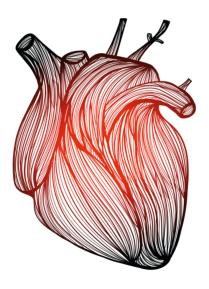
WIRKUNG VON RENIN AUF KARDIOMYOZYTEN DER RATTE UNTER PROHYPERTROPHEN BEDINGUNGEN

Benedikt Josef Rieder



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



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

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

1. Auflage 2016

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 Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen Printed in Germany





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

www.doktorverlag.de

WIRKUNG VON RENIN AUF KARDIOMYOZYTEN DER RATTE UNTER PROHYPERTROPHEN BEDINGUNGEN

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Benedikt Josef Rieder

aus Eichstätt

Aus dem Institut für Physiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rainer Schulz

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

Gutachter: PD Dr. Jochen Pöling

Tag der Disputation: 4. April 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einl	eitung		1
	1.1	Chroni	ische Herzinsuffizienz und myokardiale Hypertrophie	1
		1.1.1	Epidemiologie	1
		1.1.2	Definition	1
		1.1.3	Ätiologie und Pathogenese	2
			1.1.3.1 Kompensationsmechanismen	2
			1.1.3.2 Pathomechanismus Myokardhypertrophie	4
		1.1.4	Einteilungen und Klassifikationen	4
			1.1.4.1 Akute versus chronische Herzinsuffizienz	4
			1.1.4.2 Systolische und diastolische Herzinsuffizienz, ILVEF/PLVEF	5
			1.1.4.3 NYHA- und ACC/AHA-Klassifikation	5
	1.2	Renin	und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	6
		1.2.1	Renin und Prorenin	6
		1.2.2	Die RAAS-Kaskade	7
		1.2.3	Neuere Entwicklungen im RAAS	8
		1.2.4	Das Renin-Angiotensin-System im Fokus der Pharmakologie	9
		1.2.5	Renin und seine Rezeptoren	9
			1.2.5.1 Der (Pro-)Reninrezeptor	11
			1.2.5.2 Der Mannose-6-Phosphat/Insulin-like growth factor II Rezeptor	11
	1.3	Die Hy	ypertonie- und Herzinsuffizienzmodelle in dieser Studie	14
	1.4	Zielset	tzung dieser Arbeit	15
2	Mat	erial		16
_	2.1			16
	2.2			17
	2,2	2.2.1		17
		2.2.1	č	
		2.2.2	Geräte zur Blutdruckmessung	17
		//	Lierue vor Bonorockmettina	1 X

Inhaltsverzeichnis

		2.2.4	Geräte zur Präparation, Zellisolation und Zellkultur	18
		2.2.5	Mikroskop zur Zellgrößenmessung	19
		2.2.6	System zur Zellverkürzungsmessung	19
	2.3	Elektro	onische Datenverarbeitung	19
3	Met	hoden	2	20
	3.1	Spende	ertiere für Kardiomyozyten	20
		3.1.1	Spendertiere für die Stimulationsversuche des in-vitro-Modells	20
		3.1.2	Spendertiere für die Untersuchungen des Lebendmodells	20
	3.2	Blutdr	uck- und Pulsmessung	21
	3.3	Präpara	ation von Herzmuskelzellen adulter Ratten	21
		3.3.1	Aufbau und Vorbereitung	21
		3.3.2	Tiertötung und Präparation der Rattenorgane	22
		3.3.3	Isolationsvorgang	22
	3.4	Kultivi	erung der Kardiomyozyten	23
		3.4.1	Präinkubation und Verbringung der Zellen auf die Kulturschalen	23
		3.4.2	24-stündige Inkubation und Stimulation der Kardiomyozyten	24
	3.5	Mikros	skopische Photographie und Vermessung der Zellgröße	25
	3.6	Zellvei	kürzungsmessung	26
		3.6.1	Elektrische Stimulation der Kardiomyozyten	26
		3.6.2	Messung der Zellverkürzungsparameter	26
			3.6.2.1 Datenerfassung	26
			3.6.2.2 Datenverarbeitung	27
			3.6.2.3 Messprotokoll	28
	3.7	Statisti	k und Präsentation	28
4	Erge	ebnisse	2	29
	4.1	In-vitro	o Modell	29
		4.1.1	Zellgrößenmessung	29
			4.1.1.1 Interaktion von Renin und FCS	29
			4.1.1.2 Abhängigkeit von der Renin-Konzentration	29
			4.1.1.3 Differenzierung des Signalwegs	31
			4.1.1.4 Interaktion von Renin und Endothelin-1	32
		4.1.2	Zellverkürzungsmessung	33

Inhaltsverzeichnis

	4.2	Leben	dmodell	33
		4.2.1	Blutdruck- und Pulsmessung	34
		4.2.2	Organvermessung	35
		4.2.3	Zellgrößenmessung	36
		4.2.4	Zellverkürzungsmessung	38
5	Disk	cussion		47
	5.1	Renin	inhibiert hypertrophe Stimuli in vitro	48
	5.2	Renin	verbessert die myokardiale Kontraktion in vitro nicht	49
	5.3	Renin-	-Überexpression vermittelt geschlechtsabhängig unterschiedliche hämodynamische	
		und ka	ardiale Effekte	50
	5.4	Männl	liche TGR zeigen eine weniger ausgeprägte myokardiale Hypertrophie als ihre	
		sponta	ın hypertensiven Artgenossen	52
	5.5	Die me	eisten Werte der lastfreien Zellverkürzung zeigen keinen wesentlichen Unterschied	
		zwisch	nen SHR und Renin überexprimierenden Ratten	52
	5.6	Mögli	che Fehlerquellen	54
		5.6.1	Alter der Versuchstiere im in und ex vivo-Modell	54
		5.6.2	Notwendige medikamentöse Therapie der SD Rattenstämme	55
	5.7	Klinis	cher Bezug	55
	5.8	Ausbli	ick	56
Zι	usamr	menfas	sung	58
Sι	ımma	ıry		60
ΑI	bkürz	ungsve	rzeichnis	62
ΑI	bbildu	ıngsver	zeichnis	66
Ta	abelle	nverzei	ichnis	67
Li	teratı	ır		68
Pι	ublika	tion		80
Εł	renw	örtlich	e Erklärung	81
D	anksa	gung		82

1 Einleitung

1.1 Chronische Herzinsuffizienz und myokardiale Hypertrophie

1.1.1 Epidemiologie

Herzinsuffizienz gilt in den entwickelten Ländern der Welt als Volkskrankheit. Zusammen mit ihren Folgen war die Herzinsuffizienz 2006 in Deutschland mit rund 317.000 Fällen der häufigste Grund krankheitsbedingter Hospitalisierung und verursachte etwa 2,9 Mrd. Euro an Krankheitskosten (Neumann *et al.* 2009). Nach der chronisch-ischämischen Herzkrankheit und dem akuten Herzinfarkt steht die Herzinsuffizienz seit 1998 konstant an dritter Stelle der Todesursachenstatistik (Neumann *et al.* 2009; Statistisches Bundesamt 2009, 2010a,b, 2012a,b, 2013, 2014, 2007).

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz ist stark alters- (Neumann et~al.~2009) jedoch nicht geschlechtsabhängig (Mosterd, Hoes, et~al.~1999). Im Bereich der unter 45-Jährigen ist das Vorkommen der Erkrankung mit $\leq 10~\rm pro~100.000~Einwohnern$ fast vernachlässigbar. In der Altersgruppe zwischen 45 und 65 Jahren lag die Prävalenz im Jahre 2006 bei 158 pro 100.000 Einwohnern, wohingegen sie in der Altersgruppe $\geq 65~\rm Jahren$ bei 1738 pro 100.000 Einwohnern lag (Neumann et~al.~2009). Im Zuge der prognostizierten Alterung der Gesellschaft, aber auch durch die Verbesserung des Überlebens akuter kardialer Erkrankungen, nahm die Prävalenz bezogen auf die Gesamtbevölkerung in den letzten Jahren deutlich zu. Aus gleichen Gründen ist auch in den nächsten Jahren mit einer weiteren Zunahme zu rechnen (Murray-Thomas et~al.~2003; Neumann et~al.~2009).

1.1.2 Definition

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert Herzinsuffizienz als verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung (Herold 2014). In den Leitlinien der European Society of Cardiology® wird Herzinsuffizienz als abnormale Struktur oder Funktion des Herzens definiert, welche trotz normalen vaskulären Füllungsdrucks zur unzureichenden Versorgung des Stoffwechsel betreibenden Gewebes mit Sauerstoff führt (ESC Chronic Heart Failure Guideline Task Force 2012). Klinisch definiert wird die Herzinsuffizienz als Syndrom mit Symptomen und Zeichen, welche von einer Dysfunktion des

Tabelle 1.1: Symptome und Zeichen der Herzinsuffizienz (nach Mosterd & Hoes 2007).

Symptome	Zeichen
Dyspnoe (insb. bei Belastung, nächtlich)	Ödeme, Aszites
Verminderte Belastungsfähigkeit	Erhöhter Jugularvenendruck
Müdigkeit, Lethargie	Reibendes/pfeifendes Atemgeräusch
Orthopnoe	Tachykardie
Nächtlicher Husten	Dritter Herzton, Herzgeräusche
Keuchen	Hepatomegalie
Anorexie	Verlagerung des Herzspitzenstoßes
Verwirrtheit, Delir (bei älteren)	Kachexie, Muskelschwund

Herzens verursacht werden und eine Verkürzung der Lebensdauer zur Folge haben (ESC Chronic Heart Failure Guideline Task Force 2012; Mosterd & Hoes 2007) (s. Tab. 1.1).

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Als Hauptursachen der chronischen Herzinsuffizienz gelten die koronare Herzerkrankung und die arterielle Hypertonie. Deren Risikofaktoren können somit auch als Hauptrisikofaktoren der chronischen Herzinsuffizienz angesehen werden. Weiterhin können Kardiomyopathien, Klappen- und Shuntvitien, tachyoder bradykarde Rhythmusstörungen sowie metabolische und toxische Noxen (z. B. Alkohol, Kokain, Medikamente wie u. a. Anthrazykline, L-Carnithin-Mangel, Thiaminmangel) eine chronische Herzinsuffizienz mitverursachen. Auch virale und bakterielle Infektionen, endokrine Störungen, Autoimmun- und Speichererkrankungen können zur Pathogenese beitragen (Classen *et al.* 2009; ESC Chronic Heart Failure Guideline Task Force 2012). Eine Schädigung des Herzmuskels führt entweder zu einer Verminderung der linksventrikulären Auswurfleistung, zu einer Störung des diastolischen Bluteinstroms oder zu einer Kombination beider Pathomechanismen und somit zum verminderten Herzzeitvolumen (Classen *et al.* 2009; ESC Chronic Heart Failure Guideline Task Force 2012) (vgl. Abb. 1.1).

1.1.3.1 Kompensationsmechanismen

Zur Aufrechterhaltung der Körperfunktionen versucht der Organismus den Abfall der Herzleistung zu kompensieren. Funktionell spielen dabei in erster Linie der Frank-Starling-Mechanismus, das Bowditch-Phänomen und die Erhöhung der Herzfrequenz eine Rolle (Classen *et al.* 2009; Siegenthaler *et al.* 2006). Eine der wichtigsten Kompensationsreaktionen auf neurohumoraler Ebene dürfte die Aktivierung des β -adrenergen Systems sein. Die Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin hat in der Akutsituation nicht nur positiv chronotrope, sondern auch positiv inotrope und lusitrope Wirkung. Bei anhaltend erhöhter katecholaminerger Belastung kommt es jedoch zur Abnahme der β_1 -Adrenozeptordichte und -sensitivität, was eine deutliche Verminderung der kontraktilen Antwort zur Folge hat. Darüber hinaus kommt es

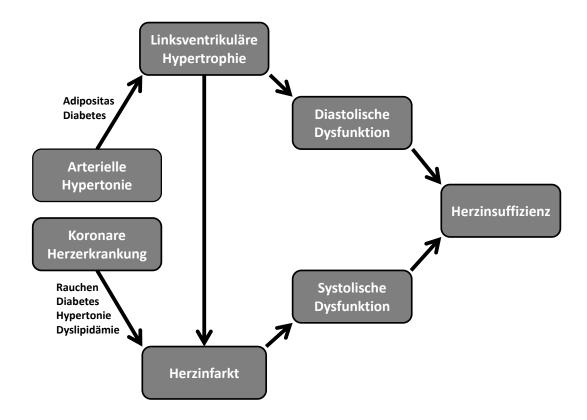


Abbildung 1.1: Pathomechanismus der Herzinsuffizienz. Arterielle Hypertonie führt durch Druckbelastung des linken Ventrikels zusammen mit anderen Risikofaktoren zu linksventrikulärer Hypertrophie, welche wiederum eine diastolische Dysfunktion des Ventrikels zur Folge hat. Die koronare Herzerkrankung führt, gefördert durch die bekannten Risikofaktoren zum Herzinfarkt. Das dadurch entstehende Narbenareal nimmt nicht mehr am Kontraktionsvorgang teil und führt zu systolischen Funktionsstörungen. Beide Pathomechanismen führen alleine oder kombiniert zur Herzinsuffizienz mit den bekannten Symptomen (aus Classen *et al.* 2009).

zur Heraufregulierung von Adrenozeptorkinasen, durch welche die β-Rezeptoren von ihren G-Proteinen entkoppelt werden (Classen *et al.* 2009; Deetjen *et al.* 2005; Siegenthaler *et al.* 2006). Als weiterer wichtiger humoraler Kompensationsweg fungiert das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, welches über Flüssigkeitsresorption und Steigerung des peripheren Wiederstands eine Erhöhung des Blutdrucks herbeiführt, jedoch auch kardiale Hypertrophie und Myokardfibrosierung zur Folge hat (Classen *et al.* 2009; Siegenthaler *et al.* 2006).

Auch über die Ausschüttung von Vasopressin und Endothelin und die daraus resultierende Flüssigkeitsretention und Vasokonstriktion sowie in geringerem Maße durch gegenregulatorische Systeme wie ANP, BNP, Prostaglandine, Bradykinin, Dopamin und Stickstoffmonoxid (NO) versucht der Organismus dem Abfall des Herzzeitvolumens humoral entgegenzuwirken (Classen *et al.* 2009; Siegenthaler *et al.* 2006).

1.1.3.2 Pathomechanismus Myokardhypertrophie

Auch strukturelle Adaptationsmechanismen des Herzens werden zur Verbesserung der Herzleistung aktiviert. Dies betrifft insbesondere die linksventrikuläre Hypertrophie, die zumindest vorübergehend einen regionalen Funktionsausfall des Myokards durch Infarkt oder eine chronische Mehrbelastung ausgleichen kann (Classen *et al.* 2009).

Hypertrophie ist definiert als Erhöhung der Organmasse durch Zunahme der Zellgröße bei nahezu unveränderter Zellzahl (Deetjen *et al.* 2005; Diwan *et al.* 2007) – im speziellen Fall der Kardiomyozyten.

Die linksventrikuläre Hypertrophie stellt aufgrund stark begrenzter bis fehlender Möglichkeit der Kardiomyozyten zur Proliferation die nahezu universelle Kompensationsreaktion gegenüber myokardialer Verletzung oder hämodynamischer Überlastung des Ventrikels dar. Sie führt zu einer Reduktion der, durch vermehrte Vor- oder Nachlast verursachten, erhöhten Spannung der Ventrikelwand, welche dem Laplaceschen Gesetz zufolge K = pr/2d beträgt. Dabei charakterisiert K die Wandspannung, p den transmuralen Druck, r den Radius des Herzlumens und d die Dicke der Ventrikelwand. Zunahme von d führt diesem Gesetz zufolge zu einer Abnahme des Quotienten und somit zur Verringerung von K (Diwan et al. 2007).

Im weiteren Verlauf führt die myokardiale Hypertrophie jedoch zum Untergang von Herzmuskelgewebe durch Vorgänge der Nekrose, Apoptose und Autophagie und Bildung von bindegewebiger Ersatzmatrix. Durch die fehlende Teilnahme dieses Ersatzgewebes am Kontraktionsvorgang führt die Herzhypertrophie letztendlich zu einer allgemeinen Abnahme der ventrikulären Pumpleistung und zum Progress der Herzinsuffizienz. Darüberhinaus vermindert sich auch die elektrophysiologische Stabilität der Kardiomyozyten, wodurch das Risiko für Herzrhythmusstörungen und plötzlichen Herztod stark ansteigt (Classen *et al.* 2009; Diwan *et al.* 2007; Levy *et al.* 1990).

1.1.4 Einteilungen und Klassifikationen

1.1.4.1 Akute versus chronische Herzinsuffizienz

Im Allgemeinen muss die Herzinsuffizienz als chronische Erkrankung betrachtet werden, bei welcher Schübe der Aggravierung Hospitalisierung oder eine vermehrte Zahl an Arztkonsultationen notwendig machen. Auf der anderen Seite ist jedoch auch eine akute Form des Herzversagens abzugrenzen, wobei innerhalb von 24 Stunden schwere Symptome (wie akutes Lungenödem, kardiogener Schock oder anderweitige Symtome auftreten. Dies ist beispielsweise oft im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms zu beobachten (Mosterd & Hoes 2007).

Tabelle 1.2: Einteilung der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association (NYHA) (nach ESC Chronic Heart Failure Guideline Task Force 2012).

Stadium	Beschreibung	
I	Keine Einschränkungen der körperlichen Aktivität. Normale physische Belastung führt nicht zu Atemnot, Müdigkeit oder Palpitationsgefühl.	
II	Leichte Einschränkungen der körperlichen Aktivität. Keine Ruhebeschwerden, aber normale körperliche Belastung führt zu Atemnot, Müdigkeit oder Palpitationsgefühl.	
III	Schwere Einschränkungen der körperlichen Aktivität. Keine Ruhebeschwerden, aber schon leichte körperliche Belastung führt zu Atemnot, Müdigkeit oder Palpitationsgefühl.	
IV	Unfähig, irgendeine körperliche Aktivität ohne Beschwerden zu durchzuführen. Ruhebeschwerden können auftreten. Bei jeglicher körperlicher Belastung nehmen die Beschwerden zu.	

1.1.4.2 Systolische und diastolische Herzinsuffizienz, ILVEF/PLVEF

Etwa die Hälfte der Patienten mit klinisch offenkundiger Herzinsuffizienz haben eine diastolische myokardiale Dysfunktion ohne Einschränkung der systolischen Funktion (Redfield *et al.* 2003). Es lässt sich somit grundsätzlich ein systolischer und ein diastolischer Mechanismus in der Pathogenese der Herzinsuffizienz unterscheiden (Classen *et al.* 2009; Mosterd & Hoes 2007) (s. auch Abb. 1.1). Aufgrund weiter Überschneidung der beiden Formen hat sich jedoch die Einteilung in Herzinsuffizienz mit eingeschränkter oder erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion (Heart failure with impaired/preserved left ventricular ejection fraction, ILVEF/PLVEF) als praktikabler erwiesen (Mosterd & Hoes 2007).

1.1.4.3 NYHA- und ACC/AHA-Klassifikation

Zur Unterteilung des klinischen Schweregrades der Symptome der Herzinsuffizienz hat sich die Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) etabliert, welche diese in vier Stadien von der symptomfreien bis zur schweren Herzinsuffizienz unterteilt. Durch gute medikamentöse Einstellung kann sich die Einstufung eines Patienten in dieser Einteilung verbessern, während die strukturelle kardiale Einschränkung in der Regel fortschreitet (Mosterd & Hoes 2007).

Des weiteren hat sich die Klassifikation des American College of Cardiology und der American Heart Association (ACC/AHA) etabliert, welche die Herzinsuffizienz mit Blick auf strukturelle Veränderungen am Herzen und Symptome ebenfalls in vier Stadien unterteilt (Mosterd & Hoes 2007) (s. Tab. 1.2 und 1.3).

Tabelle 1.3: Einteilung der Herzinsuffizienz nach dem American College of Cardiology und der American Heart Association (ACC/AHA) (nach Mosterd & Hoes 2007).

Stadium	Beschreibung	Beispiel
A	Hohes Risiko, keine Symptome	Bluthochdruck, koronare Herzerkrankung, Diabetes mellitus
В	Strukturelle Herzerkrankung, keine Symptome	Linksventrikuläre Hypertrophie, asymptomatische linksventrikuläre systolische Funktionseinschränkung
С	Strukturelle Herzerkrankung, früher oder gegenwärtig Symptome	Herzinsuffizienzbedingte Dyspnoe oder Müdigkeit
D	Strukturelle Herzerkrankung, therapierefraktäre Symptome	Patienten mit Herzversagen im Endstadium

1.2 Renin und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) oder in seiner erweiterten Form das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist einer der bedeutensten Regelkreise zur Adaption der Herz-Kreislauffunktion an die Bedürfnisse des Körpers. Die RAAS-Kaskade führt zur Vasokonstriktion, zur Retention von Natrium in den Nieren und auf diesen beiden Wegen zu einer Erhöhung des Blutdrucks und leistet damit ein wichtiges Anpassungsverfahren, beispielsweise im Rahmen der Orthostasereaktion oder bei körperlicher Belastung. Gleichzeitig stellt die unkontrollierte Aktivierung dieses Systems einen wesentlichen Faktor zur Entstehung von chronischem Bluthochdruck, myokardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz dar (Heger *et al.* 2013).

1.2.1 Renin und Prorenin

Renin ist ein Enzym und Proteohormon, welches 1898 von Robert Tigerstedt und Per Bergmann identifiziert wurde (Phillips *et al.* 1999). Sein Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert. Unter verschiedenen Säugetierspezies besteht im Renin-Gen eine hohe Übereinstimmung (Heger *et al.* 2013). Am 5'-Ende des Gens befindet sich ein klassischer Promotor von 123 bp, der eine TATA-Box enthält (Petrovic *et al.* 1996). Darüber hinaus wird die Transkription durch einen renalen Enhancer und durch eine Reihe von Cis-Elementen bei etwa -200 bp beeinflusst (Burt *et al.* 1989) und ist sensibel auf cAMP und PPARγ (Germain *et al.* 1997; Todorov *et al.* 2007). Die Translation des Gens wird weiterhin noch durch Stabilisierung der mRNA beeinflusst. Eine Steigerung der Renin-Expression wird so über den cAMP/PKA-Signalweg, eine Unterdrückung über die PKC/Calcium-Signalkaskade vermittelt (Della Bruna *et al.* 1995; Heger *et al.* 2013).

Der hauptsächliche Bildungsort von Renin befindet sich in den juxtaglomerulären Zellen der Nieren.

Dort wird es als Präprorenin translatiert. Nach Abspaltung der Prä-Sequenz erfährt es im Golgi-Apparat eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen. Eine dieser Modifikationen ist die N-Glykosylierung, im Rahmen welcher Prorenin eine Mannose-6-Phosphat (M6P)-Monoester-Gruppe erhält. Diese wird benötigt, um Renin in die dense bodies zur Exozytose zu packen. Sie befähigt das Protein jedoch später auch, als Ligand an den Mannose-6-Phosphat/Insulin-like-growth-factor-II (M6P/IGFII)-Rezeptor zu binden. Die Freisetzung ins Plasma erfolgt als Prorenin oder nach Abspaltung der Pro-Sequenz als Renin, ohne dass die M6P-Gruppe dadurch betroffen ist (Heger *et al.* 2013).

Humanes Renin wird in situ einerseits konstitutiv und andererseits stimuliert durch vielfältige Regulationsmechanismen ausgeschüttet (Pratt *et al.* 1987). Zu diesen Regulationsmechanismen zählt einerseits der Macula densa-Mechanismus, welcher die Chloridkonzentration im distalen Tubulus des Nephrons negativ mit der Plasma-Renin-Konzentration korreliert (Leyssac *et al.* 2000; Persson 2003; Skott 2002), weiterhin das sympathische Nervensystem, durch welches, vermittelt durch β-Rezeptoren auf den juxtaglomerulären Zellen, die Reninausschüttung stimuliert wird (DiBona 2000; Persson 2003) sowie ein blutdrucksensitiver Mechanismus. Dieser wird im Organismus kombiniert mit β-adrenerger Stimulation und Ausschüttung von Hormonen wie Oxytocin, welche ebenfalls die Renin-Sekretion stimulieren (W. Huang *et al.* 2001, 2000; Persson 2003; Skott 2002). Diese Mechanismen führen letztlich zu einer Hyperpolarisation der reninproduzierenden Zellen mit nachfolgender Reninausschüttung (Friis *et al.* 2003; Kurtz *et al.* 1989). Die Inhibition der Renin-Sekretion erfolgt durch Angiotensin II, welches über den Gq-gekoppelten Angiotensin II-Rezeptor 1 und daraus folgende Inhibition der Adenylatzyklase eine Erhöhung des Calciumspiegels in der juxtaglomerulären Zelle und somit eine Depolarisation der Zelle hervorruft und die Reninausschüttung unterdrückt (L. Chen *et al.* 2010; Friis *et al.* 2003; Grünberger *et al.* 2006; Ichihara *et al.* 1995; Kurtz *et al.* 1989).

Als Aspartyl-Protease stellt Renin so das Schlüsselenzym des RAAS dar (Akahane *et al.* 1985; Castrop *et al.* 2010). Auch wenn Prorenin nicht die enzymatische Aktivität von Renin besitzt, sollte es nicht als inaktives Protein betrachtet werden, da es unter anderem durch den M6P-Rest und über eine spezifische Bindungsstelle über Rezeptoren hormonelle Effekte vermitteln kann (Heger *et al.* 2013; Paul *et al.* 2006; van Kesteren *et al.* 1997).

1.2.2 Die RAAS-Kaskade

Ausgangspunkt der RAAS-Kaskade bildet die Freisetzung von Renin aus Myoepithelzellen des juxtaglomerulären Apparats der Nieren. Diese erfolgt aufgrund niedrigen Drucks im Vas afferens des Glomerulus, aufgrund des Abfalls der glomerulären Filtration oder der Chloridkonzentration im distalen Tubulus, sowie stimuliert durch Katecholamine über β -Rezeptoren. Als Endopeptidase katalysiert Renin die Aktivierung des Prohormons Angiotensinogen zum Dekapeptid Angiotensin I. Dieses wird in einem zweiten

Schritt durch das angiotensinkonvertierende Enzym (Angiotensin Converting Enzyme, ACE) zum weitaus aktiveren Hormon Angiotensin II umgesetzt (Deetjen *et al.* 2005; Heger *et al.* 2013). Angiotensin II wirkt schussendlich an Angiotensin II-Rezeptoren (AT-Rezeptoren), von welchen mehrere Formen identifiziert wurden: Über den G-Protein-gekoppelten AT₁-Rezeptor wird einerseits Vasokonstriktion vermittelt, andererseits die Freisetzung von Aldosteron und Adrenalin aus der Nebenniere, sowie Vasopressin (Antidiuretisches Hormon, ADH) aus der Hypophyse stimuliert und darüber eine Steigerung des Blutdrucks bewirkt. Auch das Durstgefühl wird durch den AT₁-Rezeptor moduliert. Am Herzen wird über den AT₁-Rezeptor eine positiv inotrope und chronotrope Wirkung erzielt sowie Zellwachstum und Proliferation von Myozyten und Fibroblasten hervorgerufen. Im juxtaglomerulären Apparat erfolgt durch Angiotensin II eine negative Rückkopplung und Reduktion der Reninausschüttung (Dinh *et al.* 2001; Volpe *et al.* 2002). Zum AT₂-Rezeptor hat Angiotensin II eine ähnlich hohe Affinität wie zum AT₁-Rezeptor. Er scheint jedoch deutlich geringer exprimiert zu werden und vermittelt vor allem antagonistische Effekte zum AT₁-Rezeptor, insbesondere auch antiproliferative und vasodilative Wirkungen (Dinh *et al.* 2001; Steckelings 2011). Neuere Studien postulieren jedoch auch prohypertrophe und proapoptotische Funktionen des AT₂-Rezeptors (Lévy 2004) (vgl. Abb. 1.2).

1.2.3 Neuere Entwicklungen im RAAS

Lange Zeit wurde das RAAS als zirkulierendes endokrines System gesehen: In der Leber gebildetes Angiotensinogen wurde durch Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat zu Angiotensin I und dieses wiederum durch in der Lunge gebildetes ACE zu Angiotensin II gespalten. Inzwischen wurden jedoch in immer mehr Organen lokale Renin-Angiotensin-Systeme identifiziert, bei denen das Organ selbst über sämtliche Schritte zur Bildung von Angiotensin II verfügt. Dies trifft insbesondere auch auf das Nervensystem, die Haut, die Verdauungsorgane, aber auch auf das Gefäßsystem und das Herz zu (Deetjen *et al.* 2005; Heger *et al.* 2013; Paul *et al.* 2006). Die lokale RAS-Aktivität im Herzen steht im Verdacht, sowohl die systolische als auch die diastolische Funktion des Herzens zu beeinträchtigen und durch Anregung des Wachstums der Kardiomyozyten die myokardiale Hypertrophie zu begünstigen. Dies geschieht über die Veränderung des Verhältnisses der schweren Ketten des Myosin (Myosin heavy chain, MHC) zugunsten der β-MHC, durch vermehrte Ablagerung interstitieller Matrixproteine im Herzgewebe und durch TGF-β-1-vermittelte Stimulation der fibroblastischen Matrixproduktion (Ohta *et al.* 1996; Paul *et al.* 2006).

In den letzten Jahren wurden zudem wichtige Erweiterungen des bekannten RAAS entdeckt. Weitere Varianten des Angiotensin wie Angiotensin III, Angiotensin IV, Angiotensin 1-7 und Angiotensin 1-9, welche durch Belassung oder zusätzliche Abspaltung einzelner oder mehrerer Aminosäuren aus Angiotensin I oder Angiotensin II entstehen, sind mehr oder weniger aktive Metabolite dieser Proteine. Sie und mehrere

neue AT-Rezeptoren sind zurzeit Gegenstand der Forschung (Deetjen et al. 2005; Dinh et al. 2001; Heger et al. 2013).

1.2.4 Das Renin-Angiotensin-System im Fokus der Pharmakologie

Das RAS bietet an mehreren Stellen seiner Kaskade Angriffspunkte für antihypertensive Therapiestrategien. Hemmung des angiotensinkonvertierenden Enzyms (ACE-Inhibition), Blockade des Angiotensin II-Rezeptors 1 (AT₁-Rezeptorblockade) und seit wenigen Jahren direkte Inhibition von Renin führen zu einer effektiven Blutdrucksenkung. Insbesondere im Falle der ACE-Hemmer wurden darüber hinaus vom Blutdruck unabhängige kardio- und nephroprotektive Effekte festgestellt (Fyhrquist *et al.* 2008; Lueder *et al.* 2012). Eine ACE-Hemmung vermindert zudem vaskuläre Entzündungsprozesse (Kortekaas *et al.* 2014).

In der CONSENSUS-Studie wurde 1987 bei Patienten mit Herzinsuffizienz durch Therapie mit dem ACE-Hemmer Enalapril eine 40-prozentige Reduktion des primären Endpunkts Mortalität festgestellt (CONSENSUS Trial Study Group 1987). Eine Metaanalyse von 20 randomisierten klinischen Studien zur kardiovaskulären Morbidität und Mortalität unter RAS-Inhibition erbrachte eine allgemeine Mortalitätsreduktion von 5 % und eine Reduktion der kardiovaskulären Mortalität von 7 %. Es zeigte sich jedoch, dass alle beobachteten Effekte auf die Wirkstoffklasse der ACE-Inhibitoren zurückzuführen sind (allgemeine Mortalitätsreduktion von 10 %), wohingegen für die AT₁-Rezeptorblockade keine Mortalitätsreduktion nachgewiesen werden konnte (van Vark *et al.* 2012). So verwundert es nicht, dass sich die RAS-Inhibition und insbesondere die Gruppe der ACE-Hemmer zu einem wichtigen Eckpfeiler der Therapie von Bluthochdruck, Herzinsuffizienz und anderen kardiovaskulären Erkrankungen entwickelt haben (Fyhrquist *et al.* 2008; Lueder *et al.* 2012).

Allen das RAS hemmenden Wirkstoffgruppen gemein ist dabei eine Erhöhung des Plasma-Renin-Spiegels, durch Inhibition des negativen Feedbacks im Sinne der Eigenregulierung und daraus resultierende vermehrte Ausschüttung von Renin (Brooks *et al.* 1997; L. Chen *et al.* 2010; Heger *et al.* 2013; Nussberger *et al.* 2007; van den Eijnden *et al.* 2001).

1.2.5 Renin und seine Rezeptoren

Neben seiner klassischen Rolle im RAAS wurden in den letzten Jahren verschiedene Wirkmechanismen von Renin entdeckt, welche nicht enzymatischer sondern hormoneller Natur sind. So wurden bislang zwei Rezeptoren identifiziert, an welche Renin und auch Prorenin binden. Peters et al. fanden darüber hinaus Hinweise auf einen weiteren Rezeptor, welcher die Internalisierung von unglycosyliertem Renin vermittelt (Peters *et al.* 2002).

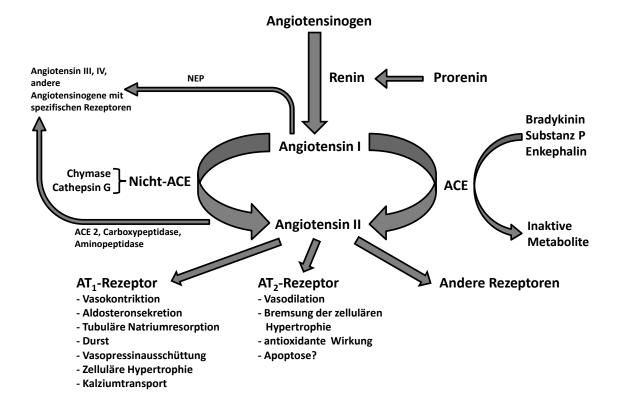


Abbildung 1.2: Schema der Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. ACE: Angiotensin konvertierendes Enzym, NEP: Neurale Endopeptidase. Angiotensinogen wird durch Renin zu Angiotensin I und dann durch ACE-abhängige und -unabhängige Mechanismen zu Angiotensin II. Vor allem dieses vermittelt hormonelle Wirkungen über den AT₁- und den AT₂-Rezeptor sowie über andere Rezeptoren. ACE wirkt darüberhinaus noch bei der Degradierung anderer Hormone mit. Aus Angiotensin I und II werden über verschiedene Enzyme weitere Angiotensin-Isoenzyme gebildet, welche über spezifische Rezeptoren Wirkungen vermitteln. (Nach Volpe *et al.* 2002, modifiziert nach Leibovitz *et al.* 2007)

1.2.5.1 Der (Pro-)Reninrezeptor

Der (Pro)Renin-Rezeptor (PRR) wurde 2002 erstmalig geklont. Als Reaktion auf die Bindung von Renin oder Prorenin aktiviert er intrazelluläre Signalwege (Nguyen, Delarue, et al. 2002) und ermöglicht gleichzeitig dem gebundenen Prorenin eine nichtproteolytische Aktivierung durch Änderung seiner Konformation. Sein Gen befindet sich beim Menschen auf dem X-chromosomalen Locus p11.4 und codiert für ein 350 Aminosäuren langes Peptid mit einer Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne, welche keine Kinaseaktivität besitzt (Nguyen & Muller 2010). Der PRR existiert als Dimer (Nguyen, Delarue, et al. 2002; Schefe et al. 2006) und wird in zahlreichen Organen wie Gehirn, Herz, Plazenta, Leber, Pankreas, Niere, Lunge, Skelett- und Gefäßmuskulatur sowie der Retina exprimiert (Campbell 2008; Nguyen, Delarue, et al. 2002). Prorenin hat eine höhere Affinität zum PRR als Renin, was auf die Tatsache zurückgeführt wird, dass eine handle region im Prosegment die Bindung erleichtert (Danser 2010). Signalwege, welche durch die Bindung von (Pro-)Renin angestoßen werden, schließen die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) ERK1/2 (p42/44-MAPK) ein und bewirken eine Hochregulation von TGFβ1, PAI1, Kollagenen, Fibronectin (Y. Huang, Wingamorntham, et al. 2006) und Cycoloxygenase 2 (COX-2) (Kaneshiro, Ichihara, Takemitsu, et al. 2006), ohne dabei auf die Bildung von Angiotensin II angewiesen zu sein (Nguyen & Muller 2010). Neben diesen profibrotischen Effekten vermittelt der Rezeptor jedoch auch konstitutiv proliferative Effekte, beispielsweise in mesangialen Zellen (Y. Huang, Noble, et al. 2007; Kirsch et al. 2014). Bei transgenen Ratten, welche den humanen PRR in allen Geweben exprimieren, hat dieses vermehrte COX-2-Expression sowie die Entwicklung von Proteinurie und Glomerulosklerose in der Niere zur Folge (Kaneshiro, Ichihara, Sakoda, et al. 2007). Exprimieren die transgenen Ratten den PRR nur im glatten Muskelgewebe, zeigen die Tiere nach ca. sechs Monaten normaler Entwicklung erhöhten Blutdruck und Puls sowie eine Erhöhung des Plasma-Aldosteronspiegels (Burcklé et al. 2006). Da ein genetisches Knockout des PRR bei der Maus zu einem Fruchttod des Embryos führt, scheint er auch eine große ontogenetische Bedeutung zu haben (Campbell 2008). Kürzlich wurde diesbezüglich eine Funktion des Rezeptors im Wnt-Signalweg entdeckt (Cruciat et al. 2010; Nguyen 2011). Eine Untersuchung des (Pro-)Renin-Rezeptor-Gen-Polymorphismus erbrachte bei japanischen Frauen deutliche Unterschiede beim Auftreten von lakunären myokardialen Infarkten und linksventrikulärer Hypertrophie bei unterschiedlichen Genotypen (Hirose et al. 2011). Zusätzlich bewirkt die (Pro-)Renin-Bindung ein negatives Feedback durch Herunterregulation des PRR (Schefe et al. 2006).

1.2.5.2 Der Mannose-6-Phosphat/Insulin-like growth factor II Rezeptor

Aufgrund der oben beschriebenen Glycosylierung von Prorenin und Renin (s. Kap. 1.2.1) sind sie auch in der Lage, den Mannose-6-Phosphat/Insulin-like growth factor II Rezeptor (M6P/IGFIIR) zu binden

1 Einleitung

(Heger et al. 2013; Kornfeld 1992). Sein Gen wurde beim Menschen auf Chromosom 6 q25→q27 lokalisiert (Laureys et al. 1988). Der M6P/IGFII-Rezeptor ist ein Protein, welches aus vier strukturellen Domänen besteht: Er besitzt eine 44 Aminosäuren lange aminoterminale Signal-Sequenz, einen 2296 Aminosäurereste langen extrazytoplasmatischen Teil, bestehend aus 15 wiederholten Sequenzen von 124 bis 192 Aminosäuren, eine einzelne 23 Aminosäurenreste kurze Transmembrandomäne und eine kurze, carboxyterminale, zytoplasmatische Domäne, welche von verschiedenen Autoren mit einer Länge von 163 bis 167 Resten angegeben wird (Heger et al. 2013; Kornfeld 1992). Der M6P/IGFIIR existiert auf Zellmembranen überwiegend als Dimer, jedoch wurden auch monomere und tetramere Formen beschrieben (Catanzaro 2005; Kornfeld 1992). Der Rezeptor bindet IGFII, Retinsäuren, Plasminogen und den Plasminogen-Aktivator-Rezeptor vom Urokinase-Typ ohne Vermittlung von Mannose-6-Phosphat sowie diverse das Mannose-6-Phosphat-Signal tragende Liganden wie Transformig growth factor-β₁, Thyreoglobulin, Proliferin, den leukämiehemmenden Faktor (leukemia inhibitory factor, LIF) und Granzym B, sowie Renin und Prorenin (Heger et al. 2013; Kornfeld 1992). Dabei erfüllt der Rezeptor eine zweifache Aufgabe: Zum einen kann er durch Endozytose und nachfolgende Prozessierung als Clearance-Rezeptor für seine Liganden betrachtet werden. Andererseits überträgt er G-Protein-vermittelt Signale (Heger et al. 2013; Ludwig et al. 1996; Saris, Derkx, Lamers, et al. 2001; van Kesteren et al. 1997).

Der M6P/IGFIIR unterliegt einem stetigen Regenerationszyklus zwischen Zellmembran und intrazellulären Kompartimenten, wobei der Großteil der Rezeptoren intrazellulär lokalisiert ist und nur ein kleiner Teil von etwa 5-10 % extrazellulär Effekte vermitteln kann (Kornfeld 1992).

Über die Expression des Rezeptors ist noch wenig bekannt. Eine reichliche Expression im Herzen, insbesondere in dessen Entwicklungsphase, ist jedoch bestätigt (Heger *et al.* 2013). Während der Embryonalentwicklung ist die Rezeptordichte auf den Kardiomyozyten die dichteste aller fötalen Gewebe. Ein globaler genetischer Knock-out des M6P/IGFIIR führte bei Mäusen zum perinatalen Tod (Ludwig *et al.* 1996) und zu schweren Herzmuskelfehlbildungen im Sinne einer hyperplastischen Kardiomegalie mit linksventrikulärer Wandverdickung und Dilatation. Sie zeigten am Tag 18.5 ein Vierfaches des Herzgewichts von Wildtyp-Mäusen. Zusätzlich wurden noch Fehlbildungen des Septums und der Herzklappen beobachtet. Darüberhinaus wurde bei diesen Tieren ein erhöhter Spiegel von frei zirkulierendem IGF II und IGF-Bindungsprotein festgestellt. Die Daten legen nahe, dass die erhöhten IGF II-Spiegel über vermehrte Bindung an den IGF I-Rezeptor zum beschriebenen Wachstum des Herzens führt (Heger *et al.* 2013; Lau *et al.* 1994). Ein herzspezifischer Knockout des Rezeptors ist jedoch offenbar weder tödlich, noch lässt sich ein spezifischer Phänotyp beobachten (Heger *et al.* 2013).

Druckbelastung des Herzens führt ebenfalls zu einem starken Anstieg der Expression des M6P/IGFIIR. Möglicherweise wird dieser auch durch Angiotensin II vermittelt (S. D. Lee *et al.* 2006).

Die Bindung und endozytotische Aufnahme von Retinsäuren über den M6P/IGFII-Rezeptor führt mög-

1 Einleitung

licherweise ebenfalls zu einer Modulation, welche insbesondere eine Verlangsamung des kardialen Wachstums bewirkt (Kang *et al.* 1999).

Renin besitzt drei verschiedene Stellen, an welchen dem Protein durch N-Glykosylierung ein M6P-Rest angefügt werden kann, um so ebenfalls als Ligand an den M6P/IGFIIR zu binden (Heger *et al.* 2013). Diese Bindung erfolgt konzentrationsabhängig, kann durch M6P kompetitiv gehemmt werden und geht einer endozytotischen Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes und im Falle von Prorenin einer proteolytischen Aktivierung voraus (Admiraal *et al.* 1999; van den Eijnden *et al.* 2001; van Kesteren *et al.* 1997, Saris, Derkx, De Bruin, *et al.* 2001). Dies betrifft jedoch scheinbar nur renales und ovarielles (Pro)Renin, da Prorenin anderen (z.B. amniotischen) Ursprungs anscheinend das M6P-Signal fehlt (Saris, Derkx, De Bruin, *et al.* 2001; Saris, Derkx, Lamers, *et al.* 2001) (Vgl. Abb. 1.3).

Natives Prorenin bindet den Rezeptor darüberhinaus in geringerem Maße als rekombinantes Renin oder Prorenin. Dies ist möglicherweise auf die Gegenwart von Wachstumsfaktoren wie Insulin und IGFII in menschlichen Körperflüssigkeiten zurückzuführen, welche zur Dephosphorylierung sowie zu einer herabgesetzten Internalisierung des M6P/IGFII-Rezeptors führen. Ebenso reduziert ein hoher Plasmaspiegel an löslichem M6P/IGFIIR die (Pro)Renin-Aufnahme in die Kardiomyozyten (Heger *et al.* 2013; Saris, Derkx, Lamers, *et al.* 2001).

Die Rolle des M6P/IGFII-Rezeptors als Clearance-Rezeptor zum lysosomalen Abbau glycosylierter Proteine ist allgemein anerkannt (Heger et al. 2013; Kornfeld 1992). Jedoch besitzt der Rezeptor auch verschiedene Signal-Rezeptor-Funktionen, sei es in der Induktion der Apoptose, in der Interaktion mit Gαq und Phospholipase Cβ (Chu et al. 2009) oder der Modulation der Empfindlichkeit der Zelle für TNFα-induzierte Apoptose oder andere Apoptose-Signalwege (Z. Chen et al. 2004). Insgesamt scheint der Rezeptor am programmierten Zelltod im Sinne von proapoptotischen Stimuli beteiligt zu sein, wobei die bisherigen Erkenntnisse darüber auf neonatale Kardiomyozyten beschränkt sind (Heger et al. 2013). Ebenso nur bruchstückhafte Erkenntnisse bestehen zur Rolle des M6P/IGFII-Rezeptors im Rahmen der kardialen Hypertrophie. Eine spezifische Stimulation des Rezeptors führt über eine G-Proteinvermittelte Signalkaskade zur kardialen Hypertrophie. Als Effektoren wirken dabei Proteinkinase Cα und die Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) sowie die Extracellular-signal Regulated Kinasen 1/2 (ERK, entspricht p42/44 MAPK). Es kommt zum Anstieg der Hypertrophiemarker ANP und BNP (Wang et al. 2012). Die Bedeutung der einzelnen Effektoren wird derzeit noch diskutiert (Kornfeld 1992). Hinrichs et al. beschrieben Renin als erstes Hormon, welches vor allem die Zelllänge von Kardiomyozyten beeinflusst. Für alle anderen prohypertrophen Agonisten wurde bis dato in erster Linie ein Einfluss auf die Zellbreite respektive den Zellradius beobachtet. Die Arbeitsgruppe um Hinrichs zeigte einen Elongationseffekt auf, welcher durch Renin am M6P/IGFIIR auf die Kardiomyozyten bewirkt und über p42/44-MAPK vermittelt wird. Dieser konnte durch M6P und durch die Aktivierung von PPARy, nicht

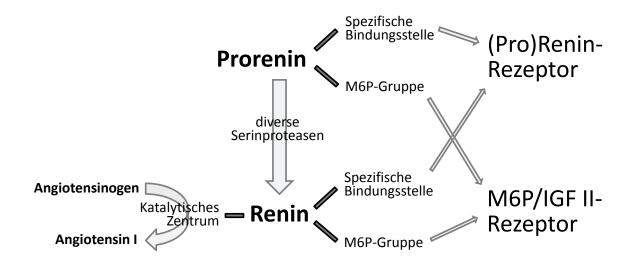


Abbildung 1.3: Prorenin, Renin und ihre Wirkungsmechanismen. Renin wirkt einerseits durch sein katalytisches Zentrum als Endopeptidase bei der Umsetzung von Angiotensinogen zu Angiotensin I mit, zum anderen kann es durch eine spezifische Bindungsstelle an den (Pro)Renin-Rezeptor und durch seinen Mannose-6-Phosphat-Rest (M6P) an den Mannose-6-Phosphat/Insulinlike-Growthfactor II (M6P/IGF II)-Rezeptor binden. Diese hormonellen Eigenschaften hat auch Prorenin, nicht jedoch die enzymatischen.

jedoch durch Glucose-6-Phosphat inhibiert werden und scheint kein reines Phänomen bei Zellen in Kultur zu sein, da er auch bei Kardiomyozyten beobachtet werden konnte, welche aus Renin überexprimierenden transgenen Ratten (TGR(mRen2)27) isoliert wurden. Dies dürfte den Autoren zufolge dem zellulären Korrelat zur konzentrischen und exzentrischen myokardialen Hypertrophie entsprechen (Hinrichs *et al.* 2011).

1.3 Die Hypertonie- und Herzinsuffizienzmodelle in dieser Studie

Spontan hypertensive Ratten (SH Ratten, SHR) und transgene Ratten, welche das murine Renin-2-Gen exprimieren (TGR(mREN2)27, SD Ren+ Ratten) sind Rattenstämme, die beide als adulte Tiere eine arterielle Hypertonie und in der Folge eine myokardiale Hypertrophie entwickeln. Die Genese der hypertensiven Blutdruckwerte unterscheidet sich jedoch deutlich. SH Ratten wurden als Selektion und Kreuzung von Wistar Ratten entwickelt, bei welchen in Blutdruckmessungen erhöhte Blutdruckwerte aufgefallen waren (Okamoto *et al.* 1963; Pinto *et al.* 1998). Sie besitzen somit eine unspezifische, multigenetisch vererbte Anlage zur Entwicklung der Hypertonie. So sind sie als Modell für die essentielle Bluthochdruckerkrankung des Menschen allgemein anerkannt (Smith *et al.* 1979). Renin-überexprimierende Ratten TGR(mREN2)27 entwickeln hingegen einen arteriellen Hypertonus mit streng definiertem genetischen Hintergrund, welcher auf Basis der Überexpression von Renin aus dem übertragenen murinen Renin-2-Gens entsteht. Sie stellen

1 Einleitung

somit kein klassisches Modell für die arterielle Hypertonieerkrankung des Menschen dar, beleuchten jedoch mit Renin und dem RAAS einen zentralen Mechanismus für dessen Genese (Doggrell *et al.* 1998; M. A. Lee *et al.* 1996). Erstaunlicherweise ist bei diesen Tieren der Renin-Spiegel im Plasma und in der Niere relativ niedrig, so dass die Blutdruckentwicklung vor allem auf lokale extrarenale Reninexpression zurückgeführt wird (M. A. Lee *et al.* 1996). Ob und wie eventuell auch der deutlich erhöhte Plasmaspiegel an Prorenin (Mullins *et al.* 1990) dazu beiträgt, ist noch unklar.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit will vor diesem Hintergrund die Auswirkungen von Renin auf die Zellgröße und das Kontraktionsverhalten von Herzmuskelzellen der Ratte untersuchen, welche unter Einfluss prohypertropher Stimuli stehen.

Zu diesem Zweck wurden Kardiomyozyten von männlichen Wistar-Ratten in Kurzzeitkultur genommen und in vitro mit verschiedenen prohypertrophen Stimulanzien und unterschiedlichen Konzentrationen von Renin inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die unterschiedlich stimulierten Zellen miteinander und mit einer unstimulierten Kontrollgruppe bezüglich Größe der Kardiomyozyten und Parameter der lastfreien Kontraktion verglichen.

Um die festgestellten Wirkungen auch an einem Tiermodell ex vivo zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten von adulten spontan hypertensiven Ratten, Renin überexprimierenden transgenen Ratten und als Kontrollgruppe Sprague-Dawley-Ratten ex vivo bezüglich der gleichen Parameter verglichen.

2 Material

2.1 Chemikalien und Substanzen

Calciumchlorid (CaCl₂) Merck KGaA, Darmstadt

Enalapril HEXAL AG, Holzkirchen

Carbogen® (CO₂/O₂-Gasgemisch) Linde AG, Pullach

Cytosin-beta-Arabinofuranosid Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Endothelin-1 Calbiochem®, Merck Millipore, USA

Ethylendiamintetraazetat (EDTA) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Ethanol Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Fetales Kälberserum (FCS) PAA Laboratories GmbH, Kölbe

Standardfuttermittel (Standarddiät) Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Laage

Glucose Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HEPES Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Isofluran Baxter Inc., USA

Karnitin Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Kaliumchlorid (KCl) Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) 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

Magnesiumchlorid (MgCl₂)

Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Magnesiumsulfat (MgSO₄)

Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Natriumchlorid (NaCl)

Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)

Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄)

Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Penicillin/Strepotmycin-Lösung Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2 Material

Renin Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Taurin Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Sämtliche weitere Substanzen und Chemikalien wurden in der höchten verfügbaren Qualität bezogen. Die Aufbewahrung und Lösung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die Bezugsquellen sind Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Roche AG (Mannheim) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen). Das Lösungsmittel für Lösungen, Medien und Puffer ist, soweit nicht anders angegeben, aqua bidest.

2.2 Geräte und Laborbedarf

2.2.1 Allgemeine Geräte

Glasgeräte Schott AG, Mainz

Heizblock neoBlock1, neoLab GmbH, Heidelberg

Kühlschränke Liebherr GmbH, Ochsenhausen

Magnetheizrührer IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen

pH-Meter WTW GmbH, Weilheim

Pipetten Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Wasserbad Aqualine AL 18, Lauda Dr. R. Wobser GmbH &

Co. KG, Lauda-Königshofen

Wasserdemineralisierungsanlage Millipore GmbH, Eschborn

Zentrifugen Allegra 25R centrifuge und Microfuge 18 centrifu-

ge, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalskalpelle VWR International GmbH, Darmstadt

Einmalspritzen B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Handdesinfektionsmittel Sterilium® classic pure, Bode Chemie, Hamburg

Handschuhe (Nitril)

Ansell Healthcare EMEA, Brüssel/Belgien

Kulturschalen Falcon®, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Paraffin-Film Parafilm "M"®, Pechiney Plastic Packaging, USA

Pipetten (5/10 ml) Falcon®, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2 Material

Pipettenspitzen Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg und

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml) Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Reaktionsgefäße (10/50 ml) Falcon®, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Sterilfilter (Porenweite 0,2 µm) GE Healthcare Europe, München

2.2.3 Geräte zur Blutdruckmessung

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

2.2.4 Geräte zur Präparation, Zellisolation und Zellkultur

Brutschrank Heraeus BDD 6220, Thermo Scientifis, USA

Flussmessgerät Flowmeter TS 410, Transonic Systems Inc., Maas-

tricht, Niederlande

Gewebeschneider McIlwain-Tissue-chopper, Mickle Laboratory En-

gineering Company Ltd.; GALA instruments, Bad

Schwalbach

Nylon-Gaze NeoLab GmbH, Heidelberg

Laborwaage Kern & Sohn GmbH, Balingen

Langendorff-Apparatur Eigenbau, Physiologisches Institut, Justus-Liebig-

Universität, Gießen

Präparationsbesteck Aesculap AG, Heidelberg

Relaisbox R2 Elec., Lauda Dr. R. Wob-

ser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen

Schlauchpumpe Ismatec Reglo Dig NS-4/8V1.13, IDEX Health &

Science GmbH, Wertheim

Sterilbank Kendro Laboratory Products GmbH, Langensel-

bold

Thermokammer Eigenbau, Physiologisches Institut, Justus-Liebig-

Universität, Gießen

Umwälzpumpe DP8/17, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG,

Lauda-Königshofen

2.2.5 Mikroskop zur Zellgrößenmessung

Mikroskop mit integrierter Digitalkamera BZ 8000, Keyence Corp., Japan

2.2.6 System zur Zellverkürzungsmessung

Interface INT4, Scientific Instruments GmbH, Heidelberg

Mikroskop TMS-F, Nikon Corp., Japan

Beobachtungsmonitor Philips N.V., Amsterdam, Niederlande

Oszilloskop OS-9020A, GoldStar Oscilloscopes

Stimulator Eigenbau, Physiologisches Institut, Justus-Liebig-

Universität, Gießen

Zeilenkamera ZK4, Scientific Instruments GmbH, Heidelberg

2.3 Elektronische Datenverarbeitung

BZ-Analyzer Keyence Corp., Japan

BZ-Observation Application Keyence Corp., Japan

LATEX 2ε LATEX Project Team

Microsoft Office® 2003 und 2010 Microsoft Corp., USA

Microsoft Windows® XP, 7, 8 Microsoft Corp., USA

MUCELL Scientific Instruments GmbH, Heidelberg

SPSS Statistics 18.0 IBM Deutschland GmbH

Texmaker 4.4.1 Pascal Brachet, Joël Amblard

TeXstudio 2.8.8 Benito van der Zander

TSE-Software 3.3.1 TSE-Systems GmbH, Bad Homburg

dict.leo.org LEO GmbH, Sauerlach

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed NCBI, USA

www.startpage.com Surfboard Holding B.V., Zeist/Niederlande

3 Methoden

3.1 Spendertiere für Kardiomyozyten

Alle Tiere wurden bis zu ihrer Tötung in Gruppen von 5 bis 7 Ratten in Käfigen einer Größe von (Breite x Tiefe x Höhe) 34 cm x 55 cm x 21 cm gehalten und hatten im Tierstall jederzeit Wasser und feste Nahrung in Form einer Standarddiät (Fa. Altromin GmbH und Co. KG) zur Verfügung.

3.1.1 Spendertiere für die Stimulationsversuche des in-vitro-Modells

Die Stimulationsversuche wurden mit Kardiomyozyten männlicher, ca. 3-4 Monate alter, 300-400 g schwerer Wistar Ratten aus der Zucht des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

3.1.2 Spendertiere für die Untersuchungen des Lebendmodells

Als Spendertiere für die Untersuchungen am Lebendmodell wurden Rattenstämme ausgewählt, welche den Bedingungen der Versuchsgruppen in den in vitro durchgeführten Versuchen möglichst nahe kamen. Als Studienarme dienten einerseits spontan hypertensive Ratten (SHR), welche der Zucht des Physiologischen Instituts der Universität Gießen entstammten. Andererseits fanden Sprague-Dawley (SD) Ratten Verwendung, welche heterozygot das murine Renin-2-Gen trugen (TGR(mREN2)27, SD Ren+). Dieser Tierstamm wurde schon ausführlich von Mullins *et al.* 1990 und von M. A. Lee *et al.* 1996 beschrieben. Durch Verpaarung der heterozygot transgenen Ratte mit einer nicht transgenen SD Ratte entstanden Nachkommen, welche mit 50 % Wahrscheinlichkeit erneut heterozygot das Renin-2-Gen besaßen. Die Differenzierung erfolgte postmortal durch Genanalyse auf Integration des Renin-2-Mausgens aus einem ca. 1 cm langen Stück der Schwanzspitze. Die nicht-transgenen SD Ratten dienten als Kontrollgruppe. Die TGR(mREN2)27 und somit auch die nicht transgenen SD Ratten stammten aus dem Max Delbrück Zentrum für molekulare Medizin der Charité Berlin und wurden für im Mittel 79 Tage über das Futter mit Enalapril behandelt, da die Renin überexprimierenden Tiere ohne diese Therapie einerseits nicht fortpflanzungsfähig wurden, andererseits in mehreren Studien schon nach im Mittel zwei Monaten eine erhöhte Mortalität, insbesondere im Rahmen von maligne hypertensiven Ereignissen festgestellt wurde

(Bishop *et al.* 2000; Whitworth *et al.* 1995). Vom Ende der Enalapriltherapie bis zur Durchführung der Untersuchungen vergingen im Mittel 22 (SD) respektive 21 (SD Ren+) Wochen.

3.2 Blutdruck- und Pulsmessung

Den SD, SHR und SD Ren+ Ratten wurde Blutdruck und Puls mittels "Tail-Cuff-Methode" nichtinvasiv gemessen. Das Vorgehen bei der Messung richtete sich nach der Bedienungsanleitung des verwendeten TSE®-Blood Pressure Monitor der 209000 Serie (TSE-Systems GmbH 2005). Da bei Raumtemperatur die Blutzufuhr zum Schwanz der Ratte gedrosselt ist, sodass sich dort keine Blutdruckdaten erheben lassen, erfolgte im Vorfeld der Messung die kontrollierte Erwärmung der Tiere bei einer Lufttemperatur von 35 °C, damit durch Dilation der Schwanzgefäße Pulswellen abgeleitet werden konnten. Die Tiere wurden hierzu in eine an ihre Größe angepasste Messkammer gesetzt. An diesen waren sie in einer einwöchigen Phase zuvor gewöhnt worden um stressinduzierte artifizielle Blutdruckschwankungen zu vermeiden. Zuerst wurde ihnen der freie Zugang zur offen stehenden Messkammer gewährt, in der Folge wurden sie in länger werdenden Zeiträumen in die verschlossene Messkammer gesetzt, bis die etwaige Dauer der Messung erreicht war. Der Messkäfig befand sich auf einer Heizplattform, um die nötige Umgebungstemperatur sicherzustellen. Über den Schwanz des Tieres wurde eine kontrolliert aufblasbare Druckmanschette und distal davon ein Infrarot-Pulssensor platziert. Dieser registrierte die veränderte Lichtdurchlässigkeit des Schwanzes im Rahmen von Druckschwankungen durch die Pulswellen und wandelte sie in elektrische Signale um. Eine Steuerungseinheit diente zur Drucksteuerung der Manschette um diese bis zur Okklusion der Schwanzarterie aufzublasen, sodass der Pulssensor kein Signal mehr erkennen konnte. Der Manschettendruck an diesem Punkt entspricht dem systolischen Blutdruck.

Pro Tier wurden bis zu 12 Einzelmessungen durchgeführt, aus denen dann ein Mittelwert gebildet wurde.

3.3 Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten

Den Versuchen lagen Kurzzeitkulturen frisch isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten der adulten Ratte zugrunde. Zu diesem Zwecke war es notwendig, diese von den restlichen Anteilen des Herzgewebes wie Fibroblasten und extrazellulärer Matrix zu trennen. Die hier beschriebene Zellisolationsmethode wurde von Piper *et al.* 1982 entwickelt und beschrieben.

3.3.1 Aufbau und Vorbereitung

Zur Vorbereitung des Präparationsvorgangs wurde die Langendorff-Perfusionsanlage in Betrieb genommen. Das zwischen den Glasmänteln zirkulierende Wasser wurde auf eine Temperatur von 37 °C aufgeheizt. Der Perfusionskreislauf wurde mit aqua bidest und in einem zweiten Schritt mit Powell-Medium

gespült. Hierauf wurde er mit 80 ml Powell-Medium befüllt, das über die ganze Präparationsdauer mit einem Gemisch aus Carbogen® (Kohlenstoffdioxid 5 % und Sauerstoff 95 %) begast und in blasenfreie Zirkulation gebracht wurde. Beim Erreichen einer Temperatur von 37 °C im Powell-Medium wurde die Präparation begonnen.

Powell-Medium

in aqua bidest

 $\begin{array}{ccc} NaCl & 110,0 \text{ mM} \\ KCl & 2,5 \text{ mM} \\ KH_2PO_4 & 1,2 \text{ mM} \\ MgSO_4 & 1,2 \text{ mM} \\ NaHCO_3 & 25,0 \text{ mM} \\ Glucose & 11,0 \text{ mM} \\ \end{array}$

mit NaOH auf pH 7,4 titriert.

3.3.2 Tiertötung und Präparation der Rattenorgane

Nach ausreichender Narkotisierung mit Isofluran (5 Vol.%) im Exsiccator und Überprüfung einer ausreichenden Bewusstlosigkeit mittels Kornealreflex wurden die Versuchtiere gewogen und danach durch zervikale Dislokation getötet. Die Bauchhöhle wurde distal des Sternums eröffnet, das Zwerchfell zum Zwecke eines inferioren Zugangs zur Thoraxhöhle durchtrennt. Das Herz-Lungen-Paket wurde vorsichtig entnommen und in eine Petrischale mit 4 °C kalter physiologischer Natriumchloridlösung (0,9 %) überführt. Blut- und Gewebereste wurden entfernt, die Lungen am Hauptbronchus abgesetzt und Ösophagus sowie Trachea abpräpariert. Mit einer Pinzette wurde die Aorta möglichst weit distal gefasst und hinter dem Abgang des Truncus anonymus durchtrennt.

3.3.3 Isolationsvorgang

An der Langendorff-Anlage wurde das Herz nun am Aortenstumpf über die Perfusionskanüle gezogen und mit einem Operationsfaden aus Leinen fixiert. Zuerst erfolgte die retrograde Spülung des Herzens mit 30 ml Powell Medium, um Blutreste zu entfernen. Dieses Perfusat wurde verworfen. Nun wurde den verbleibenden 45 ml des Powell-Mediums die Kollagenase-Stammlösung zugegeben. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde auf 0,03 ml/sec festgesetzt um eine für den Verdau optimale Perfusionsdauer von ca. 25 Minuten zu erreichen.

Kollagenase-Stammlösung

Kollagenase 25 mg (chargenabhängig)

Powell-Medium 5 ml

 $CaCl_2$ 12,5 μl

Nach der Perfusion wurden Vorhöfe und Aorta entfernt. Das ventrikuläre Gewebe wurde auf einem Uhrglas in ca. 5 mm große Stücke zerschnitten und auf einer Teflonplatte mittels Gewebezerkleinerer (tissue chopper) mit einer Schnittbreite von 0,7 mm zweimalig mechanisch zerkleinert.

Für den folgenden fünfminutigen Nachverdau wurde der Zellbrei in ein Reagenzröhrchen mit 12 ml der Perfusionslösung überführt. Durch kontinuierliches Auf- und Abpipettieren der Suspension bei 37 °C unter Begasung mit Carbogen® löste sich der Gewebeverbund zunehmend auf.

Die Zellsuspension wurde nach Beendigung des Nachverdaus durch eine Nylongaze mit einer Porengröße von 200 μm filtriert und anschließend drei Minuten lang bei 400 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugats mit Matrixbestandteilen und Zelldetritus wurde behutsam abgesaugt. Das nun folgende Protokoll diente dazu, die Zellen sukzessive in Puffer mit physiologischer Kalziumkonzentration zu überführen und durch Sedimentation abgerundete, avitale Zellen abzusondern. Das entstandene Zellpellet wurde in 6 ml Powell-Medium mit einem CaCl₂-Anteil von 200 μM eluiert und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. Diese wurde für zwei Minuten bei 400 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in Powell-Medium mit einem CaCl₂-Anteil von 400 μM aufgenommen. Die Suspension wurde gleichmäßig in zwei Reagenzgläser dekantiert, die zuvor zur zwei Dritteln mit Powell-Medium (CaCl₂-Anteil von 1 mmol/l) befüllt worden waren. Diese wurden für eine Minute bei 300 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in CCT-Kulturmedium übernommen. So entstand eine Zellpopulation, die zu 70-80 % aus intakten, stäbchenförmigen und calciumtoleranten Kardiomyozyten bestand.

3.4 Kultivierung der Kardiomyozyten

Alle Arbeiten mit Nährmedien und Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.4.1 Präinkubation und Verbringung der Zellen auf die Kulturschalen

Um sicherzustellen, dass sich möglichst zahlreiche Kardiomyozyten auf den Böden der Kulturschalen anheften, wurden diese am Vortag mit 1,5 ml Vorinkubationsmedium beschichtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dieses Medium wurde unmittelbar vor dem Ausplattieren der Kardiomyozyten abgesaugt.

3 Methoden

CCT-Kulturmedium

Medium 199/Earls's Salt 9,62 g/l
HEPES 15 mM
Kreatin 5 mM
Karnitin 2 mM
Taurin 5 mM

Cytosin-beta-Arabinofuranosid 100 µM

Vorinkubationsmedium

in CCT-Kulturmedium

FCS 4 % (vol./vol.)
Penicillin/Streptomycin 2 % (vol./vol.)

Das bei der Zellpräparation gewonnene Pellet wurde vorsichtig in ca. 20 ml 37 °C warmem CCT-Kulturmedium gelöst und die so gewonnene Suspension gleichmäßig auf die vorinkubierten Zellkulturschalen verteilt. Nach einer zweistündigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C ohne CO2-Begasung wurden die Zellen zweimal mit 37 °C warmem CCT-Medium gewaschen, um nicht haftende und abgerundete Zellen zu entfernen. Nun schloss sich für die in-vitro-Versuche die 24-stündige Inkubation und für die Untersuchung des Lebendmodells die direkte mikroskopische Untersuchung an.

3.4.2 24-stündige Inkubation und Stimulation der Kardiomyozyten

Nach den Waschvorgängen wurden die Zellen gemäß den Versuchsprotokollen stimuliert und für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank ohne CO2-Begasung inkubiert.

Versuchsprotokolle in Reihenfolge ihrer Durchführung:

Stimulationsprotokoll 1 je 4 Kulturschalen

- Kontrolle (keine Stimulation)
- FCS 10 µl/ml
- Renin 1 ng/ml
- FCS 10 µl/ml + Renin 1 ng/ml

Stimulationsprotokoll 2 je 4 Kulturschalen

- Kontrolle (keine Stimulation)
- Endothelin-1 100 nM

- Renin 1 ng/ml
- Endothelin-1 100 nM + Renin 1 ng/ml

Stimulationsprotokoll 3 je 4 Kulturschalen

- FCS 10 µl/ml
- FCS 10 µl/ml + Renin 0,01 ng/ml
- FCS 10 µl/ml + Renin 0,1 ng/ml
- FCS 10 µl/ml + Renin 1 ng/ml

Stimulationsprotokoll 4 je 4 Kulturschalen

- FCS $10 \mu l/ml + M6P 10 \mu M$
- FCS 10 μl/ml + Renin 0,01 ng/ml + M6P 10 μM
- FCS 10 μ l/ml + Renin 0,1 ng/ml + M6P 10 μ M
- FCS $10 \mu l/ml + Renin 1 ng/ml + M6P 10 \mu M$

Stimulationsprotokoll 5 je 4 Kulturschalen

- FCS $10 \mu l/ml + SB202190 1 \mu M$
- FCS 10 μl/ml + Renin 0,01 ng/ml + SB202190 1 μM
- FCS 10 μl/ml + Renin 0,1 ng/ml + SB202190 1 μM
- FCS 10 μ l/ml + Renin 1 ng/ml + SB202190 1 μ M

3.5 Mikroskopische Photographie und Vermessung der Zellgröße

Unter dem Mikroskop (Keyence BZ-8000) wurden bei 20-facher Vergrößerung digitale Photos der ersten acht Bildausschnitte jeder Kulturschale aufgenommen, auf welchen mindestens zwei vitale, nicht abgerundete Kardiomyozyten klar abgrenzbar waren. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine der Zellen auf zwei Photos abgebildet war. Sämtliche auf den Photos klar abgrenzbare Kardiomyozyten wurden in der Zellmitte in Länge und Breite vermessen. Daraus wurde unter Annahme einer annähernd zylindrischen Zellform rechnerisch ($Volumen = (\frac{1}{2}*Breite)^2*3,1415*Länge$) ein Zellvolumen ermittelt und neben den Längen- und Breitenwerten für die weitere Auswertung herangezogen.

3.6 Zellverkürzungsmessung

Die Messung der Zellverkürzung wurde bereits 1997 von Schlüter et al. beschrieben (Schlüter et al. 1997).

3.6.1 Elektrische Stimulation der Kardiomyozyten

Die Kulturschale wurde mit Hilfe einer Spezialhalterung auf dem Objekttisch eines Mikroskops fixiert und mit einem speziell präparierten Kulturschalendeckel verschlossen.

Dieser Deckel besaß vier Bohrlöcher an den Ecken eines gedachten Quadrats, dessen geometrischer Mittelpunkt mit dem geometrischen Mittelpunkt der runden Kulturschale zusammenfällt. Durch jeweils zwei benachbarte dieser Löcher war je ein Platindraht ein- und wieder ausgeführt worden, der angeschlossen an einen Elektrostimulator und in linearem, parallelem Verlauf in das Kulturmedium eintauchend die Funktion einer Stimulationselektrode im Sinne einer Kathode oder Anode übernahm. So entstand unter Einbeziehung des Kulturmediums ein geschlossener Stromkreis zwischen den beiden Polen des Elektrostimulators. Legte man zwischen den Elektroden eine Spannung an, entstand nach den Gesetzen der klassischen Elektrodynamik ein elektrisches Feld.

Durch biphasische Stimulation aus zwei entgegengesetzten, jeweils 0,5 ms dauernden Rechteckspannungen von 60 V wurden die Kardiomyozyten in diesem Feld in einer Frequenz von 2 Hz zur Kontraktion angeregt und so die unregelmäßig auftretenden Spontankontraktion einzelner Myozyten synchronisiert. Dieser Vorgabe zur Kontraktionsfrequenz beugte sich der Großteil der Zellen. Nur diese wurden bei der anschließenden Messung der Zellverkürzungsparameter berücksichtigt.

3.6.2 Messung der Zellverkürzungsparameter

Die Ermittlung der Parameter zur Zellverkürzung erfolgte mit einer Geräteanordung der Firma Scientific Instruments GmbH, Heidelberg. Die Kulturschale mit den über Nacht inkubierten Kardiomyozyten befand sich mit der oben beschriebenen Stimulationsvorrichtung auf dem Objekttisch eines Lichtmikroskops (Nikon TMS-F), welches die Beobachtung der sich kontrahierenden Myozyten ermöglichte. An dieses Mikroskop waren zwei Kamerasysteme angeschlossen, eine Videokamera zur Darstellung des Okularbildes auf einem Bildschirm sowie eine Zeilenkamera. Dies ist eine digitale Kamera, die im Gegensatz zu konventionellen Kameras kein zweidimensionales Raster zur Photodetektion besitzt, sondern eine einzelne Sensorzeile, die – im Falle des hier verwendeten Systems – Helligkeitswerte mit hoher örtlicher und zeitlicher Auflösung registriert und an ein Verarbeitungs- und Ausgabesystem übermittelt.

3.6.2.1 Datenerfassung

Um eine Zellverkürzung mit der Zeilenkamera beobachten zu können, musste die Zelle durch Verdrehen und Verschieben der Kamera und der Kulturschale gegeneinander so positioniert werden, dass sie mit

3 Methoden

ihrer Längsachse in der Sensorzeile zu liegen kam. Durch die unterschiedlichen Helligkeitswerte der Zelle und des Hintergrunds registriert die Kamera einen Signalverlauf, der nicht auf einem Monitor, sondern über ein Interface als y-Auslenkung über der x-Achse eines Oszilloskops dargestellt wird. Als Ablenkzeit wurde der Horizontalverstärker des Oszilloskops auf 0,1 ms/cm, als Ablenkspannung des Vertikalverstärkers 5 V/cm eingestellt. Bei korrekter Ausrichtung der Zelle gegen die Zeilenkamera zeigte sich so auf dem Oszilloskop ein Helligkeitsprofil, das durch einen steilen Anstieg beziehungsweise einen steilen Abfall der Helligkeitswerte an den Zellenden gekennzeichnet war, die sich synchron zur auf dem Bildschirm beobachtbaren Zellkontraktion bei Stimulation gegeneinander bewegten. Auf einem zweiten Kanal des Oszilloskops lag eine über das Interface regulierbare Spannung an, die sich auf dem Monitor als in y-Richtung frei verstellbare horizontale Linie darstellte. Auf dieser ließen sich zwei Triggerpunkte horizontal über der x-Achse einstellen. Erreichte die ansteigende Spannung des Zellbildes den durch den Triggermarker vorgegebenen Wert, konnte das Oszilloskop die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzeichnen. Visualisiert wurde dies durch einen horizontalen Sprung der Linie von Kanal zwei aus der Nulllinie in die Höhe. Wurde der Wert hinter dem zweiten Triggermarker wieder unterschritten, endete die Aufzeichnung und die Linie von Kanal zwei sprang zurück auf null. Kontrahierte sich nun eine Zelle und veränderte sich so die Amplitudenposition des Zellbilds über der x-Achse, so veränderte sich auch die Stelle, an der der Triggerwert unterschritten und so die Registrierung begonnen, respektive beendet wurde.

3.6.2.2 Datenverarbeitung

Die Spannungszustände des Interface wurden mithilfe eines Registriergeräts im Computer über das Programm MUCELL der Firma Scientific Instruments GmbH aufgezeichnet. Anhand dieser Registrierungen erstellte das Programm eine Funktion der Zelllänge über der Zeit und so einen Graphen, der die Verkürzung der Zelle in Abhängigkeit von der Zeit darstellte. Es registrierte jeweils fünf Kontraktionen einer Zelle und ermittelte folgende Werte als Mittlungen aus den fünf Einzelmessungen:

- 1. die maximale Zelllänge (L_{max} ; μ m)
- 2. die minimale Zelllänge (L_{min} ; μ m)
- die Zeit vom Beginn der Verkürzung bis zum Erreichen der minimalen Zelllänge ("Time to peak"; ms)
- die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (V_{Contr}; aus der ersten Ableitung der Kontraktionsfunktion; μm/s)
- 5. die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (V_{Relax} ; aus der ersten Ableitung der Relaxationsfunktion; $\mu m/s$)
- 6. die Zeit von 50 %-iger Zellverkürzung bis zur vollständigen Verkürzung (ms)

7. die Zeit von der maximalen Verkürzung bis zur Relaxation um 50 % der Zellverkürzungsstrecke (ms)

Als weiterer Parameter wurden aus diesen Werten errechnet:

 $\Delta L/L = \frac{L_{max} - L_{min}}{L_{max}}$; Man subtrahiere von der diastolischen Zelllänge die systolische und dividiere diese Differenz durch die diastolische Zelllänge. Dieser Wert spiegelt die Verkürzung der Zelle in Relation zur Zelllänge wieder.

3.6.2.3 Messprotokoll

Aus jeder Kulturschale wurden neun Zellen je viermal vermessen, wobei zwischen jeweils zwei Messungen 10 Sekunden gewartet wurde.

3.7 Statistik und Präsentation

Die in den Messungen gewonnenen Daten wurden als Mittelwerte und Standardabweichungen zusammengefasst. Aus den Standardabweichungen wurde der Standardfehler (Standard Error of the Means, SEM) berechnet und mit dargestellt. Um bis zu vier Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt und die Daten anschließend einer post-hoc-Analyse durch den Student-Newman-Keuls-Test, respektive bei den Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen einem Dunnett-Test unterzogen. Das Signifikanzniveau wurde in dieser Arbeit auf p < 0,05 festgelegt.

Die numerischen Werte der Ergebnisse sind in dieser Arbeit entweder im Fließtext oder in Tabellenform als Mittelwerte und SEM (Blutdruck- und Herzfrequenzparameter als Mittelwerte und Standardabweichung) angegeben. Zur besseren Anschaulichkeit wurden zahlreiche Werte zusätzlich in graphischer Form dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 In-vitro Modell

4.1.1 Zellgrößenmessung

Die Zellen der Stimulationsreihen wurden unter dem Mikroskop in Länge und Breite vermessen.

4.1.1.1 Interaktion von Renin und FCS

Wie Hinrichs *et al.* 2011 beschrieben hatten, zeigte sich nach Stimulation der Myozyten mit 10 ng/ml Renin eine signifikante Vergrößerung der Zelllänge. In der unstimuliert mitgeführten Kontrollgruppe betrug die mittlere Zelllänge 104,30 μ m (SEM = 1,85 μ m), nach Stimulation mit 10 ng/ml Renin erhöhte sich die Zelllänge signifikant auf 111,04 μ m (SEM = 1,79 μ m). Eine Stimulation mit fötalem Kälberserum (10 % vol./vol.) erbrachte keine signifikante Zellverlängerung (mean = 98,56 μ m, SEM = 1,92 μ m). Bei gleichzeitiger Stimulation durch Renin und FCS zeigte sich der elongierende Effekt von Renin aufgehoben (mean = 100,46 μ m, SEM = 1,67 μ m) (s. Abb. 4.1).

In der Breite zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (mean = $24,34 \, \mu m$, SEM = $0,42 \, \mu m$), wie bei diesem allgemeinen Hypertrophiestimulator erwartet (Maeno *et al.* 2000; Ono *et al.* 2000; Simpson *et al.* 1982), eine deutliche Verbreiterung der Zellen unter Einfluss von fötalem Kälberserum. Die Zellbreite wuchs hierunter auf durchschnittlich $26,66 \, \mu m$ (SEM = $0,52 \, \mu m$). Unter Stimulation mit Renin konnte keine signifikante Vergrößerung der Zellbreite verzeichnet werden (mean = $25,44 \, \mu m$, SEM = $0,41 \, \mu m$), jedoch zeigte sich auch unter kombinierter Stimulation mit FCS und Renin keine signifikante Zellverbreiterung (mean = $23,94 \, \mu m$, SEM = $0,53 \, \mu m$) (s. Abb. 4.2).

4.1.1.2 Abhängigkeit von der Renin-Konzentration

Zur Feststellung, ob es sich bei den beobachteten Effekten um eine konzentrationsabhängige Wirkung handelt, wurde eine Versuchsanordnung im Sinne einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve durchgeführt. Alle Versuchsarme wurden mit 10% (vol/vol.) FCS stimuliert. Zugegeben wurden ansteigende Konzentrationen von Renin. Die Zellen der basalen Stimulation mit FCS zeigten eine mittlere Länge von $103,13~\mu m$ (SEM = $1,66~\mu m$), unter Zugabe von 0,1~ng/ml (mean = $104,95~\mu m$, SEM = $1,58~\mu m$), 1~ng/ml (mean =

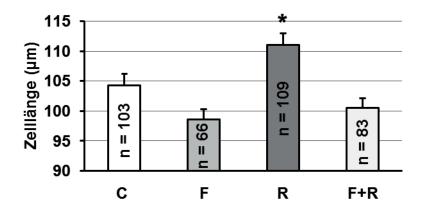


Abbildung 4.1: Einfluss von Renin auf die Zelllänge unter Interaktion mit FCS. Dargestellt sind Zelllängen (μ m) basal (Kontrolle, C), unter Stimulation mit FCS 10 % (vol./vol.) (F), Renin 10 ng/ml (R) und der Kombination aus FCS und Renin (F+R). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. *, p < 0.05 vs. C, F und F+R.

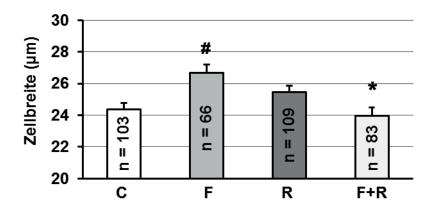


Abbildung 4.2: Einfluss von Renin auf die Zellbreite unter Interaktion mit FCS. Dargestellt sind Zellbreiten (μ m) basal (Kontrolle, C), unter Stimulation mit FCS 10 % (vol./vol.) (F), Renin 10 ng/ml (R) und der Kombination aus FCS und Renin (F+R). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. *, p < 0.05 vs. F, #, p < 0.05 vs. C.

 $104,01 \ \mu m$, SEM = $1,69 \ \mu m$) und $10 \ ng/ml$ Renin (mean = $103,90 \ \mu m$, SEM = $1,86 \ \mu m$) ergab sich keine signifikante Tendenz der Zelllängen.

Die Breitenentwicklung der Zellen im gleichen Setting zeigte eine konzentrationsabhängige Inhibition des hypertrophen Stimulus von alleinigem FCS (mean = 31,85 μ m, SEM = 0,96 μ m) bei zunehmenden Reninkonzentrationen. Durch Zugabe von 0,1 ng/ml Renin ergab sich zwar noch eine nicht signifikante Verkürzung auf gemittelt 30,34 μ m (SEM = 0,58 μ m), schon bei Zugabe von 1 ng/ml reduzierte sich die Zellbreite jedoch signifikant (mean = 29,00 μ m, SEM = 0,76 μ m) gegenüber dem nur mit FCS stimulierten Arm und bei Addition von 10 ng/ml (mean = 27,34 μ m, SEM = 0,63 μ m) bestand auch Signifikanz gegenüber dem mit FCS und 0,1 ng/ml Renin stimulierten Arm (Abb. 4.3).

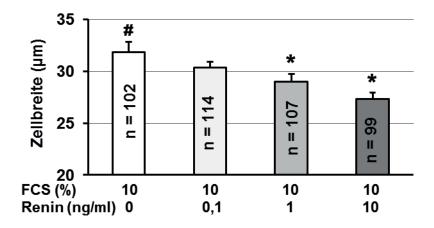


Abbildung 4.3: Interaktion von FCS mit ansteigenden Konzentrationen von Renin hinsichtlich der Zellbreite. Dargestellt sind Zelllängen (μ m) unter Stimulation mit FCS 10 % (vol./vol.) und ansteigenden Konzentrationen von Renin. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. *, p < 0.05 vs. #.

Tabelle 4.1: Interaktion von FCS und ansteigenden Konzentrationen von Renin in Anwesenheit von M6P hinsichtlich Zelllänge und -breite.

FCS 10 % M6P 10 μM	Zellläng	де (µm)	Zellbreite (µm)		
Renin (ng/ml)	mean	SEM	mean	SEM	
0	98,8	1,55	26,17	0,57	
0,1	97,92	1,72	25,68	0,55	
1,0	102,77	1,62	25,25	0,62	
10	99,74	1,77	26,21	0,55	

4.1.1.3 Differenzierung des Signalwegs

Zur Differenzierung der nichtenzymatischen Signalwege, über welche der Effekt vermittelt wird, erfolgten Versuche, in welchen bei gleicher Versuchskonstellation der M6P/IGF2-Rezeptor respektive der Signalweg des (Pro-)Reninrezeptors inhibiert wurden. Unter der Annahme, dass die genannten Effekte über den M6P/IGF2-Rezeptor vermittelt werden (vgl. die Versuche von Hinrichs *et al.* 2011), wurde die oben genannte Anordnung unter Zugabe einer hoch konzentrierten M6P-Lösung (10 µM) im Sinne einer kompetitiven Hemmung am M6P/IGF2-Rezeptor wiederholt. Unter diesen Bedingungen zeigte sich keine signifikante Zelllängen- oder -breitenveränderung unter Stimulation mit alleinigem FCS und Zugabe von ansteigenden Renin-Konzentrationen (s. Tab. 4.1, Abb. 4.4).

Da der Signalweg des (Pro-)Reninrezeptors die p38-MAP Kinase einschließt (Saris, 't Hoen, *et al.* 2006), diese jedoch gleichzeitig nicht in der Signalkaskade der Reninwirkung am M6P/IGF2-Rezeptors aktiviert wird (Hinrichs *et al.* 2011), wurde die Konzentrations-Wirkungs-Kurve auch durch Zugabe von deren selektiven Inhibitor SB202190 (1 μM) zu allen Versuchsarmen abgewandelt. Auch hier konnte keine signifikante Zelllängen- oder -breitenveränderung nachgewiesen werden (s. Tab. 4.2, Abb. 4.5).

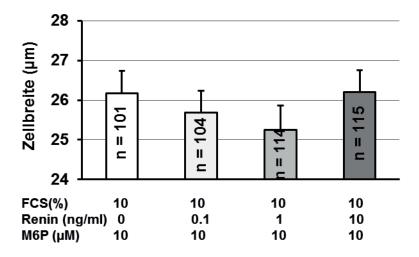


Abbildung 4.4: Interaktion von FCS mit ansteigenden Konzentrationen von Renin hinsichtlich der Zellbreite in Anwesenheit von M6P. Dargestellt sind Zellbreiten (μm) unter Stimulation mit FCS 10 % (vol./vol.) und ansteigenden Konzentrationen von Renin sowie 10 μM M6P. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen.

Tabelle 4.2: Interaktion von FCS und ansteigenden Konzentrationen von Renin in Anwesenheit von SB202190 hinsichtlich Zelllänge und -breite.

FCS 10 %	Zellläng	де (µm)	Zellbreite (µm)		
SB202190 1 µM Renin (ng/ml)	mean	SEM	mean	SEM	
0	99,32	1,19	27,04	0,54	
0,1	100,34	1,25	26,10	0,57	
1,0	100,12	1,24	27,81	0,54	
10	99,95	1,31	26,37	0,55	

4.1.1.4 Interaktion von Renin und Endothelin-1

Zum Nachweis, dass die inhibierende Wirkung von Renin nicht nur auf den allgemeinen hypertrophen Stimulus durch FCS sondern auch in Interaktion mit spezifischen hypertrophen Stimuli, wie Endothelin-1 (Drawnel *et al.* 2013; Ito *et al.* 1991) eintritt, wurde die initiale Versuchsanordnung durch Ersatz von FCS durch 100 nmol/ml Endothelin modifiziert.

In der unstimulierten Kontrollgruppe ergab sich eine mediane Zelllänge von 119,20 μ m (SEM = 1,89 μ m). Wie erwartet, ergab sich unter Zugabe von Endothelin keine (Median = 118,22 μ m, SEM = 1,99 μ m), jedoch unter Stimulation durch Renin eine signifikante Zellverlängerung (Median = 125,30 μ m, SEM = 2,14 μ m). Bei kombinierter Stimulation betrug die Zelllänge im Median 123,39 μ m (SEM =1,73 μ m) (s. Abb. 4.6). Hinsichtlich der Zellbreite zeigte sich verglichen mit der Kontrolle (mean = 28,08 μ m, SEM = 0,44 μ m) durch Stimulation mit Endothelin eine signifikante Zellverbreiterung, im Mittel auf 29,72 μ m (SEM = 0,58 μ m). Bei Zugabe von Renin zeigte sich keine nennenswerte Zellbreitenveränderung verglichen mit der Kontrolle (mean = 27,43 μ m, SEM = 0,43 μ m), durch Stimulation mit Endothelin und

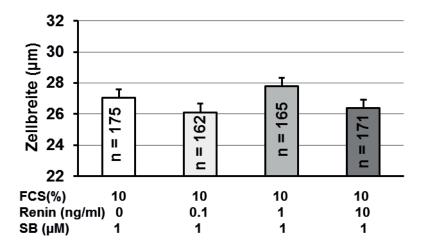


Abbildung 4.5: Interaktion von FCS mit ansteigenden Konzentrationen von Renin hinsichtlich der Zellbreite in Anwesenheit von SB202190. Dargestellt sind Zellbreiten (μm) unter Stimulation mit FCS 10 % (vol./vol.) und ansteigenden Konzentrationen von Renin sowie 1 μM SB202190. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen.

Renin zeigte sich die Zellbreite signifikant geringer als bei alleiniger Stimulation mit Endothelin (mean = $27,48 \mu m$, SEM = $0,48 \mu m$) (s. Abb. 4.7).

4.1.2 Zellverkürzungsmessung

Zur Untersuchung, ob Renin auch Auswirkung auf den negativen Einfluss hypertropher Stimuli auf die Kontraktions- und Relaxationparameter der Kardiomyozyten hat, wurden Messungen der lastfreien Zellverkürzung unter dem Zeilenmikroskop durchgeführt. Als Parameter zur Beurteilung der kardiomyozytären Kontraktion wurde das Ausmaß Zellverkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge $\Delta L/L$ sowie die maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Zellen ermittelt.

Verglichen mit der basalen relativen Zellverkürzung in der Kontrollgruppe von im Mittel 10,64% (SEM = 0,32%), reduzierte sich diese durch Zugabe sowohl von FCS (mean = 9,70%, SEM = 0,30%) als auch unter Simulation mit Renin (mean = 9,47%, SEM = 0,32%) signifikant. Auch unter kombinierter Stimulation zeigte sich gegenüber der Kontrolle eine signifikante Verschlechterung der relativen Verkürzung (mean = 9,20%, SEM 0,29%) (s. Abb. 4.8).

Auch die maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit wird durch die Stimulation mit FCS sowie deren Kombination negativ beeinflusst (s. Tab. 4.3 und Abb. 4.9 und 4.10).

4.2 Lebendmodell

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich die bisher gezeigten Ergebnisse auf ein Rattenmodell ex vivo übertragen lassen. Um die Versuchsgruppen aus dem in vitro-Modell möglichst

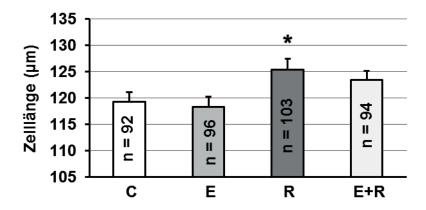


Abbildung 4.6: Einfluss von Renin auf die Zelllänge unter Interaktion mit Endothelin. Dargestellt sind Zelllängen (μ m) basal (Kontrolle, C), unter Stimulation mit Endothelin 100 nmol/ml (E), Renin 10 ng/ml (R) und der Kombination aus Endothelin und Renin (E+R). Dargestellt sind Mediane und SEM für n Zellen. *, p < 0.05 vs. C.

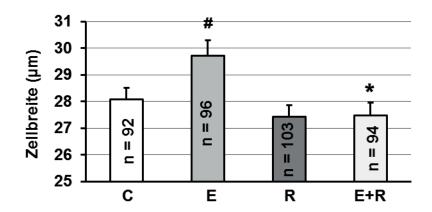


Abbildung 4.7: Einfluss von Renin auf die Zellbreite unter Interaktion mit Endothelin. Dargestellt sind Zellbreiten (μ m) basal (Kontrolle, C), unter Stimulation mit Endothelin 100 nmol/ml (E), Renin 10 ng/ml (R) und der Kombination aus Endothelin und Renin (E+R). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. #, p < 0.05 vs. C, *, p < 0.05 vs. E.

nahe zu kommen, wurden Renin überexprimierende Sprague-Dawley-Ratten (SD Ren+) und spontan hypertenisve Ratten (SH, SHR) ausgewählt. Als Kontrollgruppe wurden Sprague-Dawley-Ratten (SD) ohne Renin-Überexpression verwendet.

4.2.1 Blutdruck- und Pulsmessung

Vor der Tötung wurden die Blutdruck- und Pulsparameter der Tiere erhoben. Verglichen mit den SD Ratten zeigte sich bei den SD Ren+ Ratten eine mäßige und bei den SH Ratten eine deutliche Erhöhung der erhobenen Parameter (s. Tab.4.4). Betrachtet man isoliert die männlichen Tiere, zeigten sich die Pulswerte insbesondere bei den SH Ratten signifikant erhöht. Die Blutdruckwerte der SD Ren+ Ratten und SH Ratten waren nahezu identisch und signifikant gegenüber den SD Ratten erhöht (s. Tab. 4.5, Abb.

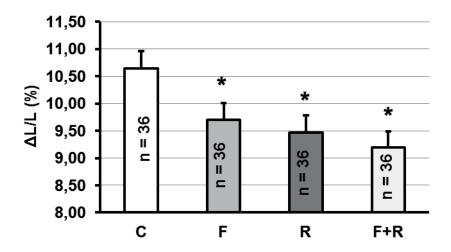


Abbildung 4.8: Einfluss von Renin auf die relative lastfreie Zellverkürzung unter Interaktion mit FCS. Dargestellt sind relative Zellverkürzungen ($\Delta L/L$, %) basal (Kontrolle, C), unter Stimulation mit FCS 10 % (vol./vol.) (F), Renin 10 ng/ml (R) und der Kombination aus FCS und Renin (F+R). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. *, p < 0.05 vs. C.

Tabelle 4.3: Wirkung von FCS, Renin und deren Kombination auf die maximale Kontraktions- (V_{Contr}) und Relaxationsgeschwindigkeit (V_{Relax}) der lastfreien Zellverkürzung.

	\mathbf{V}_{Contr}	$(\mu m/s)$	$\mathbf{V}_{Relax} (\mu m/s)$		
Stimulanz	mean	SEM	mean	SEM	
Kontrolle	183	9,50	170	9,00	
FCS 10 % (vol./vol.)	151	7,33	132	5,67	
Renin 10 ng/ml	180	10,00	160	8,50	
FCS + Renin	139	6,67	123	5,83	

4.11 und 4.12). Bei den weiblichen Tieren zeigte sich bezüglich der Herzfrequenzen kein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen, hinsichtlich des Blutdrucks zeigten die SH Ratten deutlich hypertensive Blutdruckwerte, während die Renin überexprimierenden Ratten auf nahezu einem Level mit der Vergleichsgruppe (SD Ratten) lagen (s. Tab. 4.6).

4.2.2 Organvermessung

Nach der Tötung der Tiere wurden das Gewicht des blutentleerten Herzmuskels und zur Normierung auf die Körpergröße der Tiere die Tibialänge bestimmt. Betrachtet man die Ergebnisse ohne Geschlechtsdifferenzierung, zeigte die Kontrollgruppe der SD Ratten ein auf die Tibialänge normiertes mittleres Herzgewicht von 313,6 mg/cm (SEM = 22,29 mg/cm). Das relative Herzgewicht der SH Ratten erschien mit 450,0 mg/cm Tibialänge (SEM = 37,85 mg/cm) deutlich größer, wohingegen sich das der SD Ren+Ratten mit 332,2 mg/cm (SEM = 13,01 mg/cm) nicht wesentlich von dem der Kontrollgruppe unterschied (s. Abb. 4.13). Die geschlechtsgetrennte Betrachtung der untersuchten Tiere zeigte, dass auch hier ein

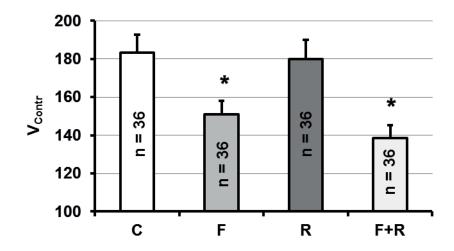


Abbildung 4.9: Wirkung von FCS, Renin und deren Kombination auf die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit der lastfreien Zellverkürzung. Dargestellt sind maximale Kontraktionsgeschwindigkeiten (V_{Contr} ; $\mu m/s$) basal (Kontrolle, C), unter Stimulation mit FCS 10 % (vol./vol.) (F), Renin 10 ng/ml (R) und der Kombination aus FCS und Renin (F+R). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. *, p < 0.05 vs. C und R.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Blutdruck- und Pulsmessung aller Tiere. Psyst: systolischer Blutdruck, Pdiast: diastolischer Blutdruck, MAP: arterieller Mitteldruck (mean arterial pressure).

		Puls (min 1)		Psyst (mmHg)		Pdiast (mmHg)		MAP (mmHg)	
Tierstamm	n	mean	σ	mean	σ	mean	σ	mean	σ
SD	8	355	41	129	3	83	4	98	3
SHR	15	430	26	196	16	128	13	151	14
SD Ren+	9	382	57	168	32	110	26	129	28

signifikanter Unterschied im wesentlichen bei den männlichen Spezimen lag. Wie erwartet war das auf die Tibialänge normierte Herzgewicht der männlichen Tiere generell geringfügig größer als die der weiblichen Tiere, doch zeigte sich bei den männlichen Ratten ein signifikanter Unterschied bezüglich der relativen Herzgewichte im Vergleich zwischen SHR und SD Ren+ Ratten, welcher bei den Weibchen nicht in dieser Deutlichkeit festzustellen war (s. Tab. 4.7 und Abb. 4.14).

4.2.3 Zellgrößenmessung

Nach Inkulturnahme der Kardiomyozyten wurden diese wiederum in Länge und Breite vermessen. Die Länge der Myozyten der SD Ratten betrug im Mittel 121,97 μ m (SEM = 0,62 μ m), die Kardiomyozyten der reninüberexprimierenden Tiere waren im Mittel 125,99 μ m lang (SEM = 0,72 μ m). Die Herzmuskelzellen der SH Ratten zeigten noch darüberhinaus eine deutliche Verlängerung auf 139,35 μ m (SEM = 0,98 μ m) (s. Abb. 4.15). In der Zellbreite zeigten die SD Ren+ Ratten (mean = 31,59 μ m, SEM = 0,26 μ m) eine signifikante Verbreiterung, verglichen mit der Kontrollgruppe der SD Ratten (mean = 29,30 μ m, SEM =

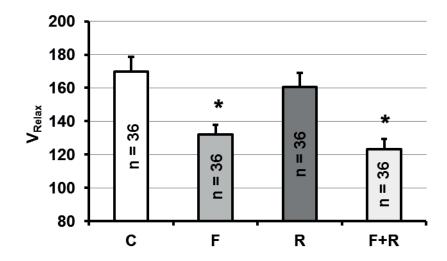


Abbildung 4.10: Wirkung von FCS, Renin und deren Kombination auf die maximale Relaxationsgeschwindigkeit der lastfreien Zellverkürzung. Dargestellt sind maximale Relaxationsgeschwindigkeiten (V_{Relax} ; $\mu m/s$) basal (Kontrolle, C), unter Stimulation mit FCS 10 % (vol./vol.) (F), Renin 10 ng/ml (R) und der Kombination aus FCS und Renin (F+R). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. *, p < 0.05 vs. C und R.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Blutdruck- und Pulsmessung der männlichen Tiere. Psyst: systolischer Blutdruck, Pdiast: diastolischer Blutdruck, MAP: arterieller Mitteldruck (mean arterial pressure).

		Puls (n	nin ¹)	Psyst (mmHg)		Pdiast (mmHg)		MAP (mmHg)	
Tierstamm	n	mean	σ	mean	σ	mean	σ	mean	σ
SD	7	348	38	129	3	83	5	98	3
SHR	3	428	21	185	6	121	6	142	6
SD Ren+	6	363	42	186	25	123	22	144	23

 $0.23 \mu m$). Die Zellen der SH Ratten (mean = $35.97 \mu m$, SEM = $0.36 \mu m$) erwiesen sich als signifikant breiter als diejenigen der SD Ren+ Tiere (s. Abb. 4.16).

Es stellte sich wiederum ein auffälliger Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren dar. Während, wie bei der Untersuchung der geschlechtsgemischten Untersuchungsgruppen, sowohl die männlichen SH als auch die SD Ren+ Tiere deutlich längere als auch breitere Kardiomyozyten aufwiesen als die SD Tiere der Kontrollgruppe, waren die Zellen der SD Ren+ Ratten ebenfalls signifikant kürzer und schmäler als die der SH Ratten. Bei den Zellen der weiblichen Ratten hingegen zeigte sich in der Zelllänge lediglich ein signifikanter Längenunterschied zwischen SHR und SD Ren+ Tieren, jedoch bei beiden Gruppen keine signifikante Abweichung von der Kontrollgruppe. Bezüglich der Zellbreite lagen die Zellen der weiblichen SHR und SD Ren+ Ratten auf etwa dem gleichen Niveau, jedoch signifikant breiter als die SD Ratten (s. Tab. 4.7 und Abb. 4.17 und 4.18).

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Blutdruck- und Pulsmessung der weiblichen Tiere. Psyst: systolischer Blutdruck, Pdiast: diastolischer Blutdruck, MAP: arterieller Mitteldruck (mean arterial pressure).

		Puls (min 1)		Psyst (mmHg)		Pdiast (mmHg)		MAP (mmHg)	
Tierstamm	n	mean	σ	mean	σ	mean	σ	mean	σ
SD	1	409	0	129	0	84	0	99	0
SHR	12	430	27	199	17	130	14	153	15
SD Ren+	3	419	66	134	5	85	2	100	1

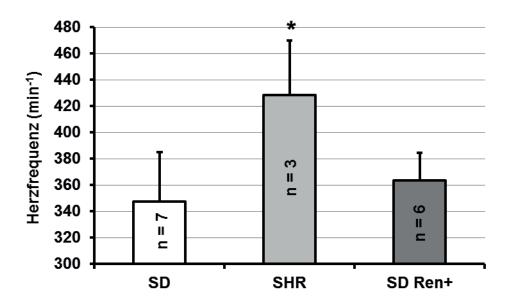


Abbildung 4.11: Herzfrequenzen der untersuchten männlichen Tiere. Dargestellt sind Herzfrequenzen (min $\,^{1}$) jeweils der männlichen Sprague Dawley Ratten (SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und reninüberexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für n Tiere. *, p < 0.05 vs. SD und SD Ren+.

4.2.4 Zellverkürzungsmessung

Auch die lastfreie Zellverkürzung der Zellen der SD, SD Ren+ und SH Ratten wurde unter dem Zeilenmikroskop gemessen. Dabei wurden, wie schon in den in vitro-Versuchen, die relative Verkürzung der Zelle $(\Delta L/L)$, die maximale Kontraktions- (C_{Contr}) und Relaxationsgeschwindigkeit (C_{Relax}) bestimmt. Bei Betrachtung aller Zellen ergab sich im Ausmaß der relativen Zellverkürzung kein signifikanter Un-

terschied. Bei den SD Ratten betrug die mittlere relative Zellverkürzung 8,21 % (SEM = 0,32 %), bei den SH Ratten 8,35 % (SEM = 0,11 %) und bei den SD Ren+ Ratten 8,54 % (SEM = 0,09 %). Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit der Herzmuskelzellen betrug bei den SD Ratten 159 μ m/s (SEM = 2,69 μ m/s), bei den SD Ren+ Ratten erhöhte sie sich signifikant auf 170 μ m/s (SEM = 2,74 μ m/s) und bei den SH Ratten noch einmal auf 185 μ m/s (SEM = 3,53 μ m/s). Ähnlich lag auch die maximale Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten bei den SD Ren+ Ratten mit 163 μ m/s (SEM = 2,79 μ m/s)

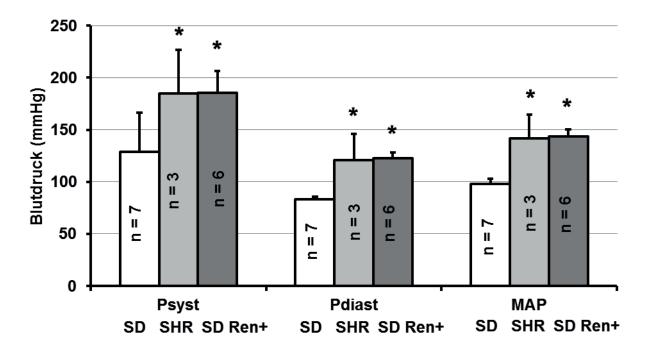


Abbildung 4.12: Blutdruckwerte der untersuchten männlichen Tiere. Dargestellt sind systolische (Psyst), diastolische (Pdiast) Blutdruckwerte und arterielle Mitteldrücke (mean arterial pressure, MAP) jeweils der männlichen Sprague Dawley Ratten (SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und reninüberexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für n Tiere. *, p < 0.05 vs. SD.

Tabelle 4.7: Geschlechtergetrennte Betrachtung der auf die Tibialänge normierten Herzgewichte von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten.

männliche Tiere					weibliche Tiere				
Tierstamm	n	mean (mg/cm)	SEM (mg/cm) n		mean (mg/cm)	SEM (mg/cm)			
SD	3	352,6	15,42	3	274,7	18,60			
SHR	3	487,7	25,40	1	336,7	0,0			
SD Ren+	2	348,2	28,92	3	321,5	2,02			

signifikant höher als die der SD Ratten (mean = 153 μ m/s, SEM = 2,64 μ m/s), und die der SH Ratten mit 176 μ m/s (SEM = 4,08 μ m/s) noch einmal deutlich darüber (s. Abb. 4.19, 4.20 und 4.21).

Auch hier ergaben sich Unterschiede zwischen den Zellen der männlichen und weiblichen Tiere. Bei den Kardiomyozyten der männlichen Ratten zeigt sich bei den SD Ren+ Ratten eine signifikant erhöhte relative Zellverkürzung verglichen mit SD und SH Ratten. Bei den maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen SD Ren+ und SH Tieren, wohl aber beider zur Vergleichsgruppe der SD Ratten. Bei den weiblichen Tieren zeigt sich – wie bei der geschlechtsgemischten Betrachtung – keine signifikant unterschiedliche relative Zellverkürzung. Es zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede in den drei untersuchten Tierstämmen bei maximaler Kontraktions- und Relaxationszeit (s. Tabb. 4.9 und 4.10 sowie Abb. 4.22, 4.23 und 4.24).

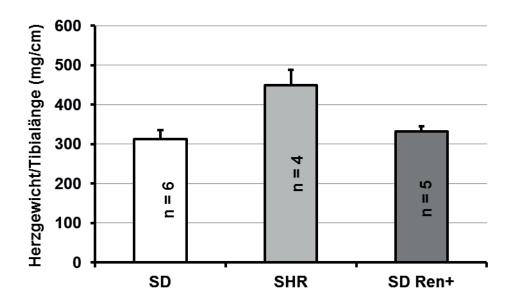


Abbildung 4.13: Herzgewichte bezogen auf die Tibialänge aller untersuchten Tiere. Dargestellt sind Herzgewichte (HW) normiert auf die Tibialänge (TL) des untersuchten Tieres (HW/TL) von Sprague Dawley Ratten (SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und reninüberexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Tiere.

Tabelle 4.8: Geschlechtsgetrennte Auswertung der Zelllängen und Zellbreiten von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten.

		mä	innliche	Tiere		weibliche Tiere				
	n	Zellläng	ge (µm)	Zellbreite (µm)		n	Zelllänge (µm)		Zellbreite (µm)	
Tierstamm		mean	SEM	mean	SEM		mean	SEM	mean	SEM
SD	934	120,56	0,74	29,46	0,26	360	125,63	1,14	28,91	0,45
SHR	562	143,01	1,15	37,78	0,42	214	129,72	1,65	31,21	0,58
SD Ren+	616	127,08	1,04	31,79	0,36	538	124,73	0,99	31,37	0,38

Tabelle 4.9: Geschlechtsgetrennte Auswertung der relativen Zellverkürzung von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten.

	m	ännliche Tie	re	weibliche Tiere				
Tierstamm	n (Zellen)	mean (%)	SEM (%)	n (Zellen)	mean (%)	SEM (%)		
SD	216	8,43	0,12	144	7,88	0,18		
SHR	144 8,48		0,14	72	8,10	0,21		
SD Ren+	144 8,99		0,15	216	8,24	0,12		

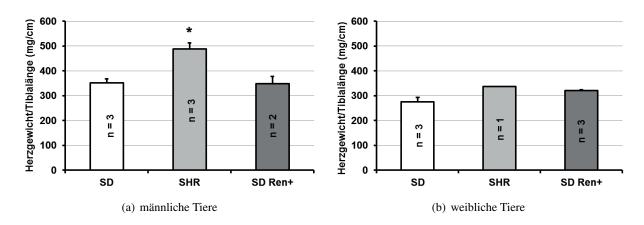


Abbildung 4.14: Herzgewichte bezogen auf die Tibialänge der untersuchten Tiere in geschlechtsgetrennter Betrachtung. (a) männliche Tiere, (b) weibliche Tiere. Dargestellt sind Herzgewichte (HW) normiert auf die Tibialänge (TL) des untersuchten Tieres (HW/TL) von Sprague Dawley Ratten (SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und reninüberexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Tiere. (a): *, p < 0.05 vs. SD und SD Ren+.

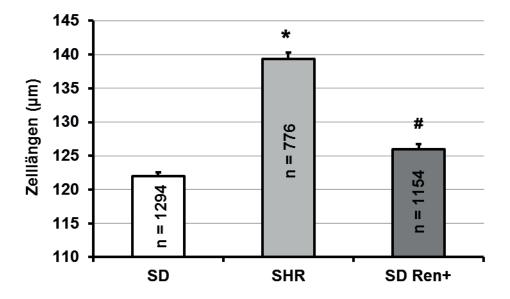


Abbildung 4.15: Zelllängen der untersuchten SD, SH und SD Ren+ Ratten. Dargestellt sind Zelllängen (μ m) der untersuchten Sprague Dawley Ratten (SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und reninüberexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. *, p < 0.05 vs. SD, #, p < 0.05 vs. SD und SHR.

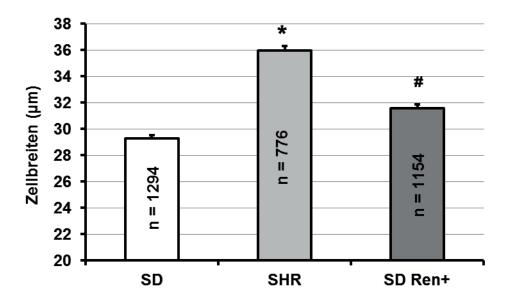


Abbildung 4.16: Zellbreiten der untersuchten SD, SH und SD Ren+ Ratten. Dargestellt sind Zellbreiten (μ m) der untersuchten Sprague Dawley Ratten (SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und reninüberexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. *, p < 0.05 vs. SD, #, p < 0.05 vs. SD und SHR.

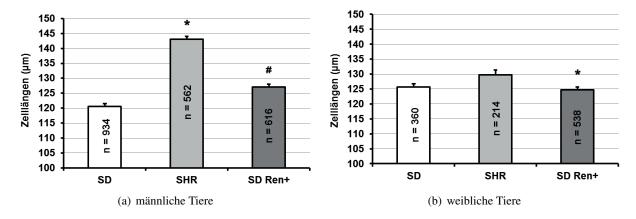


Abbildung 4.17: Geschlechtsgetrennte Auswertung der Zelllängen von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten. (a) männliche Tiere, (b) weibliche Tiere. Dargestellt sind Zelllängen (μ m) von Sprague Dawley Ratten (SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und reninüberexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. (a): *, p < 0.05 vs. SD, #, p < 0.05 vs. SD und SHR; (b): *, p < 0.05 vs. SHR.

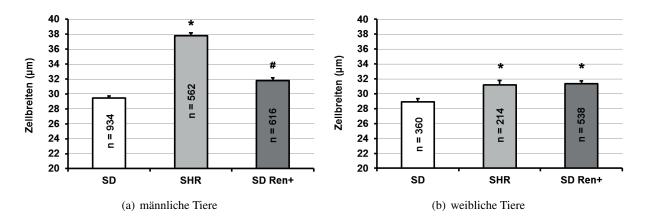


Abbildung 4.18: Geschlechtsgetrennte Auswertung der Zellbreiten von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten. (a) männliche Tiere, (b) weibliche Tiere. Dargestellt sind Zellbreiten (μ m) von Sprague Dawley Ratten (SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und reninüberexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. (a): *, p < 0.05 vs. SD, #, p < 0.05 vs. SD und SHR; (b): *, p < 0.05 vs. SD.

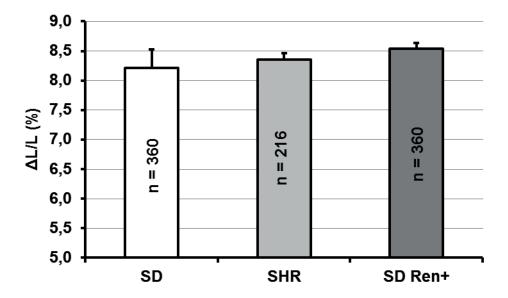


Abbildung 4.19: Lastfreie Zellverkürzung der Kardiomyozyten von SD, SH und SD Ren+ Ratten. Dargestellt ist die relative Zellverkürzung ($\Delta L/L$, %) der Kardiomyozyten von Sprague Dawley Ratten (Kontrolle, SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Renin überexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen.

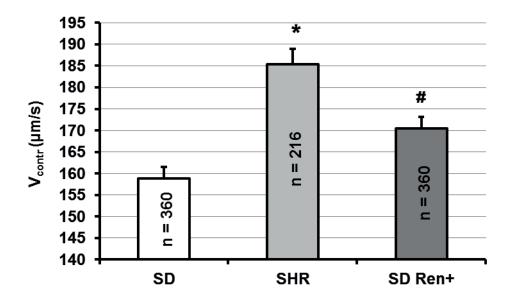


Abbildung 4.20: Maximale Kontraktionsgeschwindigkeiten unter lastfreier Zellverkürzung der Kardiomyozyten von SD, SH und SD Ren+ Ratten. Dargestellt sind maximale Kontraktionsgeschwindigkeiten (C_{Contr} , µm/s) von Sprague Dawley Ratten (Kontrolle, SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Renin überexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. *, p < 0.05 vs. SD, #, p < 0.05 vs. SD und SHR.

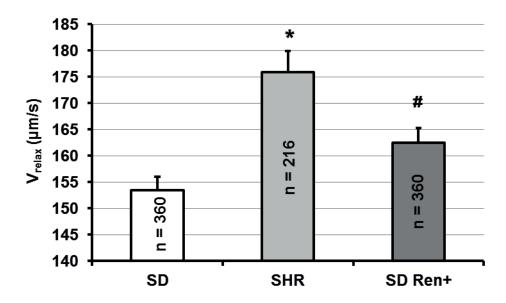


Abbildung 4.21: Maximale Relaxationsgeschwindigkeiten unter lastfreier Zellverkürzung der Kardiomyozyten von SD, SH und SD Ren+ Ratten. Dargestellt sind maximale Relaxationsgeschwindigkeiten (C_{Relax} , µm/s) von Sprague Dawley Ratten (Kontrolle, SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Renin überexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. *, p < 0.05 vs. SD, #, p < 0.05 vs. SD und SHR.

Tabelle 4.10: Geschlechtsgetrennte Auswertung der maximalen Kontraktions- (C_{Contr}) und Relaxationsgeschwindigkeiten (C_{Relax}) von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten.

	männliche Tiere						weibliche Tiere				
	n	C _{Contr} (µm/s) C _{Relax} (µm/s)			n	\mathbf{C}_{Contr}	(µm/s)	C _{Relax} (µm/s)			
Tierstamm		mean	SEM	mean	SEM		mean	SEM	mean	SEM	
SD	216	171	3,61	167	3,47	144	141	3,58	133	3,33	
SHR	144	188	4,33	182	4,83	72	180	6,28	164	7,31	
SD Ren+	144	195	4,33	182	4,42	216	154	3,06	150	3,27	

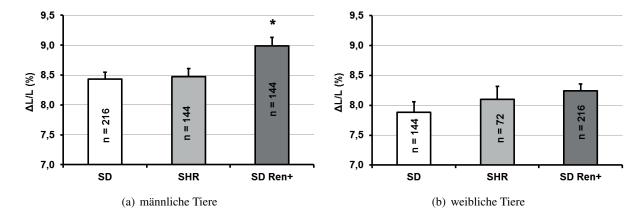


Abbildung 4.22: Geschlechtsgetrennte Darstellung der lastfreien Zellverkürzung der Kardiomyozyten von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten. (a) männliche Tiere, (b) weibliche Tiere. Dargestellt ist die relative Zellverkürzung ($\Delta L/L$, %) der Kardiomyozyten von Sprague Dawley Ratten (SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und reninüberexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. (a): *, p < 0.05 vs. SD und SHR.

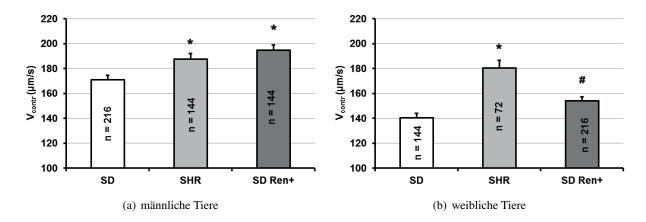


Abbildung 4.23: Geschlechtsgetrennte Darstellung der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeiten der Kardiomyozyten von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten. (a) männliche Tiere, (b) weibliche Tiere. Dargestellt sind maximale Kontraktionsgeschwindigkeiten (C_{Contr} , µm/s) der Kardiomyozyten von Sprague Dawley Ratten (SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und reninüberexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. (a): *, p < 0.05 vs. SD; (b): *, p < 0.05 vs. SD, #, p < 0.05 vs. SD und SHR.

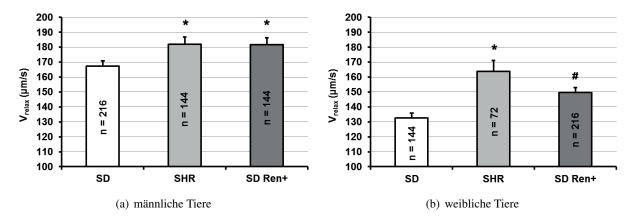


Abbildung 4.24: Geschlechtsgetrennte Darstellung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeiten der Kardiomyozyten von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten. (a) männliche Tiere, (b) weibliche Tiere. Dargestellt sind maximale Relaxationsgeschwindigkeiten (C_{Relax} , µm/s) der Kardiomyozyten von Sprague Dawley Ratten (SD), spontan hypertensiven Ratten (SHR) und reninüberexprimierenden Sprague Dawley Ratten (SD Ren+). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM für n Zellen. (a): *, p < 0.05 vs. SD; (b): *, p < 0.05 vs. SD, #, p < 0.05 vs. SD und SHR.

5 Diskussion

Ziel der aktuellen Herzinsuffizienzforschung ist, ein strukturiertes Konzept der Pathomechanismen dieser Erkrankung zu entwickeln, um spezifische Angriffspunkte für die therapeutische Intervention zu identifizieren. Auch wenn die linksventrikuläre Hypertrophie dabei initial als kompensatorische Antwort wahrgenommen wurde, um die systolische Wandspannung auszugleichen, mehren sich aktuell die Hinweise, dass es ihrer zur Aufrechterhaltung der normalen kardialen Funktion unter Stress nicht bedarf. Von der kompensatorischen Hypertrophie hat sie sich zu einem wichtigen und unabhängigen Risikofaktor für die Prognose kardialer Erkrankungen entwickelt (Bisping *et al.* 2014; Levy *et al.* 1990).

Die Inhibition des RAAS an verschiedenen Stellen hat sich in den letzten Jahrzehnten zum Eckpfeiler der Herzinsuffizienztherapie entwickelt, auch wenn die Mechanismen der vom Blutdruck unabhängigen kardioprotektiven Effekte bis heute nicht vollständig geklärt sind.

Insbesondere rückte in den vergangenen Jahren aufgrund der Entdeckung seiner nichtenzymatischen Wirkungen Renin in den Focus der Aufmerksamkeit und steht im Verdacht, eine wichtige Rolle bei der Regulation der myokardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz zu spielen (Hinrichs *et al.* 2011; Mercure *et al.* 2009; Saris, Derkx, Lamers, *et al.* 2001; van Kesteren *et al.* 1997). In dieser Arbeit wurden anhand zweier Modelle mit isolierten Kardiomyozyten in vitro und ex vivo nichtenzymatische Wirkungen von Renin auf Kardiomyozyten bezüglich zellulärer Hypertrophie und Kontraktionsverhalten unter prohypertrophem Stress untersucht.

Im Rahmen der Arbeit wurden im Wesentlichen folgende Hauptbefunde erhoben:

- 1. In vitro hemmt Renin die durch verschiedene Stimuli hervorgerufene kardiomyozytäre Hypertrophie.
- 2. Renin hat jedoch keine fördernden Einfluss auf die lastfreie Kontraktion der Kardiomyozyten.
- 3. Bei transgenen Ratten (TGR(mRen2)27) sind geschlechtsspezifisch unterschiedliche hämodynamische und kardiale Effekte der Renin-Überexpression zu beobachten.
- 4. Männliche TGR(mRen2)27 zeigen eine signifikant weniger ausgeprägte myokardiale Hypertrophie als hämodynamisch gleich belastete spontan hypertensive Ratten

5. Die lastfreie Kontraktion der Kardiomyozyten ist bei TGR(mRen2)27 nicht besser als bei spontan hypertensiven Ratten.

Diese Befunde sollen im Folgenden vor dem Hintergrund des aktuellen Forschungsstandes näher beleuchtet werden.

5.1 Renin inhibiert hypertrophe Stimuli in vitro

Die Experimente zu dieser Arbeit zeigen, dass Renin in vitro ein potenter Inhibitor der prohypertrophen Stimulation durch fötales Kälberserum ist. Die Zellbreite der Kardiomyozyten zeigte sich bei Stimulation mit FCS und Renin deutlich geringer als bei alleiniger Stimulation mit FCS (s. Kap. 4.1.1.1). Eine Inhibition ähnlichen Ausmaßes erfolgt auf die prohypertrophe Stimulation durch Endothelin-1 (s. Kap. 4.1.1.4). Diese Ergebnisse überraschen insofern, als Renin selbst als prohypertropher Faktor identifiziert worden ist. 2011 veröffentlichten Hinrichs et al. eine Studie, in welcher Renin als Agens beschrieben wurde, welches vor allem das Längenwachstum der Kardiomyozyten durch Anbau zusätzlicher Sarkomere beeinflusst (Hinrichs *et al.* 2011). Dieses Längenwachstum durch Renin-Stimulation konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, wurde jedoch durch gleichzeitige Stimulation mit FCS, nicht jedoch durch gleichzeitige Stimulation mit Endothelin aufgehoben (s. Kap. 4.1.1.1 und 4.1.1.4).

Ebenso wie in den Versuchen von Hinrichs et al. die Zunahme der Zelllänge abhängig von der Reninkonzentration ist (Hinrichs *et al.* 2011), erscheint auch der antihypertrophe Effekt von Renin abhängig von seiner Konzentration zu sein. Dies betrifft jedoch nur die Zellbreite, welche bei konstanter Stimulation mit FCS und ansteigender Reninkonzentration abnimmt. Bezüglich der Zelllänge ergibt eine Steigerung der Renindosis zu FCS keine klare Tendenz (s. Kap. 4.1.1.2).

Der inhibierende Effekt von Renin auf die hypertrophe Wirkung von FCS ist durch Mannose-6-Phosphat unterdrückbar (s. Kap. 4.1.1.3). Dies lässt auf eine Beteiligung des Mannose-6-Phosphat/Insulin-like growthfactor II-Rezeptors an der Vermittlung des antihypertrophen Effekts schließen, an welchen Renin durch seinen M6P-Rest binden kann (Saris, Derkx, De Bruin, *et al.* 2001; Saris, Derkx, Lamers, *et al.* 2001). Auch die von Hinrichs et al. festgestellte Wirkung auf die Länge der Kardiomyozyten wird über diesen Rezeptor vermittelt (Hinrichs *et al.* 2011).

Anders als die von Hinrichs et al. beschriebene Zellverlängerung, kann jedoch der antihypertrophe Effekt von Renin auch durch Inhibition der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) p38 durch den spezifischen Hemmstoff SB202190 unterbunden werden (s. Kap. 4.1.1.3). Zwar wurde in den Versuchen von Hinrichs et al. die p38 MAPK durch Renin aktiviert, dies ließ sich jedoch nicht in Zusammenhang mit dem M6P/IGF2-Rezeptor bringen. Saris et al. stellten dahingegen fest, dass die p38-MAPK eine wichtige Rolle im Signalweg des spezifischen (Pro-)Renin-Rezeptors spielt (Saris, 't Hoen, *et al.* 2006).

Eine mögliche Beteiligung des (P)RR an einem antihypertrophem Effekt widerspräche jedoch allen bis dato mit diesem Rezeptor verbundenen Eigenschaften, welche sämtlich eine Maladaption des Myokards und damit die Entwicklung und Zunahme einer Herzinsuffizienz zu begünstigen scheinen (Y. Huang, Noble, *et al.* 2007; Y. Huang, Wingamorntham, *et al.* 2006; Kaneshiro, Ichihara, Takemitsu, *et al.* 2006; Nguyen & Muller 2010). Moilanen et al. beobachteten beispielsweise nach adenovirusvermitteltem Transfer des (P)RR-Gens auf adulte Ratten echokardiographisch eine massive Abnahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion. Zwar wurde auch eine deutliche Reduktion der intraventrikulären Septumdicke festgestellt, welche sich durch Losartan-Therapie nicht beeinflussen ließ, die Querschnittsfläche der mikroskopisch untersuchten Kardiomyozyten zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den (P)RR-überexprimierenden Tieren und der Kontrollgruppe. Gleichzeitig wurde eine Aktivierung von Genen wie ANP, β -MHC und skelettalem α -Aktin registriert (Moilanen *et al.* 2012), welche mit kardiomyozytärer Hypertrophie assoziiert werden (Frey *et al.* 2003; Ruskoaho 1992).

Die Hemmbarkeit des beobachteten Effekts durch Mannose-6-Phosphat und durch Blockade der p38-MAP Kinase lassen jedoch noch an einen anderen Mechanismus denken: Wie van Kesteren et al. berichten, erfolgt über den M6P/IGF2-Rezeptor eine Internalisierung des (Pro-)Renin-Rezeptor-Komplexes und gegebenenfalls eine proteolytische Aktivierung von Prorenin zu Renin (Admiraal *et al.* 1999; van Kesteren *et al.* 1997). So wird das Protein in das lokale Renin-Angiotensin-System des Herzens eingeschleust, von dem mehrfach berichtet wurde (Nguyen, Delarue, *et al.* 2002; Singh *et al.* 2007) und in welchem selbst a. e. keine endogene Reninproduktion stattfindet (Danser & Deinum 2005). Renin kann intrazellulär enzymatisch an der Bildung von Angiotensinogenen mitwirken. Eine Aktivierung der p38-MAPK durch Angiotensin II wiederum wurde in verschiedenen Studien postuliert und auf einen AT₁-Rezeptor- und Proteinkinase-C vermittelten Pathway zurückgefürt (Ushio-Fukai *et al.* 1998; Wenzel *et al.* 2001). Es bleibt jedoch wiederum unklar, wie der hier beobachtete antihypertrophe Effekt in das Bild einer AT₁-Rezeptor-vermittelten Wirkung von Angiotensin II passen kann, die ebenfalls eher mit prohypertrophen Wirkungen assoziiert wird (Dzau 2001; Re 2000; Zhuo 2006).

5.2 Renin verbessert die myokardiale Kontraktion in vitro nicht

In der hier vorliegenden Arbeit wurde in vitro auch die lastfreie Zellverkürzung unter Stimulation mit fötalem Kälberserum und Renin sowie deren Kombination untersucht. Verglichen mit einer unstimulierten Kontrolle zeigte sich bei allen Stimulationsreihen eine Abnahme des maximalen Verkürzungsausmaßes $(\Delta L/L)$. Dabei war das Ausmaß bei kombinierter Anwendung beider Stimulanzien (FCS und Renin) tendenziell noch geringer als bei Einzelstimulation.

Die maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten der Kardiomyozyten erfuhren, verglichen mit der Kontrolle, durch Stimulation mit FCS eine signifikante, durch Stimulation mit Renin

jedoch allenfalls eine tendenzielle Abnahme. Eine Kombination beider Stimuli erbrachte eine zu Renin signifikante, jedoch auch zu FCS tendenzielle zusätzliche Reduktion der Kontraktions- respektive Relaxationsgeschwindigkeit (s. Kap. 4.1.2). Eine verbessernde Wirkung von Renin auf die kardiomyozytäre Kontraktion kann somit nicht festgestellt werden.

5.3 Renin-Überexpression vermittelt geschlechtsabhängig unterschiedliche hämodynamische und kardiale Effekte

Die Effekte, welche eine Renin-Überexpression auf die Hämodynamik ebenso wie auf das kardiale Remodelling ausübt, zeigen auffällige Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren. Schon bei der Messung der Blutdruckparameter zeigt sich ein deutlicher Geschlechtsunterschied. Wie erwartet, entwickelten die männlichen transgenen Ratten des TGR(mRen2)27-Stamms deutlich höhere Blutdruckwerte als ihre weiblichen Geschwister (M. A. Lee *et al.* 1996). So erreichte der mittlerer Blutdruck der männlichen SD Ren+ Ratten Werte, welche sich auf vergleichbarem Level wie der spontan hypertensiven Tiere bewegten. Der Blutdruck der weiblichen transgenen Ratten erbrachte jedoch keine hypertensiven Werte und unterschied sich nicht signifikant von der normotensiven Kontrollgruppe aus SD Ratten (s. Kap. 4.2.1). Diese Beobachtung stimmt mit den Erkenntnissen von Lee et al. überein, die zwar primär bei männlichen und weiblichen TGR im jungen Alter einen Blutdruckanstieg auf hypertensive Werte registrierten. Während sich der Blutdruck bei den männlichen Tieren jedoch bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von gut 40 Wochen auf ein deutlich hypertensives Level einpendelte und dort verblieb, fiel er bei den weiblichen TGR nach und nach ab, so dass ab der 21. Lebenswoche kein signifikanter Unterschied zu normotensiven SD Ratten mehr festzustellen war (M. A. Lee *et al.* 1996). Die Ursache für diesen ausgeprägten Unterschied zwischen den Geschlechtern ist bis dato noch nicht bekannt.

Trotz des ausgeprägten Blutdruckunterschieds zeigten die erhobenen Parameter der Herzhypertrophie bei den TGR nur unwesentliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Das auf die Tibialänge normierte Herzgewicht zeigte sich bei beiden Geschlechtern nicht signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrollgruppe. Während sich bei den Männchen jedoch nahezu kein Unterschied zeigte, waren die Herzen der weiblichen TGR trotz Normotension sogar tendenziell etwas schwerer als die der SD Ratten (s. Kap. 4.2.2). Auch bei der Vermessung der Kardiomyozytengröße ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen TGR (s. Kap. 4.1.1). In der lastfreien Zellverkürzung erreichten die Kardiomyozyten der transgenen männlichen Versuchstiere sowohl betreffend der maximalen relativen Kontraktion ($\Delta L/L$) als auch bezüglich der maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten deutlich höhere Werte als ihre weiblichen Stammesgenossinnen. Ob dies die unterschiedlichen hämodynamischen Verhältnisse in der Zirkulation der männlichen und weiblichen Tiere wiederspiegelt oder einen

geschlechtsverschiedenen Einfluss durch Renin, bleibt unklar (s. auch Kap. 5.5).

Es gilt als allgemein anerkannt, dass es geschlechtsspezifische Eigenheiten in der Regulation des Blutdrucks gibt. Frauen weisen im Durchschnitt prämenopausal einen signifkant niedrigeren Blutdruck als gleichaltrige Männer auf. Dieser Vorteil - auch im Sinne des kardiovaskulären Risikofaktors - wird jedoch in der postmenopausalen Phase soweit kompensiert oder sogar überkompensiert, dass dann der durchschnittliche Blutdruck sogar höher ist als beim gleichaltrigen Mann (Reckelhoff 2001). Das Renin-Angiotensin-System als wichtiges Schlüsselsystem der Blutdruckkontrolle leistet einen wichtigen Beitrag zu diesen geschlechtsspezifischen Unterschieden, da es selbst wiederum durch verschiedene Sexualhormone und durch andere geschlechtsspezifische Mechanismen beeinflusst wird (Reckelhoff 2001; Reckelhoff et al. 2000). Es zeigen sich unterschiedliche Reaktionen der beiden Geschlechter sowohl in Studien, in welchen Bestandteile des RAS stimuliert, als auch inhibiert wurden (Sullivan 2008). Beispielsweise stellten Gandhi et al. eine signifikant längere Wirkung intravenös verabreichten Angiotensins II bei männlichen verglichen mit weiblichen Probanden fest. Dieser Unterschied war nicht auf eine verminderte Angiotensin II-Clearance bei den Männern zurückzuführen. Gleichzeitig antworteten die weiblichen Versuchspersonen auf Infusion von Angiotensin I und II mit einer ausgeprägteren Reduktion der renalen Perfusion als die männlichen (Gandhi et al. 1998). Hudson et al. verglichen in einer retrospektiven Studie Patienten, die aufgrund einer kongestiven Herzinsuffizienz mit ACE-Inhibitoren oder AT₁-Rezeptorantagonisten behandelt wurden und postulierten darin einen Überlebensvorteil durch die ACE-Inhibierung bei Männern und die AT₁-Blockade bei Frauen (Hudson *et al.* 2007).

Bezüglich der mechanistischen Vermittlung der geschlechtlichen Unterschiede scheint eine stimulatorische Wirkung von Testosteron auf die Plasma-Renin-Aktivität (Reckelhoff 2001) sowie eine vermehrte Expression des AT₁-Rezeptors bei Männern gesichert zu sein (Sullivan 2008). Auch scheint der AT₂-Rezeptor bei Frauen aufgrund seines X-chromosomalen Genlocus vermehrt exprimiert zu werden (de P Rodrigues *et al.* 2006; Sullivan 2008). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Spekulationen über Unterschiede im Angiotensin II Metabolismus und die Einflüsse von Estradiol und anderen Sexualhormonen (Sullivan 2008). Grundsätzlich erscheint die Studienlage zu diesem Thema derzeit noch schwach, was auch die Einordnung der hier beobachteten Geschlechtsunterschiede erschwert. Eine Beteiligung des (Pro-)Renin-Rezeptors ist jedoch aufgrund seiner X-chromosomalen Codierung (Nguyen & Muller 2010) ebenfalls möglich.

Während die SD Ren+ Tiere wie erwartet eine deutliche Blutdruckdifferenz aufzeigten, fand sich bei den SH Ratten nahezu kein Blutdruckunterschied zwischen männlichen und weiblichen Spezimen, wobei die Weibchen entgegen den bisherigen Berichten (Okamoto *et al.* 1963) sogar tendenziell höheren Blutdruck entwickelten. Damit wird eine Konstellation erreicht, in welcher sich die männlichen SD Ren+ und SH Ratten bezüglich ihres Blutdrucks kaum unterscheiden. Dies prädestiniert die männlichen SD Ren+ und SH Ratten für einen direkten Vergleich, denn es ist davon auszugehen, dass so auch das Myokard der Tiere

beider Stämme unter vergleichbarem hämodynamischem Stress steht. Bei den weiblichen Tieren dieser beiden Studienarme zeigt sich jedoch eine ausgeprägte Blutdruckdifferenz (s. Kap 4.2.1), so dass Vergleiche bezüglich der myokardialen Hypertrophie und Kontraktionsfunktion angesichts der unterschiedlichen Hämodynamik spekulativ erscheinen.

Im Folgenden wird aus diesem Grund in erster Linie auf die Männchen der untersuchten Vergleichsgruppen eingegangen.

5.4 Männliche TGR zeigen eine weniger ausgeprägte myokardiale Hypertrophie als ihre spontan hypertensiven Artgenossen

Echokardiographische Studien zeigen beim hypertensiven Menschen hypertrophe myokarde Veränderungen, welche sich in einer Zunahme des Verhältnisses zwischen linksventrikulärer Wanddicke und Ventrikellumen sowie in einer Zunahme der kardialen Masse relativ zur Körperoberfläche (kardialer Masseindex) äußern. Unterschieden wird weiterhin zwischen konzentrischen Veränderungen, bei denen das linksventrikuläre Binnenvolumen konstant bleibt oder sich verkleinert und exzentrischen Veränderungen, die gleichzeitig zur myokardialen Hypertrophie mit einer Dilatation des linken Ventrikels einhergehen (Bountioukos *et al.* 2006; Frohlich *et al.* 1992).

Es ist somit aufgrund der arteriellen Hypertonie beider Tierstämme wenig erstaunlich, dass sich bei beiden die Kardiomyozyten verglichen mit der Kontrollgruppe hypertroph zeigen. Sowohl betreffend der Zelllänge als auch der Zellbreite zeigen sich die Kardiomyozyten der druckbelasteten Tiere signifikant größer als die der normotensiven SD Ratten. Überraschend ist jedoch, dass die Zellmaße der SD Ren+Ratten durchweg signifikant kleiner ausfallen als die der spontan hypertensiven Tiere. (s. Kap. 4.2.3). Bezogen auf das gesamte Herzgewicht (normiert auf die Tibialänge des untersuchten Tieres) ergibt sich sogar keine signifikante Differenz zwischen Renin überexprimierenden Ratten und der Vergleichsgruppe aus SD Ratten, wohl aber liegt das Herzgewicht der SH Ratten signifikant höher (s. Kap. 4.2.2). Mit Blick auf die Ergebnisse in vitro (s. o.) könnte es sich bei dieser Differenz um einen Effekt lokaler Renin-Wirkung auf die Kardiomyozyten der transgenen Ratten handeln.

5.5 Die meisten Werte der lastfreien Zellverkürzung zeigen keinen wesentlichen Unterschied zwischen SHR und Renin überexprimierenden Ratten

Es existieren zahlreiche Studien, die darauf abzielen in oder ex vivo, die Auswirkungen der arteriellen Hypertrophie und des hypertrophen Myokards auf die kardiale Funktion und insbesondere die Kontrak-

tilität des Myokards zu untersuchen. Frohlich et al. berichten von einer hyperkinetischen Zirkulation bei Patienten mit labiler Hypertension, verbunden mit erhöhter Herzfrequenz und erhöhtem Herzindex (Herzindex = Herzminutenvolumen / Körperoberfläche). Bei anhaltendem Bluthochdruck hingegen normalisiert sich der Herzindex im Gegenzug zum steigenden peripheren Widerstand (Frohlich ED, Kozul VJ, Tarazi RC et al. Physiological comparison of labile and essential hypertension. Circ Res 1979 Jul; 27 (1 Suppl 1): 55-69, zitiert nach Smith et al. 1979). Echokardiographische Untersuchungen am Menschen ohne manifeste Herzinsuffizienz zeigen auf, dass sich die linksventrikuläre Auswurffraktion (Ejektionsfraktion, EF) nicht signifikant zwischen normo- und hypertensiven Individuen unterscheidet. Untersuchungen mit Gewebedopplerverfahren (Tissue Doppler Imaging, TDI) offenbaren jedoch bei hypertensiven Studienteilnehmern niedrigere systolische und diastolische Dopplergeschwindigkeiten des Myokards als bei normotensiven Kontrollpersonen (Bountioukos et al. 2006).

Auf zellulärer Ebene wurden von Delbridge et al. die Verkürzungsparameter von spontan hypertensiven Ratten mit normotensiven Wistar-Kyoto Ratten verglichen. Dabei zeigte sich bei den SHR eine signifikante Reduktion des maximalen Kontraktionsausmaßes sowie der maximalen Verkürzungs- und Verlängerungsgeschwindigkeiten (Delbridge *et al.* 1996).

2013 veröffentlichte A. Kögel eine Studie in welcher die linksventrikuläre Funktion der Herzen von Renin-überexprimierenden transgenen Ratten (TGR(mRen2)27) und der ihnen verwandten normotensiven Sprague-Dawley Ratten verglichen wurde. Hierzu wurden Kontraktionsparameter von an der Langendorff-Anlage perfundierten Ganzherzen erhoben. Dabei wurde bei den transgenen Ratten ein deutlich höherer linksventrikulärer Druckaufbau sowie erhöhte linksventrikuläre Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten festgestellt (Kögel 2013).

In der hier vorliegenden Studie wurde wie bei Delbridge et al. die lastfreie Verkürzung der Kardiomyozyten von spontan hypertensiven Ratten und Renin überexprimierenden transgenen Ratten miteinander und mit einer Kontrollgruppe aus nicht hypertensiven Sprague Dawley Ratten verglichen. Insbesondere bei den männlichen Untersuchungsobjekten, bei denen die SH und SD Ren+ Tiere vergleichbar hohe und signifikant zur Kontrollgruppe erhöhte Blutdruckwerte aufweisen, kann diesbezüglich von validen Vergleichsergebnissen ausgegangen werden.

Das maximale Verkürzungsausmaß relativ zur Ausgangslänge ($\Delta L/L$) der männlichen SH Ratten unterschied sich nicht signifikant von dem der normotensiven Kontrollgruppe. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Delbridge et al. zeigte es sich jedoch auch nicht vermindert sondern sogar tendenziell leicht verbessert als die Kontrollgruppe. Die Renin überexprimierenden männlichen Ratten zeigen ein signifikant ausgeprägteres Ausmaß der relativen Zellverkürzung. Bezüglich der maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten ergab sich ebenfalls im Gegensatz zu den Ergebnissen von Delbridge et al. eine signifikante Erhöhung der maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwin-

digkeiten bei den Kardiomyozyten der männlichen Tiere beider druckbelasteter Rattenstämme, verglichen mit der normotensiven Kontrolle. Zwischen den SH Ratten und den SD Ren+ Tieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied (vgl. Delbridge *et al.* 1996).

Im Hinblick auf die Erhöhung der Nachlast, welche die kardiale Funktion zum adäquaten Auswurf des Blutes bei hypertensiven Individuen zu überwinden hat, erscheint die Erhöhung der kardialen Kinetik bei den zu Lebzeiten durch arterielle Hypertonie konditionierten spontan hypertensiven und Renin überexprimierenden Ratten logisch. Kleinman und Houser konnten zwar keine Auswirkungen unterschiedlicher Nachlast auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten feststellen, sie bezogen jedoch diese Erkenntnis aus dem Vergleich von links- und rechtsventrikulären Kardiomyozyten (Kleiman *et al.* 1988). Dass dieser Vergleich auch auf den Vergleich zwischen physiologischer und pathologischer Nachlast rückschließen lässt, kann jedoch nicht automatisch angenommen werden.

Die oben genannten Ergebnisse von A. Kögel (Kögel 2013) konnten in den Versuchen zu dieser Arbeit auf zellulärer Ebene nachvollzogen werden. Ob diese Beobachtungen jedoch auf die Wirkung der Reninüberexpression zurückzuführen ist oder alleine auf der veränderten Hämodynamik der transgenen Ratten beruht, kann aufgrund der fehlenden Korrelation der Daten aus dem in vitro-Modell nicht geklärt werden. Die weitgehende Übereinstimmung der Daten von spontan hypertensiven und transgenen Ratten deutet jedoch eher auf die Hämodynamik als Ursache.

5.6 Mögliche Fehlerquellen

Im Studiendesign dieser Arbeit finden sich – insbesondere im Modell in und ex vivo – an verschiedenen Punkten Schwachstellen, welche sich aus technischen oder organisatorischen Gründen nicht umgehen ließen. Im Hinblick auf die Validität der Ergebnisse können sie jedoch potentielle Fehlerquellen darstellen.

5.6.1 Alter der Versuchstiere im in und ex vivo-Modell

Zum Zeitpunkt ihrer Tötung und Zellpräparation hatten die spontan hypertensiven Ratten ein mittleres Alter von ca. 44 Wochen. Die Myozytenpräparationen und -untersuchungen an den Herzen der Sprague Dawley Ratten konnten jedoch nur in einem Alter von im Mittel 30 Wochen bei den nicht transgenen respektive 28 Wochen bei den transgenen Tieren durchgeführt werden. Dies könnte zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen, da die SHR den hypertonen Blutdruckwerten länger ausgesetzt waren und somit auch ein längerer Einfluss der Hypertonie auf Kardiomyozytengröße und -funktion bestand. Adams et al. publizierten jedoch 1989 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Entwicklung von Blutdruck und Myokardhypertrophie bei SHR von deren Lebensalter. In dieser Studie wurden SH Ratten im Alter von vier Wochen bis ca. 50 Wochen beobachtet und mit altersäquivalenten Wistar-Kyoto Ratten verglichen. Die Arbeitsgruppe um Adams stellte fest, dass die Entwicklung des Hypertonus bei den SHR ab einem

Alter von ca. 4 Wochen einsetzt und mit ca. 14 Wochen ein maximales Plateau erreicht, welches bis zum Ende des Beobachtungszeitraums anhielt. Die Entwicklung des Herzgewichts war streng an die des Bluthochdrucks gekoppelt und erreichte mit etwa 14 Wochen ein Plateau, auf welchem sich keine wesentlichen Veränderungen mehr zeigten (Adams *et al.* 1989). Für die TGR(mRen2)27 gibt es bis dato lediglich Untersuchungen zur Entwicklung des Bluthochdrucks abhängig vom Lebensalter. Diesen zufolge beginnt die Erhöhung des Bluthochdrucks im Alter von 3 bis 4 Wochen, der Blutdruck steigt kontinuierlich an, bis er im Alter von etwa 9 bis 12 Wochen wiederum ein Plateau erreicht, auf welchem er bis zum Ende der Beobachtungszeiträume (ca. 40 Wochen) weitgehend konstant bleibt (M. A. Lee *et al.* 1996; Mullins *et al.* 1990). Studien zur zeitabhängigen Entwicklung der myokardialen Hypertrophie fehlen für die transgenen Ratten. Da es jedoch auch keinen Grund gibt, warum diese Entwicklung anders verlaufen sollte als analog zum Blutdruck, wie bei den SHR, wird davon ausgegangen, dass die Hypertrophieentwicklung bei den transgenen Ratten ebenfalls analog zum Blutdruck verläuft.

5.6.2 Notwendige medikamentöse Therapie der SD Rattenstämme

Um bei den Renin überexprimierenden Tieren die Fortpflanzungsfähigkeit zu gewährleisten und aufgrund von Berichten von einem hohen Risiko für den Tod im juvenilen Alter bei Renin überexprimierenden Tieren ohne Behandlung (Bishop *et al.* 2000; Whitworth *et al.* 1995) wurden die transgenen Ratten ab Lebensbeginn für im Mittel 8 Wochen über das Trinkwasser mit dem ACE-Inhibitor Enalapril behandelt Aufgrund der erst postmortalen zweifelsfreien Identifikation wurde diese Therapie bei den nicht transgenen SD Ratten ebenso durchgeführt. Da die Renin überexprimierenden Tiere dadurch im Mittel weniger lange einem arteriellen Hypertonus ausgesetzt waren und somit auch die für die Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie relevante Zeit verkürzt war, könnte diese Tatsache eine Verfälschung der Studienergebnisse zur Folge haben. Jedoch blieben die Tiere nach Absetzen von Enalapril bis zur Tötung und Untersuchung der Kardiomyozyten für im Durchschnitt 21 Wochen ohne antihypertensive oder kardioprotektive Therapie. Angesichts der in Kapitel 5.6.1 beschriebenen Untersuchungen von Adams et al. sowie Mullins et al. und Lee et al. stand den Tieren somit mehr als ausreichend Zeit zur Verfügung, unter hypertensivem Einfluss eine myokardiale Hypertrophie voll auszubilden.

5.7 Klinischer Bezug

Im Jahr 2000 wurden im New England Journal of Medicine und im Lancet die aufsehenerregenden Ergebnisse der HOPE Studie veröffentlicht. Diese erbrachten Evidenz, dass die Therapie mit dem ACE-Hemmer Ramipril bei Risikopatienten protektive Effekte auf Herz und Niere hat, welche über die durch die Blutdrucksenkung erwarteten hinausgingen (HOPE Heart Outcome Prevention Evaluation Study Investigators (1) 2000; HOPE Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators (2) 2000). Diese

blutdruckunabhängigen Effekte wurden von den Fachleuten schon bald als Klasseneffekt interpretiert (Francis 2000; Sleight 2000). Insbesondere wurde dabei auch eine Reduktion der myokardialen Hypertrophie durch Ramipril postuliert (HOPE Heart Outcome Prevention Evaluation Study Investigators (1) 2000; HOPE Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators (2) 2000). Bezüglich der pharmakodynamischen Mechanismen dieser positiven Effekte wurde von mehreren Seiten die Akkumulation von Bradykinin und die dadurch freigesetzten Stickoxide zur Sprache gebracht (Murphey *et al.* 2003).

Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte decken sich jedoch auch mit der von Heger et al. postulierten Theorie eines durch Renin vermittelten Mechanismus der vom Blutdruck unabhängigen Effekte einer Hemmung des RAAS. Durch das Ausfallen eines negativen Feedbackmechanismus im Zuge der RAAS-Inhibition kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Renin. Dieses wiederum kann durch Interaktion mit dem (P)RR und dem M6P/IGF2-Rezeptor antihypertrophe und weitere Effekte vermitteln (Heger *et al.* 2013).

Vor dem Hintergrund einer allgemein anerkannten Prognoseverbesserung für Patienten mit Herzinsuffizienz durch Therapie mit Inhibitoren des RAS (Shearer *et al.* 2013), möglicherweise auch über durch Renin vermittelte antihypertrophe Effekte, erscheint auf der anderen Seite die ebenso anerkannte Erkenntnis wiedersprüchlich, dass eine Erhöhung der Plasma-Renin-Aktivität, sowohl ohne, als auch im Rahmen einer inhibitorischen Therapie auf das RAS, ein negativer prognostischer Parameter für das Outcome einer Herzinsuffizienzerkrankung ist (Masson *et al.* 2010). Alle klassischen Hemmer des RAS tragen durch die Anhebung der Renin-Plasma-Konzentration auch gleichzeitig zur Erhöhung der Renin-Aktivität bei. Lediglich der seit 2007 auf dem Markt erhältliche direkte Renin-Inhibitor Aliskiren erhöht zwar ebenfalls die Konzentration von Renin im Plasma, supprimiert jedoch gleichzeitig dessen enzymatische Aktivität (O'Brien *et al.* 2007). Zwar nicht die Renin-Aktivität, wohl aber der erhöhte Renin-Spiegel im Plasma ist es, worauf in dieser Arbeit der beobachtete antihypertrophe Effekt zurückgeführt wird.

Grundsätzlich wird die Frage aufgeworfen, ob es sich bei dem hier beobachteten Effekt tatsächlich um eine positive Wirkung auf das myokardiale Remodeling oder eher um eine strukturelle Degradierung der Kardiomyozyten handelt, auch wenn mikroskopisch hierfür kein Anhalt besteht.

5.8 Ausblick

Die zahlreichen aus den Ergebnissen dieser Studie aufgeworfenen Fragen zeigen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen. Diese sollten einerseits die Vermittlung des hier beobachteten Effekts im Blick haben und könnten in weiteren in vitro-Studien mit Inhibition möglicher Signalwege durchgeführt werden. Beispielsweise könnten mit PD98059 die p42/44 MAP-Kinase im Signalling des M6P/IGFII-Rezeptors oder durch einen ACE-Inhibitor die durch intrazelluläre Angiotensin II-Produktion vermittelten Effekte inhibiert werden. Andererseits gilt es, noch weit mehr über den Charakter der durch Renin auf die

5 Diskussion

Kardiomoyzyten vermittelten Effekte herauszufinden. Dies könnte im ex vivo-Modell beispielsweise durch Protein- oder Genexpressionsanalysen von Faktoren erfolgen, die für Hypertrophie und Fibrosierung (z. B. ANF, BNP, Collagen-1, Elastin), kontraktile Funktion (z. B.SERCA2a, Phospholamban, NCX) und Zellzyklusregulation (z. B. Bax und weitere Proteine der Bcl-2 Familie) von Bedeutung sind. Dies sollte wiederum im Vergleich von transgenen Renin überexprimierenden Ratten, spontan hypertensiven Ratten und einem normotensiven Rattenstamm erfolgen.

Erst nach Klärung dieser und weiterer Fragen lässt sich vielleicht beantworten, ob der hier festgestellte Effekt von Renin auf den unter prohypertrophem Stress stehenden Kardiomyozyten ein Bestandteil des blutdruckunabhängigen Effekts einer inhibitorischen Therapie auf das RAAS ist. Sollte dies der Fall sein könnte dieser Mechanismus vielleicht durch spezifische Agonisten neue pharmakologische Therapiestrategien zur Beeinflussung der Hypertrophie- und Herzinsuffizienzentwicklung ermöglichen.

Zusammenfassung

Einleitung Die moykardiale Hypertrophie spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiolgie der Herzinsuffizienz. Dieser (mal)adaptive Mechanismus führt letztlich zum nekrotischen und apoptotischen Untergang von Herzmuskelgewebe, sowie zum bindegewebigen Umbau des Myokards mit Einschränkung der myokardialen Pumpleistung.

Einen wichtigen Beitrag zur myokardialen Hypertrophie leistet das Renin-Angiotensin-(Aldosteron)-System (RA(A)S), welches durch seine Effektorhormone Angiotensin II und Aldosteron zum einen zur Erhöhung des Blutdrucks und zum anderen zu myokardialen Umbauprozessen beiträgt. Dies bietet auch zahlreiche Angriffspunkte für die aktuelle medikamentöse Herzinsuffizienztherapie.

Für Renin, das Schlüsselenzym des RA(A)S, wurden mit dem spezifischen (Pro-)Renin-Rezeptor (PRR) und dem Mannose-6-Phosphat/Insulin-like growth factor II Rezeptor (M6P/IGFIIR) in den letzten Jahren mehrere Rezeptoren entdeckt. Über diese kann das Renin in die Zelle aufgenommen werden und auch hormonelle Wirkungen vermitteln. Auch die Renin-Vorstufe Prorenin kann an diese Rezeptoren binden, wird internalisiert und zum enzymatisch aktiven Renin umgewandelt.

Die vorliegende Studie untersucht Wirkungen von Renin auf Kardiomyozyten der Ratte, welche unter prohypertrophem Stress stehen.

Methoden Kardiomyozyten männlicher Wistar-Ratten wurden in Kurzzeitkultur genommen und mit Renin in verschiedenen Konzentrationen sowie den bekannt prohypertrophen Stimulanzien FCS und Endothelin-1 inkubiert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen unter dem Mikroskop in Länge und Breite vermessen. Zudem wurden Parameter der lastfreien Zellverkürung unter der Zeilenkamera erhoben.

Zur Übertragung der Ergebnisse auf ein Rattenmodell ex vivo wurden die Kardiomyozyten von Sprague-Dawley-Ratten, spontan hypertensiven Ratten und Renin-überexprimierenden transgenen Ratten des Typs TGR(mRen2)27 in Kurzzeitkultur genommen und den gleichen Untersuchungen unterzogen. Vor der Tötung der Tiere wurden zusätzlich deren Blutdruck- und Puls-Parameter erhoben und nach der Tötung die Herzmasse gemessen und auf die Tibialänge relativiert.

Zusammenfassung

Ergebnisse Der von Hinrichs et al. 2011 festgestellte elongierende Effekt von Renin auf Kardiomyozyten konnte bestätigt werden. Unter gleichzeitiger Stimulation mit FCS respektive Endothelin-1 und Renin kam es zur Reduktion eines bekannten zellverbreiternden Effekts von FCS und Endothelin auf die Kardiomyozyten. Diese Reduktion war abhängig von der Reninkonzentration und konnte durch Mannose-6-Phosphat und SB202190 inhibiert werden. Ein verbessernder Effekt der Inkubation mit Renin auf die Parameter der lastfreien Zellverkürzung konnte nicht aufgezeigt werden.

Insbesondere im Vergleich der männlichen Tiere haben die reninüberexprimierenden transgenen Ratten signifikant kürzere und schmalere Kardiomyozyten als die vom Blutdruck weitgehend gleichen spontan hypertensiven Ratten. Nur die männlichen transgenen Ratten zeigen auch eine signifikant ausgeprägtere Zellverkürzung auf als die spontan hypertensiven Ratten, jedoch ohne signifikanten Unterschied in der Kontraktions- oder Relaxationsgeschwindigkeit.

Diskussion In vitro zeigt sich ein antihypertropher Effekt von Renin auf Kardiomyozyten. In der Vermittlung dieses Effekts spielen möglicherweise sowohl der M6P/IGFII-Rezeptor als auch der Renin-Rezeptor eine Rolle. Auch die Aktivierung eines intrazellulären RAS nach M6P/IGFII-Rezeptor vermittelter Aufnahme in die Zelle scheint denkbar.

In vivo zeigt sich ein ausgeprägter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren. Dies kann einerseits mit der Beeinflussung des RA(A)S durch verschiedene Sexualhomone zusammenhängen, andererseits ist aufgrund seines X-chromosomalen Genlocus auch eine unterschiedliche Expression des PRR denkbar. Die myokardiale Hypertrophie der männlichen transgenen Ratten ist trotz vergleichbarer hämodynamischer Belastung der Herzen weit geringer als die Hypertrophie der spontan hypertensiven Ratten.

Weder in vitro durch Stimulation mit Renin noch ex vivo durch erhöhte Reninexpression ließ sich ein wesentlicher positiver Effekt auf die myokardiale Kontraktilität feststellen. Eine Erhöhung der Kontraktionsund Relaxationsgeschwindigkeit bei spontan hypertensiven und transgenen Ratten verglichen mit der Kontrollgruppe aus Sprage-Dawley-Ratten kann auch auf die unterschiedlichen hämodynamischen Bedingungen zurückgeführt werden.

Summary

Introduction Myocardial hypertrophy plays a crucial role in the pathophysiology of heart failure. This primarily adaptive mechanism ends in necrosis as well as in apoptotic destruction of myocardial and replacement by connective tissue resulting in a loss of contractile function.

A major part in the regulation of myocardial hypertrophy is played by renin-angiotensin-(aldosterone) system (RA(A)S). With its hormonal effectors angiotensin II and aldosterone it provokes hypertension and myocardial remodelling. Due to this fact there are many targets for pharmacological therapy of heart failure.

In the last decade, several receptors were identified matching the key enzyme of the RA(A)S. By binding to the specific (pro-)renin receptor (PRR) and the mannose-6-phosphat/insulin-like growth factor II receptor (M6P/IGFIIR) the renin can be taken up into the cell and is able to mediate hormonal effects. Also prorenin, the precursor of renin, is able to bind the receptors being internalized and activated to enzymatical activity consecutively.

This study examines effects of renin on cardiomyocytes of the rat experiencing prohypertrophic stress.

Methods Cardiac myocytes of male Wistar rats were isolated and taken into short term culture. They were incubated with renin in different concentrations and treated with the known prohypertrophyc stimuli FCS and endothelin-1. After overnight incubation, the length and width of the cells was mesured under the microscope. Furthermore several parameters of cell shortening were collected.

To match the results with a rat model ex vivo cardiac myocytes of sprague-dawley rats, spontaneously hypertensive rats (SHR) and transgenic rats TGR(mRen2)27 overexpressing the murine Ren-2 gene were taken into short term culture and subjected to the same mesurements. Before being put to death, the blood pressure and pulse data of the animals were collected. Also the wight of the rats' hearts in comparrison to the length of their tibia were mesured.

Results The extending effect of renin on cardiac myocytes shown by Hinrichs et al. in 2011 was confirmed. Under stimulation with FCS and endothelin-1 respectively on the one hand and renin on the other hand there was shown a reduction of the brodening effect of FCS and endothelin on cardiac myocytes caused by renin. This reduction was dependent on the concentration of renin and was inhibited

Summary

by mannose-6-phosphat and SB202190. An ameliorating effect on the parameters of cell shortening could not be shown.

Especially regarding male animals the renin overexpressing transgenic rats showed significantly shorter and slimmer cardiac myocytes than the SHR in spite of a comparable blood pressure. Male transgenic rats also showed a greater extend of cell shortening than SHR. There was no significant difference in velocity of contraction and relaxation.

Discussion A antihypertrophic effect of renin on cardiac myocytes is shown in vitro. M6P/IGFIIR as well as PRR may play a role in mediating this effect. Also the activation of an intracellular RAS after M6P/IGFIIR mediated endocytosis of renin or prorenin may be a possible way leading to this effect.

There is a distinct difference between male and female animals in vivo. This may be due to the influence of different sexual hormones on RA(A)S but also due to a different expression of the PRR because of its X-chromosomal locus. Myocardial hypertrophy in male transgenic rats is considerably less developed than in SHR despite comparable hemodynamical stress.

A positive effect on the contractility of cardiomyocytes could neither be shown by stimulation by renin in vitro nor by overexpression of renin ex vivo. A higher velocity of contraction and relaxation equally in SHR and transgenic rats compared to sprague-dawley rats may be caused by different hemodynamic conditions.

Abkürzungsverzeichnis

ACC American College of Cardiology

ACE Angiotensin Converting Enzyme

ADH Antidiuretisches Hormon, Vasopressin

AHA American Heart Association

ANOVA Varianzanalyse

ANP Atrial Natriuretic Peptide

AT Angiotensin II

BNP Brain Natriuretic Peptide

CaCl₂ Calciumchlorid

CaMKII Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II

cAMP zyklisches Adenosinmonophosphat

CCT Karnitin/Kreatin/Taurin-Kulturmedium

CO₂ Kohlenstoffdioxid
COX-2 Cycoloxygenase 2

EDTA Ethylendiamintetraazetat

EF Ejektionsfraktion

ERK Extracellular-signal Regulated Kinasen

ESC European Society of Cardiology

FCS Fetales Kälberserum

H₂ Wasserstoff

HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-

 $ethan sulfons\"{a}ure$

HW Herzgewicht

IGFII Insulin-like Growth Factor II

ILVEF Impaired Left Ventricular Ejection Fraction

KCl Kaliumchlorid

KH₂PO₄ Kaliumdihydrogenphoshat

Abkürzungsverzeichnis

 L_{max} maximale Zelllänge L_{min} minimale Zelllänge

LIF Leukemia Inhibitory Factor

M6P Mannose-6-Phosphat

M6P/IGFIIR Mannose-6-Phosphat/Insulin-like Growth Factor

II Rezeptor

MAP Arterieller Mitteldruck

MAPK Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

MgCl₂ Magnesiumchlorid
MgSO₄ Magnesiumsulfat

MHC Myosin Heavy Chain

mRNA Messenger Ribonukleinsäure

NaCl Natriumchlorid

NaHCO₃ Natriumhydrogencarbonat NaH₂PO₄ Natriumdihydrogenphosphat

NaOH Natriumhyodroxid

NEP Neurale Endopeptidase

NO Stickstoffmonoxid

NYHA New York Heart Association

 P_syst systolischer Blutdruck P_diast diastolischer Blutdruck

PAI1 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1

PKA Proteinkinase A

PLVEF Preserved Left Ventricular Ejection Fraction

PPARγ Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ

PRR, (P)RR (Pro)Renin-Rezeptor

RAAS Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

RAS Renin-Angiotensin-System

SD Sprague-Dawley

SDRen+ Renin-überexprimierende Sprague-Dawley Ratten

vom Typ TGR(mRen2)27

SEM Standard Error of the Means

SH spontan hypertensiv

SHR spontan hypertensive Ratten

Abkürzungsverzeichnis

TDI Tissue Doppler Imaging

TGF Transforming Growth Factor

TGR transgene Ratten, soweit nicht anders bezeichnet

TGR(mRen2)27

TGR(mREN2)27 Transgene Ratten, die das murine Ren-2-Gen ex-

primieren

TL Tibialänge

 $TNF\alpha$ Tumornekrosefaktor α

V_{contr} maximale Kontraktionsgeschwindigkeit

V_{relax} maximale Relaxionsgeschwindigkeit

WHO Weltgesundheitsorganisation

Abbildungsverzeichnis

1.1	Patnomechanismus der Herzinsuffizienz	3
1.2	Die Kaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.	10
1.3	Prorenin, Renin und ihre Wirkungsmechanismen.	14
4.1	Einfluss von Renin auf die Zelllänge unter Interaktion mit FCS	30
4.2	Einfluss von Renin auf die Zellbreite unter Interaktion mit FCS	30
4.3	$Interaktion\ von\ FCS\ mit\ ansteigenden\ Konzentrationen\ von\ Renin\ hinsichtlich\ der\ Zellbreite.$	31
4.4	Interaktion von FCS mit ansteigenden Konzentrationen von Renin hinsichtlich der Zell-	
	breite in Anwesenheit von M6P.	32
4.5	Interaktion von FCS mit ansteigenden Konzentrationen von Renin hinsichtlich der Zell-	
	breite in Anwesenheit von SB202190	33
4.6	Einfluss von Renin auf die Zelllänge unter Interaktion mit Endothelin	34
4.7	Einfluss von Renin auf die Zellbreite unter Interaktion mit Endothelin	34
4.8	Einfluss von Renin auf die relative lastfreie Zellverkürzung unter Interaktion mit FCS	35
4.9	Wirkung von FCS, Renin und deren Kombination auf die maximale Kontraktionsge-	
	schwindigkeit der lastfreien Zellverkürzung.	36
4.10	Wirkung von FCS, Renin und deren Kombination auf die maximale Relaxationsgeschwin-	
	digkeit der lastfreien Zellverkürzung	37
4.11	Herzfrequenzen der untersuchten männlichen Tiere	38
4.12	Blutdruckwerte der untersuchten männlichen Tiere.	39
4.13	Herzgewichte bezogen auf die Tibialänge aller untersuchten Tiere	40
4.14	Herzgewichte bezogen auf die Tibialänge der untersuchten Tiere in geschlechtsgetrennter	
	Betrachtung	41
4.15	Zelllängen der untersuchten SD, SH und SD Ren+ Ratten.	41
4.16	Zellbreiten der untersuchten SD, SH und SD Ren+ Ratten.	42
4.17	Geschlechtsgetrennte Auswertung der Zelllängen von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+	
	Ratten	42

Abbildungsverzeichnis

4.18	Geschlechtsgetrennte Auswertung der Zellbreiten von SD Ratten, SH Ratten und SD	
	Ren+ Ratten.	43
4.19	Lastfreie Zellverkürzung der Kardiomyozyten von SD, SH und SD Ren+ Ratten	43
4.20	Maximale Kontraktionsgeschwindigkeiten unter lastfreier Zellverkürzung der Kardio-	
	myozyten von SD, SH und SD Ren+ Ratten	44
4.21	Maximale Relaxationsgeschwindigkeiten unter lastfreier Zellverkürzung der Kardiomyo-	
	zyten von SD, SH und SD Ren+ Ratten.	44
4.22	Geschlechtsgetrennte Darstellung der lastfreien Zellverkürzung der Kardiomyozyten von	
	SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten	45
4.23	Geschlechtsgetrennte Darstellung der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeiten der	
	Kardiomyozyten von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten	46
4.24	Geschlechtsgetrennte Darstellung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeiten der Kar-	
	diomyozyten von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten.	46

Tabellenverzeichnis

1.1	Symptome und Zeichen der Herzinsuffizienz	2
1.2	Einteilung der Herzinsuffizienz nach NYHA.	5
1.3	Einteilung der Herzinsuffizienz nach ACC/AHA	6
4.1	Interaktion von FCS und ansteigenden Konzentrationen von Renin in Anwesenheit von	
	M6P hinsichtlich Zelllänge und -breite.	31
4.2	Interaktion von FCS und ansteigenden Konzentrationen von Renin in Anwesenheit von	
	SB202190 hinsichtlich Zelllänge und -breite.	32
4.3	Wirkung von FCS, Renin und deren Kombination auf die Kontraktions- und Relaxations-	
	geschwindigkeit der lastfreien Zellverkürzung	35
4.4	Ergebnisse der Blutdruck- und Pulsmessung aller Tiere	36
4.5	Ergebnisse der Blutdruck- und Pulsmessung der männlichen Tiere	37
4.6	Ergebnisse der Blutdruck- und Pulsmessung der weiblichen Tiere.	38
4.7	Geschlechtsgetrennte Betrachtung der auf die Tibialänge normierten Herzgewichte von	
	SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten	39
4.8	Geschlechtsgetrennte Auswertung der Zelllängen und Zellbreiten von SD Ratten, SH	
	Ratten und SD Ren+ Ratten	40
4.9	Geschlechtsgetrennte Auswertung der relativen Zellverkürzung (%) von SD Ratten, SH	
	Ratten und SD Ren+ Ratten	40
4.10	Geschlechtsgetrennte Auswertung der maximalen Kontraktions- (C _{Contr}) und Relaxati-	
	onsgeschwindigkeiten (C_{Relax}) von SD Ratten, SH Ratten und SD Ren+ Ratten	45

- Adams, M. A., Bobik, A. & Korner, P. I. Differential Development of Vascular and Cardiac Hypertrophy in Genetic Hypertension. Relation to Sympathetic Function. *Hypertension* 14, 191– 202 (1989).
- Admiraal, P. J., van Kesteren, C. A. M., Danser, A. H. J., Derkx, F. H. M., Sluiter, W. & Schalekamp, M. A. D. H. Uptake and proteolytic activation of prorenin by cultured human endothelial cells. *Journal of Hypertension* 17, 621–629 (1999).
- 3. Akahane, K., Umeyama, H., Nakagawa, S., Moriguchi, I., Hirose, S., Iizuka, K. & Morakami, K. Three-dimensional Structure of Human Renin. *Hypertension* **7**, 3–12 (1985).
- 4. Bishop, J. E., Kiernan, L. A., Montgomery, H. E., Gohlke, P. & McEwan, J. R. Raised blood pressure, not renin-angiotensin systems, causes cardiac fibrosis in TGR m(Ren2)27 rats. *Cardiovascular Research* **47**, 57–67 (2000).
- 5. Bisping, E., Wakula, P., Poteser, M. & Heinzel, F. R. Targeting Cardiac Hypertrophy: Toward a Casual Heart Failure Therapy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **64**, 293–305 (2014).
- 6. Bountioukos, M., Schinkel, A. F. L., Bax, J. J., Lampropoulos, S. & Poldermans, D. The impact of hypertension on systolic and diastolic left ventricular function. A tissue Doppler echocardiographic study. *American Heart Journal* **151**, e7–e12 (2006).
- 7. Brooks, W. W., Bing, O. H. L., Conrad, C. H., O'Neill, L., Crow, M. T., Lakatta, E. G., Dostal, D. E., Baker, K. M. & Boluyt, M. O. Captopril Modifies Gene Expression in Hypertrophied and Failing HHeart of Aged Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* **30**, 1362–1368 (1997).
- 8. Burcklé, C. A., Danser, A. H. J., Müller, D. N., Garrelds, I. M., Gasc, J.-M., Popova, E., Plehm, R., Peters, J., Bader, M. & Nguyen, G. Elevated Blood Pressure and Heart Rate in Human Renin Receptor Transgenic Rats. *Hypertension* 47 [part 2], 552–556 (2006).
- 9. Burt, D. W., Nakamura, N., Kelly, P. & Dzau, V. J. Identification of Negative and Positive Regulatory Elements in the Human Renin Gene. *The Journal of Biological Chemistry* **264,** 7357–7362 (1989).
- 10. Campbell, D. J. Critical Review of Prorenin and (Pro)renin Receptor Research. *Hypertension* **51**, 1259–1264 (2008).

- 11. Castrop, H., Höcherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V. & Wagner, C. Physiology of Kidney Renin. *Physiological Reviews* **90**, 607–673 (2010).
- 12. Catanzaro, D. F. Physiological Relevance of Renin/Prorenin Binding and Uptake. *Hypertension Research* **28**, 97–105 (2005).
- Chen, L., Kim, S. M., Eisner, C., Oppermann, M., Huang, Y., Mizel, D., Li, L., Chen, M., Lopez, M. L. S., Weinstein, L. S., Gomez, R. A., Schnermann, J. & P., B. J. Stimulation of Renin Secretion by Angiotensin II Blockade is Gs alpha-Dependent. *Journal of the American Society of Nephrology* 21, 986–992 (2010).
- 14. Chen, Z., Ge, Y. & Kang, J. X. Down-regulation of the M6P/IGF-II Receptor increases cell proliferation and reduces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *BMC Cell Biology* (2004).
- Chu, C. H., Tzang, B. S., Chen, L. M., Liu, C. J., Tsai, F. J., Tsai, C. H., Lin, J. A., Kuo, W. W., Bau,
 D. T., Yao, C. H. & Huang, C. Y. Activation of Insulin-Like Growth Factor II Receptor Induces
 Mitochondrial-Dependent Apoptosis through G alpha q and Downstream Calcineurin Signaling in
 Myocardial Cells. *Endocrinology*, 2723–2731 (2009).
- 16. *Classen/Diehl/Kochsiek Innere Medizin* 6. Auflage (eds Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K., Böhm, M., Hallek, M. & Schmiegel, W.) (Elsevier, München, 2009).
- 17. CONSENSUS Trial Study Group. Effects of Enalapril on Mortality in Severe Congestive Heart Failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *The New England Journal of Medicine* **316**, 1429–1435 (1987).
- Cruciat, C. M., Ohkawara, B., Acebron, S. P., Karaulanov, E., Reinhard, C., Ingelfinger, D., Boutros, M. & Niehrs, C. Requirement of prorenin receptor and vacuolar H+-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling. *Science* 327, 459–463 (2010).
- 19. Danser, A. H. J. The increase in renin during renin inhibition: does it result in harmful effects by the (pro)renin receptor? *Hypertension Research* **33**, 4–10 (2010).
- 20. Danser, A. H. J. & Deinum, J. Renin, Prorenin and the Putative (Pro)renin Receptor. *Hypertension* **46**, 1069–1076 (2005).
- De P Rodrigues, S. F., dos Santos, R. A., Silva-Antonialli, M. M., Scavone, C., Nigro, D., Carvalho, M. H., de Cássia Tostes, R. & Tortes, Z. B. Differential effect of losartan in female and male spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences* 78, 2280–2285 (2006).
- 22. *Physiologie* 4. Auflage (eds Deetjen, P., Speckmann, E. J. & Hescheler, J.) (Elsevier, München, 2005).

- 23. Delbridge, L. M., Connel, P. J., Morgan, T. O. & Harris, P. J. Contractile Function of Cardiomyocytes from the Spontaneously Hypertensive Rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **28**, 723–733 (1996).
- 24. 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* **47**, 1266–1273 (1995).
- 25. DiBona, G. F. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 279, R1517–R1524 (2000).
- Dinh, D. T., Frauman, A. G., Johnston, C. I. & Fabiani, M. E. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clinical Science* 100, 481–492 (2001).
- 27. Diwan, A. & Dorn, G. W. I. Decompensation of Cardiac Hypertrophy: Cellular Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Physiology* **22**, 56–64 (2007).
- 28. Doggrell, S. A. & Brown, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research* **39**, 89–105 (1998).
- 29. Drawnel, F. M., Archer, C. R. & Roderick, L. H. The role of the paracrine/autocrine mediator endothelin-1 in regulation of cardiac contractility and growth. *British Journal of Pharmacology* **168**, 296–317 (2013).
- 30. Dzau, V. J. Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease. A Unifying Hypothesis. *Hypertension* **37**, 1047–1052 (2001).
- 31. ESC Chronic Heart Failure Guideline Task Force. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *European Heart Journal* **33**, 1787–1847 (2012).
- 32. Francis, G. S. ACE inhibition in cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine* **342**, 201–202 (2000).
- 33. Frey, N. & Olson, E. N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual Review of Physiology* **65**, 45–79 (2003).
- 34. Friis, U. G., Jorgensen, F., Andreasen, D., Jensen, B. L. & Skott, O. Molecular and Functional Identification of Cyclic AMPSensitive BKCa Potassium Channels (ZERO Variant) and L-Type Voltage-Dependent Calcium Channels in Single Rat Juxtaglomerular Cells. *Circulation Research* **93**, 213–220 (2003).

- 35. Frohlich, E. D., Apstein, C., Chobanian, A. V., Devereux, R. B., Dustan, H. P., Dzau, V., Fauad-Tarazi, F., Horan, M. J., Marcus, M., Massie, B., Pfeffer, M. A., Re, R. N., Roccella, E. J., Savage, D. & Shub, C. The Heart in Hypertension. *The New England Journal of Medicine* 327, 998–1008 (1992).
- 36. Fyhrquist, F. & Saijonmaa, O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine* **264**, 224–236 (2008).
- 37. Gandhi, S. K., Gainer, J., King, D. & Brown, N. J. Gender Affects Renal Vasoconstrictor Response to Ang I and Ang II. *Hypertension* **31** [part 1], 90–96 (1998).
- 38. Germain, S., Konoshita, T., Fuchs, S., Philippe, J., Corvio, P. & Pinet, F. Regulation of human renin gene transcription by cAMP. *Clinical and Experimental Hypertension* **19**, 543–550 (1997).
- 39. Grünberger, C., Obermayer, B., Klar, J., Kurtz, A. & Schweda, F. The Calcium Paradoxon of Renin Release. Calcium Suppresses Renin Exocytosis by Inhibition of Calcium-Dependent Adenylate Cyclases AC5 and AC6. *Circulation Research* **99**, 1197–1206 (2006).
- 40. Heger, J. & Schlüter, K.-D. Renin and the IGFII/M6P Receptor System in Cardiac Biology. *The Scientific World Journal* (2013).
- 41. Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung (ed Herold, G.) (Eigenverlag, Köln, 2014).
- 42. Hinrichs, S., Heger, J., Schreckenberg, R., Wenzel, S., Euler, G., Arens, C., Bader, M., Rosenkranz, S., Caglayan, E. & Schlüter, K.-D. Controlling cardiomyocyte length: the role of renin and PPARgamma. *Cardiovascular Research* **89**, 344–352 (2011).
- 43. Hirose, T., Hashimoto, M., Totsuna, K., Metoki, H., Hara, A., Satoh, M., Kikuya, M., Ohkubo, T., Asayama, K., Kondo, T., Kamide, K., Katsuya, T., Ogihara, T., Izumi, S. I., Rakugi, H., Takagashi, K. & Imai, Y. Association pf (pro)renin receptor gene polymorphisms with lacunar infarction and left ventricular hypertrophy in Japanese women: the Ohasama study. *Hypertension Research* 34, 530–535 (2011).
- 44. HOPE Heart Outcome Prevention Evaluation Study Investigators (1). Effects of an Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitor, Ramipril, on Cardiovascular Events in High-Risk Patients. *The New England Journal of Medicine* **342**, 145–153 (2000).
- 45. HOPE Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators (2). Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *The Lancet* **355**, 253–259 (2000).

- 46. Huang, W., Sjöquist, M., Skott, O., Stricker, E. M. & Sved, A. F. Oxytocin antagonist disrupts hypotension-evoked renin secretion and other responses in conscious rats. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **280**, R760–R765 (2001).
- 47. Huang, W., Sjöquist, M., Skott, O., Stricker, E. M. & Sved, A. F. Oxytocin-induced renin secretion in conscious rats. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **278**, R226–R230 (2000).
- 48. Huang, Y., Noble, N. A., Zhang, J., Xu, C. & Border, W. A. Renin-stimulated TGF-beta1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells. *Kidney International* **72**, 45–52 (2007).
- 49. Huang, Y., Wingamorntham, S., Kasting, J., McQuillan, D., Owens, R. T., Yu, L., Noble, N. A. & Border, W. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney International* **69**, 105–113 (2006).
- 50. Hudson, M., Rahme, E., Behlouli, H., Sheppard, R. & Pilote, L. Sex differences in the effectiveness of angiotensin receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors in patients with congestive heart failure A population study. *European Journal of Heart Failure* **9**, 602–609 (2007).
- 51. Ichihara, A., Suzuki, H., Murakami, M., Naitoh, M., Matsumoto, A. & Saruta, T. Interactions between angiotensin II and norepinephrine on renin release by juxtaglomerular cells. *European Journal of Endocrinology* **133**, 569–577 (1995).
- 52. Ito, H., Hirata, Y., Hirose, M., Tsujino, M., Adachi, S., Takamoto, T., Nitta, M., Taniguchi, K. & Marumo, F. Endothelin-1 Induces Hypertrophy With Enhanced Expression of Muscle-Specific Genes in Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Circulation Research* **69**, 209–215 (1991).
- 53. Kaneshiro, Y., Ichihara, A., Sakoda, M., Takemitsu, T., Nurun Nabi, A. H. M., Nasir Uddin, M., Nakagawa, T., Nishiyama, A., Suzuki, F., Inagami, T. & Itoh, H. Slowly Progressive, Angiotensin II Independent Glomerulosclerosis in Human (Pro)renin Receptor Transgenic Rats. *Journal of the American Society of Nephrology* **18**, 1789–1795 (2007).
- 54. Kaneshiro, Y., Ichihara, A., Takemitsu, T., Sakoda, M., Suzuki, F., Nakagawa, T., Hayashi, M. & Inagami, T. Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats. *Kidney International* **70**, 641–646 (2006).
- 55. Kang, J. X., Bell, J., Beard, R. L. & Chandraratna, R. A. S. Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor Mediates the Growth-Inhibitory Effects of Retinoids. *Cell Growth and Differentiation* **10**, 591–600 (1999).

- 56. Kirsch, S., Schrezenmeier, E., Klare, S., Zaade, D., Seidel, K., Schmitz, J., Bernhard, S., Lauer, D., Slack, M., Goldin-Lang, P., Unger, T., Zollmann, F. S. & Funke-Kaiser, H. The (pro)renin receptor mediates constitutive PLZF-independent pro-proliferative effects which are inhibited by bafilomycin but not genistein. *International Journal of Molecular Medicine* 33, 795–808 (2014).
- 57. Kleiman, R. B. & Houser, S. R. Electrophysiologic and mechanical properties of single feline RV and LV myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **20**, 973–982 (1988).
- 58. Kögel, A. Einfluss von Renin auf die linksventrikuläre Funktion und das linksventrikuläre Remodeling isolierter Rattenherzen und Kardiomyozyten VVB Laufersweiler Verlag. Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs der Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (Justus-Liebig-Universität Gießen, 2013).
- 59. Kornfeld, S. Structure and Function of the Mannose 6-Phosphate/Insulinlike Growth Factor II Receptor. *Annual Review of Biochemistry* **61,** 307–330 (1992).
- Kortekaas, K. E., Meijer, C. A., Hinnen, J. W., Dalman, R. L., Xu, B., Hamming, J. F. & Lindeman,
 J. H. ACE Inhibitors Potently Reduce Vascular Inflammation, Results of an Open Proof-Of-Concept
 Study in the Abdominal Aortic Aneurysm. *PLoS ONE* 9, e111952 (2014).
- 61. Kurtz, A. & Penner, R. Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86,** 3423–3427 (1989).
- 62. Lau, M. M. H., Stewart, C. E. H., Liu, Z., Bhatt, H., Rotwein, P. & Stewart, C. L. Loss of the imprinted IGF2 / cationindependent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes and Development* **8**, 2953–2963 (1994).
- 63. Laureys, G., Barton, D. E., Ullrich, A. & Francke, U. Chromosomal mapping of the gene for the type II insulin-like growth factor receptor-cation-independent mannose 6-phosphate receptor in man und mouse. *Genomics* **3**, 224–229 (1988).
- 64. Lee, M. A., Böhm, M., Paul, M., Bader, M., Ganten, U. & Ganten, D. Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)27. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* **270**, E919–E929 (1996).
- 65. Lee, S. D., Chu, C. H., Huang, E. J., Lu, M. C., Liu, J. Y., Liu, C. J., Hsu, H. H., Lin, J. A., Kuo, W. W. & Huang, C. Y. 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* **291**, E306–E314 (2006).
- 66. Leibovitz, E. & Schiffrin, E. L. Novel Drugs Targeting Hypertension: Renin Inhibitors and Beyond. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **50**, 3–8 (2007).

- 67. Lévy, B. I. Can Angiotensin II Type 2 RReceptor Have Deleterious Effects in Cardiovascular Disease? Implications for Therapeutic Blockade of the Renin-Angiotensin-System. *Circulation* **109**, 8–13 (2004).
- 68. Levy, D., Garrison, R. J., Savage, D. D., Kannel, W. B. & Castelli, W. P. Prognostic Implications of Echocardiographically Determined Left Ventricular Mass in the Framingham Heart Study. *New England Journal of Medicine* **322** (1990).
- 69. Leyssac, P. P., Holstein-Rathlou, N.-H. & Skott, O. Renal blood flow, early distal sodium, and plasma renin concetrations during osmotic diuresis. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **279**, R1268–R1276 (2000).
- 70. Ludwig, T., Eggenschwiler, J., Fisher, P., D'Ercole, A. J., Davenport, M. L. & Efstratiadis, A. Mouse Mutants Lacking the Type 2 IGF Receptor (IGF2R) Are Rescued from Perinatal Lethality in Igf2 and Igf1r Null Backgrounds. *Developemental Biology* **177**, 517–535 (1996).
- 71. Lueder, T. G. v. & Krum, H. RAAS Inhibitors and Cardiovascular Protection in Large Scale Trials. *Cardiovascular Drugs and Therapy* (2012).
- 72. Maeno, Y., Iwasa, M., Inoue, H., Koyama, H., Matoba, R. & Nagao, M. Direct effects of methamphetamine on hypertrophy and microtubules in cultured adult rat ventricular myocytes. *Forensic Science International* **113**, 239–243 (2000).
- 73. Masson, S., Solomon, S., Angelici, L., Latini, R., Anand, I. S., Prescott, M., Maggioni, A. P., Tognoni, G. & Cohn, J. N. Elevated Plasma Renin Activity Predicts Adverse Outcome in Chronic Heart Failure, Independently of Pharmacologic Therapy: Data From the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Journal of Cardiac Failure* 16, 964–970 (2010).
- 74. Mercure, C., Prescott, G., Lacombe, M. J., Silversides, D. W. & Reudelhuber, T. L. Chronic Increases in Circulating Prorenin Are not Associated With Renal or Cardiac Pathologies. *Hypertension* **53**, 1062–1069 (2009).
- 75. Moilanen, A. M., Rysä, J., Serpi, R., Mustonen, E., Szabò, Z., Aro, J., Näpänkangas, J., Tenhunen, O., Sutinen, M., Salo, T. & Ruskoaho, H. (Pro)renin Receptor Triggers Distinct Angiotensin II-Independent Extracellular Matrix Remodeling and Deterioration of Cardiac Function. *PLoS ONE* 7 (2012).
- 76. Mosterd, A. & Hoes, A. W. Clinical Epidemiology of Heart Failure. *Heart* **93**, 1137–1146 (2007).
- Mosterd, A., Hoes, A. W., de Bruyne, M. C., Deckers, J. W., Linker, D. T., Hofman, A. & Grobbee,
 D. E. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The
 Rotterdam Study. European Heart Journal 20, 447–455 (1999).

- 78. Mullins, J. J., Peters, J. & Ganten, D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* **344**, 541–544 (1990).
- 79. Murphey, L., Vaughan, D. & Brown, N. Contribution of bradykinin to the cardioprotective effects of ACE inhibitors. *European Heart Journal Supplements* **5** (2003).
- 80. Murray-Thomas, T. & Cowie, M. R. Epidemiology and clinical aspects of congestive heart failure. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosteron System* **4,** 131–136 (2003).
- 81. Neumann, T., Biermann, J., Neumann, A., Wasern, J., Ertl, G., Dietz, R. & Erbel, R. Herzinsuffizienz: Häufigster Grund für Krankenhausaufenthalte. *Deutsches Ärzteblatt* **106**, 269–275 (2009).
- 82. Nguyen, G. Renin, (pro)renin and receptor: an update. Clinical Science 120, 169–178 (2011).
- 83. Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzhir, L., Giller, T. & Sraer, J. D. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *Journal of Clinical Investigation* **109**, 1417–1427 (2002).
- 84. Nguyen, G. & Muller, D. N. The Biology of the (Pro)Renin Receptor. *Journal of the American Society of Nephrology* **21**, 18–23 (2010).
- 85. Nussberger, J., Gradman, A. H., Schmieder, R. E., Lins, R. L., Chiang, Y. & Prescott, M. F. Plasma renin and the antihypertensive effect of the orally active renin inhibitor aliskiren in clinical hypertension. *International Journal of Clinical Practice* **91**, 1461–1468 (2007).
- 86. O'Brien, E., Barton, J., Nussberger, J., Mulcahy, D., Jensen, C., Dicker, P. & Stanton, A. Aliskiren reduces blood pressure and suppresses plasma renin activity in combination with a thiazide diuretic, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, or an angiotensin receptor blocker. *Hypertension* **49**, 276–284 (2007).
- 87. 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* **94**, 785–791 (1996).
- 88. Okamoto, K. & Aoki, K. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Japanese Circulation Journal* **27**, 282–293 (1963).
- 89. Ono, Y., Ito, H., Tamamori, M., Nozato, T., Adachi, S., Abe, S., Marumo, F. & Hiroe, M. Role and Relation of p70 S6 and Extracellular Signal-Regulated Kinases in the Phenotypic Changes of Hypertrophy of Cardiac Myocytes. *Japanese Circulation Journal* **64**, 695–700 (2000).
- 90. Paul, M., Mehr, A. P. & Kreutz, R. Physiology of Local Renin-Angiotensin-Systems. *Physiological Reviews* **86**, 747–803 (2006).

- 91. Persson, P. B. Renin: origin, secretion and synthesis. *The Journal of Physiology* **552**, 667–671 (2003).
- 92. Peters, J., Farrenkopf, R., Clausmeyer, S., Zimmer, J., Kantachuvesiri, S., Sharp, M. G. F. & Mullins, J. J. Functional Significance of Prorenin Internalization in the Rat Heart. *Circulation Research* **90**, 1135–1141 (2002).
- 93. Petrovic, N., Black, T. A., Fabian, J. R., Kane, C., Jones, C. A., Loudon, J. A., Abonia, J. P., Sigmund, C. D. & Gross, K. W. Role of Proximal Promoter Elements in Regulation of Renin Gene Transcription. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 22499–22505 (1996).
- 94. Phillips, M. I. & Schmidt-Ott, K. M. The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News in Physiological Science* **14**, 271–274 (1999).
- 95. Pinto, Y. M., Paul, M. & Ganten, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular Research* **39**, 77–88 (1998).
- 96. Piper, H. M., Probst, I., Schwartz, P., Hütter, J. J. & Spieckermann, P. G. Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **14**, 397–412 (1982).
- 97. Pratt, R. E., Carleton, J. E., Richie, J. P., Heusser, C. & Dzau, V. J. Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 7837–7840 (1987).
- 98. Re, R. N. On the Biological Actions of Intracellular Angiotensin. *Hypertension* **35**, 1189–1190 (2000).
- 99. Reckelhoff, J. F. Gender Differences in the Regulation of Blood Pressure. *Hypertension* **37**, 1199–1208 (2001).
- 100. Reckelhoff, J. F., Zhang, H. & Srivastava, K. Gender Differences in Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. Role of the Renin-Angiotensin System. *Hypertension* 35, 480–483 (2000).
- 101. Redfield, M. M., Jacobsen, S. J., Burnett Jr., J. C., Mahoney, D. W., Bailey, K. R. & Rodeheffer, R. J. Burden of Systolic and Diastolic Ventricular Dysfunction in the Community. Appreciating the Scope of the Heart Failure Epidemic. *The Journal of the American Medical Association* 289, 194–202 (2003).
- 102. Ruskoaho, H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release and metabolism. *Pharmacological Reviews* **44**, 479–602 (1992).

- 103. Saris, J. J., Derkx, F. H. M., De Bruin, R. J. A., Dekkers, D. H. W., Lamers, J. M. J., Saxena, P. R., Schalekamp, M. A. D. H. & Danser, A. H. J. High-affinity prorenin binding to cardiac man-6-P/IGF-II receptors precedes proteolytic activation to renin. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 280, H1706–H1715 (2001).
- Saris, J. J., Derkx, F. H. M., Lamers, J. M. J., Saxena, P. R., Schalekamp, M. A. D. H. & Danser,
 A. H. J. Cardiomyocytes Bind and Activate Native Human Prorenin. Role of Soluble Mannose
 6-Phosphate Receptors. *Hypertension* 37, 710–715 (2001).
- 105. Saris, J. J., 't Hoen, A. C., Garrelds, I. M., Dekkers, D. H. W., den Dunnen J. T., Lamers, J. M. J. & Danser, A. H. J. Prorenin Induces Intracellular Signaling in Cardiomyocytes Independently of Angiotensin II. *Hypertension* 48, 564–571 (2006).
- 106. Schefe, J. H., Menk, M., Reinemund, J., Effertz, K., Hobbs, R. M., Pandolfi, P. P., Ruiz, P., Unger, T. & Funke-Kaiser, H. A Novel Signal Transduction Cascade Involving Direct Physical Interaction of the Renin/Prorenin Receptor With the Transcription Factor Promyelocytic Zinc Finger Protein. Circulation Research 99, 1355–1366 (2006).
- 107. Schlüter, K.-D., Weber, M. & Piper, H. M. Effects of PTH-rP(107111) and PTH-rP(7 34) on adult cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **29**, 3057–3065 (1997).
- 108. Shearer, F., Lang, C. C. & Struthers, A. D. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Heart Failure. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **94**, 459–467 (2013).
- 109. *Klinische Pathophysiologie* 9. Auflage (eds Siegenthaler, W. & Blum, H. E.) (Thieme, Stuttgart, 2006).
- 110. Simpson, P., McGrath, A. & Savion, S. Myocyte Hypertrophy in Neonatal Rat Heart Cultures and Its Regulation by Serum and by Catecholamines. *Circulation Research* **51**, 787–801 (1982).
- 111. Singh, V. P., Le, B., Bhat, V. B., Baker, K. M. & Kumar, R. High-glucose-induced regulation of intracellular ANG II synthesis and nuclear redistribution in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 293, H939–H948 (2007).
- 112. Skott, O. Renin. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **282**, R937–R939 (2002).
- 113. Sleight, P. The HOPE Study (Heart Outcomes Prevention Evaluation). *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **1**, 18–20 (2000).
- 114. Smith, T. L. & Hutchins, P. M. Central Hemodynamics in the Developmental Stage of Spontaneous Hypertension in the Unanesthetized Rat. *Hypertension* **1**, 508–517 (1979).

- 115. Statistisches Bundesamt. Gesundheit. Todesursachen in Deutschland 2007. *DEStatis* Fachserie 12 (2009).
- 116. Statistisches Bundesamt. Gesundheit. Todesursachen in Deutschland 2008. *DEStatis* Fachserie 12 (2010).
- 117. Statistisches Bundesamt. Gesundheit. Todesursachen in Deutschland 2009. *DEStatis* Fachserie 12 (2010).
- 118. Statistisches Bundesamt. Gesundheit. Todesursachen in Deutschland 2010. *DEStatis* Fachserie 12 (2012).
- 119. Statistisches Bundesamt. Gesundheit. Todesursachen in Deutschland 2011. *DEStatis* Fachserie 12 (2012).
- 120. Statistisches Bundesamt. Gesundheit. Todesursachen in Deutschland 2012. *DEStatis* Fachserie 12 (2013).
- 121. Statistisches Bundesamt. Gesundheit. Todesursachen in Deutschland 2013. *DEStatis* Fachserie 12 (2014).
- 122. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2006. DEStatis Fachserie 12 (2007).
- 123. Steckelings, U. Der Angiotensin AT2-Rezeptor: Untersuchungen zu Expression, physiologischen Wirkungen und zum therapeutischen Potential einer pharmakologischen Stimulation Habilitationsschrift (Charité Centrum für Therapieforschung, Institut für Pharmakologie/Center for Cardiovascular Research, 2011).
- 124. Sullivan, J. C. Sex and the renin-angiotensin system: inequality between the sexes in response to RAS stimulation and inhibition. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **294**, R1220–R1226 (2008).
- 125. Todorov, V. T., Desch, M., Schmitt-Nilson, N., Todorova, A. & Kurtz, A. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Is Involved in the Control of Renin Gene Expression. *Hypertension* **50**, 939–944 (2007).
- 126. TSE-Systems GmbH. TSE Blood Pressure Monitor 209000 series TSE Systems GmbH (2005).
- 127. Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M. & Griendling, K. K. p38 Mitogen-activated Protein Kinase Is a Critical Component of the Redox-sensitive Signaling Pathways Activated by Angiotensin II. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 15022–15029 (1998).

- 128. Van den Eijnden, M. M. E. D., Saris, J. J., de Bruin, R. J. A., de Wit, E., Sluiter, W., Reudelhuber, T. L., Schalekamp, M. A. D. H., Derkx, F. H. M. & Danser, A. H. J. Prorenin Accumulation and Activation in Human Endothelial Cells. Importance of Mannose 6-Phosphate Receptors. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 21, 911–916 (2001).
- 129. Van Kesteren, C. A. M., Danser, A. H. J., Derkx, F. H. M., Dekkers, D. H. W., Lamers, J. M. J., Saxena, P. R. & Schalekamp, M. A. D. H. Mannose 6-Phosphate Receptor Mediated Internalization and Activation of Prorenin by Cardiac Cells. *Hypertension* 30, 1389–1396 (1997).
- 130. Van Vark, L. C., Bertrand, M., Akkerhuis, K. M., Brugts, J. J., Fox, K., Mourad, J. J. & Boersma, E. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality in hypertension: a meta-analysis of randomized clinical trials of reninangiotensinal dosterone system inhibitors involving 158 998 patients. *European Heart Journal* (2012).
- 131. Volpe, M., Savoia, C., de Paolis, P., Ostrowska, B., Tarasi, D. & Rubattu, S. The Renin-Angiotensin System as a Risk Factor and Therapeutic Target for Cardiovascular and Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **13**, S173–S178 (2002).
- 132. Wang, K. C. W., Brooks, D. A., Botting, K. J. & Morrison, J. L. IGF-2R-Mediated Signaling Results in Hypertrophy of Cultured Cardiomyocytes from Fetal Sheep. *Biology of Reproduction* **86**, 183(1–8) (2012).
- 133. Wenzel, S., Taimor, G., Piper, H. M. & Schlüter, K.-D. Redox-sensitve intermediates mediate angiotensin II induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. *The FASEB Journal* (2001).
- 134. Whitworth, C. E., Fleming, S., Kotelevtsev, Y., Manson, L., Brooker, G. A., Cumming, A. D. & Mullins, J. J. A genetic model of malignant phase hypertension in rats. *Kidney International* 47, 529–535 (1995).
- 135. Zhuo, J. L. Intracrine renin and angiotensin II: a novel role in cardiovascular and renal cellular regulation. *Journal of Hypertension* **24**, 1017–1020 (2006).

Publikation

Posterbeitrag zur 78. Jahrestagung der DGK – Herz- und Kreislaufforschung e. V.:

Rieder, B., Heger, J., Schreckenberg, R., Bader, M. & Schlüter, K.-D. The non-proteolytic interaction of renin with pro-hypertrophic stimulation. *Clinical Research in Cardiology* **101**, Supplement 1, P1674 (April 2012), *DOI 10.1007/s00392-012-1100-6*.

Ehrenwörtliche Erklärung

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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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.

Burgebrach, den 15. Oktober 2015

Danksagung

Herzlich gedankt sei Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die Bereitstellung des Themas. Stets nahm er sich reichlich Zeit für Fragen und Probleme zur Arbeit und bot mir so eine hervorragende Betreuung. Darüber hinaus danke ich ihm sehr herzlich für die statistische Auswertung der Versuchsdaten.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Michael Bader für die Bereitstellung der transgenen Ratten, die in meinen Versuchen Verwendung fanden.

Weiterhin danke ich auch Herrn Dr. Rolf Schreckenberg, Frau Nadine Woitasky und Herrn Peter Volk sehr herzlich für die Einweisung in sämtliche Labortechniken, für die stete Hilfe in Rat und Tat und die großartige Unterstützung in allen technischen Belangen.

Ebenso danke ich Frau PD Dr. Jacqueline Heger, Frau Prof. Dr. Sybille Wenzel, Frau Daniela Schreiber und allen meinen Mitdoktoranden für jegliche Unterstützung und für die gute und nicht selten auch heitere Zusammenarbeit.

Herrn Fabian Stein und Herrn Georg-Vincent Reh danke ich herzlich für ihre Korrekturen, Frau Lara Stein für die Beschaffung zahlreicher Artikel.

Nicht genug danken kann ich schließlich meinen Eltern und meiner geliebten Frau zum einen für die eifrige Korrektur der Arbeit, zum anderen jedoch auch für die stete Hilfe und Geduld sowie die immerwährenden Ermutigungen, die auch über manche Durststrecke in der Entstehung der Arbeit hinweg halfen.

