

Einfluss von Renin
auf die linksventrikuläre Funktion
und das linksventrikuläre Remodeling
isolierter Rattenherzen und Kardiomyozyten

Andreas Kögel



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Einfluss von Renin
auf die linksventrikuläre Funktion
und das linksventrikuläre Remodeling
isolierter Rattenherzen und Kardiomyozyten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs der Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Andreas Kögel

aus Löbau

Gießen 2013

Aus dem Physiologischen Institut
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Gutachter: PD Dr. J. Wiecha

Tag der Disputation: 22.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie und Definition der chronischen Herzinsuffizienz.....	1
1.2 Ätiologie und Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz.....	2
1.3 Inter- und Intrazelluläre Kompensationsmechanismen	3
1.3.1 Das β -adrenerge System	3
1.3.2 Die Calciumhomöostase	4
1.3.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	5
1.3.4 Das kardiale „Remodeling“	6
1.4 Die Therapie der chronischen Herzinsuffizienz durch ACE-Inhibition	6
1.5 Prorenin und Renin	7
1.6 Der Mannose-6-Phosphat-/Insulin-like-growth-factor-II-Rezeptor.....	8
1.7 Das Herzinsuffizienzmodell dieser Studie	9
1.8 Die Zielsetzung dieser Studie	10
2. Material	11
2.1 Chemikalien und Substanzen	11
2.2 Geräte und Laborbedarf.....	13
2.2.1 Allgemein verwendete Geräte.....	13
2.2.2 Geräte zur Blutdruckmessung	13
2.2.3 Geräte der Langendorffanlage, Zellpräparation und Zellkultur	13
2.2.4 Geräte zur RNA-Extraktion und PCR.....	14
2.2.5 Geräte für Western-Blot.....	14
2.2.6 Verbrauchsmaterialien.....	15
2.2.7 EDV.....	15
2.2 Primer.....	15
2.3 Antikörper.....	16
3. Methoden	17
3.1 Versuchsbedingungen und Studiendesign	17

3.2 Genotypisierung	17
3.2.1 DNA-Präparation	17
3.2.2 Amplifikation und gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente	18
3.3 Blutdruckmessung	20
3.4 Präparation der Rattenorgane	21
3.5 Herzfunktionsmessung ex vivo	22
3.5.1 Die Langendorff-Perfusionsanlage.....	22
3.5.2 Rattenherzperfusion.....	22
3.5.2 Parametererfassung	23
3.5.3 Versuchsprotokoll	23
3.6 Kardiomyozytenisolation und Zellkultur	24
3.6.1 Kardiomyozytenspender	24
3.6.2 Aufbau und Vorbereitung	24
3.6.3 Isolationsvorgang.....	25
3.6.4 Kardiomyozytenkultivierung	26
3.6.5 Inkubationsversuche	26
3.6.6 Probengewinnung.....	27
3.7 RT-PCR	27
3.7.1 RNA-Extraktion	27
3.7.2 RNA-Konzentrationsbestimmung.....	28
3.7.3 Reverse Transskription	28
3.7.4 DNA-Amplifikation.....	29
3.8 Gelelektrophoretische Methoden	31
3.8.1 Probenaufbereitung	31
3.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
3.8.3 Western-Blot.....	33
3.8.4 Immunochemischer Proteinnachweis.....	34
3.9 Statistik	35
4. Ergebnisse	36
4.1 Körper- und Organgewichte	36
4.2 Hämodynamik und linksventrikuläre Funktion	37
4.2.1 Entwicklung einer Angiotensin-II induzierten Hypertonie bei TGR.....	37
4.2.2 Linksventrikulärer Druck und Herzfrequenz bei TGR	38
4.2.3 Linksventrikuläre Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit bei TGR.....	39
4.3 Linksventrikuläre druckinduzierte Hypertrophie bei TGR	40

4.4	Linksventrikuläre β-adrenerge Ansprechbarkeit bei TGR	41
4.4.1	Linksventrikuläre Funktion bei TGR nach Isoprenalingabe.....	41
4.4.2	Genexpression des β_1 - und β_2 - Adrenozeptors bei TGR	43
4.4.3	Ankopplung des β -adrenergen Systems an intrazelluläre Prozesse bei TGR..	44
4.5	Die Calciumhomöostase bei TGR	45
4.5.1	SERCA2a	45
4.5.2	PLB.....	49
4.5.3	NCX.....	51
4.6	Linksventrikuläre Matrix bei TGR	52
5.	Diskussion.....	55
5.1	Hauptbefunde	55
5.2	(Pro-)Renin verbessert die linksventrikuläre Funktion	55
5.3	(Pro-)Renin beeinflusst das kardiale β -adrenerge System	57
5.4	(Pro-)Renin beeinflusst die Synthese der extrazellulären Matrix	59
6.	Zusammenfassung.....	63
7.	Summary.....	65
8.	Abkürzungsverzeichnis	67
9.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	71
9.1	Abbildungsverzeichnis	71
9.2	Tabellenverzeichnis	72
10.	Literaturverzeichnis	73
11.	Publikationsverzeichnis.....	83
12.	Ehrenwörtliche Erklärung	84
13.	Danksagung.....	85

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und Definition der chronischen Herzinsuffizienz

Herz-Kreislauf-Erkrankungen bilden derzeit die Haupttodesursache in der Bundesrepublik Deutschland. Bezogen auf alle verstorbenen Bundesbürger des Jahres 2011 verstarben 40,2 % aufgrund einer Herz-Kreislauf-Erkrankung bzw. 5,3% in Folge einer Herzinsuffizienz (nach ICD-10-I50). Damit befindet sich die Herzinsuffizienz in Deutschland an dritter Stelle der Todesursachenstatistik und stellt folglich einen der häufigsten Hospitalisierungsgründe dar [2, 65]. Nicht zuletzt gilt sie daher auch als wesentlicher Kostenfaktor im deutschen Gesundheitswesen [65]. Die Prävalenz der Erkrankung ist laut Rotterdam-Studie stark vom Alter abhängig [61]. Sie wird in der Gruppe der 60-Jährigen mit ca. 1% und bei den „über 80-Jährigen“ mit bis zu 10% angegeben. Zudem scheint das männliche Geschlecht mit einem Verhältnis von 1,5:1 (m:w) häufiger an einer Herzinsuffizienz zu leiden [36].

Definiert wurde die Herzinsuffizienz im Jahre 1995 durch die Weltgesundheitsorganisation WHO als „Unfähigkeit des Herzens den Organismus mit ausreichend Blut und damit mit genügend Sauerstoff zu versorgen, um den Stoffwechsel unter Ruhe- sowie unter Belastungsbedingungen zu gewährleisten.“ [34, 36]. Dieser eher „pathophysiologischen Definition“ wurden im Verlauf „klinische“ Aspekte hinzugefügt. Hierzu gehört das Auftreten „typischer Symptome“ wie „Dyspnoe, Müdigkeit und/oder Flüssigkeitsretention, die auf dem Boden einer kardialen Funktionsstörung“ bestehen [14, 36]. Der Grad der Ausprägung einer Herzinsuffizienz wird seit 1994 durch die New York Heart Association (NYHA) mit 4 funktionellen Schweregraden (NYHA1-4) angegeben und seit 2001 durch die ABCD-Stadien der American Heart Association (AHA) ergänzt (s. Tab.1) [9, 38]. Die Stadieneinteilung der AHA richtet sich dabei nicht nur nach den klinischen Symptomen, sondern berücksichtigt auch die strukturellen Herzveränderungen bei einer chronischen Herzinsuffizienz. Je nach betroffener Herzregion kann des Weiteren von einer systolischen und/oder diastolischen Rechtsherz-, Linksherz- bzw. einer globalen Herzinsuffizienz gesprochen werden [14].

Tab. 1

NYHA-Stadium		AAH-Stadium	
I	Herzerkrankung ohne körperliche Einschränkung/Symptome.	A	Hohes Herzinsuffizienzrisiko; viele Risikofaktoren. Keine strukturelle Herzerkrankung. Keine Symptome.
		B	Strukturelle Herzerkrankung, jedoch keine Herzinsuffizienzsymptome.
II	Leichte körperliche Einschränkung bzw. Symptome bei erhöhter körperlicher Belastung. Keine Ruhesymptome.	C	Strukturelle Herzerkrankung mit Herzinsuffizienzsymptomen bei Belastung. Keine Ruhesymptomatik.
III	Starke körperliche Einschränkung bzw. Symptome bei alltäglicher Belastung. Keine Ruhesymptomatik.		
IV	Ruhesymptomatik. Bettlägerigkeit.	D	Schwere Herzinsuffizienzsymptome in Ruhe.

Tabelle 1:
Einteilung der chronischen Herzinsuffizienz.

Es werden hier die Einteilungen der NYHA und AHA gegenübergestellt und in Anlehnung an Hoppe et al. 2005 [36] und Hunt et al. 2005 [38] tabellarisch aufgelistet.

1.2 Ätiologie und Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz

Zu den Hauptursachen einer chronischen Herzinsuffizienz zählen im Besonderen die koronare Herzkrankheit und die arterielle Hypertonie (ca. 70%) [9, 25]. Hierbei lassen sich Rauchen, chronischer Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus und eine positive Familienanamnese als wesentliche Risikofaktoren ableiten. Darüber hinaus sind Herzklappenventien (10%), Kardiomyopathien (10%), Brady- bzw. Tachyarrhythmien (z.B. bei Vorhofflimmern, Anämie, Thyreotoxikose), Perikarderkrankungen (z.B. Perikarderguss; konstriktive Perikarditis) aber auch Toxine (z.B. Alkohol, Kokain, oder „potentiell kardiotoxische Zytostatika“ wie „Anthrazykline (Doxorubicin, Epirubicin, Daunorubicin“) für die Entstehung einer Herzinsuffizienz ätiologisch bedeutsam [25,1, 14].

Pathophysiologisch tritt die chronische Herzinsuffizienz entweder durch eine verminderte diastolische Relaxationskompetenz der Ventrikel oder durch eine reduzierte systolische Auswurfleistung in Erscheinung [9]. Die in „60% der Fälle“ vorliegende „systolische Ventrikelstörung“ wird häufig durch den Verlust an

Myokardkontraktilität (z.B. bei Zustand nach Myokardinfarkt) oder durch eine erhöhte Wandspannung des Ventrikels bei steigender Vor- oder Nachlast (z.B. bei arterieller Hypertonie, hypertropher obstruktiver Kardiomyopathie (HOCM), Klappenvitien etc.) hervorgerufen [9, 34, 36]. Um eine dauerhaft erhöhte Wandspannung zu normalisieren, hypertrophiert das Myokard, wodurch jedoch die Progredienz einer Herzinsuffizienz durch Überschreiten des kritischen Herzgewichts (ca. 500 g) weiter beschleunigt wird [9, 34]. Eine „diastolische Dysfunktion“ tritt bei ca. einem Drittel aller Herzinsuffizienzpatienten auf und lässt sich auf eine verminderte Dehnbarkeit und Erschlaffung des Ventrikels zurückführen (z.B. Myokardremodeling bei koronarer Herzkrankheit (KHK) bzw. Myokardhypertrophie) [9, 34]. Letztlich ist in beiden Fällen das Herz unfähig, das für den Organismus benötigte Herzzeitvolumen aufzubringen.

1.3 Inter- und Intrazelluläre Kompensationsmechanismen

1.3.1 Das β -adrenerge System

Ein unter Herzinsuffizienz leidender Organismus versucht die nachlassende Herzfunktion mit verschiedenen Mechanismen zu kompensieren. Die Reduktion des Herzzeitvolumens (HZV) führt in erster Linie zum Anstieg des Sympathikotonus mit nachfolgender Freisetzung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin [70]. Diese steigern in der „akuten Phase“ über kardiale β_1 -Adrenozeptoren sowohl die Herzfrequenz (positive Chronotropie) und die Relaxationsbereitschaft (positive Lusitropie) als auch die Herzkraft (positive Inotropie) und wirken gleichzeitig über α_1 -Rezeptoren direkt konstringierend auf das periphere Gefäßsystem [9, 85].

Eine chronische Katecholaminerhöhung führt hingegen mittels negativer Rückkopplung zur Desensibilisierung und „Downregulation“ der β_1 -Adrenozeptoren [53]. Die Rezeptoren werden bei ausgedehnter Katecholaminstimulation phosphoryliert, „entkoppelt“ und schließlich in „intrazytoplasmatische Vesikel“ verpackt, „internalisiert“ und „sequestriert“ [9, 53]. Die „ β_1 -Down-Regulation“ charakterisiert eine Herzinsuffizienz bereits im Frühstadium und erschwert hierdurch eine effiziente kardiale Anpassung an „akute Belastungssituationen“ [9, 55]. Zudem übt die chronische Stimulation der verbliebenen β_1 -Rezeptoren hypertrophisierende, proapoptotische und profibrotische Effekte auf das Myokard aus, sodass der Progress einer Herzinsuffizienz weiter beschleunigt wird [12, 27, 73, 82].

Der ebenfalls im Myokard lokalisierte β_2 -Adrenozeptor unterliegt dagegen keiner Herabregulierung [55, 60]. Die gezielte Aktivierung des β_2 -Rezeptors kann im

insuffizienten Herzen sogar Inotropie und Lusitropie erhöhen [40]. Ein hypertrophisierender Effekt auf isolierte Kardiomyozyten wurde jedoch auch bei β_2 -Agonisten in vitro nachgewiesen [100].

1.3.2 Die Calciumhomöostase

Eine ausgeglichene Regulierung des intrazellulären Calciumhaushalts, die sogenannte Calcium(Ca^{++})-Homöostase, bildet die Voraussetzung für regelhaft verlaufende Kontraktions- und Relaxationsvorgänge [9]. Wird eine Herzmuskelzelle erregt und depolarisiert, so öffnen sich spannungsabhängige, sarkolemmale L-Typ- Ca^{++} -Kanäle, die einen intrazellulären diskreten Ca^{++} -Einstrom ermöglichen. Diese Ca^{++} -„Triggerionen“ aktivieren Ryanodinrezeptoren (z.B. Isoform RyR2) auf dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), welcher als myozytärer Kalziumspeicher dient, sodass weitere Mengen an Ca^{++} -Ionen intrazellulär freigesetzt werden. Als sogenannter „second messenger“ bindet Ca^{++} nun an die „Regulatorproteine“ der Myofilamente (z.B. Troponin C) und aktiviert so die Querbrückenbildung bzw. letztlich die Kontraktion der Myofibrillen. Anschließend erfolgt die Relaxation der Kardiomyozyte durch Eliminierung der Ca^{++} -Ionen aus dem Zytosol. Dies kann einerseits schnell und aktiv (d.h. unter Energieverbrauch) mittels sarkoplasmatischer Kalziumpumpe (z.B. Isoform SERCA2a) erfolgen. Hierbei bleibt die Gesamtmenge an Ca^{++} -Ionen für eine weitere Kontraktion erhalten. Andererseits lässt sich Kalzium via sarkolemmalen Na-Ca-Austauscher (NCX) nach extrazellulär transferieren, wobei dies mit einem stetigen Verlust an Ca^{++} -Ionen einhergeht [50, 85].

Zur Anpassung an „akute Belastungssituationen“ aktivieren Katecholamine via β_1 -Rezeptoren mittels cyclischer Adenosinmonophosphate (cAMP) die Proteinkinase A (PKA), welche anschließend Proteine phosphoryliert, die an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind [50]. So wird beispielsweise das SERCA2a-inhibierende Protein Phospholamban (PLB) phosphoryliert und inaktiviert. Durch diese Phosphorylierung können mehr SERCA2a-Proteine in den aktiven Zustand überführt werden, was letztlich zu einer erhöhten Relaxationsgeschwindigkeit führt [92].

Im „Mittelpunkt“ des chronisch insuffizienten Myokards steht „die gestörte Kalziumhomöostase der Zelle“ [9]. Einerseits lässt sich ein verminderter SERCA2a-Proteingehalt bei diesen Myozyten feststellen, andererseits wird der NCX vermehrt exprimiert [31, 32]. Des Weiteren zeigt sich ein verminderter Phosphorylierungsgrad des PLB im chronisch insuffizienten Myokard, was auf die Desensibilisierung der β_1 -Rezeptoren zurückgeführt werden kann [86]. Dieses Missverhältnis ist

charakterisierend für eine diastolische Relaxationsstörung, da sich die Elimination der Ca^{++} -Ionen aus dem Zytosol mit sinkender SERCA2a-Aktivität zunehmend verzögert [32]. Eine Störung der „systolischen Kontraktion“ lässt sich wiederum durch einen verminderten systolischen, intrazellulären Anstieg an Ca^{++} -Ionen erklären [9]. Hierfür wird die gestörte Phosphorylierung des RyR2 verantwortlich gemacht, da RyR2 in phosphorylierter Konformation deutlich effektiver Kalzium aus dem SR nach intrazellulär schleust [50].

1.3.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Des Weiteren aktiviert die mit einer Herzinsuffizienz einhergehende „Minderperfusion der Nieren“ das zirkulierende Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und führt zusammen mit dem antidiuretischen Hormon (ADH) zur Natrium- und Wasserretention sowie peripheren Vasokonstriktion [72, 91]. Aktiviertes und im Blutsystem zirkulierendes Renin ist in der Lage, das vorwiegend in Leber und Fettgewebe synthetisierte Angiotensinogen zu Angiotensin-I umzusetzen. Das „Decapeptid“ Angiotensin-I wird anschließend durch das Enzym „angiotensin-I-converting-enzyme“ (ACE), dessen quantitativ wichtigster Bildungsort das Lungenendothel ist, zum „Octapeptid“ Angiotensin-II proteolysiert. Mittels negativer Rückkopplung hemmt Angiotensin-II wiederum die Freisetzung von Renin und somit seine eigene Synthese [52]. Das physiologische Wirkspektrum des starken Vasokonstriktors Angiotensin-II umfasst sowohl den direkten Anstieg des arteriellen Blutdruckes via AT_1 -Rezeptor, als auch eine Erhöhung des Extrazellulärvolumens via Aldosteron- und ADH-Synthese [91]. Die Zunahme der Nachlast durch Erhöhung des peripheren Widerstandes sowie die Steigerung der Vorlast durch Hypervolämie können ein vermindertes Herzzeitvolumen (HZV) zunächst kompensieren, verschlimmern jedoch im „Verlauf die Herzinsuffizienz“ [34].

Darüber hinaus können zahlreiche Studien bereits die Existenz eines kardialen RAAS belegen [6, 20, 58]. Die Aktivierung des gewebespezifischen RAAS erfolgt hierbei durch intravasal zirkulierendes Renin bzw. Prorenin renalen Ursprungs [21]. Es diffundiert ins Interstitium und generiert dort zusammen mit ortsgebundenem ACE kardiales Angiotensin-II [19, 45].

1.3.4 Das kardiale „Remodeling“

Eine chronische Aktivierung des kardialen RAAS führt jedoch zu pathophysiologischen Umbauprozessen am Myokard, dem sogenannten „Remodeling“ [80]. So fördert Angiotensin-II in Fibroblasten beispielsweise über den lokalen Wachstumsfaktor TGF β via AT $_1$ -Rezeptor die Synthese extrazellulärer Matrixproteine (z.B. Kollagen) und damit die Fibrose des Myokards. Des Weiteren begünstigt TGF β als auto- und parakrin wirkendes Zytokin die Proliferation der Fibroblasten [78].

Doch auch in Kardiomyozyten wird TGF β durch Angiotensin-II über den AT $_1$ -Rezeptor induziert und führt dort zu einem intrazellulären „Remodeling“ [78]. So nimmt TGF β beispielsweise Einfluss auf das kardiale β -adrenerge System [37]. Transgene TGF β -überexprimierende Mäuse zeigen etwa eine TGF β -bedingte Zunahme an kardialen β -Adrenozeptoren bei einer gleichzeitig verminderten Anzahl β -inhibitorischer Proteine (Gi; β ARK). Aufgrund der β -adrenergen Induktion des wachstumsfördernden Polyaminstoffwechsel mittels Ornithindecaboxylase (ODC), resultiert bei diesen Tieren aufgrund der guten β -adrenergen Ankopplung eine deutliche Myokardhypertrophie [79, 84]. Da die Progredienz einer Herzhypertrophie ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz darstellt, scheinen die RAAS geschalteten kardialen Umbauprozesse direkt mit dem Verlust an Herzfunktion zu korrelieren [12, 62]. Durch die Strukturveränderungen des Myokards kann das Herz einen drohenden Funktionsverlust zunächst kompensieren. Auf Dauer führt das vorwiegend durch Angiotensin-II induzierte „Remodeling“ jedoch zu irreversiblen Umbauprozessen. Es entsteht ein „circulus vitiosus“ der „therapeutisch unterbrochen werden muss“ [34].

1.4 Die Therapie der chronischen Herzinsuffizienz durch ACE-Inhibition

Die aktuelle Leitlinie der ESC zur Therapie einer chronischen Herzinsuffizienz empfiehlt unter anderem den frühzeitigen Einsatz von ACE-Inhibitoren (z.B. Captopril) zur Unterbrechung einer chronischen RAAS-Aktivierung. Diese Form der Medikation wirkt sich lebensverlängernd und mortalitätssenkend auf Herzinsuffizienzpatienten aus [25]. Gleichsam scheinen myokardiale Strukturveränderungen und somit der Progress einer Herzinsuffizienz verzögert zu werden [30, 39]. Die hierfür verantwortlichen Mechanismen können jedoch nur unzureichend durch den Wegfall der Angiotensin-II vermittelten, pathophysiologischen Myokardveränderungen erklärt werden. So wurde etwa ein zeitlich verzögerter Anstieg der Angiotensin-II-Plasmakonzentration unter ACE-Inhibition festgestellt [96]. Weiter konnte gezeigt werden, dass andere Enzyme

(z.B. Cathepsin D,E,G) zur Konversion von Angiotensin-I zu Angiotensin-II befähigt und wahrscheinlich für die wieder ansteigende Angiotensin-II-Konzentration verantwortlich sind [94].

Aufgrund der latenten Minderung des negativen „Angiotensin-II-feedbacks“ auf die juxtaglomeruläre Reninsynthese wurden hohe Proreninplasmaspiegel unter ACE-Inhibition gemessen [46]. Dieser Effekt lässt sich ebenso unter der Therapie mit AT₁-Rezeptorantagonisten (z.B. Losartan) wie auch unter direkter Renininhibition (z.B. Aliskiren) beobachten [87]. Da Renin und Prorenin direkt und nicht-enzymatisch mit Kardiomyozyten interagieren können, versucht die vorliegende Studie auch, eine eventuelle kardioprotektive Bedeutung dieser erhöhten Proreninspiegel für das insuffiziente Myokard näher zu ergründen [80].

1.5 Prorenin und Renin

Die Aspartylprotease Renin (40kD) nimmt als Schlüsselenzym in der Hormonkaskade des RAAS eine zentrale Stellung ein [90]. Es geht aus der „enzymatisch inaktiven Vorstufe“ Prorenin (45kD) hervor, das im juxtaglomerulären Epithel der Vas afferens der Nierenarteriolen produziert, modifiziert und gespeichert wird [18]. Das Renin selbst ist auf Chromosom 1 lokalisiert und besitzt einen cAMP-abhängigen Promotor, sodass es regulierbar transkribiert werden kann [17, 89]. Unter anderem „stimulieren Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin“ über „β₁- bzw. D₁-Rezeptoren“ cAMP-gekoppelt die Reninsynthese [24, 52]. Angiotensin-2 hemmt hingegen via Proteinkinase-C bzw. erhöhter cyclischer Guanosinmonophosphat-Spiegel (cGMP) die Reninsynthese und wirkt so seiner eigenen Produktion entgegen [22]. Die intravasale Freisetzung des Prorenins erfolgt beim Menschen vorwiegend kontinuierlich und stimulationsunabhängig [76]. So bildet die inaktive Vorstufe Prorenin mit ca. 70-75% den größten Anteil des im Blut nachweisbaren Renins [5]. Ein Teil des Prorenins wird jedoch in das enzymatisch aktive Renin proteolysiert. Dieser Schritt erfolgt in vivo in den sekretorischen Vesikeln des juxtaglomerulären Mesangiums durch eine renale Prokonvertase-1 sowie Cathepsin-B [66, 77]. Ferner kann Prorenin in vitro bei einem niedrigen pH-Wert (≤3.3) bzw. bei niedriger Temperatur auch nicht-enzymatisch aktiviert werden [54, 75]. Desweiteren wird Renin bzw. Prorenin während der posttranslationalen Modifikation im Golgi-Apparat mit Mannose-6-Phosphaten N-glycosyliert. Es kann so bei verminderter Nierenperfusion bzw. bei „Reduktion des Extrazellulärvolumens“ auch mittels regulierter Exozytose nach intravasal freigesetzt werden [64].

1.6 Der Mannose-6-Phosphat-/Insulin-like-growth-factor-II-Rezeptor (M6P/IGFII-R)

Als bedeutendes Stellglied der Kreislaufregulation sind Prorenin und Renin aber auch in der Lage, direkt und nicht-enzymatisch mit Kardiomyozyten zu interagieren. Eine zentrale Rolle übernimmt hierbei der sogenannte Mannose-6-Phosphat-/Insulin-like-growth-factor-II-Rezeptor (M6P/IGFII-R) [80]. Dieser kann N-glycosyliertes Prorenin binden, internalisieren und intrazellulär zu Renin transformieren [97]. Zugleich wird dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade via p38- bzw. p42-Kinase aktiviert [81]. Ein weiterer Prorenin und Renin bindender Rezeptor ist der im Jahre 2002 publizierte (Pro)reninrezeptor (PRR) [67]. Die Aktivierung des PRR setzt gleichfalls eine Vielzahl an Signalkaskaden in Gang (z.B. Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAP)), sodass eine Angiotensin-II-unabhängige Interaktion des (Pro)renins mit dem Myokard erfolgen kann [68]. Hinrichs et al konnte beispielsweise bereits eine Renin-getriggerte Längenzunahme isolierter Kardiomyozyten nachweisen [35]. In Wieweit sich ein Renin- bzw. Prorenin-induziertes „Remodeling“ auf das adulte Myokard auswirkt ist derzeit nur unzureichend erforscht und soll den Mittelpunkt der hier vorliegenden Studie bilden.

Abb. 1

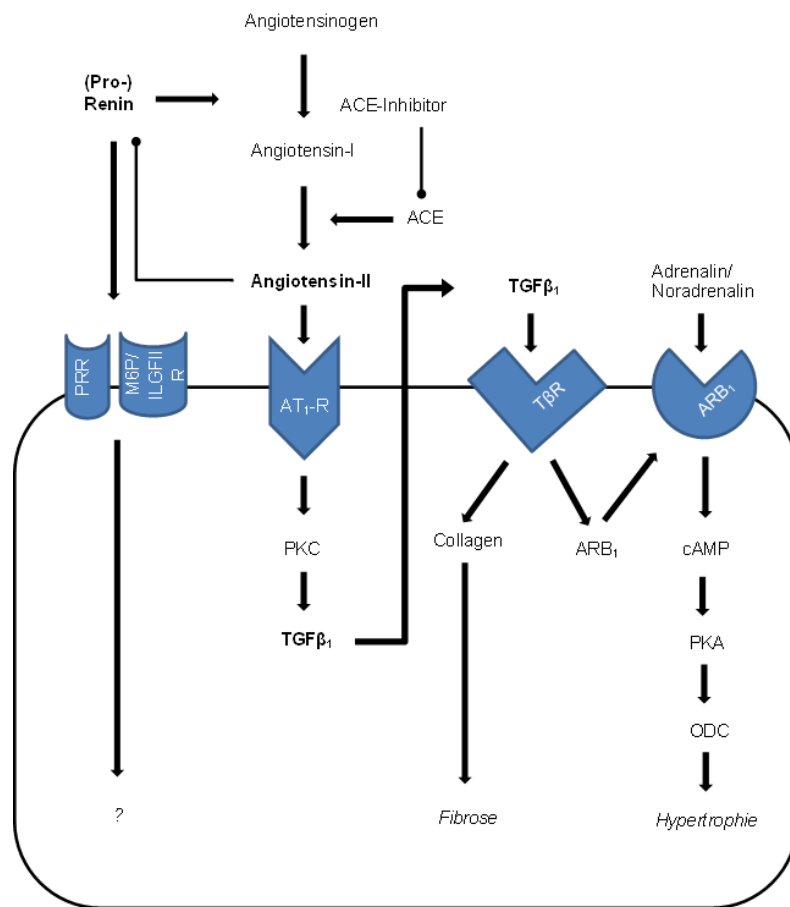


Abbildung 1:
Schaubild des kardialen „Remodeling“ bei einer chronischen Herzinsuffizienz.

Diese Abbildung zeigt vereinfacht die kardiomyozytären Umbauprozesse die ein reduziertes Herzzeitvolumen kompensieren sollen aber teilweise für die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz verantwortlich sind. Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an Rosenkranz et al 2005 und Schmidt/Lang [78, 85].

Legende: \longrightarrow = positiv/ fördernd; $\longrightarrow \bullet$ = negativ/hemmend.

1.7 Das Herzinsuffizienzmodell dieser Studie

Die Grundlage des hier verwendeten Herzinsuffizienzmodells bilden heterozygote transgene hypertensive Ratten (TGR) des Typs (mREN2)27, die auf dem genetischen Hintergrund einer Sprague-Dawley-Ratte (SDR) gezüchtet wurden. Diesen transgenen Ratten (TGR) liegt das sogenannte Renin-2-Mausgen zugrunde, welches mit einer Renin-Überexpression in verschiedenen Geweben einhergeht [48]. Die Expression dieses Gens und die damit verbundene Aktivierung des Renin-Angiotensin-

Aldosteronsystems (RAAS) führt unbehandelt zu einer starken Hypertension und druckinduzierten, linksventrikulären Myokardhypertrophie, wofür insbesondere das lokale RAAS verantwortlich gemacht werden kann [63, 69]. Der Plasmarenin Spiegel dieser Tiere verbleibt auf einem niedrigen Niveau, da die Vas afferens der Nieren selbst das Renin nicht übermäßig bilden und freisetzen kann. Im Gegensatz dazu können jedoch erhöhte Proreninkonzentrationen im Plasma der transgenen Ratten gemessen werden [63]. Zudem weisen Träger des Renin-2-Mausgens eine verminderte β_1 -adrenerge Ansprechbarkeit bei herabgesetzter β_1 -Adrenozeptordichte auf [13].

1.8 Die Zielsetzung dieser Studie

Die vorliegende Studie setzt sich nun damit auseinander, welchen Einfluss sowohl (Pro-)Renin, als auch die verminderte β_1 -adrenerge Ansprechbarkeit auf die linksventrikuläre Funktion sowie das hypertrophe, linksventrikuläre, druckinduzierte „Remodeling“ der adulten TGR haben.

Hierfür wurde die linksventrikuläre Funktion von isolierten Herzen adulter TGR ex vivo sowohl salin-perfundiert als auch unter Isoprenalinstimulation an der Langendorffanlage bestimmt und mit den jeweiligen Kontrollen verglichen. Die ermittelten Funktionsdaten der Tiere wurden anschließend molekulargenetisch mittels Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und Western-Blot näher untersucht.

2. Material

2.1 Chemikalien und Substanzen

6-Aminohexansäure	Merck KGaA, Darmstadt
Acrylamid (AA)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Agarose	Qbiogene, Heidelberg
Angiotensin-II (Ang2)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Bisacrylamid (BAA)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Captopril	Fagron GmbH & Co KG, Barsbüttel
Cell-Lysis-Buffer (10X)	Cell-Signaling-Technology [®] , USA
Chloroform	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Carbogen [®] (CO ₂ /O ₂ -Gasgemisch)	Linde AG, Pullach
Cytosin-beta-Arabinofuranosid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Diethylether	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
DNA-Ladder (100bp Ladder)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
dNTP`s	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ECL-Detektionsreagenzien	Thermo Scientific, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Glucose	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycin	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
HCl	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
HEPES	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Isoprenalin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Isopropanol	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Karnitin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kollagenase Typ CLS II	Biochrome AG, Berlin
Kreatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Medium 199/Earl`s Salt	Biochrome AG, Berlin
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
M-MLV-RT	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker/Rainbowmarker	GE Healthcare, Freiburg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Oligo-dT	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
peqGold Trifast [®] -Lösung	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Bioline GmbH, Luckenwalde
Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Proteinkinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt
Renin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
5xRT-Puffer (PCR-Puffer)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNAasin	Promega GmbH, Mannheim
SYBR [®] -Safe DNA Gel stain	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SYBR [®] -Green-Supermix	BioRad Laboratories GmbH, München
Taurin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Tween20	AppliChem GmbH, Darmstadt

2.2 Geräte und Laborbedarf

2.2.1 Allgemein verwendete Geräte

Gewebezerkleinerer	Ultra-Turrax [®] , IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Glasgeräte	Schott AG, Mainz
Heizblock	neoBlock1, neoLab GmbH, Heidelberg
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Magnetheizrührer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Minirührer/zerkleinerer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schüttler	Biometra GmbH, Göttingen
Vortexer	Heidolph GmbH & Co. KG, Kelheim
Wasserbad	Aqualine AL 18, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore GmbH, Eschborn
Zentrifugen	Allegra 25R centrifuge & Microfuge 18 centrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld

2.2.2 Geräte zur Blutdruckmessung

Messplattform	TSE-Systems GmbH, Bad Homburg
Steuereinheit	TSE-Systems GmbH, Bad Homburg
Blutdruckmanchetten	TSE-Systems GmbH, Bad Homburg

2.2.3 Geräte der Langendorffanlage, Zellpräparation und Zellkultur

Brutschrank	Heraeus BDD 6220, Thermo Scientific, USA
Druckaufnehmer	Combitrans (1x) Set Mod. II, Justus-Liebig-Universität & Braun
Gewebeschneider	Mcllwain-Tissue-chopper, Mickle Laboratory Engineering Company Ltd; GALA instruments, Bad Schwalbach

Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan
Nylon-Gaze	NeoLab GmbH, Heidelberg
Laborwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Langendorf-Apparatur & Software	Eigenbau und Eigenprogrammierung, physiologischen Instituts, Justus-Liebig-Universität Gießen & Lab. view, Nat. Instruments
Präparationsbesteck	Aeskulab, Heidelberg
Relaisbox	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Schlauchpumpe	Ismatec, Schweiz
Sterilbank	Kendro, Hanau
Thermokammer	Eigenbau, physiologischen Instituts, Justus-Liebig-Universität Gießen
Umwälzpumpe	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen

2.2.4 Geräte zur RNA-Extraktion und PCR

Elektrophoresekammer	GE Healthcare, Freiburg
Spektralphotometer	NanoDrop®ND-1000, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermalcycler	iCycler® myIQ 569BR, BioRad Laboratories GmbH, München
Thermocycler	Techne, Wertheim-Bestenheid
UV-Kammer	UV-Stratalinker 2400, Stratagene, USA

2.2.5 Geräte für Western-Blot

Chemielumineszenzsystem	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammer	Biometra GmbH, Göttingen
Elektroblotkammer	Biometra GmbH, Göttingen
Glasplatten	Biometra GmbH, Göttingen
Hamilton®spritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Kämme	Biometra GmbH, Göttingen
Netzgerät	Biometra GmbH, Göttingen
Plattenklemmen	Biometra GmbH, Göttingen

Platzhalter („Spacer“)	Biometra GmbH, Göttingen
Ultraschallgerät	Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin

2.2.6 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen (10ml;20ml)	B.Braun, Melsungen
Filterpapier	Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen
Handschuhe (Nitril, Gr. M)	Ansell Healthcare Europe, Brüssel
Kulturschalen (Falcon®)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
PCR-Tubes (Thermostrips 0,2 ml)	Thermo Scientific, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PVDF-Membran	Millipore GmbH, Eschborn
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2,0 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Einmalskalpelle	VWR International GmbH, Darmstadt

2.2.7 EDV

Citavi 3.4.0	Swiss Academic Software, Schweiz
ImageQuant®	Molekular Dynamics GmbH, Krefeld
Microsoft Office® (V2003 & 2010)	Microsoft Corp., USA
Microsoft Windows® (XP & 7)	Microsoft Corp., USA
myiCycler™iQ Optical System Software	BioRad Laboratories GmbH, München
QuantityOne®	BioRad Laboratories GmbH, München
SPSS Statistics 18.0	IBM Deutschland GmbH
TSE-Software V3.3.1	TSE-Systems GmbH, Bad Homburg
www.google.de	Google Inc., USA
www.leo.org	LEO GmbH, Sauerlach
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	NCBI, USA

2.2 Primer

Die für die RT-PCR verwendeten Primer sind mit jeweiliger „Annealing“-Temperatur (AnT) und Produktlänge (bp) im Folgenden nach den Genprodukten alphabetisch aufgelistet. Alle Primer entstammen der Firma Invitrogen GmbH mit Sitz in Karlsruhe.

Gen	AnT (°C)	Länge (bp)	Sequenz (jew. forward oben, reverse = unten)
ARB1	67,0	145	5`-GGC GCT CAT CGT GCT GCT CA-3` 5`-AGG CAC CAC CAG CAG TCC CA-3`
ARB2	67,0	161	5`-GCT TCT GTG CCT TCG CCG GT-3` 5`-AGC CTT CCA TGC CAG GGG CT-3`
ANP	58,0	456	5`-ATG GGC TCC TTC TCC ATC AC-3` 5`-TCT TCG GTA CCG GAA GCT G-3`
Collagen-1	62,0	154	5`-GCG AAC AAG GTG ACA GAG-3` 5`-CCA GGA GAA CCA GCA GAG-3`
Elastin	56,0	140	5`-TGC TAC TGC TTG GTG GAG AAT G-3` 5`-CGT GGC TGC TGC TGT CTG-3`
HPRT	63,0	132	5`-CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT-3` 5`-CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC-3`
NCX	53,0	187	5`-CCG TAA TCA GCA TTT CAG AG-3` 5`-GCC AGG TTA GTC TTC TTA AT-3`
ODC	58,0	304	5`-GAA GAT GAG TCA AAC GAG CA-3` 5`-AGT AGA TGT TTG GCC TCT GG-3`
PLB	57,5	171	5`-TAT GTC TGC TGC TGA TAT GC-3` 5`-ACT CTT AAA TCG TGA CCC TTC-3`
REN27	59,0	650	5`-CAA AGT CAT GTT TGA CAC GGG-3` 5`-AGT CAG AGG ACT CAT AGA GGC-3`
SERCA2a	57,0	268	5`-CGA GTT GAA CCT TCC CAC AA-3` 5`-AGG AGA TGA GGT AGC GGA TGA A-3`
TGFβ ₁	61,0	117	5`-ATT CCT GGC GTT ACC TTG G-3` 5`-CCT GTA TTC CGT CTC CTT GG-3`

2.3 Antikörper

Aktin (rabbit)	Sigma GmbH, Taufkirchen
Phospholamban FL-52 (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
p-Phospholamban Ser-16 (goat)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Serca2 C-20 (goat)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Sheep anti-rabbit IgG	Affinity Biologicals TM , Kanada
Donkey anti-goat IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA

3. Methoden

3.1 Versuchsbedingungen und Studiendesign

Die aus dem Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin der Charité, Berlin stammenden, heterozygoten TGR sind mit SDR verpaart worden, sodass einerseits heterozygote Träger des Renin-2-Mausgens (TGR(mREN2)²⁷), andererseits nicht-transgene Sprague-Dawley-Ratten (SDR) hervorgebracht wurden. Durch eine Genotypisierung konnten die Renin-2-Genträger letztlich postmortal identifiziert werden. Sowohl 39 TGR (mREN2)²⁷ als auch 42 SDR der aus Berlin stammenden Nachfolgenerationen wurden somit von Geburt an über das Trinkwasser dauerhaft mit Captopril (30mg/kg) behandelt. Dieses Vorgehen war notwendig, da sich die Tiere im unbehandelten Zustand nicht vermehrten. Zudem wird über eine erhöhte Mortalität bei TGR berichtet, die schon von Geburt an druckbelastet wurden [10]. Anschließend wurde bei der Hälfte der behandelten Tiere im Alter von 12 Wochen Captopril für weitere 8 Wochen abgesetzt. Es sind somit 4 Bedingungen ab der 12. Lebenswoche - TGR mit und ohne Captopril sowie SDR mit und ohne Captopril - zu je ca. 20 Ratten festgelegt und alle Tiere im Alter von 5 Monaten zur Präparation freigegeben worden. Aus technischen Gründen war es jedoch nicht möglich alle Untersuchungsmethoden an sämtlichen Tieren bzw. Gewebe- und Zellmaterialien durchzuführen.

3.2 Genotypisierung

Zur Differenzierung zwischen TGR(mREN2)²⁷ und SDR wurde genetisches Material (ca. 1 cm der Schwanzspitze) post mortem entnommen, um letztlich die genomische DNA der jeweiligen Tiere auf Integration des Renin2-Mausgens in das Rattengenom zu überprüfen.

3.2.1 DNA-Präparation

Die in jeweils 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufbewahrten Gewebeproben wurden mit 500 µl Gewebepuffer und 15 µl (20mg/ml) Proteinkinase K bei 55°C über Nacht inkubiert. Nach dieser Verdauphase schloss sich eine kurze Zentrifugation (12.000 rpm, 2 Minuten, 4°C) an, um anschließend den wässrigen Überstand zur DNA-Fällung in neue Reaktionsgefäße (1,5 ml) mit je 700 µl Isopropanol zu überführen. Nach wiederholter

kurzer Zentrifugation (12.000 rpm, 2 Minuten, 4°C) setzten sich DNA-Pellets am Boden der Reagenzgefäße ab. Im Folgenden wurde der Isopropanolüberstand wieder verworfen, um die Pellets erst in je 500 µl Ethanol (70%) zu zentrifugieren (12.000 rpm, 2 Minuten, 4°C) und später an Luft (24°C) zu trocknen. Die schließlich in 500 µl TE-Puffer resuspendierte DNA konnte nun mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert werden.

Gewebepuffer:

SDS	1 %
Tris, pH 7,5	50 mM
EDTA	10 mM
NaCl	100 mM

TE-Puffer:

Tris, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM

3.2.2 Amplifikation und gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente

Der PCR-Reaktionsansatz-1 (für 100 Proben) setzte sich wie folgt zusammen:

Auqa bidest.	571 µl
MgCl (25mM)	120 µl
10xPCR-Puffer	120 µl
dNTP`s (2,5mM)	96 µl
Primermix	90 µl
Taq-Polymerase	3 µl

Der Primer (REN27) wurde zunächst auf das Verhältnis 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt. Aus dem PCR-Reaktionsansatz-1 wurden anschließend je 10 µl entnommen und zusammen mit 2 µl DNA-Probe in ein PCR-Tube pipettiert. Die PCR konnte nun im Thermocycler bei einer Annealing-Temperatur von 59°C mit folgendem Protokoll gestartet werden:

Zyklus 1 (1x)	Step 1	95°C, 3 Minuten
Zyklus 2 (35x)	Step 1 (Denaturierung)	95°C, 30 Sekunden
	Step 2 (Annealing)	59°C, 1 Minute
	Step 3 (Amplifikation)	72°C, 1 Minute
Zyklus 3 (1x)	Step 1	72°C, 2 Minuten

Der PCR folgte schließlich die gelelektrophoretische Auftrennung der einzelnen DNA-Fragmente in einem Agarose-Gel (1,5%). Hierfür wurde das kochende Gel in eine Gelwanne gegossen und anschließend mit Kunststoffkämme versehen, die nach Härtung des Gels wieder entfernt worden sind. Die so entstandenen Geltaschen konnten nun nach Überführung des Agarose-Gels in eine Elektrophorese-Kammer (TAE(x1)-Gelpuffer) mit je 10 µl DNA-Proben-Mix befüllt werden. Die erste Geltasche wurde dabei mit 10 µl des 100bp-Markers versehen.

Agarose-Gel (1,5%):

Agarose	1,1 g
TAE(x1)-Puffer	75 ml
SYBR® Safe	3,75 µl

DNA-Proben-Mix:

DNA-Probe	8 µl
Auftragspuffer	2 µl

100bp-Marker:

DNA-Ladder(100bp)	5 µl
Auftragspuffer	10 µl
TAE(x1)	58 µl

Auftragspuffer:

TAE(x10)	1 ml
Glycerin	0,5 ml
BPB	Spatelspitze (1/10)

TAE-Puffer(x50):

Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5 M)	100 ml

mit Aqua bides auf 1 Liter auffüllen

Die Gelelektrophorese wurde schließlich für eine Stunde bei einer angelegten Spannung von ca. 96 Volt durchgeführt. Die so aufgetrennten DNA-Fragmente konnten nun im UV-Licht (366nm) demaskiert und abglichtet werden. Bei TGR[(mREN2)27] zeigten sich im Gegensatz zu den SDR, DNA-Banden, die eine Größe von ca. 650 Basenpaaren aufwiesen.

Abb. 2

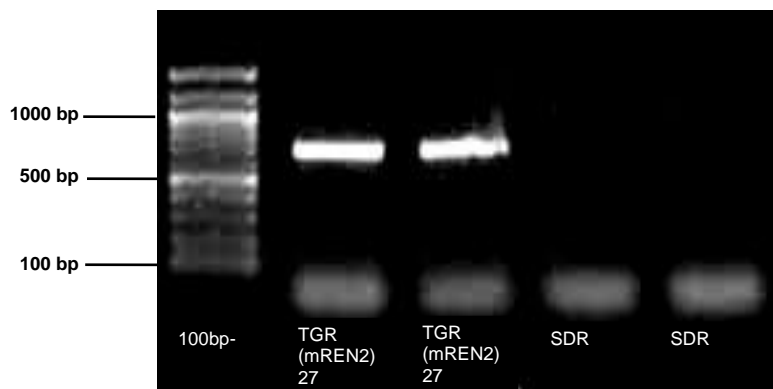


Abbildung 2
Abbildung eines
Agarose-Gel-
Ausschnitts zur
Rattenidentifikation

Sie zeigt die ca 650 bp große Bande bei den TGR[(mREN2)27]. Bei SDR erschien auf Höhe von 650 bp keine Bande. Als Referenz diente ein 100bp-Marker.

3.3 Blutdruckmessung

Sowohl Blutdruck, als auch Herzfrequenz wurden von Geburt an bei einer kleinen Gruppe (n=16) der Tiere in vivo am Schwanz der nicht-narkotisierten Ratten mittels „Tail-Cuff-Methode“ einmal pro Woche „nicht-invasiv“ bestimmt. Die Durchführung der Messmethode richtete sich dabei nach den Vorgaben der Bedienungsanleitung des TSE®-Blutdruckmesssystems 9002 [95]. Für die Messungen setzte man die Ratten in eigens auf ihre Größe angepasste Messkäfige, an die sie im Vorfeld gewöhnt worden waren, um stressinduzierte Blutdruckschwankungen bei den Messungen auszuschließen. Anschließend wurde eine aufblasbare Druckmanschette auf den Rattenschwanz gezogen, um hinter dieser einen „Pulssensor“ platzieren zu können.

Als „Pulssensor“ diente ein „optischer Infrarotsensor“, der Blutdruckschwankungen und die damit verbundenen veränderten Lichtdurchlässigkeiten des Schwanzes registrierte und in elektrische Signale umwandelte. Da bei Raumtemperatur (ca. 23°C) die Durchblutung der Rattenschwänze reduziert ist, mussten die Tiere zusätzlich einer Lufttemperatur von ca. 35°C ausgesetzt werden, damit die wärmebedingte Erweiterung der Schwanzarterien zu messbaren Pulswellen führen konnte. Die Erwärmung wurde durch eine unter dem Messkäfig platzierte „Heizmessplattform“ sichergestellt. Die Drucksteuerung der Manschette leistete ein an das Messsystem angeschlossener Druckgenerator einer „zentralen Steuerungseinheit“. Dieser konnte die Manschette während der Messung kontinuierlich aufblasen und so die Schwanzarterie zunehmend occludieren bis der Pulssensor aufgrund des fehlenden Blutflusses kein Signal mehr wahrnahm. An diesem Punkt wurde der zu messende Druck als systolischer Blutdruck registriert. Aus den bis zu 12 Einzelmessungen pro Tier und Messtag ist letztlich der Mittelwert gebildet worden.

3.4 Präparation der Rattenorgane

In der vorliegenden Studie sind alle Tiere im Alter von 5 Monaten zur Präparation der Organe verwendet worden. Zu Beginn wurden die Ratten mit Diethylether narkotisiert und anschließend der Grad der Bewusstlosigkeit mittels Cornealreflex überprüft. In der Folge sind die Tiere bei ausreichender Betäubung erst gewogen und anschließend per cervicaler Dislokation getötet worden. Durch Eröffnung der Bauchhöhle distal des Sternums wurde das Diaphragma durchtrennt, um von inferior zur Thoraxhöhle zu gelangen. Im Anschluss entnahm man das gesamte Herz-Lungenpaket und gab es in eine mit Natriumchloridlösung (+4°C; 0,9%) befüllte Petrischale. Sogleich wurden die dem Herzen anliegenden Strukturen (Ösophagus, Thymus, Trachea und beide Lungen) unter großer Sorgfalt entfernt. Das isolierte Herz konnte nun zur Messung der Herzfunktion ex vivo an die Langendorffanlage (s. Kap. 3.5) angeschlossen werden. Das Gesamtherzgewicht wurde am Ende der Versuchsreihe mit einer Waage bestimmt. Anschließend trennte man mit einer Präparierschere den linken und rechten Ventrikel vom übrigen Herzgewebe um auch deren Gewichte ermitteln zu können. Im weiteren Verlauf wurden neben Tibialänge auch Nieren und Lungengewicht notiert, um anschließend alle Organe und Gewebe zur Weiterverarbeitung bei -80°C einzugefrieren.

3.5 Herzfunktionsmessung ex vivo

3.5.1 Die Langendorff-Perfusionsanlage

Den Bauplan einer Anlage zur Perfusion isolierter Tierherzen sowie deren Durchführung am Froschherzen lieferte 1895 der deutsche Mediziner und Physiologe Oskar Langendorff (1853-1908) [101]. Der Grundgedanke besteht darin, das isolierte Tierherz retrograd über die Aorta mit allen für das schlagende Herz lebensnotwendigen Stoffen zu versorgen [101]. Das Perfusat soll bei physiologisch geschlossenen Aortenklappen die Coronararterien, das venöse System und letztlich den Sinus Coronarius im rechten Vorhof erreichen, um die Versorgung des gesamten Myokards zu gewährleisten [26]. Durch diese Innovation kann bis heute eine Vielzahl von Funktionsparametern direkt am isolierten und schlagenden Herzen bestimmt werden.

3.5.2 Rattenherzperfusion

Die Methodik der Rattenherzperfusion folgte in dieser Studie der Anleitung von H.J. Döring und H. Dehnert [26]. Die isolierten Herzen wurden nach Präparation (Kap. 3.4) zunächst in einer allseits umschlossenen Plexiglaskammer (37°C) aufgehängt. Hierbei wurde der Aortenstumpf mit einer Pinzette über die Perfusionskanüle gezogen und mit einer Metallklemme an dieser befestigt. Die endgültige Fixation erfolgte letztlich mit einem Leinenoperationsfaden (Nr.40). Der mit einem Carbogen-Sauerstoffgemisch (5% CO₂ und 95% O₂) dauerhaft begasten Perfusionslösung war es nun möglich, retrograd via Aorta die Koronararterien und damit das Myokard zu erreichen. Zusätzlich konnten über Dreiwegehähne oberhalb der Kanüle weitere Stoffe dem Perfusat zugeleitet werden.

Perfusionslösung:

NaCl	140 mM	
KCl	2,6 mM	
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,4 mM	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 mM	
Glucose	5,0 mM	
CaCl ₂ x H ₂ O	1,8 mM	
NaHCO ₃	25 mM	(pH=7,4)

Zur Erfassung der linksventrikulären Druckverhältnisse wurde ein mit aqua bidest. befüllter Latexballon (Größe 5) im linken Ventrikel platziert. Dieser Ballon war ebenso wie auch die Perfusionskanüle an einen Druckaufnehmer angeschlossen, der über einen Analog-Digital-Wandler die gemessenen Impulse an einen PC weiterleitete. Zu Beginn der Versuche wurde schließlich der Perfusionsdruck bei einer durchschnittlichen Flussrate von ca. 6-10 ml/min auf einen Grundwert von 50 mmHg eingestellt. Desweiteren musste der Ballondruck auf 10-12 mmHg nachjustiert werden, um den physiologischen Bedingungen im linken Ventrikel gerecht werden zu können.

3.5.3 Parametererfassung

Neben den linksventrikulären systolischen ($P_{\text{syst.}}$) und diastolischen ($P_{\text{diast.}}$) Drücken konnten bei konstanter Flussgeschwindigkeit auch die Herzfrequenz (HF) und der Perfusionsdruck ($P_{\text{perf.}}$) ermittelt werden. Der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) errechnete sich dabei aus der Differenz der systolischen und diastolischen Druckwerte. Desweiteren wurde die maximale linksventrikuläre Kontraktions- ($+dP/dt$) und Relaxationsgeschwindigkeit ($-dP/dt$) aufgezeichnet.

3.5.4 Versuchsprotokoll

In dieser Studie wurden die linksventrikulären Funktionsparameter der isolierten Rattenherzen sowohl basal als auch unter Isoprenalinperfusion (10nM) ermittelt und miteinander verglichen. Damit die Versuche unter konstanten Bedingungen durchgeführt werden konnten, wurde nach Anschluss des Herzens an die Perfusionsanlage eine Stabilisierungsphase von mindestens 20 Minuten eingehalten. Während dieser Zeit stellte man sowohl Perfusions- und Ballondruck als auch die Flussrate auf die in Kap. 3.5.2 erwähnten Werte ein. Im Folgenden wurden die jeweiligen Funktionsparameter insgesamt dreimal in Abständen von je 10 Minuten gemessen, sodass sich stets eine Gesamtperfusionsdauer von 30 Minuten ergab.

3.6 Kardiomyozytenisolation und Zellkultur

3.6.1 Kardiomyozytenspender

Als Kardiomyozytenspender dienten ein Teil der bereits in Kap. 3.1 erwähnten TGR und SDR, sowie die im physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität gezüchteten männlichen Wistar-Hannover-Ratten (300-400g). Alle Tiere wurden bis zu ihrer Tötung in Gruppen von 5-7 Ratten in 34 x 55 x 21 cm (Breite x Tiefe x Höhe) großen Käfigen gehalten. Ein freier Zugang zu Trinkwasser und Futter (Altromin®) war jederzeit möglich.

3.6.2 Aufbau und Vorbereitung

Um Versuche an isolierten Kardiomyozyten durchführen zu können, musste man diese in mehreren Arbeitsschritten vom übrigen Herzgewebe trennen. Die Methodik der Kardiomyozytenisolation sowie deren Kultivierung erfolgte modifiziert nach Piper et al. [74]. Zuerst wurden 100 ml Powell-Medium, welches als Perfusat diente, auf 37°C erwärmt und mit einem Carbogen-Sauerstoffgemisch (5% CO₂ und 95% O₂) dauerhaft begast. Anschließend befüllte man eine Perfusionsanlage nach Langendorff am oberen Glaskolben mit 20 ml des vorbehandelten Perfusats (s. Kap. 3.5), um in der Anlage für 5 Minuten zu zirkulieren. Nachdem die 20 ml Powell-Medium abgelassen worden sind, wurde die Anlage erneut mit 80 ml Perfusat luftblasenfrei aufgefüllt. Am unteren Ende der Perfusionsanlage befand sich eine Kanüle (2,3 mm) an die die Rattenherzen über ihre Aorta aufgehängt und retrograd perfundiert werden konnten.

Powell-Medium:

NaCl	110,0 mM
KCl	2,6 mM
KH PO	1,2 mM
MgSO	1,2 mM
NaHCO	25,0 mM
Glucose	11,0 mM

3.6.3 Isolationsvorgang

Die Rattenpräparation erfolgte wie bereits in Kap. 3.4 beschrieben. Unter zu Hilfenahme einer Pinzette wurde der Aortenstumpf des isolierten Herzens über die Perfusionskanüle gezogen und mit einer Metallklemme daran befestigt. Die endgültige Fixation erfolgte letztlich mit einem Leinenoperationsfaden (Nr.40). Zu Beginn wurde das Herz retrograd mit 30 ml Powell-Medium, welches anschließend verworfen worden ist, blutfrei perfundiert. In der Folge löste man 25 mg Kollagenase sowie 12,5 µl CaCl₂ in 5ml zuvor abgelassenes Perfusat und führte den entstandenen Kollagenasepuffer wieder zu den restlichen 45 ml Perfusat zurück. Die Geschwindigkeit der sich anschließenden Perfusion stellte man auf 0,03 ml/sec ein, damit ein für die Verdauphase optimales Zeitfenster von 25 Minuten Perfusionsdauer eingehalten werden konnte.

Kollagenasepuffer:

Powell-Medium	50 ml
Kollagenase	25 mg
CaCl ₂	12,5 µl

Das Herz wurde nach Perfusion mit der Pinzette gefasst und von der Anlage abgeschnitten, sodass Vorhöfe und Aorta an der Kanüle verblieben. Danach legte man das perfundierte Herz auf eine Teflonplatte und zerkleinerte es weiter mechanisch in Abständen von 0,7 mm mit dem Gewebezerkleinerer („tissue chopper“ McIWAIN) sowohl längs als auch quer. Der so entstandene Zellbrei wurde zusammen mit 12 ml Kollagenasepuffer in ein Reagenzröhrchen (50ml) überführt und bei 37°C in einem Wasserbad für 5 Minuten unter ständigem Auf- und Abpipettieren nachverdaut. Im Folgenden ist der Zellbrei durch eine 200 µm Nylon-Gaze in ein neues Reagenzgefäß (50ml) filtriert und bei 400 rpm für 3 Minuten zentrifugiert worden. Im Anschluss wurde der Überstand mit den darin enthaltenen Zellresten und Matrixbestandteilen verworfen und das Zellpellet mit 6 ml Powell-Medium sowie 25 CaCl₂ µl durch sanftes Schütteln resuspendiert. Nach zwei weiteren Zentrifugationsvorgängen (400 rpm), bei denen die CaCl₂ -Konzentration schrittweise von 200 µl auf 400 µl erhöht worden ist, erhielt man das Pellet isolierter Kardiomyozyten.

3.6.4 Kardiomyozytenkultivierung

Unter sterilen Bedingungen sind bereits am Vortag die für die Zellkultur verwendeten 35-mm-Kulturschalen mit je 1,5 ml Vorinkubationsmedium beschichtet worden, damit ein effizientes Anheften der Kardiomyozyten ermöglicht werden konnte. Vor dem Ausplattieren der Kardiomyozyten wurde das Vorinkubationsmedium schließlich wieder per Sauger entfernt. Das bereits in mehreren Aufbearbeitungsschritten (Kap. 3.6.1 - 3.6.3) hergestellte Zellpellet isolierter Kardiomyozyten konnte nun in 40 ml CCT-Kulturmedium (37°C) und 2%-iger Penicillin-Streptomycin-Lösung (800µl) resuspendiert werden. Anschließend wurden je 2 ml der Suspension per Glaspipette (10ml) auf die einzelnen Kulturschalen verteilt und für eine einstündige Ruhepause im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Dieser Vorgang diente sowohl der Myozytenregeneration als auch der Selektion, da sich nur intakte Herzmuskelzellen an den Böden der Kulturschalen fest binden können. In dem sich anschließenden Waschvorgang wurden die im CCT-Medium „freischwebenden“ toten Zellkonglomerate abgesaugt und durch neues CCT-Medium (2 ml pro Schale) ersetzt. Die lichtmikroskopische Prüfung ergab einen durchschnittlichen Anteil an gesunden langgestreckten Kardiomyozyten von ca 80-90%.

Vorinkubationsmedium:

CCT	50 ml
FCS	4% vol/vol (2ml)
Penicillin/Streptomycin	2% vol/vol (1ml)

CCT-Medium (pH 7,4):

Medium 199/Earl`s Salt	9,62 g/l
HEPES	15 mM
Kreatin	5 mM
Karnitin	2 mM
Taurin	5 mM
Cytosin-beta-Arabinofuranosid	100 µM

3.6.5 Inkubationsversuche

Die isolierten Kardiomyozyten der Wistar-Hannover-Ratten wurden für verschiedene Inkubationsversuche herangezogen. Hierfür inkubierte man 1/3 der Kulturschalen (n=6)

nach dem Waschvorgang mit 20 µl Renin (100nM) und ein weiteres Drittel (n=6) Schalen mit 20 µl Angiotensin-II (100nM) für 24 h. Als Kontrolle diente das letzte Drittel der Kardiomyozytenschalen (n=6) welches ausschließlich mit CCT-Medium behandelt wurde.

3.6.6 Probengewinnung

Für die Probengewinnung wurde das Inkubations- bzw. CCT-Medium wieder abgesaugt und alle Schalen mit 1 ml PBS versehen. Die gebundenen Kardiomyozyten konnten sodann mit einem Gummispatel abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt werden. Nach einer kurzen Zentrifugation (3000 rpm, 5 Minuten, 23°C) setzte sich ein kleines Zellpellet ab und konnte bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C tiefgefroren werden.

3.7 RT-PCR

Die Synthese eines Proteins wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Da die Transkription den ersten Schritt der Genexpression darstellt, liegt es nahe, zuerst die Konzentration der RNA des jeweiligen Proteins quantitativ zu analysieren. Somit lässt sich ableiten inwiefern ein Protein zumindest auf RNA-Ebene exprimiert worden ist. Die hierfür verwendete Methode der Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde nach Bustin et al. und Livak et al. durchgeführt [15, 51].

3.7.1 RNA-Extraktion

Die Methode der RNA-Extraktion richtete sich weitgehend nach der Arbeitsanleitung von peg-Gold-Trifast® [71]. Die verschiedenen gefrorenen Gewebeproben (ca 200g) wurden zu Beginn der RNA-Extraktion zusammen mit je 1ml Trifast®-Lösung (bei isolierten Zellen 300 µl) in Reagenzgläser gegeben und mit dem Ultra-Turrax® homogenisiert worden. Anschließend wurden 200 µl Chloroform (bei isolierten Zellpellets 50 µl) pro Probe hinzugefügt, milchig-trüb geschüttelt (ca. 15 sec) und mit 12.000 rpm 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Es ließ sich nun eine Trennung in drei Phasen erkennen. Die oberste mit RNA angereicherte Phase wurde vorsichtig abgenommen und in neuen Reaktionsgefäßen (1,5ml) mit 0,5 ml Isopropanol für mindestens 20 Minuten bei -20 °C inkubiert. Die übrigen DNA- und proteinhaltigen

Phasen wurden anschließend verworfen. Nach dieser RNA-Präzipitation folgte eine weitere Zentrifugation (12.000 rpm, 15 Minuten, 4°C), damit sich RNA-Pellets am Boden der Eppendorf-Gefäße absetzen konnten. Nachdem die Überstände dekantiert worden sind, wurden die verbliebenen RNA-Pellets mit 1 ml Ethanol (70%) versetzt. Dieser Waschvorgang wurde mit einer weiteren Zentrifugation (12.000 rpm, 15 Minuten, 4°C) beendet. Die Pellets wurden daraufhin von den Ethanolüberständen getrennt, um sich anschließend nach Lufttrocknung (30 Minuten, 23°C) in 50 µl destilliertem Wasser (bei isolierten Zellen 15 µl) lösen zu können.

3.7.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der RNA-Konzentrationen wurde das UV/Vis-Spektral-photometer Nano Drop®1000 mit einem Spektrum von 220-750 nm verwendet. Das Vorgehen richtete sich dabei nach der Bedienungsanleitung des Gerätes [93]. Zur Messung wurden aus den Eppendorffgefäßen - mit der sich darin vollständig in Aqua bidest. gelösten RNA - jeweils 2 µl mit einer Pipette entnommen und luftblasenfrei auf den Sensor des NanoDrop®-Gerätes gegeben. Anschließend zeigte die zugehörige Software dem Nutzer die Konzentration der RNA bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm in µl an. Die für die cDNA-Synthese definierte RNA-Konzentration lag hierbei im Bereich von 200-1000 ng/µl. Bei gemessenen Werten über 1000 ng/µl wurde die Probe auf den erwünschten Bereich mit aqua bidest. herunterverdünnt.

3.7.3 Reverse Transkription

Da die Polymerase-Kettenreaktion aufgrund fehlender RNA-Taq-Polymerasen nur für DNA möglich ist, musste die gewonnene RNA in eine copy-DNA umgeschrieben werden. Für einen Ansatz cDNA wurden 1 µg RNA/µl der jeweiligen Probe in neue Eppendorffgefäße überführt und mit aqua bidest. auf 5 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Aufgrund der Konzentrationsunterschiede der einzelnen Proben mussten dafür jedoch unterschiedliche Mengen entnommen werden. Zur Berechnung dieser Mengen wurde folgende Formel verwendet:

$(1000/\text{NanoDrop®-Wert in ng/}\mu\text{l}) = \text{zu entnehmende Menge an RNA}$

Im Anschluss wurden die 5 µl RNA-Proben im Thermocycler für 15 Minuten bei 60°C denaturiert, um später das Anlagern der Reversen Transkriptase an die RNA zu erleichtern. Nach dem Denaturierungsvorgang wurden je 5 µl cDNA-Synthese-Mix zu den einzelnen Proben hinzugefügt, um die Reverse Transkription (1h, 37°C) im Thermocycler starten zu können. Eine für 5 Minuten angesetzte Denaturierung bei 95°C beendete den Transkriptionsvorgang. Die jeweils 10 µl cDNA konnten nun weiterverarbeitet oder bei -20°C tiefgefroren werden.

cDNA-Synthese-Mix (5 µl für je eine Probe):

oligo-dT	1,0 µl (0,1 mg/ml)
5x RT-Puffer	2,0 µl
dNTP's	1,0 µl (10 mM je Nukleotid)
DTT	0,5 µl (0,1 M)
RNAsin	0,2 µl (25 U/µl)
M-MLV-RT (ReverseTranskriptase)	0,3 µl (200 U/µl)

3.7.4 DNA-Amplifikation

Die 10 µl cDNA-Proben wurden zuerst mit 90 µl aqua bidest. versetzt, um anschließend 3 µl dieser 1:10 Verdünnung in spezielle PCR-Tubes zu überführen. Diesen 3 µl wurde 17 µl des PCR-Reaktionsansatzes-2 hinzugefügt. Somit konnte nun im iCycler die Polymerase-Kettenreaktion starten.

PCR-Reaktionsansatz-2:

SYBR® Green Supermix	10,0 µl
aqua bidest.	6,4 µl
Primer (fw+rev)	0,6 µl (1:10 a.b. Verdünnung)

Die Polymerase-Kettenreaktion folgte dabei einem genau auf den Primer zugeschnittenen Protokoll. Im ersten Schritt konnten neben der Aktivierung der DNA-Taq-Polymerase die dsDNA-Sequenzen bei 95°C zu ssDNA-Abschnitten denaturieren. Im Anschluss daran lagerten sich bei einer für den Primer spezifischen Anealing-Temperatur (X°C) diese an die ssDNA an, um als Startpunkt für die DNA-Taq-Polymerase zu dienen. Bei 72°C erfolgte nun die Neusynthese der zur ssDNA-Sequenzen komplementären DNA-Abschnitte. Dieser Zyklus wurde mehrmals

wiederholt, sodass sich die Gesamtmenge der gesuchten DNA-Abschnitte exponentiell amplifizieren konnte (s. Abb. 3).

PCR-Protokoll:

Zyklus 1	(1x) Step 1	95°C, 15 Minuten
Zyklus 2	(45x) Step 1 (Denaturierung)	95°C, 30 Sekunden
	Step 2 (Annealing)	X°C, 30 Sekunden
	Step 3 (Amplifikation)	72°C, 30 Sekunden
Zyklus 3	(100x) Step 1	50°C, 10 Sekunden
(Temperatursteigerung in 0,5°C-Schritten bis 100°C)		

Die für den iCycler® verwendete Software von Biorad® errechnete schließlich eine auf den PCR-Lauf zugeschnittene Grenze (threshold-line), mit der sich die Gesamtmenge der sich amplifizierenden DNA-Sequenzen schnitt. Die so erhaltenen Ct-Werte (Ct = threshold cycle) der jeweiligen Primer wurden nun auf die Ct-Werte des „Houskeeping“-Gens HPRT bezogen, welches keiner Regulierung unterliegt [23]. Die Real-time-Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht jedoch nur eine relative Aussage über die Expressionsrate der Genabschnitte, da der absolute RNA-Gehalt mit dieser Methode nicht ermittelt werden kann.

Abb. 3

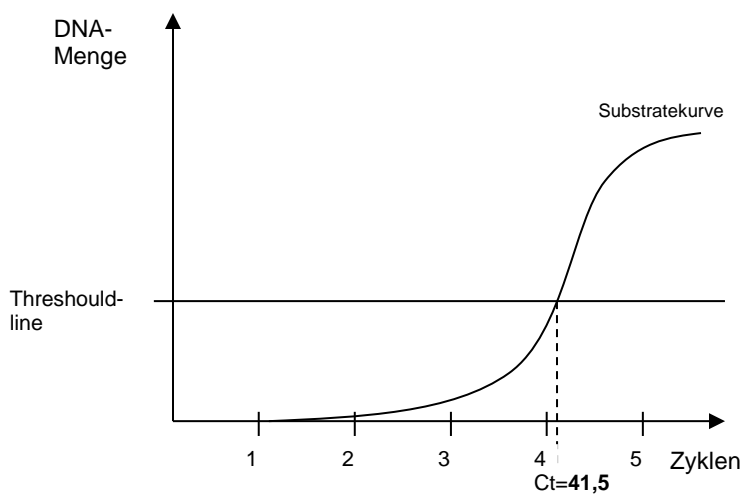


Abbildung 3
Schematische Darstellung
einer PCR-Amplifikations-
kurve.

Die Ct-Werte ergaben sich aus den Schnittpunkten der „threshold-line“ mit der Substratekurve. Der Ct-Wert eines Primers wurde für jede Probe auf das Referenzgen HPRT bezogen und konnte so ausgewertet und verglichen werden.

3.8 Gelelektrophoretische Methoden

3.8.1 Probenaufbereitung

Zum Nachweis der Modifikation und Menge eines linksventrikulären Proteins diente in dieser Studie die Methode der „SDS-Page“ mit Westernblot und anschließenden immunologischen Nachweisverfahren. Zur Aufbereitung der Proben wurden die linken Ventrikel der Versuchstiere nach Präparation (Kap. 3.4) zunächst mit einem Skalpell geviertelt und je $\frac{1}{4}$ eines Ventrikels mit 500 μ l Lysispuffer sowie 5 μ l PMSF (0,1 M) in Eppendorffgefäße (1,5ml) gegeben. Nach einer kurzen Homogenisierungsphase mittels Precyll® (2*20Sec;6500rpm) konnte eine weitere Durchmischung der Gewebestücke durch eine Ultraschallsonde erfolgen. Desweiteren wurde eine Zentrifugation (14000*g; 4°C;10min) durchgeführt, um danach den klaren Überstand (ca 200ml) in neue Eppendorffgefäße (1,5ml) füllen zu können. Das klare Lysat konnte nun mit je 100 ml Laemmli-Puffer versetzt und anschließend für 5 Minuten bei 95°C erhitzt werden. Dieser Schritt diente der Denaturierung der Proteine sowie der Aktivierung des im Laemmli-Puffers enthaltenen Natriumdodecylsulfat (SDS). Im aktivierten Zustand sorgt SDS für ausgeglichene Ladungsverhältnisse an den Proteinstrukturen. Somit lassen sich die Proteine in gelelektrischen Verfahren nach ihrer Größe und nicht aufgrund ihrer Ladungsverhältnisse auftrennen.

Lysis-Puffer der Firma Cell-Signaling-Technology®:

Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
NaCl	150 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Triton	1 %
Phosphat	2,5 mM
β -Glycerolphosphat	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
Leupeptin	1 μ g/ml

Laemmli-Puffer:

Tris-HCl	50 mM
SDS	2 % (w/v)
Natriumvanadat	10 % (v/v) (1 mM)
Mercaptoethanol	10 % (v/v)
(pH 6,7)	

3.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die nach Lämmli modifizierte Gelelektrophorese wurde ein Biometra®-Kammersystem verwendet [44]. Dadurch konnte die diskontinuierliche, gelelektrophoretische Proteinauftrennung in zwei getrennten Gelen gleichzeitig ermöglicht werden. Zuerst wurden 4 Glasplatten mit Ethanol (70%) gereinigt um danach je zwei Platten auf jeder Seite der Kammer zu befestigen. Ein Silikonschlauch zwischen den Glasplatten verhinderte ein Auslaufen des Gels nach unten bzw. zur Seite. Zudem befanden sich je zwei Abstandshalter aus Kunststoff an den Außenseiten zweier Platten. Anschließend wurde das Trenngel mit einer Glaspipette (20 ml) bis auf einer Höhe von ca. 2/3 zwischen die Glasplatten gegossen und mit einer dünnen Wasserschicht überlagert. Es konnte nun bei Raumtemperatur für mindestens zwei Stunden auspolymerisieren.

Trenngel (12,5 %; Mengenangabe jeweils für ein Trenngel):

AA/BA (30:1)	12,5 ml
Trenngelpuffer (pH 8,6)	7,5 ml
Aqua bidest	10,0 ml
SDS (10%)	300 µl
APS (10%)	200 µl
TEMED	25 µl

Trenngelpuffer:

Tris-HCl (pH 8,6)	1,5 M
-------------------	-------

Nach Verwerfen des Wasserüberstandes wurde das obere Drittel zwischen den Glasplatten mit Sammelgel aufgefüllt und Platzhaltekömme für 18 Probestaschen eingesetzt. Die sich anschließende Polymerisierungsphase des Sammelgels betrug dabei mindestens 30 Minuten. Nach ausreichender Härtung des Gels konnten die

Kämme entfernt und die Gelkammer mit Laufpuffer befüllt werden. Je 20 µl der vorbereiteten Proben wurden nun pro Geltasche des Sammelgels mittels Hamilton-Spritze aufgetragen. Die erste Geltasche blieb für den Laufmarker ausgespart. Dieser „Rainbow-Marker“ enthielt farblich markierte Proteine bekannter Größe und ließ somit die Höhe der aufgetrennten Proteine makroskopisch erkennen. Schließlich wurde die Gelkammer an ein Netzgerät angeschlossen, um die Gelelektrophorese für 4 Stunden bei einer angelegten Spannung von 200 V durchführen zu können.

Sammelgel (Mengenangabe jeweils für ein Sammelgel):

AA/BA (30:1)	1,2 ml
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	2,5 ml
Aqua bidest	6,4 ml
SDS (10%)	50 µl
APS (10%)	100 µl
TEMED	12 µl

Sammelgelpuffer:

Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 M
-------------------	-------

Laufpuffer:

Glycin	1,44% (wt/vol)
Tris-HCl	0,3% (wt/vol)
SDS	0,1% (wt/vol)

3.8.3 Western-Blot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese erfolgte das Übertragen der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Blotmembran (0,2 µm Porengröße), dem sogenannten „Blotting“. Die Methode richtete sich nach dem Verfahren des „semi-dry-blotting“ von Kyhse-Andersen aus dem Jahre 1984 [43]. Es wurden zunächst drei Filterpapiere, deren Größe die des Polyacrylamidgels entsprachen, in Anodenpuffer geschwenkt und auf die Anode einer Blotkammer gelegt. Nach einer kurzzeitigen Aktivierungsphase in Methanol (100%; 3 Minuten) konnte die PVDF-Membran auf die Filterpapiere gelegt werden. Nun wurde das Polyacrylamidgel vorsichtig von den Glasplatten der Elektrophoresekammer gelöst und luftblasenfrei auf die Blotmembran gebettet. Danach schwenkte man drei weitere Filterpapiere in Kathodenpuffer und

überschichtete damit das Polacryamidgel. Schließlich bildete der Kathodendeckel das Dach der Blotkammer, die nun in Betrieb genommen werden konnte. Die angelegte Stromstärke richtete sich dabei nach der Größe der PVDF-Membran und lag durchschnittlich bei 100 mA pro Gel bzw. Blotmembran (0,8 mA/cm²). Die Dauer des „blottings“ wurde durch die zu untersuchende Proteingröße bestimmt (>40kD = 2 Stunden; <40kD = 1 Stunde).

Anodenpuffer:

Tris-HCl (pH=10,4)	30 mM
Methanol	20 % (vol/vol)

Kathodenpuffer:

Tris-HCl (pH=9,4)	25 mM
6-Aminohexansäure	40 mM
Methanol	20 % (vol/vol)

3.8.4 Immunochemischer Proteinnachweis

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran mussten die verbliebenen Proteinbindestellen der Blotmembran geblockt werden. Hierfür wurde die PVDF-Membran für eine Stunde in einem Blockpuffer geschwenkt.

Blockpuffer:

1 x TBS	10 ml
Tween20	0,1 % (vol/vol)
BSA	5 % (w/vol)

Anschließend konnte die Blotmembran für mindestens eine Stunde in einer Antikörperlösung mit dem Primärantikörper inkubiert werden.

Antikörperlösung:

1 x TBS	10 ml
Tween20	0,1 % (vol/vol)
BSA	5 %

Antikörper 1 : X (jeweilige vom Hersteller angegebene Konzentration)

Es folgten mehrere Waschschrirte mit einer Waschlösung (3 x 10 Minuten), um freie Antikörper zu entfernen und ein unspezifisches Binden zu verhindern.

Waschlösung:

1 x TBS	20 ml
Tween20	0,1 % (vol/vol)

Daraufhin wurde die Blotmembran für mindestens eine Stunde in einer Antikörperlösung mit dem Sekundäntikörper inkubiert, welcher sich gegen den Primäntikörper richtete. Nach wiederholtem Waschen mit der obigen Waschlösung (2 x 10 Minuten) sowie einmal in 5 ml 1xTBS war die Membran nun bereit für die Detektion. Der Zweitantikörper besaß eine Phosphataseaktivität und konnte mittels ECL-Entwicklerlösungen (2 x 4ml) durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden. Eine spezielle Kameraapparatur, der sogenannte Chemolumineszenzdetektor, erfasste die Lumineszenzwerte der einzelnen Proben, die anschließend durch die Software Image-Quant[®] densitometrisch ausgewertet werden konnten.

3.9 Statistik

Die in dieser Arbeit gewonnen Daten und Messwerte wurden als Mittelwerte (MW) und deren Standardabweichungen (SD) zusammengefasst und dargestellt. Da bis zu 4 Gruppen (z.B. SDR; TGR; SDR+Capt.; TGR+Capt.) miteinander verglichen werden sollten, wurde zunächst eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Anschließend wurden die Daten einer post-hoc-Analyse mittels Student-Newman-Keuls-Test unterzogen. Bei einem Vergleich von lediglich zwei Gruppen (z.B. K; Ang2) wurden die Daten mittels t-Test auf Signifikanz überprüft. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde der Levene-Test herangezogen. Das Signifikanzniveau wurde in dieser Studie auf $p < 0,05$ bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1 Körper- und Organgewichte

In der vorliegenden Studie wurden zunächst die Körper-, Lungen- und Nierengewichte der Versuchstiere untersucht, um mögliche extrakardiale Einflüsse einer erhöhten Reninexpression feststellen zu können. Hierfür wurden Körper- und Organgewichte post mortem ermittelt und auf die Tibialängen (TL) der jeweiligen Tiere bezogen. Dabei zeigten die Messwerte eine signifikante Erhöhung der Körper- und Nierengewichte bei druckbelasteten TGR (Tab. 2). Eine Behandlung der Tiere mit Captopril konnte einerseits das Körpergewicht der TGR reduzieren, andererseits das Lungen- und Nierengewicht annähernd auf dem Niveau ihrer Kontrollen halten.

Tab. 2

Gewicht/TL (g/cm)	SDR (n=18)	TGR (n=16)	SDR + Capt. (n=16)	TGR + Capt. (n=15)
Körper	0,831 ± 0,133	0,980 ± 0,150 *	0,719 ± 0,040	0,718 ± 0,051
Lunge	0,473 ± 0,047	0,559 ± 0,077	0,567 ± 0,188	0,554 ± 0,141
Niere	0,535 ± 0,075	0,602 ± 0,055 *	0,469 ± 0,049	0,504 ± 0,064

Tab. 2:

Darstellung der Körper-, Lungen- und Nierengewichte. Die Körper- und Nierengewichte sind bei TGR gegenüber SDR signifikant erhöht. Captopril konnte bei TGR das jeweilige Gewicht annähernd auf dem Niveau der Kontrollen halten. Daten aus je n = 15-18 Tieren pro Gruppe, * = p < 0,05 vs Kontrolle (SDR).

4.2 Hämodynamik und linksventrikuläre Funktion

4.2.1 Entwicklung einer Angiotensin-II induzierten Hypertonie bei TGR

In einem weiteren Experiment dieser Studie wurde die erfolgreiche Hypertonieentwicklung der unbehandelten Reninratten (TGR) überprüft. Dies sollte die Grundvoraussetzung für alle weiteren Untersuchungen bilden. Unbehandelte TGR müssten aufgrund der hohen Reninexpression und der damit gesteigerten Angiotensin-II-Aktivität einen wesentlich höheren systemischen Blutdruck vorweisen, als ihre Sprague-Dawley-Kontrolltiere (SDR) [63]. Die Daten aus Abb. 4 zeigen eine starke Erhöhung systolischer und diastolischer Blutdruckwerte bei unbehandelten TGR gegenüber den SDR. Um einen isolierten Renineffekt auf das Rattenmyokard beobachten zu können, wurde ein Teil der TGR durchgehend mit Captopril therapiert (TGR + Capt.). Durch Gabe des ACE-Inhibitors konnte die Bildung von Angiotensin-II weitgehend verhindert und somit der Blutdruck der transgenen Tiere (TGR + Capt.) auf dem Niveau der Kontrollgruppen (SDR bzw. SDR + Capt.) gehalten werden.

Abb. 4

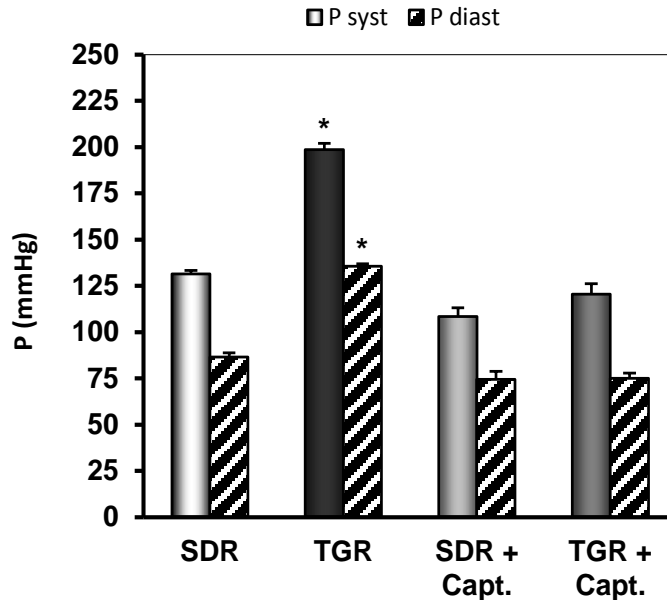


Abbildung 4:
Diagramm der in vivo gemessenen Blutdruckwerte.

Die hier dargestellten Blutdruckwerte (P) der Tiere wurden in vivo mittels „Tail-cuff-Methode“ bis zum 5. Lebensmonat bestimmt und gemittelt. Sowohl systolische, als auch diastolische Blutdruckwerte waren bei unbehandelten TGR gegenüber ihren Kontrolltieren (SDR) signifikant erhöht. Eine Captopriltherapie konnte bei TGR einen möglichen Blutdruckerhöhung erfolgreich verhindern. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Gruppen aus je n = 4 Tieren; * = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR).

4.2.2 Linksventrikulärer Druck und Herzfrequenz bei TGR

Anschließend wurde die linksventrikuläre Funktion der isoliert- und kochsalz-perfundierten Rattenherzen ex vivo ermittelt. Es zeigte sich, dass sowohl unbehandelte, druckbelastete als auch mit Captopril behandelte TGR gegenüber ihren Kontrollen deutlich erhöhte linksventrikuläre Drücke (LVDP) aufwiesen. Der LVDP errechnete sich dabei aus der Differenz der systolischen und diastolischen Druckwerte des linken Ventrikels. Um eine Myokardhypertrophie als mögliche Ursache der verbesserten linksventrikulären Funktion ausschließen zu können, wurden die Messwerte auf das Herzgewicht der jeweiligen Tiere bezogen. Aus Abb. 5 lässt sich ableiten, dass ein erhöhter LVDP behandelter TGR nicht druckinduziert ist, sondern Renin-abhängig erfolgt.

Abb. 5

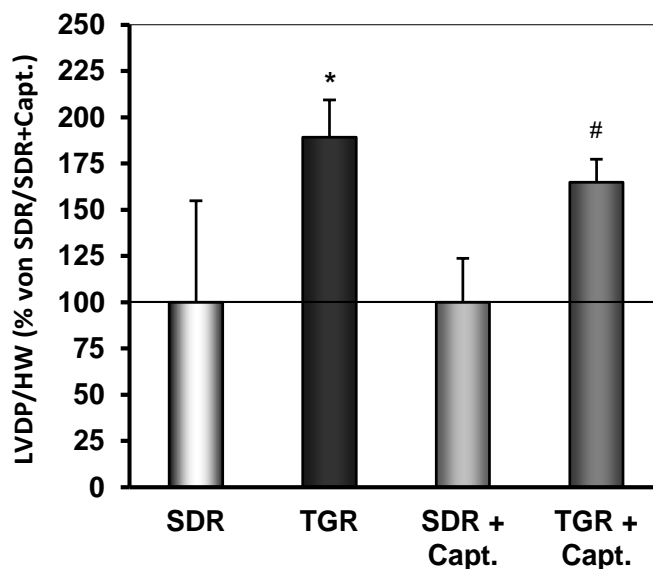


Abbildung 5:

Diagramm des ex vivo ermittelten linksventrikulären Druckaufbaus (LVDP).

Der LVDP wurde hier ex vivo an der Langendorffanlage bestimmt und ist bei druckbelasteten TGR wie auch bei den mit Captopril behandelten TGR gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht. Es sind Mittelwerte \pm SD der Gruppen aus je n = 9-10 Tieren, * = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR) bzw. # = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR + Capt.) dargestellt. Das 100%-Niveau entspricht bei SDR 44 mmHg/g und bei SDR + Capt. 46 mmHg/g.

Die Herzfrequenz wurde sowohl in vivo per „Tailcuff-Methode“ als auch ex vivo an der Langendorffanlage gemessen. Die in Tab. 3 dargestellten Mittelwerte der Herzraten zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Tab. 3

Herzfrequenz	SDR	TGR	SDR + Capt.	TGR + Capt.
In vivo (je n=4)	326 ± 4/min	343 ± 7/min	348 ± 29/min	374 ± 10/min
Ex vivo (je n=9-10)	211 ± 28/min	211 ± 14/min	211 ± 23/min	187 ± 22/min

Tabelle 3:

Darstellung der Herzfrequenzen. Dargestellt sind die in und ex vivo gemessenen Mittelwerte \pm SD der Herzfrequenzen aller 4 Gruppen. Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen TGR und SDR feststellen.

4.2.3 Linksventrikuläre Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit bei TGR

Des Weiteren wurde eine gesteigerte maximale linksventrikuläre Kontraktions- (+dP/dt) und Relaxationsgeschwindigkeit (-dP/dt) bei isolierten Herzen der TGR ex vivo gemessen. Auch hier sind beide Parameter auf das Herzgewicht der jeweiligen Rattenherzen bezogen worden. Aus Abb. 6 wird ersichtlich, dass die linksventrikuläre Leistungsfähigkeit bei TGR gegenüber den nicht-transgenen Tieren gesteigert ist. Zudem scheint die ACE-Inhibition durch Captopril sowie die daraus resultierenden hohen (Pro-)Reninspiegel die linksventrikuläre Funktion der Tiere weiter zu verbessern.

Abb. 6

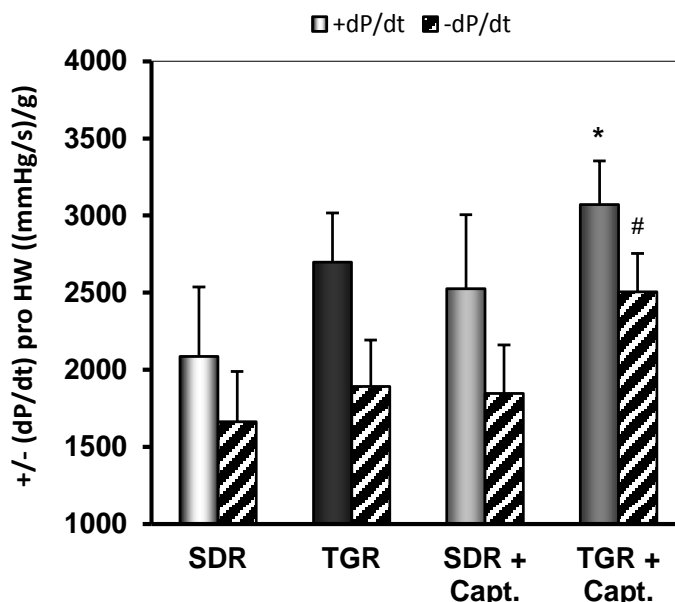


Abbildung 6:

Diagramm der ex vivo gemessenen maximalen Kontraktions- (+dP/dt) und Relaxationsgeschwindigkeiten (-dP/dt).

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der ex vivo an der Langendorffanlage ermittelten maximalen Kontraktions- (+dP/dt) und Relaxationsgeschwindigkeiten (-dP/dt) welche auf das jeweilige Herzgewicht (HW) bezogen wurden. Es zeigt, dass TGR, unabhängig einer Captopriltherapie deutlich verbesserte Funktionswerte gegenüber ihren Kontrollen aufweisen. Es sind Daten aus je n = 9-10 Tieren pro Gruppe, * = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR) bzw. # = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR + Capt.).

4.3 Linksventrikuläre druckinduzierte Hypertrophie bei TGR

Durch die chronische Hypertonie und der damit verbundenen gesteigerten Belastung des linken Ventrikels, entwickelten unbehandelte TGR eine deutliche links-ventrikuläre Hypertrophie. Diese konnte durch Bestimmung des linksventrikulären Gewichts bezogen auf die Tibialängen der jeweiligen Ratten post mortem ermittelt werden. Die linken Ventrikel der unbehandelten TGR waren ca. 20% schwerer als bei den Kontrolltieren (SDR). Eine Reduktion des linksventrikulären Gewichts wurde bei TGR unter Captopriltherapie festgestellt.

Abb. 7

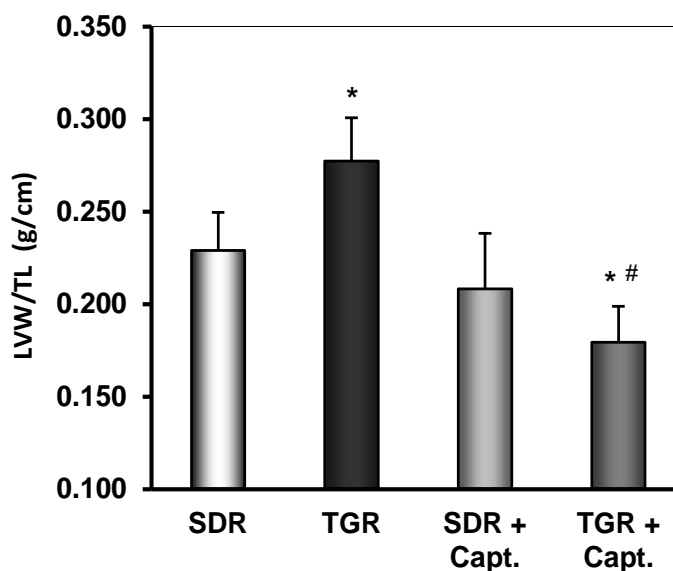


Abbildung 7:
Diagramm des linksventrikulären Gewichts (LVW).

Das linksventrikuläre Gewicht (LVW) wurde nach Rattenherzpräparation bestimmt und auf die ebenfalls post mortem gemessene Tibialänge (TL) bezogen. Unbehandelte TGR zeigten eine signifikante Erhöhung des linksventrikulären Gewichts. Bei den mit Captopril behandelten TGR war dieses um ca. 20% reduziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus je n = 9-10 Tieren pro Gruppe; * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle (SDR) bzw. # = $p < 0,05$ vs. Kontrolle (SDR + Capt.).

Die linksventrikuläre Hypertrophie bei unbehandelten TGR sowie die Abnahme des linksventrikulären Gewichts bei behandelten TGR konnte auch auf molekularer Ebene bestätigt werden. Als Hypertrophieparameter diente das natriuretische Peptid ANP, dessen mRNA-Expressionsrate mit dem linksventrikulären Gewicht korreliert [56]. Die RT-PCR-Daten in Abb. 8 zeigen eine deutliche Zunahme der ANP- mRNA-Expression bei unbehandelten TGR. Im Gegensatz dazu ist diese bei den mit Captopril therapierten TGR um mehr als die Hälfte reduziert.

Abb. 8

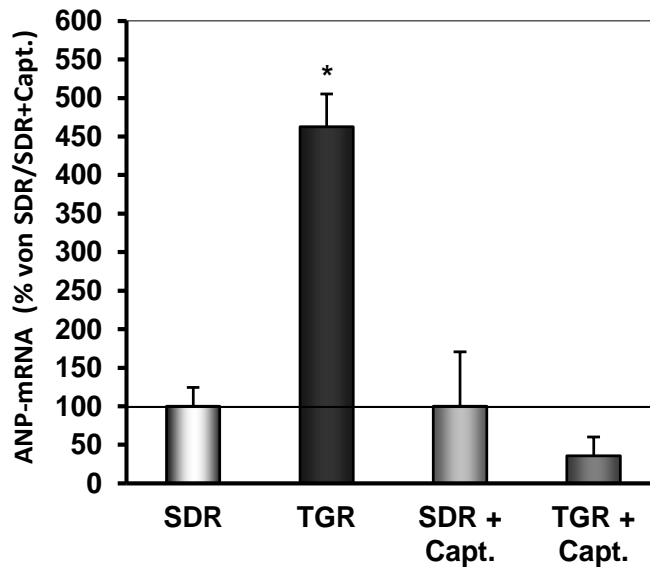


Abbildung 8:
Diagramm zur linksventrikulären ANP-mRNA-Expression.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der ANP-mRNA-Expression aus linksventrikulärem Ganzherzmaterial. Die Expressionsrate an ANP-mRNA ist bei den unbehandelten TGR um das ca. 4,5 fache höher als bei der Kontrollgruppe SDR. Bei den behandelten TGR ist sie um mehr als die Hälfte herunterreguliert. Daten aus je n = 9-10 Tieren pro Gruppe, * = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR).

4.4 Linksventrikuläre β -adrenerge Ansprechbarkeit bei TGR

4.4.1 Linksventrikuläre Funktion bei TGR nach Isoprenalingabe

Da das RAAS mit dem sympathischen System eng verbunden ist, wurde nun die linksventrikuläre β -adrenerge Ansprechbarkeit bei TGR näher untersucht. Als Sympathomimetikum diente in unseren Versuchen Isoprenalin (Isoproterenol). Es aktiviert unselektiv sowohl β_1 - als auch β_2 -Adrenozeptoren [29, 41]. Bei einer regelrechten Anbindung des β -adrenergen Systems an intrazelluläre Signalkaskaden der Myozyten wirkt Isoprenalin daher positiv inotrop. In der vorliegenden Studie wurden isolierte Rattenherzen aller 4 Versuchsgruppen an der Langendorffanlage für 10 Minuten mit Isoprenalin (10nM) perfundiert und die Funktionsdaten aufgezeichnet. Anschließend sind die Messwerte (LVDP; -dP/dt; +dP/dt) auf das Herzgewicht der zugehörigen Tiere bezogen worden. Die Ausgangswerte der LVDP's/HW lagen bei

TGR - wie schon in Kap. 4.2.2 beobachtet - deutlich über denen ihrer korrespondierenden Kontrollen. Jedoch zeigte sich sowohl bei den druckbelasteten, als auch bei den druckentlasteten TGR ein vermindertes Ansprechen auf Isoprenalin. Der zu erwartende Anstieg des LVDP/HW nach Isoprenalinperfusion blieb bei den TGR verglichen mit ihren Kontrollen deutlich zurück.

Abb. 9

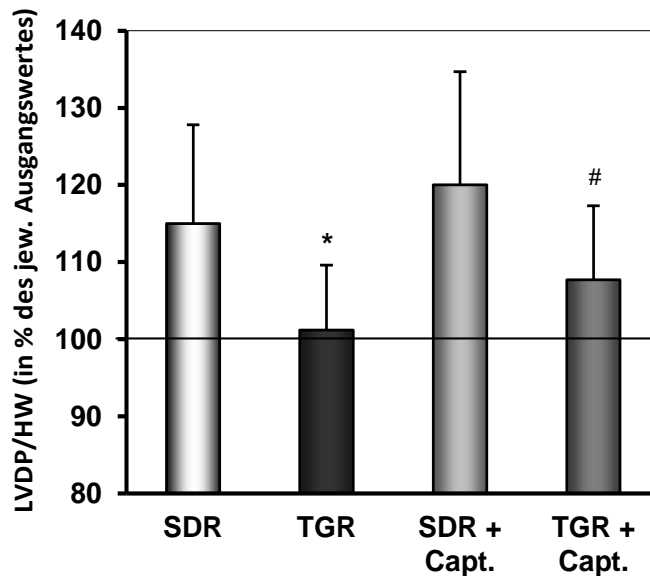


Abbildung 9:

Diagramm zur linksventrikulären Funktion nach Isoprenalinstimulation Teil 1.

Funktionsdaten der isolierten und mit Isoprenalin (10nM/l) an der Langendorffanlage perfundierten Rattenherzen zeigen eine reduzierte β -adrenerge Ansprechbarkeit bei TGR. Der zu erwartende Anstieg des LVDP/HW blieb bei TGR nach 10 Minuten Perfusion verglichen mit den Kontrolltieren deutlich zurück. Die Mittelwerte \pm SD in % aus je $n = 4$ Tieren pro Gruppe beziehen sich auf den jeweiligen LVDP/HW der Gruppen vor Perfusion (=100%-Niveau). Der gemittelte LVDP/HW vor Perfusion betrug für SDR 31,8 mmHg/g, TGR 55,1 mmHg/g, SDR+Capt. 37,8 mmHg/g und TGR+Capt. 51 mmHg/g; * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle (SDR) bzw. # = $p < 0,05$ vs. Kontrolle (SDR + Capt.).

Darüber hinaus wurde während der Isoprenalinperfusion auch die linksventrikuläre Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit bestimmt. Erstaunlicherweise zeigte sich hier bei den transgenen Tieren eine verbesserte linksventrikuläre Leistungsfähigkeit trotz verminderter β -adrenerger Ansprechbarkeit. Die Perfusionsdaten der Herzen der transgenen Reninratten zeigen also ein vermindertes Ansprechen auf Isoprenalin bei ansonsten besseren linksventrikulären Funktionsparametern gegenüber den SDR-Kontrolltieren.

Abb. 10

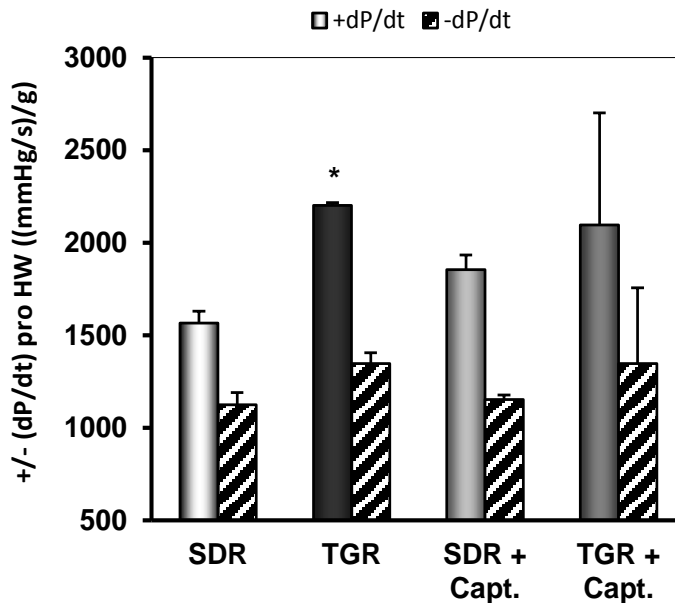


Abbildung 10:

Diagramm zur linksventrikulären Funktion nach Isoprenalinstimulation Teil 2.

Dieses Schaubild zeigt Mittelwerte \pm SD der ex vivo ermittelten maximalen Kontraktions- (+dP/dt) und Relaxationsgeschwindigkeiten (-dP/dt) nach einer Isoprenalinperfusion (10nM) von 10 Minuten. Beide Parameter sind auf das jeweilige Herzgewicht (HW) der Tiere bezogen worden. Die Darstellung verdeutlicht, dass eine verbesserte linksventrikuläre Funktion bei TGR trotz verminderter β -adrenerger Ansprechbarkeit auch nach einer Isoprenalinperfusion gegenüber den Kontrollen (SDR) vorliegt. Es sind Daten aus je n = 4 Tieren pro Gruppe; * = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR).

4.4.2 Genexpression des β_1 - und β_2 - Adrenozeptors bei TGR

Die in Kap. 4.4.1 beobachtete verminderte β -adrenerge Ansprechbarkeit konnte auch auf molekularer Ebene nachvollzogen werden. Die RT-PCR-Daten in Abb. 11 zeigen eine verminderte mRNA-Expression des β_1 -Adrenozeptors (ARB1/2) sowohl bei den druckbelasteten als auch bei den mit Captopril therapierten TGR. Die Genexpression des β_2 -Adrenozeptors verblieb einerseits bei den druckbelasteten TGR auf dem Niveau ihrer Kontrollen, andererseits zeigte sie sich auch in der Gruppe der behandelten TGR vermindert.

Abb. 11

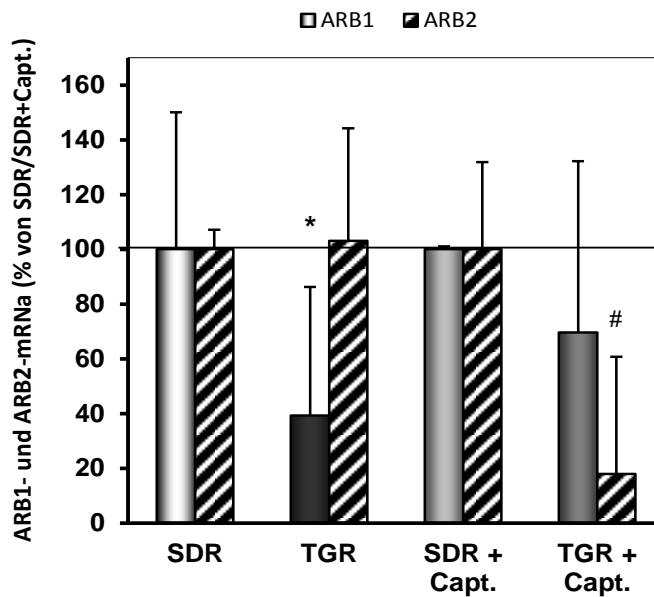


Abbildung 11:
Diagramm der kardiomyozytären mRNA-Expression des β_1 - und β_2 -Adrenozeptors (ARB1/2).

Diese Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD der mRNA-Expressionsdaten des β_1 - und β_2 -Adrenozeptors (ARB1/2) isolierter Kardiomyozyten. Die mRNA-Expression des β_1 -Rezeptors (ARB1) ist bei TGR stark vermindert. Die des β_2 -Rezeptors (ARB2) bleibt bei unbehandelten TGR auf Höhe der Kontrolle. Bei behandelten TGR reduzierte sich jedoch ebenfalls die mRNA-Expressionsrate des ARB2. Daten aus je n = 6-8 Tieren pro Gruppe; * = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR) bzw. # = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR + Capt.).

4.4.3 Ankopplung des β -adrenergen Systems an intrazelluläre Prozesse bei TGR

Es wurde jetzt untersucht, welchen Einfluss die verminderte Ansprechbarkeit der β -Adrenozeptoren auf die β -adrenerge Hypertrophie zeigt. Die Ornithindecarboxylase (ODC) besitzt als Schlüsselenzym des Polyaminstoffwechsels einen cAMP-abhängigen Promotor und unterliegt daher einer β -adrenergen Kontrolle [84]. Auch hier zeigt sich bei den TGR aufgrund der verschlechterten β -adrenergen Ansprechbarkeit eine verminderte Expression an ODC-mRNA in isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten. Dabei ist es nicht relevant, ob TGR mit Captopril behandelt wurden oder nicht.

Abb. 12

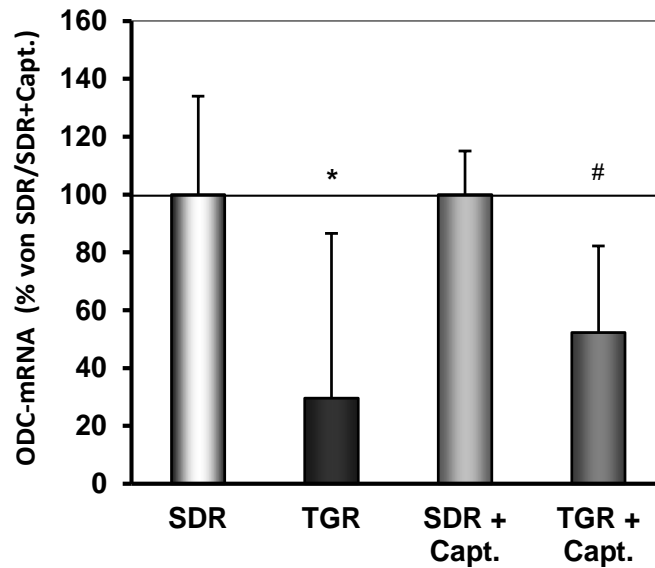


Abbildung 12:
Diagramm der linksventrikulären ODC-mRNA-Expression.

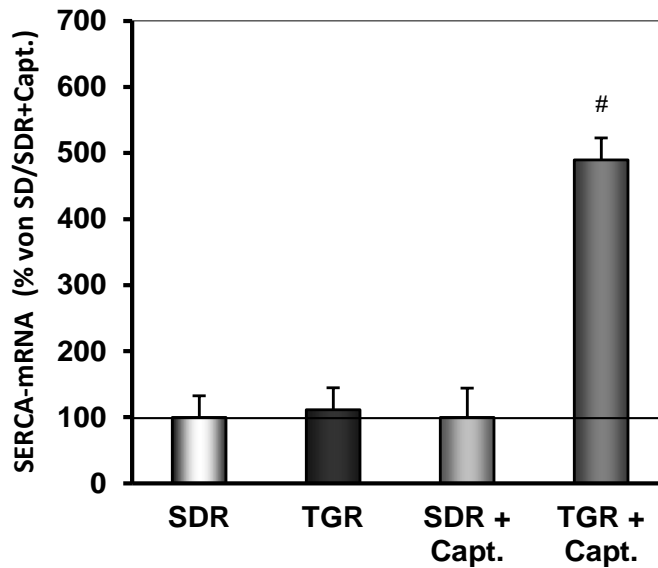
Die Mittelwerte \pm SD der RT-PCR-Daten isolierter, linksventrikulärer Kardiomyozyten zeigen eine verminderte ODC-mRNA-Expression bei TGR. Das Ausmaß der Reduktion korreliert dabei mit dem Grad der herabregulierten β_1 -Rezeptoren. Die Behandlung mit Captopril ist dabei unerheblich. Daten aus je $n = 6-8$ Tieren pro Gruppe, * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle (SDR) bzw. # = $p < 0,05$ vs. Kontrolle (SDR + Capt.).

4.5 Die Calciumhomöostase bei TGR

4.5.1 SERCA2a

Es galt nun, die verbesserte linksventrikuläre Funktion der TGR auch auf molekularer Ebene näher zu untersuchen. Hierbei nimmt die Regulation des Calciumhaushaltes im Kontraktions- und Relaxationsverhalten der Kardiomyozyten eine zentrale Stellung ein [42]. In einem ersten Schritt wurde die mRNA-Expression von SERCA2a in isolierten ventrikulären Myozyten mittels RT-PCR bestimmt. Die in Abb. 13 dargestellten Messwerte zeigen insbesondere bei den behandelten TGR eine deutliche Steigerung der SERCA2a-mRNA-Expression.

Abb. 13

**Abbildung 13:****Diagramm der basalen kardiomyozytären SERCA2a-mRNA-Expression.**

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der SERCA-mRNA-Expressiondaten isolierter Kardiomyozyten. TGR weisen eine Steigerung der SERCA2a-Expression gegenüber ihren Kontrollen auf. Insbesondere die mit Captopril therapierten TGR zeigen eine Erhöhung der Expression um fast mehr als 500%. Daten aus je n = 6-8 Tieren pro Gruppe; # = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR + Capt.).

Um die in Abb. 13 dargestellte Steigerung der SERCA2a-Expression auf einen möglichen Renineffekt zurückführen zu können, wurden isolierte Kardiomyozyten von Wistar-Hannover-Ratten für jeweils 24 Stunden mit Renin- bzw. Angiotensin-II inkubiert. Als Kontrollgruppe (K) dienten isolierte Kardiomyozyten der gleichen Präparation, die ausschließlich mit CCT-Medium behandelt worden waren. Es zeigte sich bei den mit Renin behandelten Zellen eine bis zu 1,3-fach erhöhte SERCA2a-mRNA-Expression. Diese Beobachtung war jedoch nicht signifikant.

Abb. 14

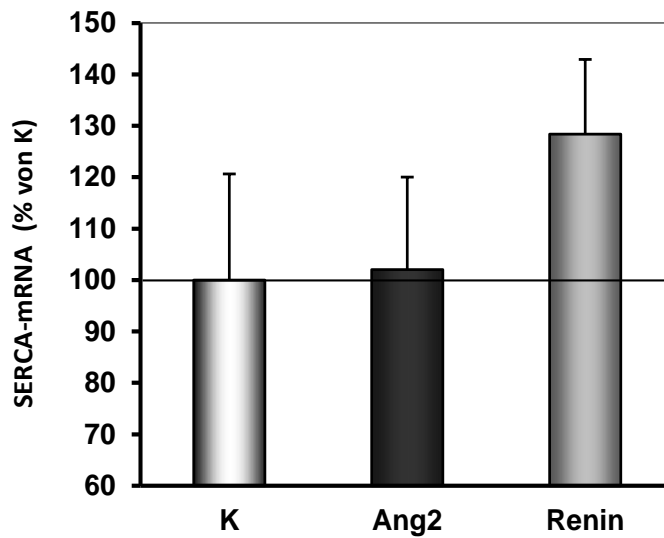


Abbildung 14:
Diagramm der kardiomyozytären SERCA2a-mRNA-Expression unter Einfluss von Renin und Angiotensin-II (Ang2).

Die Mittelwerte \pm SD isolierter Kardiomyozyten zeigen unter Renininkubation (10nM;24h) eine 1,3-fache Erhöhung der SERCA2a-mRNA-Expression gegenüber den Kontrollzellen (K). Eine Behandlung mit Angiotensin2 (Ang2) steigerte die SERCA2a-mRNA-Expression nur geringfügig. Beide Beobachtungen waren statistisch nicht signifikant. Daten aus je $n = 6$ Wistar-Hannover-Rattenherzpräparationen pro Gruppe.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nun untersucht, inwiefern sich die Steigerung der SERCA2a-Expression auch auf Proteinebene widerspiegelt. Durch immunochemische Nachweisverfahren ließ sich eine stark verminderte SERCA2a-Proteinexpression bei unbehandelten TGR feststellen. Die densitometrisch ermittelten SERCA2a-Werte wurden dabei auf das Referenzprotein Aktin bezogen. Aus Abb. 15 wird zudem ersichtlich, dass eine Therapie mit Captopril den intrazellulären SERCA2a-Proteingehalt bei TGR steigern konnte.

Abb. 15

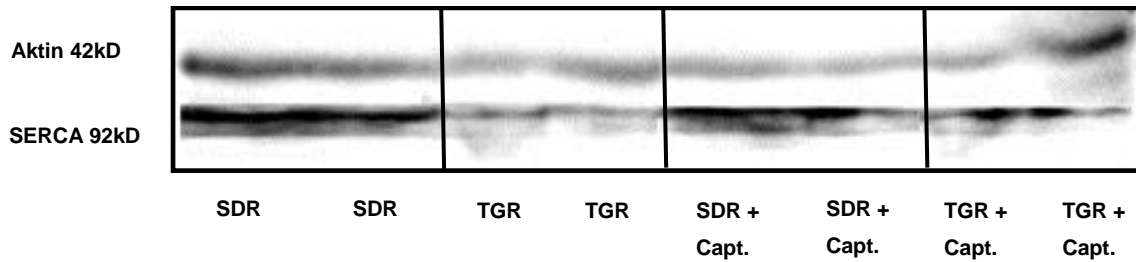


Abbildung 15:
Ausschnitt eines Western-Blots zur Ermittlung des linksventrikulären SERCA2a-Proteingehalts.

Repräsentativ dargestellte, mit Anti-Aktin- (obere Reihe) und Anti-SERCA2a-Antikörpern (untere Reihe) markierte Banden eines Western-Blots. Die Proteine wurden aus linksventrikulärem Ganzherzgewebe gewonnen.

Abb. 16

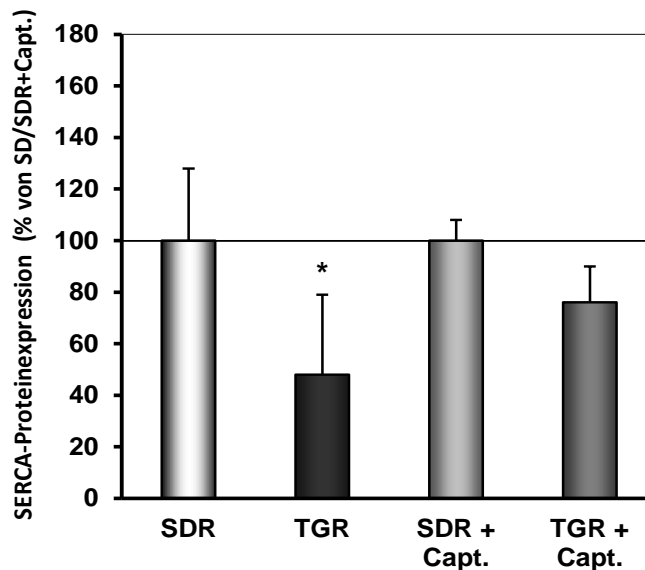


Abbildung 16:
Diagramm der linksventrikulären SERCA2a-Proteinexpression.

Diese Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD der densitometrisch ausgewerteten Banden des in Abb. 15 repräsentativ dargestellten Westernblots. Die so aus Ganzherzmaterial ermittelte SERCA2a-Proteinexpression ist bei TGR gegenüber den Kontrollen stark erniedrigt. Die mit Captopril therapierten TGR zeigen jedoch eine diskrete Steigerung der SERCA2a-Menge gegenüber unbehandelten TGR. Daten aus je $n = 4$ Tieren pro Gruppe; * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle (SDR).

4.5.2 PLB

Da PLB in phosphoryliertem Zustand von SERCA2a abdissoziiert und dieses wiederum auf diese Weise aktiviert wird, wurde anschließend der linksventrikuläre Phosphorylierungsgrad des PLB-Proteins nach einer Isoprenalinperfusion von 10 Minuten bestimmt.

Abb. 17

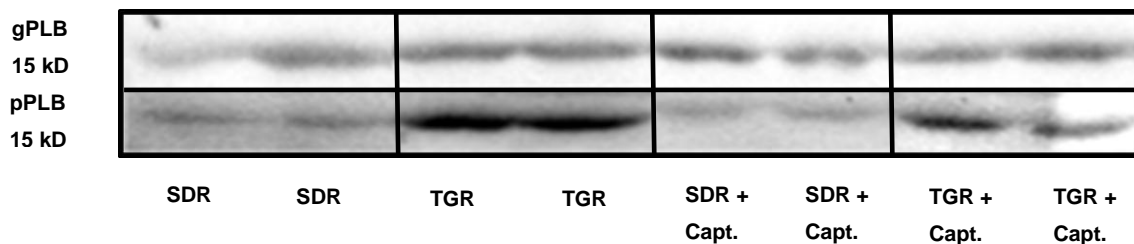


Abbildung 17:
Ausschnitt eines Western-Blots zur Ermittlung der linksventrikulären PLB-Phosphorylierung.

Repräsentativ dargestellte, mit Anti-gPLB- und Anti-pPLB-(Ser16)Antikörpern markierte Banden eines Western-Blots. Die Proteine wurden nach Isoprenalinperfusion (10nM;10Min.) aus linksventrikulärem Ganzherzmaterial gewonnen. Es findet sich ein erhöhter Anteil an phosphoryliertem Phospholamban (pPLB) als bei den SDR-Kontrolltieren.

Der in dieser Studie verwendete Anti-pPLB-Antikörper richtete sich gegen die Phosphorylierungsstelle der Aminosäure Serin-16 des PLB. Da Serin-16 als Target der Proteinkinase-A (PKA) gilt, wird damit insbesondere die intrazelluläre Ankopplung des β -adrenergen Systems berücksichtigt. Die densitometrisch ausgewerteten Banden des in Abb. 17 repräsentativ dargestellten Western-Blots zeigen bei TGR einen erhöhten Anteil an phosphoryliertem Phospholamban (pPLB) - bezogen auf das Gesamtpospholamban (gPLB) - gegenüber den korrespondierenden Kontrollen (s. Abb. 18).

Abb. 18

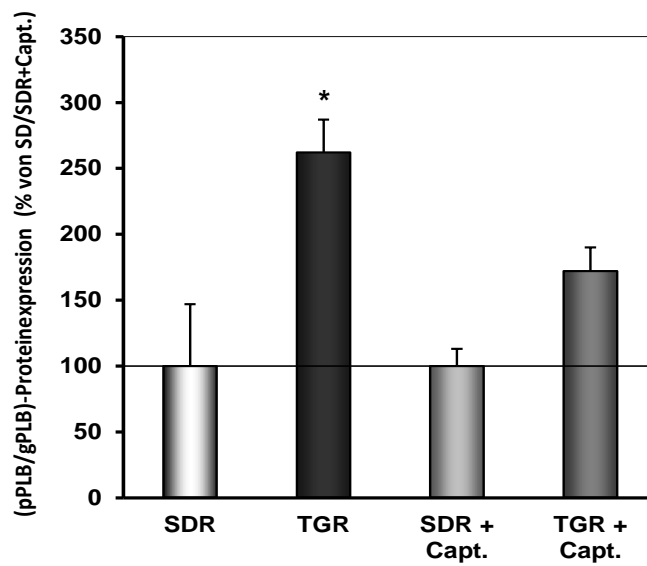


Abbildung 18:
Diagramm des linksventrikulären PLB-Phosphorylierungsgrads.

Diese Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD der densitometrisch ausgewerteten Banden des in Abb.17 repräsentativ dargestellten Westernblots. Der Anteil an phosphoryliertem PLB (pPLB) am Gesamtphospholamban (gPLB) ist nach einer linksventrikulären Isoprenalinstimulation von 10 Minuten (10nM) bei TGR ca. 1,5-2,5-fach höher als bei SDR. Daten aus je n = 4 Tieren pro Gruppe; * = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR).

4.5.3 NCX

Bei der Herzmuskelrelaxation wird Ca^{2+} jedoch nicht ausschließlich über die SERCA2a aus dem Zytosol eliminiert. Der im Sarkolemm angesiedelte Na/Ca-Austauscher (NCX) befördert je nach extra- bzw. intrazellulärem Konzentrationsgradienten Ca^{2+} in das jeweilige Kompartiment. Dieser Vorgang erfolgt aber nicht so effektiv und schnell wie der Rücktransport des Ca^{2+} mittels SERCA2a in das SR [42]. Es war daher wichtig, das Verhältnis zwischen SERCA2a und NCX auf Expressionsebene zu ermitteln, um weitere Erkenntnisse über die guten linksventrikulären Funktionsparametern bei TGR auf molekularer Ebene zu erlangen. Hierfür wurde die mRNA-Expressionsrate von SERCA2a und NCX isolierter linksventrikulärer Myozyten ermittelt und aufeinander bezogen. Die folgenden Daten zeigen eine ca. 1,7 fache Erhöhung des (SERCA2a-mRNA/NCX-mRNA)-Quotienten bei den mit Captopril therapierten TGR. Eine leichte Reduktion des Quotienten lässt sich hingegen bei unbehandelten TGR beobachten.

Abb. 19

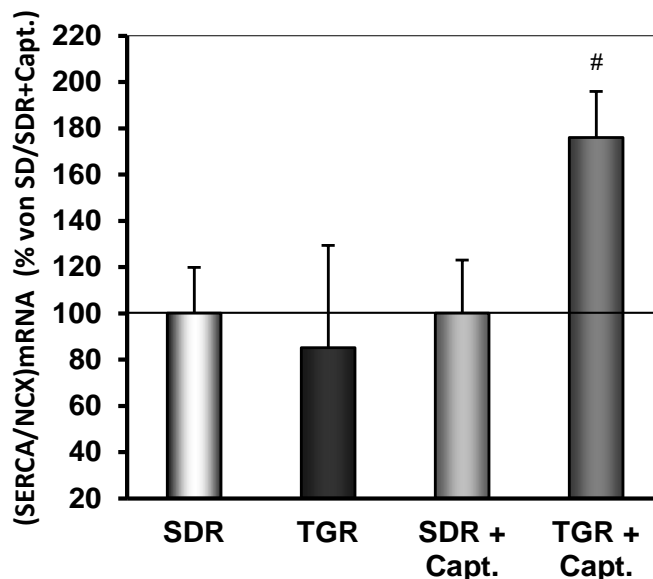


Abbildung 19:

Diagramm zum kardiomyozytären (SERCA2a/NCX)-mRNA-Expressionquotienten.

Das Schaubild zeigt die Mittelwerte \pm SD des Quotienten (SERCA2a/NCX)-mRNA isolierter Myozyten. Bei unbehandelten TGR reduziert sich der Quotient diskret. Bei den mit Captopril behandelten TGR kann ein Anstieg von über 70% gegenüber der korrespondierenden Kontrolle (SDR+Capt.) beobachtet werden. Daten aus je n = 6-8 Tieren pro Gruppe; # = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR + Capt.).

Anschließend wurde die mRNA-Expressionsrate des NCX in isolierten Kardiomyozyten ermittelt, welche mit Renin und Angiotensin-II für 24 Stunden inkubiert worden waren. Aus Abb. 20 lässt sich ableiten, dass die mRNA-Expression des NCX unter Einfluss von Angiotensin-2 signifikant anstieg.

Abb. 20

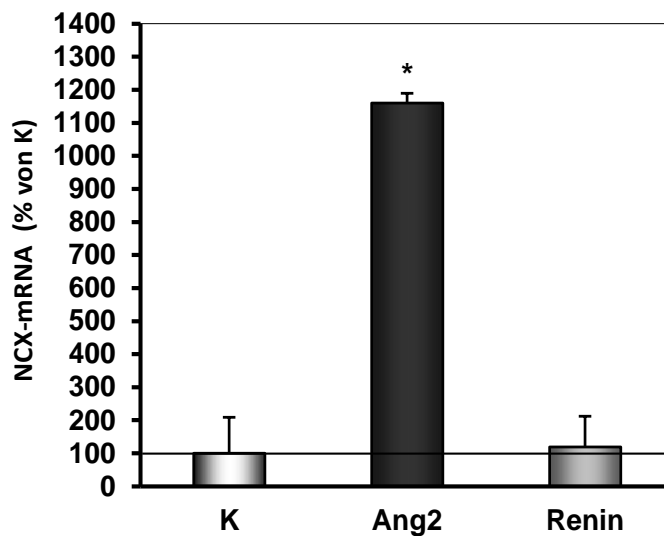


Abbildung 20:

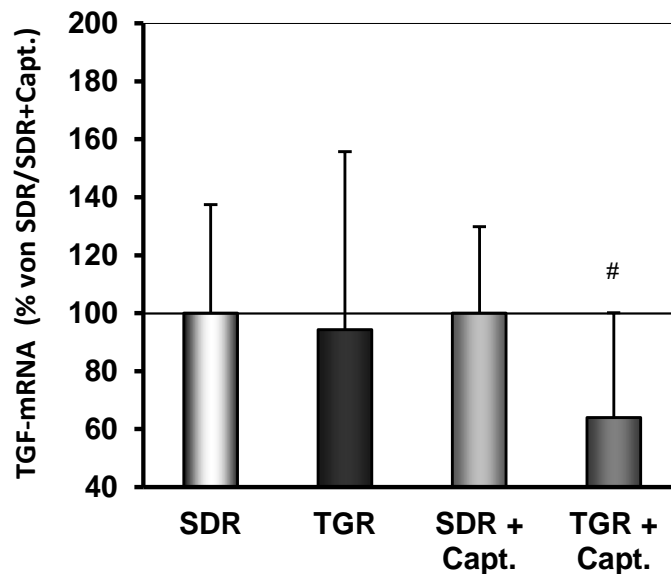
Diagramm der kardiomyozytären NCX-mRNA-Expression unter Einfluss von Renin und Angiotensin-II (Ang2).

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD isolierter Kardiomyozyten die einer Renin- bzw Angiotensin-II-Inkubation für 24 Stunden unterzogen wurden. Kardiomyozyten die ausschließlich mit CCT-Medium behandelt wurden, dienen als Kontrolle (K). Eine Behandlung mit Angiotensin-II (Ang2) erhöhte die NCX-mRNA-Expression deutlich. Daten aus je n = 6 Wistar-Hannover-Rattenherzpräparationen pro Gruppe. * = p < 0,05 vs. Kontrolle (K).

4.6 Linksventrikuläre Matrix bei TGR

Neben Angiotensin-II gelten auch β -adrenerge Stimulantien als wichtige Induktoren einer Myokardhypertrophie und Fibrose [78]. Daher wurde nun die Genexpression linksventrikulärer Matrixproteine bei TGR untersucht. Das nachstehende Schaubild zeigt eine herabregulierte Genexpression des „Transforming Growth Factor beta“ der Isoform 1 (TGF β ₁) in linksventrikulärem Ganzherzmaterial der TGR. Diese Beobachtung ist unter Captopriltherapie besonders ausgeprägt, da hier die mRNA-Expressionsrate des TGF β ₁ bei TGR 35% unter der zu vergleichenden Kontrolle liegt.

Abb. 21

**Abbildung 21:****Diagramm der linksventrikulären TGF β 1-mRNA-Expression.**

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der TGF β 1-mRNA-Expression aus linksventrikulärem Ganzherzmaterial. Bei TGR+Capt. wird TGF β 1 um mehr als 30% herunterreguliert. Bei unbehandelten TGR fällt diese Beobachtung geringer aus. Daten aus je n = 9-10 Tieren pro Gruppe; # = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR + Capt.).

Da der auto- und parakrin wirkende TGF β 1 auch in Kardiomyozyten gebildet wird, wurde die Genexpression des TGF β 1, Kollagen1 und Elastin in linksventrikulären Myozyten per RT-PCR ermittelt (s. Abb. 22). Die Daten ergaben eine herabregulierte Expression von TGF β 1- und Elastin-mRNA in den isolierten Zellen der TGR. Die Expression von Kollagen-1-mRNA war bei den druckbelasteten TGR hingegen deutlich erhöht. Anschließend wurde die TGF β 1-Genexpression in isolierten Kardiomyozyten untersucht, die für 24 Stunden unter dem direkten Einfluss von Renin- bzw. Angiotensin-II standen. In dieser Kurzzeitzellkultur ließ sich ein Anstieg der TGF β 1- und Kollagen-1-mRNA-Expression sowohl unter Renin- als auch unter Angiotensin-II beobachten (s. Abb. 23).

Abb. 22

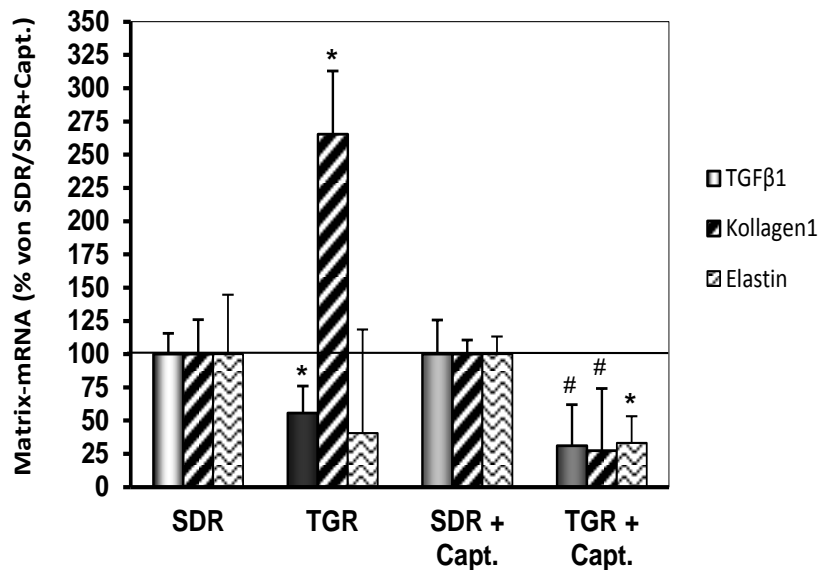


Abbildung. 22:

Diagramm zur mRNA-Expression von kardiomyozytären Matrixproteinen.

Die Mittelwerte \pm SD isolierter Kardiomyozyten zeigen eine signifikant verminderte Genexpression der Matrixprotein bei behandelten TGR (TGR+Capt.). Bei unbehandelten TGR ist die Expressionsrate der TGF β 1- und Elastin-mRNA ebenfalls erniedrigt, während die Expression von Kollagen1-mRNA gegenüber der korrespondierenden Kontrolle um mehr als 150% ansteigt. Daten aus je n = 6-8 Tieren pro Gruppe; * = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR) bzw. # = p < 0,05 vs. Kontrolle (SDR + Capt.).

Abb. 23

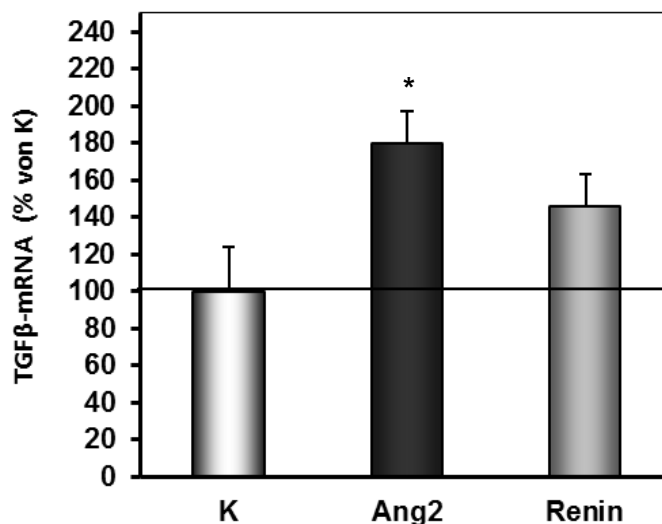


Abbildung. 23:

Diagramm der kardiomyozytären TGF β 1-mRNA-Expression unter Einfluss von Renin und Angiotensin-II (Ang2).

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD isolierter Kardiomyozyten die einer Renin- bzw Angiotensin-II-Inkubation für 24 Stunden unterzogen wurden. Kardiomyozyten die ausschließlich mit CCT-Medium behandelt wurden, dienten als Kontrolle (K). Eine Behandlung mit Angiotensin-II (Ang2) erhöhte hier die TGF β 1-mRNA-Expression. Daten aus je n = 6 Wistar-Hannover-Rattenherzpräparationen pro Gruppe. * = p < 0,05 vs. Kontrolle (K).

5. Diskussion

Der Übergang einer kompensatorischen, druckinduzierten Myokardhypertrophie in eine Herzinsuffizienz ist fließend und wird durch viele Faktoren bedingt. Die aktuelle Herzinsuffizienzforschung beschäftigt sich damit, die unterschiedlichen Einflussfaktoren zu isolieren, um ein Voranschreiten der Herzinsuffizienz gezielt aufhalten zu können. So wird beispielsweise (Pro-)Renin verdächtigt, die pathologischen Umbauprozesse in der Herzinsuffizienzentwicklung entscheidend zu beeinflussen [35, 59, 80, 97]. Für diese Studie wurde das Tiermodell der TGR herangezogen, um ein Einwirken von (Pro-)Renin auf die linksventrikuläre Funktion sowie dem kardialen „Remodeling“ des chronisch insuffizienten Herzen näher zu untersuchen.

5.1 Hauptbefunde

(Pro-)Renin induziert ein spezifisches kardiales „Remodeling“ bei dem der Übergang einer kompensatorischen Myokardhypertrophie in eine Herzinsuffizienz verhindert wird. Dies erreicht (Pro-)Renin indem es:

- 1.) die Calcium-Homöostase positiv beeinflusst und dadurch die linksventrikuläre Funktion verbessert.
- 2.) die kardiale β -adrenerge Ansprechbarkeit reduziert, sodass ein maladaptives neuroendokrines „Remodeling“ verhindert wird.
- 3.) die übersteigerte Synthese extrazellulärer Matrixproteine hemmt und damit einer Myokardfibrose vorbeugen kann.

5.2 (Pro-)Renin verbessert die linksventrikuläre Funktion

In der vorliegenden Arbeit wurde an isolierten Herzen von TGR eine verbesserte linksventrikuläre Leistung im Gegensatz zu Herzen aus den nicht-transgenen Wurfgeschwistern festgestellt. Insbesondere der linksventrikuläre Druckaufbau (LVDP) war bei TGR deutlich höher als bei den korrespondierenden Kontrollen. Des Weiteren

konnte das linksventrikuläre Myokard der TGR schneller kontrahieren und relaxieren als bei den nicht-transgenen Tieren (s. Kap. 4.2.2 & Kap. 4.2.3). Wie zu erwarten wiesen die TGR auch eine deutliche druckinduzierte Herzhypertrophie auf (s. Kap. 4.3). Funktionsdiagnostisch konnten jedoch keinerlei Anzeichen einer Herzinsuffizienz gemessen werden. In zurückliegenden Studien wurde zuweilen über eine schlechte linksventrikuläre Funktion bei den transgenen Reninratten berichtet [26, 95]. Dieses Phänomen beobachtete man jedoch meist bei Ratten, die bereits zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt druckbelastet wurden. In dieser Studie entwickelten die transgenen Tiere ihre Hypertonie erst im Alter von 3 Monaten, wodurch ausschließlich adulte Rattenherzen einem Bluthochdruck ausgesetzt wurden. Es gilt dabei zu beachten, dass neonatale Zellen im Gegensatz zu ausgereiften Zellsystemen sehr differenziert auf Umweltreize, wie z.B. Renin, reagieren [16, 57].

Ein wesentlicher Grund für die hier festgestellte gesteigerte kardiale Leistungsfähigkeit der TGR liegt in einer verbesserten intrazellulären Kalzium-Homöostase. Gerade für eine erhöhte Relaxationsgeschwindigkeit scheint die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) einen besonderen Stellenwert zu haben [42, 61]. So korreliert beispielsweise die Erhöhung der SERCA2a-Genexpression mit einer gesteigerten linksventrikulären Lusitropie, wohingegen das insuffiziente Myokard durch eine verringerte SERCA-2a-Aktivität charakterisiert ist [33, 34, 36]. Auch in dieser Studie konnte die verbesserte linksventrikuläre Funktion der TGR auf molekularer Ebene bestätigt werden. So zeigte sich in Kardiomyozyten, die aus druckentlasteten TGR isoliert wurden, eine fast 5-fach gesteigerte SERCA2a-Expressionsrate (s. Abb. 13). Eine direkte Stimulation der SERCA2a-Genexpression durch Renin wurde ferner bei isolierten und mit Renin inkubierten Kardiomyozyten verifiziert (s. Abb. 14). Es scheint, dass der SERCA2a-Proteingehalt durch hohe Reninspiegel verbessert werden kann (s. Abb. 16). Der positive Einfluss von ACE-Inhibitoren und AT_1 -Rezeptorblockern auf die linksventrikuläre Funktion sowie auf die SERCA-2a-Genexpression wurde bereits von Jessup et al. beschrieben [39]. In Ergänzung dazu, legt die hier vorgelegte Arbeit nahe, dass es mechanistisch zu einem Renin-vermittelten Effekt des ACE-Hemmers kommt, da durch die Hemmung der Angiotensin-II-Rückkopplung die Reninplasmaspiegel deutlich ansteigen [38].

Für eine gesteigerte linksventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit ist aber nicht die Menge an SERCA2a-Gesamtprotein entscheidend, sondern vielmehr der Gehalt an aktivierter SERCA2a, d.h. der Anteil an SERCA2a, der nicht von Phospholamban (PLB) gehemmt wird [4]. So wurde in dieser Studie auch der Phosphorylierungsgrad des PLB in Kardiomyozyten transgener Tiere nach einer β -adrenergen Stimulation

gemessen. Hier zeigte sich eine deutlich gesteigerte Phosphorylierung des PLB in TGR gegenüber den Kontrollen (s. Kap. 4.5.2). Durch die PLB-Inhibierung scheint die Aktivität von SERCA2a bei TGR - trotz niedrigen Proteinlevels - erhöht zu sein. Dieser Sachverhalt entspricht wiederum der guten linksventrikulären Leistungsfähigkeit der TGR, obgleich bei diesen Tieren eine verminderte β -adrenerge Ansprechbarkeit vorliegt (s. Kap. 4.4.1).

In der kardialen Kalzium-Homöostase spielt neben SERCA2a aber noch ein anderes Kalziumtransportprotein eine wichtige Rolle. Der Na-Ca-Austauscher (NCX) eliminiert intrazelluläre Kalzium-Ionen in den Extrazellulärraum, wodurch diese für weitere Kontraktionsvorgänge den Kardiomyozyten kurzfristig nicht mehr zur Verfügung stehen [85]. Die Synthese des NCX wird dabei durch Angiotenin-II begünstigt, sodass hauptsächlich das insuffiziente Myokard durch eine steigende NCX-Genexpression gekennzeichnet ist [3, 8]. Folglich verschiebt sich in insuffizienten Kardiomyozyten das Verhältnis von SERCA2a/NCX zu Gunsten des Na-Ca-Austauschers [83]. In dieser Studie konnte hingegen ein steigender Quotient (SERCA2a/NCX) bei den nicht-druckbelasteten TGR auf Genexpressionsebene beobachtet werden. Hier spiegelte sich einerseits der positive Einfluss des (Pro-)Renins auf die SERCA2a-Produktion wieder, andererseits wurde die Angiotensin-II-Synthese und somit auch die Genexpression des NCX durch den ACE-Hemmer, der zur Druckentlastung eingesetzt worden ist, gehemmt.

Die in dieser Studie erhobenen Daten lassen darauf schließen, dass (Pro-)Renin die intrazelluläre Kalzium-Homöostase positiv beeinflussen kann und somit der Übergang in eine Herzinsuffizienz bei TGR unwahrscheinlich erscheint. Ein weiterer Hinweis für die ausbleibende Herzinsuffizienzentwicklung der adulten TGR ist, dass bei diesen Tieren ein annähernd normales Lungengewicht gemessen wurde (s. Kap. 4.1). Eine dekompensierte Linksherzinsuffizienz führt bekanntlich zu einer pulmonalen Blutstauung, wodurch dann wiederum ein steigendes Lungengewicht zu beobachten wäre [11].

5.3 (Pro-)Renin beeinflusst das kardiale β -adrenerge System

Durch die Aktivierung neuroendokriner Systeme kann eine Herzinsuffizienz kurzfristig kompensiert werden [70]. Die chronische Beanspruchung des RAAS bzw. des kardialen β -adrenergen Systems führt im Myokard hingegen zu maladaptiven Umbauprozessen. Dieses „Remodeling“ charakterisiert den Übergang einer

kompensatorischen Myokardhypertrophie in eine Herzinsuffizienz. Insbesondere die langfristige Stimulation kardialer β -adrenerger Rezeptoren wirkt wachstumsfördernd auf Kardiomyozyten [79]. Bei den TGR wurde bereits in vergangenen Arbeiten über eine verminderte β -adrenerge Ansprechbarkeit berichtet. Hierbei schien jedoch vorwiegend der β_1 -Rezeptor betroffen zu sein, da die Membrandichte der β_2 -Rezeptoren sowie deren Ansprechbarkeit unverändert war [13]. Daher gibt es nun den Anlass zur Annahme, dass das herunterregulierte β -adrenerge System bei den TGR die Progression von einer maladaptiven Hypertrophie hin zu einer manifesten Herzinsuffizienz weitgehend verhindern kann.

Auch in dieser Studie konnte bei TGR ein reduziertes Ansprechen auf Isoprenalin beobachtet werden. Hierfür wurde die linksventrikuläre Funktion der isolierten Rattenherzen nach einer 10-minütigen Isoprenalinperfusion an der Langendorfanlage ex vivo ermittelt. Sowohl der Anstieg des LVDP als auch der linksventrikulären Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit blieb bei den TGR gegenüber den Kontrolltieren deutlich zurück (s. Kap. 4.4.1). Erstaunlicherweise war die Auswirkung der verminderten β -adrenergen Ansprechbarkeit in der intrazellulären elektromechanischen Signalverarbeitung nicht wiederzufinden. So war der PKA-abhängige Phosphorylierungsgrad des PLB bei den TGR gegenüber den Kontrollen erhöht (s. Kap. 4.5.2). Diese zunächst widersprüchlichen Ergebnisse wurden auch in einem anderen Renin-überexprimierenden Rattenmodell beobachtet [7]. Es liegt daher nahe, dass (Pro-)Renin für die reduzierte β -adrenerge Ansprechbarkeit verantwortlich ist, ohne sich dabei negativ auf die linksventrikuläre Basalfunktion auszuwirken.

In dieser Arbeit konnte die Inhibierung des kardialen β -adrenergen Systems durch (Pro-)Renin auch auf molekularer Ebene nachvollzogen werden. Hierfür wurden zunächst die mRNA-Expressionsraten der β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren mittels Realtime-PCR bestimmt. Dabei zeigte sich eine deutlich herunterregulierte Genexpression des β_1 -Rezeptors in TGR unabhängig von der Druckbelastung (s. Kap. 4.4.2). Böhm et al. beobachteten bereits neben einer reduzierten β_1 -Genexpression eine verminderte β_1 -Rezeptordichte in der Kardiomyozytenmembran der TGR [13]. Da die β_1 -adrenerge Stimulation des Myokards zu hypertrophen Umbauprozessen führt, wurden auch in dieser Studie intrazelluläre Marker für eine β -Rezeptor-induzierte Hypertrophie untersucht [84]. Dabei ließ sich eine verminderte β -adrenerge Ankopplung an intrazelluläre, prohypertrophe Prozesse beobachten. Besonders betroffen schien dabei der wachstumsfördernde Polyaminstoffwechsel zu sein. Das für die Polyaminsynthese notwendige Schlüsselenzym, die Ornithindecaboxylase (ODC), war zumindest auf Genexpressionsebene deutlich vermindert (s. Kap. 4.4.3). In vorangegangenen

Untersuchungen beobachtete man bereits, dass die Progression einer Herzinsuffizienz mit einer gesteigerten ODC-Enzymaktivität verbunden ist [84, 88]. Daher ist ein rascher Übergang in eine Herzinsuffizienz aufgrund der erniedrigten ODC-Genexpression bei adulten TGR auch nicht zu erwarten.

Überdies ist bekannt, dass Angiotensin-II die β_1 -adrenerge Ansprechbarkeit in Kardiomyozyten mittels TGF β_1 verbessert und so profibrotisch und wachstumsfördernd auf das Myokard wirkt [78]. In unseren Untersuchungen wurde eine erniedrigte linksventrikuläre TGF β_1 -Genexpression bei TGR gemessen (s. Kap. 4.6). Da der Wachstumsfaktor TGF β_1 die β -Adrenozeptoren sensibilisiert, entspricht die restriktive TGF β_1 -Expression der schlechten β -adrenergen Ansprechbarkeit dieser Tiere. Diese Beobachtung könnte auf eine antihypertrophe Wirkung des (Pro-)Renins hinweisen. Im Gegensatz dazu entdeckte Hinrichs et al. 2011 eine spezielle hypertrophe Reaktion bei unter Renineinfluss stehenden Kardiomyozyten. So förderte Renin das Längenwachstum der Myozyten, wohingegen eine klassische Hypertrophie, im Sinne einer Druckbelastung, nicht hervorgerufen wurde. Das durch Renin vermittelte „Remodeling“ schien über den IGF2/M6PR induziert zu werden, da sich das Längenwachstum unter Zugabe von M6P antagonisieren ließ [35]. In wieweit sich das Längenwachstum auf die linksventrikuläre Funktion der TGR auswirkt, muss nun in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Hier stehen insbesondere Untersuchungen zur Wechselwirkung von Renin mit klassischen prohypertrophen Stimuli aus.

5.4 (Pro-)Renin beeinflusst die Synthese der extrazellulären Matrix

Das insuffiziente Herz ist gekennzeichnet durch eine zunehmende Bindegewebsvermehrung und einen damit einhergehenden Elastizitätsverlust. Als Hauptmediator dieser Myokardfibrose gilt Angiotensin-II. Es induziert via AT $_1$ -Rezeptor den Wachstumsfaktor TGF β_1 und so letztlich die Synthese unterschiedlicher Matrixproteine, wie z.B. Kollagen [78]. Hier konnten bisher durch den Einsatz von ACE-Inhibitoren, AT $_1$ -Rezeptorantagonisten und Renininhibitoren die maladaptiven Veränderungen bei einer Herzinsuffizienz therapeutisch aufgehalten werden [39, 99]. Welche Rolle dabei die durch die Medikamente hervorgerufenen hohen (Pro-)Reninspiegel einnehmen, wurde bis heute nur unzureichend erforscht.

In dieser Studie wurde die Genexpression sowohl des Mediators TGF β_1 , wie auch die der wichtigsten extrazellulären Matrixproteine in linksventrikulärem Gewebe von TGR untersucht. Hierbei konnte eine reduzierte Genexpressionsrate von TGF β_1 in den isolierten Myozyten der transgenen Tiere nachgewiesen werden. Dies äußerte sich

auch in einer verminderten Elastin-Expression in den transgenen Kardiomyozyten, wobei zumindest das Verhältnis von Kollagen zu Elastin bei Zellen aus TGR ohne Druckbelastung zugunsten des Elastins verschoben war. Die erhöhte Kollagen-Genexpression bei den druckbelasteten TGR könnte hingegen durch Angiotensin-II hervorgerufen worden sein. Hier konnte bisher der therapeutische Einsatz von ACE-Inhibitoren bzw. AT1-Rezeptorantagonisten die Regeneration von Angiotensin-II und somit eine gesteigerte Kollagenproduktion bei einer Herzinsuffizienz verhindern [39].

Weiterhin standen in dieser Studie isolierte Kardiomyozyten in einer Kurzzeitzellkultur unter einem mehrstündigen Renineinfluss. Erstaunlicherweise zeigte sich unter Renin ein Anstieg der TGF β_1 -mRNA-Sequenzen in den isolierten Zellen (s. Kap. 4.6). Ein autokriner Einfluss von intrazellulär regeneriertem Angiotensin-II auf die TGF β_1 -Genexpression kann dabei nicht ausgeschlossen werden. Außerdem wird bereits darauf verwiesen, dass ein kurzzeitiger Einfluss von (Pro-)Renin eher profibrotisch auf das Myokard wirkt, wohingegen eine chronische Stimulation keine Myokardfibrose induziert [65, 93]. Flesch et al. konnte bei den chronisch druckbelasteten Reninratten des gleichen Typs [(mREN2)27] ebenfalls keinerlei Anzeichen einer Fibrose in der interstitiellen Matrix des Rattenmyokards beobachten [28]. In Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten kann daher angenommen werden, dass eine chronische (Pro-)Reninstimulation die TGF β_1 -Genexpression langfristig hemmt und so eine Angiotensin-II induzierte Kollagensynthese antagonisieren kann.

Die genauen Mechanismen der Renin-vermittelten Signalwege sind bis dato noch weitgehend unerforscht. Etwaige Interaktionsmöglichkeiten zwischen (Pro-)Renin und Kardiomyozyten wurden aber schon mehrfach beschrieben. Als wesentliches Zielprotein für (Pro-)Renin wird der in der Kardiomyozytenmembran verankerte IGFII-/M6P-Rezeptor genannt [80]. Dieser Rezeptor wird während der kardialen Reifung vermehrt exprimiert und scheint so für die Myokardentwicklung notwendig zu sein [47]. Darüber hinaus lässt sich auch eine erhöhte Dichte an IGFII-/M6P-Rezeptoren auf den Kardiomyozyten herzinsuffizienter Patienten finden [98]. Vermutlich wurde die gesteigerte Rezeptorexpression bei diesen Patienten durch Angiotensin-II hervorgerufen [49]. So könnte (Pro-)Renin wiederum die maladaptiven Myokardveränderungen von Angiotensin-II bei einer chronischen Herzinsuffizienz via IGFII-/M6P-Rezeptor antagonisieren. Ein weiterer Prorenin bindender Rezeptor ist der im Jahr 2002 publizierte Proreninrezeptor (PRR) [67]. Dieser kann Prorenin in eine enzymatisch aktive Struktur überführen. Des Weiteren scheint dieser Rezeptor vor allem an der lokalen Wirkung von Renin über Angiotensin-II-Rezeptoren beteiligt zu sein, wie beispielsweise die in dieser Arbeit beschriebene Wirkung von (Pro-)Renin auf

die kardiomyozytäre Expression von TGF β_1 in der Kurzzeitzellkultur (s. Kap. 4.6). Ferner wird durch die Aktivierung des PRR eine Reihe von Signalkaskaden in Gang gesetzt [81]. Welche Rezeptoren bzw. Signalwege für die in dieser Arbeit durch (Pro-)Renin hervorgerufenen Beobachtungen nun letztendlich verantwortlich sind, muss erst in weiteren Studien näher erforscht werden (s. Abb. 24).

5.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann aufgrund der vorliegenden Datenlage postuliert werden, dass (Pro-)Renin ein spezifisches linksventrikuläres „Remodeling“ im Myokard adulter TGR induziert. TGR zeigen eine verminderte linksventrikuläre, β -adrenerge Ansprechbarkeit auf sympathomimetische Reize bei einer gleichzeitig herabgesetzten β -Adrenozeptordichte. Folglich resultiert eine erniedrigte Aktivität der prohypertrophen ODC in Kardiomyozyten von TGR. Die Begründung für die schlechte β -adrenerge Ansprechbarkeit der TGR liegt in einer erniedrigten kardialen TGF β_1 -Aktivität. (Pro-)Renin scheint somit über supprimierte TGF β_1 - und ODC-Spiegel den Übergang in eine maladaptive Hypertrophie und Myokardfibrose erfolgreich zu verhindern.

Desweiteren wird der kardiomyozytäre Calcium-Haushalt bei TGR durch die chronische (Pro-)Reninstimulation, via SERCA2a-Induktion, verbessert. Auch der Phosphorylierungsgrad von PLB zeigt sich unter Isoprenalinstimulation, trotz der reduzierten β -adrenergen Ansprechbarkeit, erhöht. Die verbesserte Calcium-Homöostase bildet bei TGR somit den Grundstein für die bei diesen Tieren gemessene gute linksventrikuläre Funktion. Der Übergang von einer druckinduzierten Hypertrophie hin zur Herzinsuffizienz scheint bei adulten TGR daher unwahrscheinlich.

Abschließend kann verallgemeinernd behauptet werden, dass (Pro-)Renin die linksventrikuläre Funktion verbessert, einer Myokardfibrose vorbeugt und den Progress einer chronischen Herzinsuffizienz verzögern wenn nicht gar verhindern kann.

6. Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele: Das kardiale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist an der Entwicklung und Progredienz einer chronischen Herzinsuffizienz wesentlich beteiligt. Welche kardiospezifische Rolle das Schlüsselenzym Renin übernimmt, wurde bisher jedoch nur unzureichend erforscht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die linksventrikuläre Funktion von Herzen aus adulten, transgenen Renin-überexprimierenden Ratten (TGR) sowohl an der Langendorffanlage als auch molekulargenetisch zu untersuchen, um so Hinweise auf ein Renin-induziertes, linksventrikuläres „Remodeling“ zu bekommen. Anschließend sollten die Befunde an isolierten und kultivierten Herzmuskelzellen verifiziert werden.

Methoden: Anhand von isolierten und salin-perfundierten Rattenherzen sowie isolierten und kultivierten ventrikulären Herzmuskelzellen aus adulten TGR [(mREN2)27] und nicht transgene Sprague-Dawley Ratten (SDR) wurden die Basalfunktion, die funktionelle Ansprechbarkeit auf Isoprenalin und die molekularbiologische Ansprechbarkeit der Herzmuskelzellen auf Einzellebene mittels Langendorff Perfusion, qRT-PCR und Western-Blot untersucht.

Ergebnisse: Die in dieser Studie erhobenen Daten zeigen eine deutlich gesteigerte linksventrikuläre Funktion bei Herzen aus transgenen Reninratten verglichen mit ihren nicht-transgenen Kontrollen. Insbesondere der linksventrikuläre Druckaufbau (LVDP) war bei TGR, bezogen auf das jeweilige Herzgewicht (HW) durchschnittlich doppelt so hoch als bei den SDR-Kontrolltieren (MW des LVDP/HW: 83 mmHg/g bei TGR, n=9 Herzen vs. 44 mmHg/g bei SDR, n=9 Herzen, $p < 0,05$). Molekulargenetisch spiegelte sich die gute linksventrikuläre Funktion der TGR in einer verbesserten Calcium-Homöostase wieder. Darüber hinaus konnte im Zellkulturversuch (24h) gezeigt werden, dass Renin die Expression des Calcium-handling-Proteins SERCA2a direkt stimulieren kann. Desweiteren wurde in dieser Arbeit eine erniedrigte Genexpressionsrate des Wachstumsfaktors TGF β_1 bei TGR beobachtet. Dies kann als mögliche Ursache für die bereits publizierte und auch in dieser Arbeit gemessene, verminderte β -adrenerge Ansprechbarkeit auf β -adrenerge Stimuli (z.B. Isoprenalin) bei TGR gewertet werden. Neben einer reduzierten TGF β_1 -Aktivität weisen die vorliegenden Daten ebenfalls auf erniedrigte Syntheseraten extrazellulärer Matrixproteine (z.B. Kollagen) hin. Die chronische Reninstimulation scheint somit einer Myokardfibrose vorzubeugen.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Renin ein spezifisches linksventrikuläres „Remodeling“ induziert, in dem es die maladaptiven Veränderungen von Angiotensin-II antagonisiert und so den Übergang von einer druckinduzierten Myokardhypertrophie in eine Herzinsuffizienz verhindern kann. Interessanterweise sind diese direkten kardialen Wirkungen des Renins denen der systemischen RAAS-Aktivierung entgegengesetzt.

7. Summary

Background and Aims: The cardiac renin-angiotensin-aldosterone-system (RAAS) is substantially involved in the development and progress of heart failure. What cardio-specific role the key-enzyme renin takes on, has so far only insufficiently been explored. Therefore, the aim of the present study was to analyze the left ventricular performance in isolated hearts from adult transgenic rats (TGR) overexpressing renin both by Langendorff-perfusion-system and molecular genetics in order to find evidence of a renin-induced remodeling. Afterwards, the findings were to be verified in isolated and cultured cardiomyocytes.

Methods: Based on isolated and saline-perfused rat hearts as well as isolated and cultured cardiomyocytes from adult TGR [(mREN2)27] and non-transgenic Sprague-Dawley rats, the basic function and the functional responsiveness to isoprenalin as well as the molecular biological responsiveness of cardiomyocytes were investigated by the Langendorff-perfusion-system, RT-PCR and western-blot.

Results: The data collected in this study show a significantly increased left ventricular performance in hearts from transgenic renin rats compared with their non-transgenic controls. Especially the left ventricular developed pressure (LVDP), based on the specific heart weight (HW), was in TGR twice as high as in the SDR-control-animals (Mean value of the LVDP/HW: 83 mmHg/g in TGR, n=9 hearts vs. 44 mmHg/g in SDR, n=9 hearts, $p < 0,05$). Molecular biologically, the good left ventricular performance of TGR was reflected in an improved calcium-homoeostasis. Moreover, it was shown in cell culture experiments (24 h) that renin can stimulate the expression of the calcium-handling-protein SERCA2a directly. Furthermore, in this study a decreased rate of gene expression of the growth factor TGF β_1 was observed in TGR. This may be a possible cause of the reduced β -adrenergic responsiveness of TGR on β -adrenergic stimuli (e.g. isoprenalin), which was measured in this study and has already been published by an older study. Apart from the reduced activity of TGF β_1 the available data also indicate decreased rates of extracellular matrix proteins. The chronic stimulation of renin appears to prevent a myocardial fibrosis.

Conclusion: In summary, it can be stated, that renin induces a specific left ventricular remodeling by antagonizing the maladaptive changes of angiotensin-2 and so may

prevent the transition from pressure-induced cardiac hypertrophy to heart failure. Interestingly, the direct cardiac effects of renin are opposite to those of systemic activation of the RAAS.

8. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% vol/vol	Volumenprozent
% wt/vol	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
-dP/dt	Relaxationsgeschwindigkeit
+dP/dt	Kontraktionsgeschwindigkeit
µg	Mikrogramm
µm	Mikromol
µl	Mikroliter
AA	Acrylamid
a.b.	aqua bidest. (zweifach destilliertes Wasser)
ACE	Angiotensin-konvertierendes-Enzym
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADRB 1 und 2	β-adrenerger Rezeptor Typ 1 und 2
AG	Aktiengesellschaft
AHA	American Heart Association
ANOVA	analysis of variance
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AnT	Annealing-Temperature
APS	Ammoniumpersulfat
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensinrezeptor Typ 1
BAA	Bisacrylamid
βARK	β-adrenerge Rezeptorkinase
bidest.	bidestillata
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ⁺⁺	Calcium
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein kinases II
CaCl	Calciumchlorid
Capt.	Captopril
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat

cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cm	Centimeter
Co.	Compagnie
Corp.	Corporation
Ct	threshold cycle
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
e.g.	for example
ERK	Extrazellulär responsive Kinase
ESC	European Society of Cardiology
et. al	und andere
etc.	etcetera
FCS	Fetales Kälberserum
fw	forward
g	Gramm
G _i	inhibierendes G-Protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gr.	Größe
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HF	Herzfrequenz
HOCM	Hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
HPRT	Hypoxanthin-Phosphorribosyltransferase
HW	Herzgewicht
HZV	Herzzeitvolumen
ICD	International classification of diseases
IgG	Immunglobulin G
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton

KG	Kommanditgesellschaft
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
Ltd.	Limited
LV	Linker Ventrikel
LVDP	Linksventrikulär entwickelter Druck/Druckaufbau
LVW	linksventrikuläres Gewicht
M	mol/l
M6P/IGFII-R	Mannose-6-phosphat/Insulin-like-growth-factor-receptor
MAP/P38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
mA	Milliampere
MgCl_2	Magnesiumchlorid
MgSO_2	Magnesiumsulfat
Mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ml	Milliliter
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
NYHA	New York Heart Association
ODC	Ornithindecaboxylase
P	Blutdruck
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase-A
PLB	Phospholamban (gesamt = gPLB; phosphoryliert = pPLB)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
PRR	Proreninrezeptor
Pdiast.	Diastolischer Druck

pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
Pperf.	Perfusionsdruck
Psyst.	Systolischer Druck
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
REN27	Renin-2-Mausgen Nr. 27
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real-Time-Polymerasekettenreaktion
RyR2	Ryanodinrezeptor
rw.	reverse
s.	siehe
S.	Seite
SD	Standardabweichung
SDR	Sprague-Dawley-Ratte
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SERCA	Calciumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
ssDNA	Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β_1	Transforming growth factor 1
T β R	TGF-beta-receptor
TGR	Transgene Renin-überexprimierende Ratte(n) des Typs [(mREN2)27]
TL	Tibiallänge
UV	ultraviolet
vs.	versus
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schaubild des kardialen „Remodeling“ bei einer chronischen Herzinsuffizienz	S. 9
Abb. 2:	Abbildung eines Agarose-Gels zur Rattenidentifikation	S. 20
Abb. 3:	Schematische Darstellung einer PCR-Amplifikationskurve	S. 30
Abb. 4:	Diagramm der in vivo gemessenen Blutdruckwerte	S. 37
Abb. 5:	Diagramm des ex vivo ermittelten linksventrikulären Druckaufbaus (LVDP)	S. 38
Abb. 6:	Diagramm der ex vivo gemessenen maximalen Kontraktions- (+dP/dt) und Relaxationsgeschwindigkeiten (-dP/dt).	S. 39
Abb. 7:	Diagramm des linksventrikulären Gewichts (LVW)	S. 40
Abb. 8:	Diagramm der linksventrikulären ANP-mRNA-Expression	S. 41
Abb. 9:	Diagramm zur linksventrikulären Funktion nach Isoprenalin-stimulation Teil 1	S. 42
Abb. 10:	Diagramm zur linksventrikulären Funktion nach Isoprenalin-stimulation Teil 2	S. 43
Abb. 11:	Diagramm der kardiomyozytären mRNA-Expression des β_1 - und β_2 -Adrenozeptors (ARB1/2)	S. 44
Abb. 12:	Diagramm der linksventrikulären ODC-mRNA-Expression	S. 45
Abb. 13:	Diagramm der basalen kardiomyozytären SERCA2a-mRNA-Expression	S. 46
Abb. 14:	Diagramm der kardiomyozytären SERCA2a-mRNA-Expression unter Einfluss von Renin und Angiotensin-II (Ang2).	S. 47
Abb. 15:	Ausschnitt eines Western-Blots zur Ermittlung des linksventrikulären SERCA2a-Proteingehalts	S. 48
Abb. 16:	Diagramm der linksventrikulären SERCA2a-Proteinexpression	S. 48
Abb. 17:	Ausschnitt eines Western-Blots zur Ermittlung der linksventrikulären PLB-Aktivität	S. 49
Abb. 18:	Diagramm des linksventrikulären PLB-Phosphorylierungsgrads	S. 50
Abb. 19:	Diagramm zum kardiomyozytären (SERCA2a/NCX)-mRNA-Expressionquotienten	S. 51

Abb. 20:	Diagramm der kardiomyozytären NCX-mRNA-Expression unter Einfluss von Renin und Angiotensin-II (Ang2)	S. 52
Abb. 21:	Diagramm der linksventrikulären TGF β ₁ -mRNA-Expression	S. 53
Abb. 22:	Diagramm zur mRNA-Expression von kardiomyozytären Matrixproteinen	S. 54
Abb. 23:	Diagramm der kardiomyozytären TGF β ₁ -mRNA-Expression unter Einfluss von Renin und Angiotensin-II (Ang2)	S. 54
Abb. 24:	Schaubild zur direkten Interaktion zwischen (Pro-)Renin und Kardiomyozyten	S. 62

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Einteilung der chronischen Herzinsuffizienz	S. 2
Tab. 2:	Darstellung der Körper-, Lungen- und Nierengewichte	S. 36
Tab. 3:	Darstellung der Herzfrequenzen	S. 39

10. Literaturverzeichnis

1. Herzensbrecher Zytostatika | universimed.com. <http://reports-news.universimed.com/artikel/herzensbrecher-zytostatika> (27.02.2013).
2. Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis). <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html> (27.02.2013).
3. Aiello EA, Villa-Abrille MC, Cingolani HE. Autocrine stimulation of cardiac Na(+)-Ca(2+) exchanger currents by endogenous endothelin released by angiotensin II. *Circulation research* 2002; 90: 374–76.
4. Andino LM, Takeda M, Kasahara H, Jakymiw A, Byrne BJ, Lewin AS. AAV-mediated knockdown of phospholamban leads to improved contractility and calcium handling in cardiomyocytes. *The journal of gene medicine* 2008; 10: 132–42.
5. Atlas SA, Laragh JH, Sealey JE, Hesson TE. An inactive, prorenin-like substance in human kidney and plasma. *Clinical science (London, England 1979)* 1980; 59 Suppl 6: 29s-33s.
6. Bader M. Role of the local renin-angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2002; 34: 1455–62.
7. Bartel S, Hoch B, Vetter D, Krause E. Expression of human angiotensinogen-renin in rat: effects on transcription and heart function. *Hypertension* 2002; 39: 219–23.
8. Bers DM, Despa S, Bossuyt J. Regulation of Ca²⁺ and Na⁺ in normal and failing cardiac myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1080: 165–77.
9. Beuckelmann DJ, Böhm M. *Betablockertherapie der Herzinsuffizienz*, 1. Aufl. Bremen: UNI-MED, 1998.
10. 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. *Cardiovascular research* 2000; 47: 57–67.
11. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Aguzzi A. *Pathologie: Mit 164 Tabellen*, 3. Aufl. München [u.a.]: Urban & Fischer, 2004.
12. Böhm M, Kouchi I, Schnabel P, Zolk O. Transition from Hypertrophy to Failure - β -Adrenergic desensitization of the Heart. *Heart Failure Reviews* 1999; 4: 329–51.

13. Böhm 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: 653–62.
14. Bundesärztekammer (BÄK) KB(AdWMF(Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz, 2009. Available from: <http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/herzinsuffizienz>, 2009.
15. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* 2000; 25: 169–93.
16. Chen Z, Ge Y, Kang JX. Down-regulation of the M6P/IGF-II receptor increases cell proliferation and reduces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *BMC cell biology* 2004; 5: 15.
17. Chirgwin JM, Schaefer IM, Rotwein PS, Piccini N, Gross KW, Naylor SL. Human renin gene is on chromosome 1. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 1984; 10: 415–21.
18. Danser AHJ, Deinum J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *Hypertension* 2005; 46: 1069–76.
19. Danser AH, Saris JJ, Schuijt MP, van Kats JP. Is there a local renin-angiotensin system in the heart? *Cardiovascular research* 1999; 44: 252–65.
20. Danser AH, van Kats JP, Verdouw PD, Schalekamp MA. Evidence for the existence of a functional cardiac renin-angiotensin system in humans. *Circulation* 1997; 96: 3795–96.
21. Danser AH, van Kesteren CA, Bax WA, Tavenier M, Derkx FH, Saxena PR, Schalekamp MA. Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme in normal and failing human hearts. Evidence for renin binding. *Circulation* 1997; 96: 220–26.
22. Della Bruna R, Pinet F, Corvol P, Kurtz A. Opposite regulation of renin gene expression by cyclic AMP and calcium in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Kidney international* 1995; 47: 1266–73.
23. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 2004; 37: 112-4, 116, 118-9.
24. DiBona GF. Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension* 2000; 36: 1083–88.

25. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJV, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K. 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). *European journal of heart failure* 2008; 10: 933–89.
26. Döring HJ, Dehnert H. Das isolierte perfundierte Warmblüter-Herz nach Langendorff, 1. Aufl. March: Biomesstechnik-Verl, 1985.
27. Flesch M, Erdmann E, Böhm M. Changes in beta-adrenoceptors and G-proteins during the transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Journal of cardiac failure* 1996; 2: S35-43.
28. Flesch M, Schiffer F, Zolk O, Pinto Y, Rosenkranz S, Hirth-Dietrich C, Arnold G, Paul M, Böhm M. Contractile systolic and diastolic dysfunction in renin-induced hypertensive cardiomyopathy. *Hypertension* 1997; 30: 383–91.
29. Futaki S, Goto Y, Ohgoshi Y, Yaku H, Kawaguchi O, Suga H. Denopamine (beta 1-selective adrenergic receptor agonist) and isoproterenol (non-selective beta-adrenergic receptor agonist) equally increase heart rate and myocardial oxygen consumption in dog heart. *Japanese circulation journal* 1991; 55: 972–82.
30. Gaddam V. Ace inhibitors in cardiovascular diseases. *The Journal of the Arkansas Medical Society* 2002; 98: 328–29.
31. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation research* 1994; 75: 434–42.
32. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H. Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 1999; 99: 641–48.
33. 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 Ca²⁺ ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *The Journal of clinical investigation* 1997; 100: 380–89.

-
34. Herold G. Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold, 2012.
 35. Hinrichs S, Heger J, Schreckenber R, Wenzel S, Euler G, Arens C, Bader M, Rosenkranz S, Caglayan E, Schlüter K. Controlling cardiomyocyte length: the role of renin and PPAR- γ . *Cardiovascular research* 2011; 89: 344–52.
 36. Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Zeitschrift für Kardiologie* 2005; 94: 488–509.
 37. Huntgeburth M, Tiemann K, Shahverdyan R, Schlüter K, Schreckenber R, Gross M, Mödersheim S, Caglayan E, Müller-Ehmsen J, Ghanem A, Vantler M, Zimmermann WH, Böhm M, Rosenkranz S. Transforming growth factor β_1 oppositely regulates the hypertrophic and contractile response to β -adrenergic stimulation in the heart. *PloS one* 2011; 6: e26628.
 38. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2005; 112: e154-235.
 39. Jessup JA, Westwood BM, Chappell MC, Groban L. Dual ACE-inhibition and AT1 receptor antagonism improves ventricular lusitropy without affecting cardiac fibrosis in the congenic mRen2.Lewis rat. *Therapeutic advances in cardiovascular disease* 2009; 3: 245–57.
 40. Kaumann A, Bartel S, Molenaar P, Sanders L, Burrell K, Vetter D, Hempel P, Karczewski P, Krause EG. Activation of beta2-adrenergic receptors hastens relaxation and mediates phosphorylation of phospholamban, troponin I, and C-protein in ventricular myocardium from patients with terminal heart failure. *Circulation*; 99: 65–72.
 41. Kaumann AJ, Birnbaumer L. Studies on receptor-mediated activation of adenylyl cyclases. IV. Characteristics of the adrenergic receptor coupled to myocardial adenylyl

- cyclase: stereospecificity for ligands and determination of apparent affinity constants for beta-blockers. *The Journal of biological chemistry* 1974; 249: 7874–85.
42. Kawase Y, Hajjar RJ. The cardiac sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase: a potent target for cardiovascular diseases. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* 2008; 5: 554–65.
 43. Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* 1984; 10: 203–09.
 44. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–85.
 45. Lannoy LM de, Danser AH, van Kats JP, Schoemaker RG, Saxena PR, Schalekamp MA. Renin-angiotensin system components in the interstitial fluid of the isolated perfused rat heart. Local production of angiotensin I. *Hypertension* 1997; 29: 1240–51.
 46. Laragh JH, Sealey JE. Relevance of the plasma renin hormonal control system that regulates blood pressure and sodium balance for correctly treating hypertension and for evaluating ALLHAT. *American journal of hypertension* 2003; 16: 407–15.
 47. Lau MM, Stewart CE, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart CL. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes & development* 1994; 8: 2953–63.
 48. Lee MA, Böhm M, Paul M, Bader M, Ganten U, Ganten D. Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)27. *The American journal of physiology* 1996; 270: E919-29.
 49. Lee S, Chu C, Huang E, Lu M, Liu J, Liu C, Hsu H, Lin JA, Kuo W, Huang C. Roles of insulin-like growth factor II in cardiomyoblast apoptosis and in hypertensive rat heart with abdominal aorta ligation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2006; 291: E306-14.
 50. Lehnart S, Marks AR. Regulation of ryanodine receptors in the heart. *Circulation research* 2007; 101: 746–49.
 51. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 2001; 25: 402–08.
 52. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Aufl. Heidelberg: Springer, 2007.

-
53. Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *The Journal of biological chemistry* 1992; 267: 8558–64.
 54. Lumbers ER. Activation of renin in human amniotic fluid by low pH. *Enzymologia*; 40: 329–36.
 55. Madamanchi A. Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *McGill journal of medicine MJM an international forum for the advancement of medical sciences by students* 2007; 10: 99–104.
 56. Matsubara H, Yamamoto J, Hirata Y, Mori Y, Oikawa S, Inada M. Changes of atrial natriuretic peptide and its messenger RNA with development and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats. *Circulation research* 1990; 66: 176–84.
 57. McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P, Lala PK. Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2001; 86: 3665–74.
 58. Mello WC de, Danser AH. Angiotensin II and the heart: On the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000; 35: 1183–88.
 59. Mercure C, Prescott G, Lacombe M, Silversides DW, Reudelhuber TL. Chronic Increases in Circulating Prorenin Are not Associated With Renal or Cardiac Pathologies. *Hypertension* 2009; 53: 1062–69.
 60. Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, Lefkowitz RJ. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science (New York, N.Y.)* 1994; 264: 582–86.
 61. Mosterd A, Hoes AW, Bruyne MC de, Deckers JW, Linker DT, Hofman A, Grobbee DE. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *European heart journal* 1999; 20: 447–55.
 62. Mufti S, Wenzel S, Euler G, Piper HM, Schlüter K. Angiotensin II-dependent loss of cardiac function: mechanisms and pharmacological targets attenuating this effect. *Journal of cellular physiology* 2008; 217: 242–49.
 63. Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990; 344: 541–44.

-
64. Mullins LJ, Payne CM, Kotelevtseva N, Brooker G, Fleming S, Harris S, Mullins JJ. Granulation rescue and developmental marking of juxtaglomerular cells using "piggy-BAC" recombination of the mouse ren locus. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275: 40378–84.
 65. Neumann T, Biermann J, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R, Erbel R. Herzinsuffizienz: Häufigster Grund für Krankenhausaufenthalte –. *Deutsches Ärzteblatt* 2009; 106: M-269.
 66. Neves FA, Duncan KG, Baxter JD. Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. *Hypertension* 1996; 27: 514–17.
 67. Nguyen G. Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clinical science (London, England 1979)* 2011; 120: 169–78.
 68. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer J. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *The Journal of clinical investigation* 2002; 109: 1417–27.
 69. Ohta K, Kim S, Wanibuchi H, Ganten D, Iwao H. Contribution of local renin-angiotensin system to cardiac hypertrophy, phenotypic modulation, and remodeling in TGR (mRen2)²⁷ transgenic rats. *Circulation* 1996; 94: 785–91.
 70. Packer M. Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. *Circulation* 1988; 77: 721–30.
 71. PEQLAB Biotechnologie GmbH. Arbeitsanleitung - peqGOLD TriFast(TM), V.11.05. www.peqlab.de.
 72. Persson PB. Renin: origin, secretion and synthesis. *The Journal of physiology* 2003; 552: 667–71.
 73. Pinson A, Schlüter KD, Zhou XJ, Schwartz P, Kessler-Icekson G, Piper HM. Alpha- and beta-adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1993; 25: 477–90.
 74. Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hütter FJ, Spieckermann PG. Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1982; 14: 397–412.
 75. Pitarresi TM, Rubattu S, Henrikson R, Sealey JE. Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin. *The Journal of biological chemistry* 1992; 267: 11753–59.

-
76. Pratt RE, Carleton JE, Richie JP, Heusser C, Dzau VJ. Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987; 84: 7837–40.
 77. Reudelhuber TL, Ramla D, Chiu L, Mercure C, Seidah NG. Proteolytic processing of human prorenin in renal and non-renal tissues. *Kidney international* 1994; 46: 1522–24.
 78. Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovascular research* 2004; 63: 423–32.
 79. Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, Schlüter K, Böhm M. Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2002; 283: H1253-62.
 80. Saris JJ, Derkx FH, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA, Danser AH. Cardiomyocytes bind and activate native human prorenin: Role of soluble mannose 6-phosphate receptors. *Hypertension* 2001; 37: 710–15.
 81. Saris JJ, Hoen PAC 't, Garrelds IM, Dekkers DHW, den Dunnen JT, Lamers JM, Jan Danser AH. Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II. *Hypertension* 2006; 48: 564–71.
 82. Schäfer M, Frischkopf K, Taimor G, Piper HM, Schlüter KD. Hypertrophic effect of selective beta(1)-adrenoceptor stimulation on ventricular cardiomyocytes from adult rat. *American journal of physiology. Cell physiology* 2000; 279: C495-503.
 83. Schillinger W, Fiolet JW, Schlotthauer K, Hasenfuss G. Relevance of Na⁺-Ca²⁺ exchange in heart failure. *Cardiovascular research* 2003; 57: 921–33.
 84. Schlüter KD, Frischkopf K, Flesch M, Rosenkranz S, Taimor G, Piper HM. Central role for ornithine decarboxylase in beta-adrenoceptor mediated hypertrophy. *Cardiovascular research* 2000; 45: 410–17.
 85. Schmidt RF, Lang F, Hrsg. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie mit 600 vierfarbigen Abbildungen in 1129 Einzeldarstellungen und 77 Tabellen*, 30. Aufl. Heidelberg: Springer, 2007.
 86. Schwinger RH, Münch G, Bölck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1999; 31: 479–91.

-
87. Sealey JE, Laragh JH. Aliskiren, the first renin inhibitor for treating hypertension: reactive renin secretion may limit its effectiveness. *American journal of hypertension* 2007; 20: 587–97.
 88. Shantz LM, Feith DJ, Pegg AE. Targeted overexpression of ornithine decarboxylase enhances beta-adrenergic agonist-induced cardiac hypertrophy. *The Biochemical journal* 2001; 358: 25–32.
 89. Shi Q, Black TA, Gross KW, Sigmund CD. Species-specific differences in positive and negative regulatory elements in the renin gene enhancer. *Circulation research* 1999; 85: 479–88.
 90. Sielecki AR, Hayakawa K, Fujinaga M, Murphy ME, Fraser M, Muir AK, Carilli CT, Lewicki JA, Baxter JD, James MN. Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)* 1989; 243: 1346–51.
 91. Silbernagl S, Lang F. *Taschenatlas der Pathophysiologie*, 2. Aufl. Stuttgart ;, New York: Thieme, 2005.
 92. Tada M, Inui M. Regulation of calcium transport by the ATPase-phospholamban system. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1983; 15: 565–75.
 93. Thermo Fisher Scientific. User`s Manual - NanoDrop 1000, V.3.7, 2008.
 94. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation. *Pharmacological reviews* 2007; 59: 54–87.
 95. TSE Systems GmbH. Bedienungsanleitung - TSE Blutdruck-Messsystem 9002. www.TSE-Systems.com.
 96. van den Meiracker AH, Man Veld AJ in 't, Admiraal PJ, van Ritsema Eck HJ, Boomsma F, Derkx FH, Schalekamp MA. Partial escape of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition during prolonged ACE inhibitor treatment: does it exist and does it affect the antihypertensive response? *Journal of hypertension* 1992; 10: 803–12.
 97. van Kesteren CA, Danser AH, Derkx FH, Dekkers DH, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA. Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells. *Hypertension* 1997; 30: 1389–96.
 98. Wei Y, Li J, Huang J, Zhang X, Zhao H, Cui C, Li Y, Hu S. Elevation of IGF-2 receptor and the possible underlying implications in end-stage heart failure patients before and after heart transplantation. *Journal of cellular and molecular medicine* 2012; 16: 1038–46.

99. Whaley-Connell A, Habibi J, Cooper SA, Demarco VG, Hayden MR, Stump CS, Link D, Ferrario CM, Sowers JR. Effect of renin inhibition and AT1R blockade on myocardial remodeling in the transgenic Ren2 rat. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2008; 295: E103-9.
100. Zhou XJ, Schlüter KD, Piper HM. Hypertrophic responsiveness to beta 2-adrenoceptor stimulation on adult ventricular cardiomyocytes. *Molecular and cellular biochemistry*; 163-164: 211–16.
101. Zimmer H. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News in physiological sciences an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 1998; 13: 203–10.

11. Publikationsverzeichnis

Reisestipendium der DGK zur 76. Jahrestagung der DGK – Herz- & Kreislaufforschung e.V. im April 2010 für folgenden Posterbeitrag:

04/2010 A. Kögel, S.Hinrichs, R.M. da Costa Rebelo,
R.Schreckenber, J.Heger, M.Bader, K.-D.Schlüter
*„Einfluss der verminderten β -adrenergen Ansprechbarkeit
transgener Renin-exprimierender Ratten [TG(mREN2)27] auf
das hypertrophe Remodeling“*
76. Jahrestagung der DGK – Herz- & Kreislaufforschung e.V.
(2010)
Clin. Res. Cardiol. 99, Supplement 1: P1301

weitere Publikationen:

03/2010 K.-D.Schlüter, A.Kögel, R.Schreckenber, J.Heger, G.Euler
*„Effect of reduced β -adrenoceptor responsiveness on
hypertrophic remodelling in renin expressing rats
[TG(mREN2)27]“*
Joint meeting Scandinavian & German Physiological Society
(2010)

03/2009 K.-D.Schlüter , R.Schreckenber, R.M.da Costa Rebelo,
S.Hinrichs, A.Kögel, E.Caglayan, S.Rosenkranz
*PPAR γ activation limits the nonenzymatic effect of renin on
cell lengths in adult ventricular cardiomyocytes*
Acta Physiologica (2009), Volume 195, Supplement 669: P162

12. Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen im Oktober 2013

Andreas Kögel

13. Danksagung

Ich danke ganz besonders Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die Bereitstellung des Themas sowie für die außerordentlich gute Betreuung. Ein offenes Ohr sowie die stete Hilfsbereitschaft waren zu jeder Zeit selbstverständlich.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Bader für die Bereitstellung der Ratten zur Organ- und Gewebeentnahme.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Rolf Schreckenberg, Peter Volk und Nadine Woitasky für die Einweisung und die unermüdliche Unterstützung in sämtlichen Labortechniken, insbesondere der Zellpräparation bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Rui Manuel da Costa Rebelo für die Betreuung der Ratten, sowie Durchführung der Blutdruckmessung und Rattenpräparation bedanken.

Ich bedanke mich auch bei Frau Prof. Dr. Sibylle Wenzel, Dr. Jacqueline Heger, Daniela Schreiber und allen Mitdoktoranden für jegliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Gleichfalls danke ich Daniela Fischer für die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit, Felix Pelka für die Korrektur der englischen Zusammenfassung und Lena Röhl für die wertvolle mentale Unterstützung.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern die mir die Voraussetzungen für diese Arbeit ermöglicht haben.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6079-4



9 783835 196079 4