlich. Sowohl in zahlreichen tierexperimentellen Untersuchungen als auch in humanen insuffizienten Herzen konnten eine verminderte SERCA2a-Expression sowie eine gesteigerte NCX-Aktivität bzw. -Funktion nachgewiesen werden. Darüber hinaus spielen Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von myokardialen Ischämie-Reperfusionsschäden.

Durch die Untersuchungen an einem neu generierten doppelt transgenen hypertensiven SERCA2a/ Ren2-Rattenmodell (SERen) wurde in dieser Arbeit der potentiell mögliche Einfluss einer zusätzlichen Expression eines SERCA2a-Transgens auf die Herzfunktion von (mREN2)27-transgenen Ratten (REN2) mit monogenetisch-bedingter Hypertonie untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die im Vergleich zu normotensiven, nicht transgenen Kontrolltieren (NTG) gefundene ca. 30%-ige Hypertrophie, die ca. 2-fach erhöhte NCX-Aktivität sowie die um 48% erhöhten Gewebespiegel des Fibrosemarkers Hydroxyprolin des linken Ventrikels von heterozygoten Ren2 durch die zusätzliche Expression des SERCA2a-Transgens in den doppelt transgenen SERen-Tieren nicht verändert wurden.

Die unter normoxischer Perfusion gemessenen maximal entwickelten linksventrikulären Drucke (LVdP) sowie die maximalen Druckerhöhungs- ( $+\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ ) und Abfallgeschwindigkeiten ( $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ ) belegen für die beiden transgenen Versuchsgruppen Ren2 und SERen das Vorliegen einer kompensierten linksventrikulären Dysfunktion. Dabei dominieren diastolische Funktionsstörungen. Eine entsprechende signifikante Erhöhung des diastolischen Zeitparameters Tau ( $\tau$ ) in Ren2 und SERen gegenüber NTG zeigte eine stärkere Beeinträchtigung der späten Relaxation. Eine Beeinflussung der kardialen Funktion durch die zusätzliche SERCA2a-Expression in SERen konnte nicht nachgewiesen werden.

Ren2 und SERen zeigten im Vergleich zu NTG signifikant niedrigere Herzfrequenzen. Dies kann im Sinne der bei Ratten bestehenden negativen Kraft-Frequenz-Beziehung als Kompensationsmechanismus der hypertrophierten Herzen in den transgenen Versuchsgruppen gewertet werden. Die Messung der NCX-Aktivität an Grobmembranpräparaten ergab signifikant höhere Werte für Ren2 und SERen gegenüber NTG ohne Hinweise einer Beeinflussung der NCX-Aktivität unter SERCA2a-Überexpression. Nach den ersten 10 Minuten Ischämiezeit zeigte sich ein unerwartet

starker Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) in der Kontrollgruppe auf Werte von 70 mmHg gegenüber Werten um 35 mmHg in den beiden transgenen Versuchsgruppen. Am Ende der Reperfusion wurden im Vergleich zu den jeweiligen präischämischen Ausgangswerten um 8-fach erhöhte LVEDP-Werte der NTG Gruppe bei nur 4-facher Erhöhung der Werte in der Ren2- und SERen-Gruppe gemessen. Ein möglicher Erklärungsansatz stellen veränderte Stoffwechselprozesse mit erhöhtem Glycogenumsatz und gesteigerter anaerober Glykolyseaktivität mit resultierender Verminderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität des Troponin C in hypertrophierten Kardiomyozyten dar. Während des gesamten Reperfusionszeitraums zeigten sowohl Ren2 als auch SERCA2a signifikant höhere auf das linksventrikuläre Feuchtgewicht (LVW) normierte LVdP Werte. Auch für  $+dP/dt_{\text{max}}$  und  $-dP/dt_{\text{max}}$  wurden für beide transgenen Versuchsgruppen signifikant höhere Werte gemessen. Diese Ergebnisse sind im Zusammenhang mit dem deutlich stärkeren LVEDP-Anstieg in der nicht transgenen Kontrollgruppe zu sehen, sprechen aber insgesamt für eine größere Toleranz gegenüber Ischämie und Reperfusionsepisoden in beiden transgenen Versuchsgruppen. Auch in der Reperfusionsphase konnten anhand der auf LVdP normierten  $+dP/dt_{\text{max}}$ - und  $-dP/dt_{\text{max}}$ -Werte Hinweise für das Überwiegen einer diastolischen, kompensierten Dysfunktion in der Ren2- und SERen-Gruppe gefunden werden. Ein positiver Einfluss der SERCA2a-Überexpression mit verminderter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung konnte nicht gesehen werden. Unter Perfusion mit Isoproterenol nach erfolgten Ischämie-Reperfusionsversuchen konnten anhand der LVdP- und  $\pm dP/dt_{\text{max}}$ -Werte Hinweise für eine herabgesetzte  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit der Ren2- und SERen-Gruppe gegenüber NTG gefunden werden. Auch unter  $\beta$ -Rezeptor-Stimulation ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der kontraktiven Parameter zwischen Ren2 und SERen.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Statistisches Bundesamt. Krankenhausstatistik - Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern. *Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn* 2013 December 17; Available at: URL: [https://www.gbe-bund.de/oowa921-in-stall/servlet/oowa/aw92/WS0100/\\_XWD\\_PROC?\\_XWD\\_206/2/XWD\\_CUBE.DRILL/\\_XWD\\_234/D.000/3722](https://www.gbe-bund.de/oowa921-in-stall/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_PROC?_XWD_206/2/XWD_CUBE.DRILL/_XWD_234/D.000/3722). Accessed December 08, 2014.
- (2) Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K, Vahanian A, Camm J, De CR, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J* 2008;29(19):2388-2442.
- (3) Keating GM, Jarvis B. Carvedilol: a review of its use in chronic heart failure. *Drugs* 2003;63(16):1697-1741.
- (4) Krum H. Beta-blockers in heart failure. The 'new wave' of clinical trials. *Drugs* 1999;58(2):203-210.
- (5) Goldberg RJ, Ciampa J, Lessard D, Meyer TE, Spencer FA. Long-term survival after heart failure: a contemporary population-based perspective. *Arch Intern Med* 2007;167(5):490-496.
- (6) Krum H, Abraham WT. Heart failure. *Lancet* 2009;373(9667):941-955.
- (7) Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation* 2000;102(20 Suppl 4):IV14-IV23.
- (8) Bers DM. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:380-387.
- (9) Frank KF, Bolck B, Erdmann E, Schwinger RH. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc Res* 2003;57(1):20-27.
- (10) Zolk O, Flesch M, Nickenig G, Schnabel P, Bohm M. Alteration of intracellular Ca<sup>2+</sup>-handling and receptor regulation in hypertensive cardiac hypertrophy: insights from Ren2-transgenic rats. *Cardiovasc Res* 1998;39(1):242-256.
- (11) Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Bohm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H. Gene expression of the cardiac Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 1994;75(3):443-453.
- (12) Takeo S, Nasa Y, Tanonaka K, Yamaguchi F, Yabe K, Hayashi H, Dhalla NS. Role of cardiac renin-angiotensin system in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in the ischemic-reperfused heart. *Mol Cell Biochem* 2000;212(1-2):227-235.

- (13) Osada M, Neticadan T, Tamura K, Dhalla NS. Modification of ischemia-reperfusion-induced changes in cardiac sarcoplasmic reticulum by preconditioning. *Am J Physiol* 1998;274(6 Pt 2):H2025-H2034.
- (14) Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2003;75(2):S644-S648.
- (15) Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 2008;70:23-49.
- (16) Wehrens XH, Lehnart SE, Marks AR. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol* 2005;67:69-98.
- (17) Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415(6868):198-205.
- (18) Endoh M. Cardiac Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> sensitizers. *Circ J* 2008;72(12):1915-1925.
- (19) Pitt GS, Zuhlke RD, Hudmon A, Schulman H, Reuter H, Tsien RW. Molecular basis of calmodulin tethering and Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 2001;276(33):30794-30802.
- (20) Bassani JW, Yuan W, Bers DM. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1995;268(5 Pt 1):C1313-C1319.
- (21) Inesi G, Prasad AM, Pilankatta R. The Ca<sup>2+</sup> ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum: Physiological role and relevance to diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369(1):182-187.
- (22) Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Pieske B, Meyer M, Drexler H, Just H. Calcium cycling proteins and force-frequency relationship in heart failure. *Basic Res Cardiol* 1996;91 Suppl 2:17-22.
- (23) Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(8):951-969.
- (24) Wehrens XH, Lehnart SE, Marks AR. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol* 2005;67:69-98.
- (25) Schillinger W, Janssen PM, Emami S, Henderson SA, Ross RS, Teucher N, Zeitz O, Philipson KD, Prestle J, Hasenfuss G. Impaired contractile performance of cultured rabbit ventricular myocytes after adenoviral gene transfer of Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>(2+)</sup> exchanger. *Circ Res* 2000;87(7):581-587.
- (26) Pogwizd SM, Bers DM. Calcium cycling in heart failure: the arrhythmia connection. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002;13(1):88-91.
- (27) DiPaola K, Mattiello JA, Margulies KB, Jeevanandam V, Houser SR. The sarcoplasmic reticulum and the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger both contribute to the Ca<sup>2+</sup> transient of failing human ventricular myocytes. *Circ Res* 1999;84(4):435-444.
- (28) Weber CR, Piacentino V, III, Houser SR, Bers DM. Dynamic regulation of sodium/calcium exchange function in human heart failure. *Circulation* 2003;108(18):2224-2229.

- (29) Flesch M, Schiffer F, Zolk O, Pinto Y, Rosenkranz S, Hirth-Dietrich C, Arnold G, Paul M, Bohm M. Contractile systolic and diastolic dysfunction in renin-induced hypertensive cardiomyopathy. *Hypertension* 1997;30(3 Pt 1):383-391.
- (30) Ganten D, Lindpaintner K, Ganten U, Peters J, Zimmermann F, Bader M, Mullins J. Transgenic rats: new animal models in hypertension research. Invited lecture. *Hypertension* 1991;17(6 Pt 2):843-855.
- (31) 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;47(1):57-67.
- (32) Seccia TM, Belloni AS, Kreutz R, Paul M, Nussdorfer GG, Pessina AC, Rossi GP. Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(4):666-673.
- (33) Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol* 1999;83(12A):53H-57H.
- (34) Rothermund L, Pinto YM, Vetter R, Herfort N, Kossmehl P, Neumayer HH, Paul M, Kreutz R. Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene. *J Hypertens* 2001;19(8):1465-1472.
- (35) Piper HM, Kasseckert SA, Schluter KD, Abdallah Y. [Pathophysiology of myocardial reperfusion injury]. *Dtsch Med Wochenschr* 2008;133(12):586-590.
- (36) Dhalla NS, Panagia V, Singal PK, Makino N, Dixon IM, Eyoifson DA. Alterations in heart membrane calcium transport during the development of ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1988;20 Suppl 2:3-13.
- (37) Rapundalo ST, Briggs FN, Feher JJ. Effects of ischemia on the isolation and function of canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol* 1986;18(8):837-851.
- (38) Yoshida Y, Shiga T, Imai S. Degradation of sarcoplasmic reticulum calcium-pumping ATPase in ischemic-reperfused myocardium: role of calcium-activated neutral protease. *Basic Res Cardiol* 1990;85(5):495-507.
- (39) Takeo S, Nasa Y, Tanonaka K, Yamaguchi F, Yabe K, Hayashi H, Dhalla NS. Role of cardiac renin-angiotensin system in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in the ischemic-reperfused heart. *Mol Cell Biochem* 2000;212(1-2):227-235.
- (40) Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 1994;75(3):401-409.
- (41) Wolska BM, Stojanovic MO, Luo W, Kranias EG, Solaro RJ. Effect of ablation of phospholamban on dynamics of cardiac myocyte contraction and intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Am J Physiol* 1996;271(1 Pt 1):C391-C397.
- (42) He H, Meyer M, Martin JL, McDonough PM, Ho P, Lou X, Lew WY, Hilal-Dandan R, Dillmann WH. Effects of mutant and antisense RNA of phospholamban on SR Ca(2+)-ATPase activity and cardiac myocyte contractility. *Circulation* 1999;100(9):974-980.

- (43) He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R, Choi DJ, Rockman HA, McDonough PM, Bluhm WF, Meyer M, Sayen MR, Swanson E, Dillmann WH. Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest* 1997;100(2):380-389.
- (44) Meyer M, Dillmann WH. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase overexpression by adenovirus mediated gene transfer and in transgenic mice. *Cardiovasc Res* 1998;37(2):360-366.
- (45) Muller OJ, Lange M, Rattunde H, Lorenzen HP, Muller M, Frey N, Bittner C, Simonides W, Katus HA, Franz WM. Transgenic rat hearts overexpressing SERCA2a show improved contractility under baseline conditions and pressure overload. *Cardiovasc Res* 2003;59(2):380-389.
- (46) Maier LS, Wahl-Schott C, Horn W, Weichert S, Pagel C, Wagner S, Dybkova N, Muller OJ, Nabauer M, Franz WM, Pieske B. Increased SR Ca<sup>2+</sup> cycling contributes to improved contractile performance in SERCA2a-overexpressing transgenic rats. *Cardiovasc Res* 2005;67(4):636-646.
- (47) Vetter R, Rehfeld U, Reissfelder C, Weiss W, Wagner KD, Gunther J, Hammes A, Tschope C, Dillmann W, Paul M. Transgenic overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase improves reticular Ca<sup>2+</sup> handling in normal and diabetic rat hearts. *FASEB J* 2002;16(12):1657-1659.
- (48) Suarez J, Gloss B, Belke DD, Hu Y, Scott B, Dieterle T, Kim YK, Valencik ML, McDonald JA, Dillmann WH. Doxycycline inducible expression of SERCA2a improves calcium handling and reverts cardiac dysfunction in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(5):H2164-H2172.
- (49) del MF, Williams E, Lebeche D, Schmidt U, Rosenzweig A, Gwathmey JK, Lewandowski ED, Hajjar RJ. Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in a rat model of heart failure. *Circulation* 2001;104(12):1424-1429.
- (50) del M, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ. Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 1999;100(23):2308-2311.
- (51) Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, Lebeche D, Shi Y, Jin H, Hadri L, Yoneyama R, Hoshino K, Takewa Y, Sakata S, Peluso R, Zsebo K, Gwathmey JK, Tardif JC, Tanguay JF, Hajjar RJ. Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(11):1112-1119.
- (52) Kannel WB, Castelli WP, McNamara PM, McKee PA, Feinleib M. Role of blood pressure in the development of congestive heart failure. The Framingham study. *N Engl J Med* 1972;287(16):781-787.
- (53) Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990;344(6266):541-544.
- (54) Engler S, Paul M, Pinto YM. The TGR(mRen2)27 transgenic rat model of hypertension. *Regul Pept* 1998;77(1-3):3-8.

- (55) Bachmann S, Peters J, Engler E, Ganten D, Mullins J. Transgenic rats carrying the mouse renin gene--morphological characterization of a low-renin hypertension model. *Kidney Int* 1992;41(1):24-36.
- (56) Peters J, Schluter T, Riegel T, Peters BS, Beineke A, Maschke U, Hosten N, Mullins JJ, Rettig R. Lack of cardiac fibrosis in a new model of high prorenin hyperaldosteronism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297(5):H1845-H1852.
- (57) Pinto YM, Buikema H, van Gilst WH, Scholtens E, van Geel PP, de Graeff PA, Wagner J, Paul M. Cardiovascular end-organ damage in Ren-2 transgenic rats compared to spontaneously hypertensive rats. *J Mol Med* 1997;75(5):371-377.
- (58) Hilgers KF, Peters J, Veelken R, Sommer M, Rupprecht G, Ganten D, Luft FC, Mann JF. Increased vascular angiotensin formation in female rats harboring the mouse Ren-2 gene. *Hypertension* 1992;19(6 Pt 2):687-691.
- (59) Reit E. Actions of angiotensin on the adrenal medulla and autonomic ganglia. *Fed Proc* 1972;31(4):1338-1343.
- (60) Dostal DE, Baker KM. Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. Mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertens* 1992;5(5 Pt 1):276-280.
- (61) Bohm M, Lippoldt A, Wienen W, Ganten D, Bader M. Reduction of cardiac hypertrophy in TGR(mREN2)27 by angiotensin II receptor blockade. *Mol Cell Biochem* 1996;163-164:217-221.
- (62) Bohm M, Lee M, Kreutz R, Kim S, Schinke M, Djavidani B, Wagner J, Kaling M, Wienen W, Bader M, . Angiotensin II receptor blockade in TGR(mREN2)27: effects of renin-angiotensin-system gene expression and cardiovascular functions. *J Hypertens* 1995;13(8):891-899.
- (63) He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R, Choi DJ, Rockman HA, McDonough PM, Bluhm WF, Meyer M, Sayen MR, Swanson E, Dillmann WH. Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest* 1997;100(2):380-389.
- (64) Baker DL, Hashimoto K, Grupp IL, Ji Y, Reed T, Loukianov E, Grupp G, Bhagwhat A, Hoit B, Walsh R, Marban E, Periasamy M. Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts. *Circ Res* 1998;83(12):1205-1214.
- (65) Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1998;39(1):60-76.
- (66) Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, Overbeek P, Richardson JA, Grant SR, Olson EN. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest* 2000;105(10):1395-1406.
- (67) Frey N, McKinsey TA, Olson EN. Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* 2000;6(11):1221-1227.
- (68) Zhang T, Miyamoto S, Brown JH. Cardiomyocyte calcium and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: friends or foes? *Recent Prog Horm Res* 2004;59:141-168.

- (69) Randall MD, Gardiner SM, Bennett T. Enhanced cardiac preconditioning in the isolated heart of the transgenic ((mREN-2) 27) hypertensive rat. *Cardiovasc Res* 1997;33(2):400-409.
- (70) Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca<sup>2+</sup> handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 1999;85(1):38-46.
- (71) Flesch M, Schiffer F, Zolk O, Pinto Y, Stasch JP, Knorr A, Ettlbruck S, Böhm M. 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;15(9):1001-1009.
- (72) Vandecaetsbeek I, Raeymaekers L, Wuytack F, Vangheluwe P. Factors controlling the activity of the SERCA2a pump in the normal and failing heart. *Biofactors* 2009;35(6):484-499.
- (73) Brittsan AG, Carr AN, Schmidt AG, Kranias EG. Maximal inhibition of SERCA2 Ca(2+) affinity by phospholamban in transgenic hearts overexpressing a non-phosphorylatable form of phospholamban. *J Biol Chem* 2000;275(16):12129-12135.
- (74) Asahi M, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH. Sarcolipin inhibits polymerization of phospholamban to induce superinhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases (SERCAs). *J Biol Chem* 2002;277(30):26725-26728.
- (75) Vetter R, Studer R, Reinecke H, Kolar F, Ostadalova I, Drexler H. Reciprocal changes in the postnatal expression of the sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca(2+)-exchanger and SERCA2 in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27(8):1689-1701.
- (76) Murphy E, Cross HR, Steenbergen C. Is Na/Ca exchange during ischemia and reperfusion beneficial or detrimental? *Ann N Y Acad Sci* 2002;976:421-430.
- (77) Wang QD, Swardh A, Sjoquist PO. Relationship between ischaemic time and ischaemia/reperfusion injury in isolated Langendorff-perfused mouse hearts. *Acta Physiol Scand* 2001;171(2):123-128.
- (78) Jennings RB, Murry C, Reimer KA. Myocardial effects of brief periods of ischemia followed by reperfusion. *Adv Cardiol* 1990;37:7-31.
- (79) Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW, Allard MF. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev* 2002;7(2):161-173.
- (80) van d, V, van BM, Glatz JF. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc Res* 2000;45(2):279-293.
- (81) Hayashi H. Pathogenesis and the role of Ca<sup>2+</sup> overload during myocardial ischemia/reperfusion. *Nagoya J Med Sci* 2000;63(3-4):91-98.
- (82) Schonekess BO, Allard MF, Lopaschuk GD. Recovery of glycolysis and oxidative metabolism during postischemic reperfusion of hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol* 1996;271(2 Pt 2):H798-H805.
- (83) Parsons B, Szczesna D, Zhao J, Van SG, Kerrick WG, Putkey JA, Potter JD. The effect of pH on the Ca<sup>2+</sup> affinity of the Ca<sup>2+</sup> regulatory sites of skeletal and cardiac troponin C in skinned muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 1997;18(5):599-609.



- (84) Miklos Z, Ivanics T, Roemen TH, van d, V, Dezsi L, Szekeres M, Kemecsei P, Toth A, Kollai M, Ligeti L. Time related changes in calcium handling in the isolated ischemic and reperfused rat heart. *Mol Cell Biochem* 2003;250(1-2):115-124.
- (85) Daly PA, Sole MJ. Myocardial catecholamines and the pathophysiology of heart failure. *Circulation* 1990;82(2 Suppl):I35-I43.
- (86) Bohm M. Alterations of beta-adrenoceptor-G-protein-regulated adenylyl cyclase in heart failure. *Mol Cell Biochem* 1995;147(1-2):147-160.
- (87) Bohm M, Moll M, Schmid B, Paul M, Ganten D, Castellano M, Erdmann E. Beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in cardiac hypertrophy of renin transgenic rats. *Hypertension* 1994;24(6):653-662.
- (88) Thandroyen FT, Muntz KH, Buja LM, Willerson JT. Alterations in beta-adrenergic receptors, adenylyl cyclase, and cyclic AMP concentrations during acute myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1990;82(3 Suppl):II30-II37.
- (89) Erkasap N. SERCA in genesis of arrhythmias: what we already know and what is new? *Anadolu Kardiyol Derg* 2007;7 Suppl 1:43-46.

## 7. Anhang

### 7.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Michael Kluge, versichere Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Vergleich der kontraktilen Funktion isolierter perfundierter Herzen mRen2 transgener und mRen2/SERCA2 doppelt transgener Ratten bei Normoxie, globaler Ischämie und Reperfusion“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE –[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

09.12.2014

Michael Kluge

## 7.2 Lebenslauf

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



## 7.3 Veröffentlichung

### 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

## 7.4 Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während der Arbeit an dieser Dissertationsschrift begleitet und unterstützt haben.

Zunächst gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Roland Vetter für die Bereitstellung des Dissertationsthemas sowie die kompetente und geduldige Betreuung. Die zahlreichen wertvollen Hinweise sowie die konstruktive Kritik waren mir stets eine große Hilfe bei der Erstellung meiner Dissertation.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Wolfgang Weiß bedanken, der mich bei der Einarbeitung in die Methodik des retrograd perfundierten Herzen maßgeblich unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt der technischen Assistentin Frau Ursula Jakob-Müller für die angenehme Zusammenarbeit und die kompetente Vermittlung verschiedener Techniken im Labor.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei meinem Mitdoktoranden Herrn Dr. med. Sebastian Trinks für die jederzeit inspirierende und heitere Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben: meiner Frau Cécile für die anhaltende Unterstützung und unermüdliche Ermutigung und meinem Sohn Hans Jonathan für die angenehme Zerstreuung während der Arbeit an dieser Dissertation.