

**Untersuchungen über den Einfluss von Losartan auf die
Symptome der Herzinsuffizienz
am Beispiel eines genetischen Mausmodells der kardialen
Überexpression von Calsequestrin**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Sophie Günther

geboren am 16.12.1981 in Halle (Saale)

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Joachim Neumann
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Reinhard Neubert
3. Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann

Verteidigungsdatum: Halle (Saale), den 21. Februar 2012

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle(Saale) in dem Zeitraum von Oktober 2006 bis März 2010 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. J. Neumann und unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. R. Neubert am Institut für Pharmazie, Abteilung pharmazeutische Technologie und Biopharmazie (Arbeitsgruppe Biopharmazie) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle(Saale) angefertigt.

*Man versäumt viele Gelegenheiten zu lachen,
wenn man nicht über sich selbst lacht!*

Sara Feannette Duncan

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. J. Neumann für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas und für die gute Betreuung sowie sein Interesse am Fortgang der Arbeit, insbesondere für die Ratschläge und Diskussionen während der Erstellung dieser Arbeit sowie die Bereitstellung der finanziellen Mittel. Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. R. Neubert danke ich für die freundliche Übernahme der naturwissenschaftlichen Betreuung und das dieser Arbeit entgegengebrachte Interesse. Allen ehemaligen Kollegen des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie Halle (Saale) danke ich ganz herzlich für das freundliche und kollegiale Arbeitsklima, ihre fachliche Unterstützung sowie die Mithilfe im Labor, die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die immer anregenden Gespräche, die wesentlich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Herrn Dr. rer. nat. U. Gergs danke ich für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Julius-Bernstein-Instituts für Physiologie Halle (Saale), insbesondere bei Herrn Prof. Dr. med. U. Klöckner und Frau Jun. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. C. Großmann, für die tatkräftige Unterstützung und stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken. Herrn Prof. Dr. med. S. Hauptmann und Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Holzhausen und den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie Halle (Saale) möchte ich für die Unterstützung bei der Erstellung der histologischen und elektronenmikroskopischen Schnitte danken. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. H. A. Baba und Mitarbeitern am Institut für Pathologie und Neuropathologie Essen für die gute Zusammenarbeit bei den Fibrosemessungen sowie Herrn Dr. rer. nat. habil. V. Adams am Herzzentrum Leipzig für die Möglichkeit zur Durchführung der Enzymmessungen der Skelettmuskelproben mit Bereitstellung aller notwendigen Materialien. Für die Vermessung der Plasmaproben möchte ich mich zudem bei Frau Dr. med. A. Heider Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle (Saale) bedanken. Frau PD Dr. rer. nat. Karla Punkt und Frau T. Kusche am Institut für Pathologie Leipzig möchte ich sehr für die gute und freundliche Zusammenarbeit am Projekt „Einfluss von Losartan auf die Skelettmuskulatur der CSQ-Mäuse“ danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter Marianne, meinem Vater Harry, meiner Schwester Annemarie und meinem Schwager André für die immerwährende großartige Unterstützung, die mir entgegengebrachte Geduld und die Aufmunterung während der Promotionszeit sowie das engagierte und kritische Korrekturlesen der Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei Annabelle für die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft beim Korrekturlesen der Arbeit sowie bei fachlichen Fragen und die aufbauenden Worte über die ganze Promotionszeit bedanken. Sie hat somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzelle	1
1.2 Quartärer Proteinkomplex	4
1.3 Struktur und Lokalisation des Calsequestrins	6
1.4 Mausmodelle der kardialen Überexpression von Calsequestrin	9
1.5 Herzinsuffizienz	10
1.6 Einfluss der Herzinsuffizienz auf den Skelettmuskel	13
1.7 Eigenschaften des Angiotensin II-Rezeptorantagonisten Losartan	16
1.7.1 Pharmakologische Eigenschaften	16
1.7.2 Metabolismus	16
1.7.3 Pharmakokinetik	17
1.7.4 Pharmakodynamik	17
1.7.5 Klinische Studien	19
2 Fragestellung	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Tierexperimentelle Methoden	21
3.1.1 Beschreibung der Mauslinie	21
3.1.2 Narkose und Organpräparation	22
3.1.3 Applikation von Losartan	22
3.1.4 Bestimmung der laborchemischen Parameter	23
3.2 Histologische Untersuchungen	23
3.2.1 Histologische Färbungen und Fibrosequantifizierung	23
3.2.2 Bestimmung der ATPase-Aktivität	23
3.2.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	24
3.3 Hämodynamische Untersuchungen	25
3.3.1 Messung kontraktiver Parameter des Herzens im „Working Heart“-Modus	25
3.3.2 Elektrokardiographische Messungen	26
3.3.3 Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an Herzvorhöfen	26
3.4 Methoden zur Untersuchung der RNA	28
3.4.1 RNA-Extraktion aus Herzgewebe	28
3.4.2 cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase	28
3.4.3 Quantitative RT-PCR	29

3.5	Methoden zur Untersuchung der DNA.....	31
3.5.1	DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen	31
3.5.2	PCR zur Genotypisierung der CSQ-transgenen Mäuse.....	31
3.5.3	Gelelektrophorese	32
3.6	Proteinchemische Methoden.....	33
3.6.1	Herstellung von Homogenaten	33
3.6.2	Proteinbestimmung	34
3.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot.....	34
3.6.4	Coomassie-Färbung	34
3.6.5	Immunologische Identifizierung von Proteinen.....	34
3.7	Skelettmuskel-Untersuchungen.....	35
3.7.1	Muskelpräparation und Gewebevorbereitung.....	35
3.7.2	Messungen der Enzymaktivität in Muskelhomogenaten	36
3.7.3	Immunhistochemie.....	36
3.7.4	Enzymhistochemie.....	37
3.7.5	Zytophotometrie	37
3.7.6	Fasertypisierung und -quantifizierung	37
3.7.7	Quantifizierung der Calcineurin A-Expression.....	38
3.8	HPLC-Bestimmung von Losartan und EXP3174.....	39
3.8	Behördliche Genehmigungen und Sicherheitsbestimmungen	39
3.9	Statistische Auswertung.....	40
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Phänotyp der CSQ-überexprimierenden Mäuse	41
4.1.1	Kaplan-Meier-Überlebenswahrscheinlichkeit	41
4.1.2	Morphologische Parameter.....	43
4.1.3	Laborchemische Parameter.....	46
4.2	Herzmorphologie und Histopathologie	47
4.2.1	Histologische Färbungen und Fibrosequantifizierung	47
4.2.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	49
4.3	Hämodynamische Untersuchungen	50
4.3.1	„Working Heart“-Untersuchungen.....	50
4.3.2	Elektrokardiographische Messungen	52
4.3.3	Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an linken Herzvorhöfen	54
4.4	mRNA-Expression kardialer Ionenkanäle	62
4.5	Biochemische Effekte von Losartan im Myofilament.....	62
4.5.1	ATPase-Aktivität	62
4.5.2	mRNA-Expression von ANP	63
4.6	Expression kardialer Proteine.....	64

4.7	Skelettmuskel-Messungen.....	66
4.7.1	Messung der enzymatischen Aktivität in Muskelhomogenaten.....	66
4.7.2	Zusammensetzung der Fasertypen.....	67
4.7.3	Zytophotometrische Messungen der Enzymaktivitäten.....	69
4.7.4	Expression von Calcineurin A.....	73
4.8	HPLC- Messungen.....	74
5	Diskussion.....	76
5.1	Effekte von Losartan auf die Morphologie und Sterblichkeit.....	76
5.2	Biochemische Effekte von Losartan im Sarkoplasmatischen Retikulum	81
5.3	Biochemische Effekte von Losartan im Sarkolemm	82
5.4	Biochemische Effekte von Losartan in Myofilamenten	84
5.5	Effekte von Losartan auf die Herzkontraktilität	85
5.6	Effekte von Losartan auf das EKG.....	89
5.7	Pharmakokinetische Aspekte von Losartan	90
5.8	Der Vergleich mit anderen Interventionsstudien in CSQ-Mäusen	90
5.9	Effekte von Losartan auf den Skelettmuskel	91
5.10	Einordnung der Daten im Hinblick auf die Therapie der menschlichen Herzinsuffizienz	95
6	Zusammenfassung.....	97
7	Anhang.....	98
7.1	Puffer und Lösungen.....	98
Literaturverzeichnis.....		102
Veröffentlichungen		118
Publikationen.....		118
Kongressbeiträge.....		118
Curriculum Vitae		119

Abkürzungsverzeichnis

Neben den Abkürzungen der deutschen Rechtschreibung laut Duden, den Internationalen Einheiten mit Präfixen und den chemischen Formeln wurden folgende Abkürzungen verwendet:

α -MHC-Promotor	Promotor der α -Isoform der schweren Kette des Myosins
β ARK1	β -adrenerge Rezeptorkinase 1
ACE	Angiotensin Converting Enzyme = Angiotensin-konvertierendes Enzym
Ala	Alanin
ANOVA	Analysis of Variance = Varianzanalyse
ANP	Atriales natriuretisches Peptid = atrialer natriuretischer Faktor
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
AT _{1/2} -Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Subtyp I/II
ATPase	Adenosintri-phosphatasen
AU	Arbitrary Units = willkürliche Einheiten
AV	atrioventrikulär
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-Toluidin-Salz
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin = Albumin aus Rinderserum
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary desoxyribonuclein acid = komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHARM	Candesartan in Heart Failure Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity (Candesartan-Studie)
CHF	Chronic Heart Failure = chronische Herzinsuffizienz
CPVT	Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia = katecholamin-induzierte polymorphe ventrikuläre Tachykardie
CSQ	Calsequestrin
Cys	Cystein
dATP	Didesoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Didesoxycytidintri-phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat

Abkürzungsverzeichnis

dGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNase	Desoxyribonukleasen
dNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
+dP/dt _{max}	maximaler Wert der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks = Druckanstiegsgeschwindigkeit
-dP/dt	minimaler Wert der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks = Druckabfallsgeschwindigkeit
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Didesoxythymidintriphosphat
ECF	elektrochemische Fluorierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz-dihydrat (Titrierkomplex III)
EKG	Elektrokardiogramm
ELITE 1/2	Evaluation of Losartan in the Elderly Study 1/2 (Losartan-Studie)
EXP3174	aktiver Metabolit des Losartans
FG-Fasern	„fast-glycolytic“ Fasern = schnelle glykolytische Fasern
FOG-Fasern	„fast-oxidative-glycolytic“ Fasern = schnelle oxidativ-glykolytische Fasern
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GenTG	Gentechnikgesetz
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GPDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HERG	Human Ether-a-Go-go Related Gene = spannungsaktivierter Kaliumkanal im Herzen
His	Histidin
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography = Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie
I. E.	Internationale Einheiten
i. p.	intra peritoneal
IGF 1	Insulin-like Growth Factor 1 = insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
Ile	Isoleucin
JCN	Junctin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KEKE-Struktur	alternierend Lysin (K, Lys) und Glutaminsäure (E, Glu)

L	Losartan, Losartanbehandlung
Leu	Leucin
LIFE	Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study
LTCC	Spannungsabhängiger L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal in Herzen (α 1-Untereinheit)
LV	linker Ventrikel
Met	Methionin
MHC I/IIa/IIb/IV	Myosin Heavy Chain I/IIa/IIb/IV = schwere Ketten des Myosins I/IIa/IIb/IV
mmHg/s	Millimeter Quecksilbersäule (1 mmHg \triangleq 133,32240 Pa) pro Sekunde
mRNA	messenger ribonucleic acid = Boten-Ribonukleinsäure
n	Stichprobenumfang
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher
NP-40	Polyethylenglycol (40)-nonylphenoether
NYHA	New York Heart Association
ONTARGET	The ONgoing Telmisartan Alone and in combination with Ramipril Global Endpoint Trial (Telmisartan-Studie)
P	phosphorylierter Zustand
p. o.	per oral
P2X ₄	Purin-Rezeptor Subtyp 4
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerasekettenreaktion
Phe	Phenylalanin
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP1/2A	Protein-Phosphatase 1/2A
PRP	Post-Rest Potentiation = Post Pausen Potenzierung
Pro	Prolin
PTFE	Polytetrafluorethylen
QTc	frequenzkorrigiertes QT-Intervall nach Bazett-Formel
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationspuffer
RNase	Ribonukleasen
Rox	5-Carboxy-X-rhodamin-Triethylamin-Salz
rpm	rotations per minute = Umdrehung per Minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid = ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction = quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

RyR	Ryanodin-Rezeptor (kardiale Form: RyR2) = Ca^{2+} -Freisetzungskanal
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standard Error of Mean = Standardfehler des Mittelwertes
Ser	Serin
SERCA	SR- Ca^{2+} -ATPase (kardiale Form: SERCA2a)
SO-Fasern	„slow-oxidative“ Fasern = verlangsamt oxidative Fasern
SOLVD	Study of Left Ventricular Dysfunction
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SV 40	Simian Virus 40
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloroacetic acid = Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TG	Maus mit kardialer CSQ-Überexpression
TGF β	Transforming Growth Factor β = transformierender Wachstumsfaktor
Thr	Threonin
TnC/I/T	Troponin C/I/T
TRD	Triadin (kardiale Form: TRD1)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
Val-HeFT	The Valsartan Heart Failure Trial (Valsartan-Studie)
(v/v)	volume-volume-percentage = Volumen-Volumen-Anteil
WH	Working Heart = isoliert Arbeit-leistendes Herz
WT	Wildtyp-Maus
(w/v)	weight-volume-percentage = Masse-Volumen-Anteil

1 Einleitung

Herzinsuffizienz und die damit verbundenen Komplikationen zählen zu den häufigsten Todesursachen der industrialisierten Länder. Gekennzeichnet ist eine Herzinsuffizienz durch eine kontraktile Funktionsstörung, kompensatorische Herzumbauprozesse im Bezug auf mechanische und elektrophysiologische Parameter (sogenanntes Remodeling) sowie durch plötzlichen Herztod (Hoppe et al. 2011). Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase im Myokard spielen eine wichtige Rolle bei der kontraktile Funktionsstörung der Herzinsuffizienz. Die Herzkontraktion wird durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an die Myofilamente der Herzmuskelzellen ausgelöst. Durch die freie Ca^{2+} -Ionen-Konzentration im Zytosol der Herzmuskelzellen wird die Kontraktion sowie die Relaxation des Herzens beeinflusst. Während der Kontraktion wird Ca^{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch den Ca^{2+} -Freisetzungskanal (Ryanodin-Rezeptor, RyR) freigesetzt und während der Relaxation durch die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) wieder in das SR gepumpt, wo die Bindung der Ca^{2+} -Ionen vor allem an Calsequestrin (CSQ) erfolgt. CSQ, ein wichtiges Ca^{2+} -Speicherprotein im SR, bildet zusammen mit RyR und den junktionalen Proteinen Triadin (TRD) und Junctin (JCN) einen quartären Komplex (Jones et al. 1995; Kobayashi et al. 2000; Zhang et al. 1997). Demzufolge spielt CSQ eine regulierende Rolle im Ca^{2+} -Freisetzungsprozess (Györke et al. 2004a; Ikemoto et al. 1989; Knollmann et al. 2006). Veränderungen in der Expression von CSQ können somit zu einer veränderten Kontraktion im Myokard führen. In den nachfolgenden Abschnitten sollen die elektromechanische Kopplung sowie die Ca^{2+} -Homöostase (Abschnitt 1.1), der quartäre Komplex (Abschnitt 1.2), die Struktur und Funktion von CSQ (Abschnitt 1.3), das verwendete CSQ-Mausmodell (Abschnitt 1.4), die Komplexität der Herzinsuffizienz (Abschnitt 1.5), die mit metabolischen Veränderungen der Skelettmuskulatur assoziiert sein kann (Abschnitt 1.6) und Therapieoptionen der Herzinsuffizienz mit dem Angiotensin II-Rezeptorantagonisten Losartan (Abschnitt 1.7) ausführlicher betrachtet werden.

1.1 Die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzelle

Unter der elektromechanischen Kopplung des Herzens versteht man den Kopplungsmechanismus zwischen elektrischer Erregung der Zellmembran und Kontraktion der einzelnen Herzmuskelzelle. Als Folge der Depolarisation kommt es zur Aktivierung eines Aktionspotentials und damit verbunden zur Öffnung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle der Zellmembran. Die Form und die Länge des Aktionspotentials werden im Wesentlichen durch den Ca^{2+} -Strom und durch repolarisierende K^+ -Ströme determiniert (Hoppe et al. 2010). Der Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol bedingt nach Bindung an den Ca^{2+} -Freisetzungskanal die

Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR, die sogenannte Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (Fabiato und Fabiato 1975; Györke et al. 2004a; Bers 2006). Die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR wird möglicherweise durch den quartären Proteinkomplex im junktionalen SR, bestehend aus RyR, TRD, JCN und CSQ, reguliert. Andererseits werden der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal in der Zellmembran und der Ca^{2+} -Freisetzungskanal des SR durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration inaktiviert. Eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in der näheren Umgebung des Ca^{2+} -Freisetzungskanals und/oder ein erhöhter Ca^{2+} -Gehalt im SR führen zu einer gesteigerten diastolischen Öffnungswahrscheinlichkeit des Ca^{2+} -Freisetzungskanals (Bers et al. 2006). Das freigesetzte Ca^{2+} bindet an Troponin C (TnC) der Myofilamente und initiiert so die Kontraktion der Herzmuskelzelle (Bers 2006). TnC bildet mit Troponin I (TnI) und Troponin T (TnT) einen Komplex und besitzt dadurch eine Strukturanalogie zum Ca^{2+} -bindenden Protein Calmodulin (Houdusse et al. 1997). Durch die Ca^{2+} -Bindung an TnC kommt es zu einer Konformationsänderung des Tn-Moleküls, wodurch Bindungsplätze für Myosin und Aktin frei werden. Dies führt zur Verkürzung und Kraftentwicklung in der Herzmuskelzelle. Eine Phosphorylierung des TnI inhibiert das Ca^{2+} -bindende TnC, was wiederum die Affinität des TnC für Ca^{2+} -Ionen verringert (Solaro et al. 1981; Ward et al. 2002). Diese Phosphorylierung bewirkt somit eine Desensitivierung der Myofilamente gegenüber den Ca^{2+} -Ionen. Mit Abfall der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unter etwa 200 nM beginnt die Relaxationsphase und der Ruhezustand der Herzmuskelzelle. Während der Relaxation der Herzmuskelzelle werden die freien Ca^{2+} -Ionen vom Zytosol vor allem entweder durch die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) in das SR oder durch den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) gegen aufgenommenes Na^+ über die Zellmembran in den Extrazellularraum ausgeschleust.

Bisher konnten fünf verschiedene Isoformen der SERCA in verschiedenen Muskelgeweben nachgewiesen werden: SERCA1a/b, SERCA2a/b, SERCA3. SERCA2a stellt die Hauptisoform im Myokard dar (Brandl et al. 1987; Lytton et al. 1988, 1992; Zarain-Herzberg et al. 1990). SERCA2a wird durch Phospholamban (PLB), einem intrinsischen Protein des freien SR, inhibiert (Simmerman und Jones 1998). Durch seine Phosphorylierung wiederum kann diese inhibierende Wirkung aufgehoben werden und zu einer erhöhten Ca^{2+} -Aufnahme in das SR führen. Von dort aus gelangen die Ca^{2+} -Ionen in das junktionale SR, wo sie vermutlich bis zur erneuten Ca^{2+} -Freisetzung an CSQ gebunden werden (Györke et al. 2004b).

Die Ca^{2+} -Homöostase beschreibt den Ca^{2+} -Transport vom Extrazellularraum via Zytosol zum SR sowie dessen Regulierung, die von grundlegender Bedeutung für die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzellen ist. Die genaue Funktion und Beeinflussung der regulierenden Proteine des SR ist noch weitgehend unbekannt. Jedoch könnten gerade diese SR-Proteine und vor allem CSQ eine essentielle Rolle bei der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase der Herzmuskelzelle spielen.

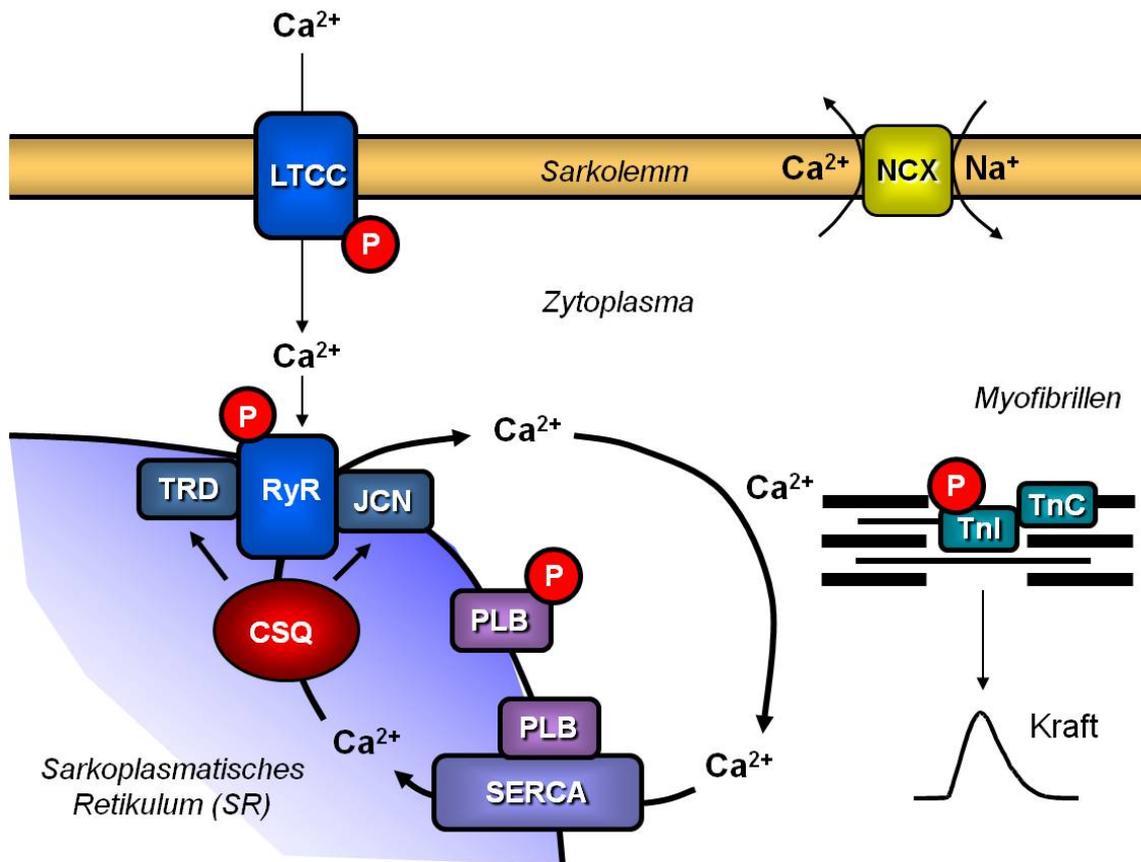


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase im Myokard. Ca^{2+} gelangt über den spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal (LTCC) durch das Sarkolemm in die Zelle. Dort bindet Ca^{2+} an den Ryanodin-Rezeptor (RyR) und bedingt dadurch eine Ca^{2+} -induzierte- Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Im Zytosol bindet das Ca^{2+} an Troponin C (TnC) der Myofilamente und löst somit die Kontraktion der Herzmuskelzelle aus. Während der Relaxation werden die Ca^{2+} -Ionen über die Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) wieder zurück in das SR gepumpt oder aus der Zelle über den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) oder zum Teil über die sarkolemmale Ca^{2+} -Pumpe hinaus transportiert. Im unphosphorylierten Zustand wirkt Phospholamban (PLB) hemmend auf die SERCA2a-Aktivität. Dies kann mittels Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase oder die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinase II aufgehoben werden. Im SR werden die Ca^{2+} -Ionen vermutlich an das Ca^{2+} -Speicherprotein Calsequestrin (CSQ) bis zur erneuten Freisetzung gebunden. CSQ bildet zusammen mit den transmembranären Proteinen des junctionalen SR, Triadin (TRD) und Junctin (JCN) sowie dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal (RyR) einen quartären Proteinkomplex. P: phosphorylierter Zustand; Tnl: Troponin I.

1.2 Quartärer Proteinkomplex

Im junctionalen SR sind verschiedene wichtige Proteine für die Ca^{2+} -Freisetzung lokalisiert. Diese Proteine, zu denen vor allem RyR, JCN, TRD sowie CSQ zählen, bilden einen quartären Komplex an der junctionalen Membran des SR (Zhang et al. 1997; Abbildung 2).

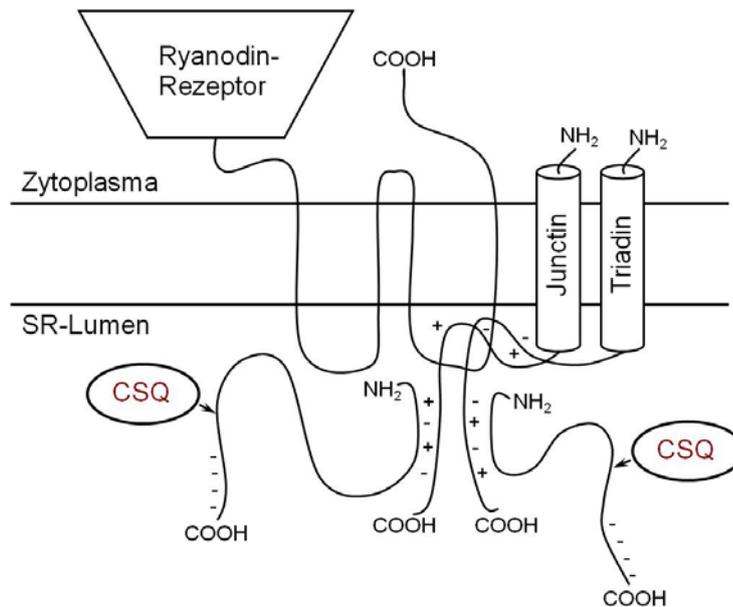


Abbildung 2: Schematische Darstellung des quartären Proteinkomplexes im junctionalen sarkoplasmatischen Retikulum modifiziert nach Zhang et al. 1997. Der quartäre Proteinkomplex besteht aus den zwei transmembranären Proteinen Triadin (TRD) und Junctin (JCN) sowie dem Ryanodin-Rezeptor (RyR) und Calsequestrin (CSQ). Auf der zytoplasmatischen Seite des SR befindet sich der RyR. CSQ hingegen befindet sich auf der luminalen Seite des SR und bindet über sein C-terminales Ende Ca^{2+} -Ionen. Es dient somit der Speicherung der Ca^{2+} -Ionen im SR. TRD und JCN sind transmembranäre Proteine, die über elektrostatische Wechselwirkungen an CSQ binden und so mit dem RyR verankert sind. Die Bindung zwischen JCN und TRD, sowie zu RyR scheint Ca^{2+} -unabhängig. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem C-terminalen Ende des CSQ und den C-terminalen Enden von JCN und TRD hingegen sind wohl abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration.

RyR fungiert als Ionenpore für das ausströmende Ca^{2+} (Bers et al. 2001) und ist somit verantwortlich für die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Von RyR sind drei verschiedene Isoformen bekannt: RyR1 wird überwiegend im Skelettmuskel, RyR2 im Herzen und RyR3 im Gehirn exprimiert. Das RyR2-Gen besteht aus 105 Exonen mit einem Molekulargewicht von 565 kDa (Tiso et al. 2001). RyR steht in funktionellem Kontakt mit TRD (Guo et al. 1996) und JCN (Jones et al. 1995).

JCN ist ein transmembranäres Protein des SR mit einem Molekulargewicht von 26 kDa. Es besteht aus 210 Aminosäuren, wobei die Aminosäuren 23 - 44 die transmembranäre Domäne ausmachen, während das C-terminale Ende mit den Aminosäuren 45 - 210 in das Lumen des SR ragt (Jones et al. 1995). JCN bindet deutlich affiner an CSQ als TRD. Zudem konnten JCN und CSQ durch einen Antikörper gegen CSQ koimmunopräzipitiert werden, was ebenfalls auf eine starke Protein-Protein-Interaktion hindeutet (Zhang et al. 1997). Die bindende Domäne des JCN für CSQ wird von den Aminosäureresten 46 - 210 gebildet (Jones et al. 1995). Diese intraluminale Region enthält 55 % der geladenen Aminosäurereste. CSQ besitzt ebenfalls eine hohe Dichte an geladenen Resten. Vermutlich kommt es zu elektrostatischen Bindungen zwischen JCN und CSQ (Zhang et al. 1997). In vitro bindet JCN neben CSQ auch an TRD und RyR. Die Bindung an TRD ist Ca^{2+} -unabhängig. Die Interaktion erfolgt vermutlich über die intraluminale Aminosäuren von JCN und TRD und könnte durch die KEKE-Strukturen bedingt sein. Diese Strukturen weisen typischerweise alternierend positiv (Lysin, K) und negativ (Glutaminsäure, E) geladene Aminosäuren auf (Zhang et al. 1997). Die Bindung von RyR könnte auch durch die KEKE-Strukturen im Lumen des SR bedingt sein. Eine kardiale Überexpression von JCN in Mäusen resultiert in einer Verschlechterung der Relaxation sowie in einer verringerten TRD-Expression (Kirchhefer et al. 2003). JCN Knock-out Mäuse weisen eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase auf. Es kommt zur Erhöhung der kontraktile und Ca^{2+} -zirkulierenden Parameter, die zu tödlich verlaufenden Arrhythmien führen können (Yuan et al. 2007).

TRD ist genauso wie JCN ein transmembranäres Protein des SR und wurde erstmals von Casewell et al. (1991) und Kim et al. (1990) aus dem Skelettmuskel isoliert. TRD besitzt eine ausgeprägte strukturelle Homologie zu JCN (Kobayashi et al. 2000). Im Herzen konnten drei verschiedene Isoformen nachgewiesen werden, welche scheinbare Molekulargewichte von 35, 40 und 92 kDa besitzen. Alle drei Isoformen haben einen großen gemeinsamen luminalen Bereich, der von den Aminosäuren 69 - 264 gebildet wird (Guo et al. 1996). Im Herzmuskel ist TRD1 die Hauptisoform mit 95 % (Kobayashi und Jones 1999), welche an CSQ und RyR bindet (Guo et al. 1996; Jones et al. 1995; Kobayashi et al. 2000; Mitchell et al. 1988; Zhang et al. 1997). Diese Interaktion ist Ca^{2+} -abhängig. Die bindende Domäne des TRD für CSQ besitzt 25 Aminosäurereste (200 - 224) mit KEKE-Strukturen (Kobayashi et al. 2000). Im Gegensatz zu JCN bindet TRD nur in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen an CSQ.

Somit wäre ein Wechsel der CSQ-Bindung an TRD (bei millimolaren Konzentrationen) oder JCN (bei submillimolaren Konzentrationen) je nach Ca^{2+} -Gehalt im SR denkbar. Eine kardiale Überexpression von TRD führt ebenso zu einer Verschlechterung der Relaxation (Kirchhefer et al. 2001). TRD Knock-out Mäuse weisen neben einer Herunterregulierung der SR-Proteine CSQ, RyR und JCN eine veränderte SR-Struktur auf und zeigen in-vivo eine verminderte Herzkontraktilität. Durch die strukturelle Veränderung der Ca^{2+} -Freisetzung im SR, die in einer veränderten elektromechanischen Kopplung sowie in einer veränderten Kontraktilität resultiert, lässt sich das erhöhte Arrhythmie-Risiko in diesen Mäusen erklären (Chopra et al. 2009).

Obwohl keine physische Interaktion zwischen CSQ und RyR besteht, bindet CSQ über TRD und JCN an RyR. Ikemoto et al. (1989) zeigten Wechselwirkungen zwischen CSQ und RyR. JCN und TRD stabilisieren diesen Komplex und verankern so CSQ mit RyR (Zhang et al. 1997; Abbildung 2). Dieser quartäre Proteinkomplex ist essentiell für die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR.

1.3 Struktur und Lokalisation des Calsequestrins

Calsequestrin (CSQ) wurde erstmals von MacLennan und Wong (1971) im Skelettmuskel identifiziert. CSQ bindet über sein C-terminales Ende Ca^{2+} -Ionen mit hoher Kapazität (bis zu 40 Mol Ca^{2+} pro Mol CSQ) und geringer Affinität ($K_D = 0,4 - 1$ mM; Mitchell et al. 1988). Neben der Skelettmuskelform (CSQ1) ist auch eine kardiale Form des CSQ (CSQ2) bekannt. Beide Formen werden von unterschiedlichen Genen kodiert. Die Homologie zwischen CSQ1 und CSQ2 liegt bei Menschen und Kaninchen bei etwa 60 % (Scott et al. 1988). Die kardiale Form des CSQ, die in dieser Arbeit von Interesse ist, besitzt zusätzlich zu CSQ1 31 Aminosäuren am C-terminalen Ende sowie eine weitere Glykosylierungsstelle und wurde erstmals von Scott et al. (1988) aus dem Hundeherzen kloniert und sequenziert.

Das Kristallgitter des kardialen Hunde-CSQ zeigt lineare fadenförmige Verdichtungen (Kim et al. 2007). Die hohe Ca^{2+} -Bindungskapazität kann möglicherweise durch die Bildung von Ca^{2+} -CSQ-Komplexen bei relativ hoher Ca^{2+} -Konzentration erklärt werden. Das CSQ-Molekül kommt abhängig von der ionischen Umgebung entweder als Monomer oder als Cluster vor. Das N-terminale Ende des CSQ bildet die vordere Schnittfläche des Dimers. Mit Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration bilden sich aufgrund des negativ-geladenen C-terminalen Endes des CSQ Tetramere und übergeordnete Polymere, die eine beachtliche Menge an Ca^{2+} in der hinteren Schnittfläche aufnehmen können (Kim et al. 2007).

In ihrer Sekundärstruktur weist die kardiale Form des CSQ sowohl eine α -Helix-Struktur als auch eine β -Faltblattstruktur auf und zeigt zwei verschiedene Domänen. Das N-terminale Ende verfügt über einen hohen Anteil basischer Aminosäuren sowie eine α -Helix- und β -Faltblattstruktur (Scott et al. 1988). Das C-terminale Ende des Proteins verfügt hingegen über einen hohen Anteil negativ geladener Aminosäuren. CSQ besitzt neben den drei Phosphorylierungsstellen Ser 378, Ser 382 und Ser 386 (Cala and Jones 1991; Abbildung 3) auch zwei Glykosylierungsstellen Asn 316 und Asn 376 (Scott et al. 1988; Abbildung 3).

Met Lys Arg Thr His Leu Phe Ile Ala Gly Leu Tyr Leu Leu Ala Ser Cys Arg Ala ATGAAGAGAACACACCTGTTTCATCGCGGGGCTCTACCTGCTGGCCTCCTGCCGGGCA	(0) 0
Glu Glu Gly Leu Asn Phe Pro Thr Tyr Asp Gly Lys Asp Arg Val Val Ser Leu Thr Glu Lys Asn Phe Lys Gln GAAGAGGGGCTCAACTCCCCACGTATGATGGCAAGACCGTGTGTGTCAGTCTCACTGAGAAGAAGCTCAAGCAG	(1) 58
Val Leu Lys Lys Tyr Asp Val Leu Cys Leu Tyr Tyr His Glu Ser Val Ser Ser Asp Lys Val Ala Gln Lys Gln GTTTTGAAGAAATACGACGTGCTTTGCCCTACTACCAAGAGTCCGTGTCTTCGGACAAAGTCGCGCAGAAACAG	(26) 133
Phe Gln Leu Lys Glu Ile Val Leu Glu Leu Val Ala Gln Val Leu Glu His Lys Asp Ile Gly Phe Val Met Val TTCCAGCTGAAGGAAATCGTCTCGAGCTTGTGCGCCAGGTCCTGGAGCATAAAGATATAGGCTTTGTGATGGT	(51) 208
Asp Ala Lys Lys Glu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Gly Phe Asp Glu Glu Gly Ser Leu Tyr Val Leu Lys Gly GATGCCAAGAAAGCAAGCCTTGCCAAGAAGCTGGGTTTTGATGAAGAAGGAAGCCTGTATGTTCTTAAGGGT	(76) 283
Asp Arg Thr Ile Glu Phe Asp Gly Glu Phe Ala Ala Asp Val Leu Val Glu Phe Leu Leu Asp Leu Ile Glu Asp GATCGCACGATTGAGTTTGATGGCGAGTTTGCAGCTGACGCTTGGTG GAATTT CTCCTGGATCTAATTGAAGAT	(101) 358
Pro Val Glu Ile Ile Asn Ser Lys Leu Glu Val Gln Ala Phe Glu Arg Ile Glu Asp Gln Ile Lys Leu Ile Gly CCTGTGGAGATCATCAACAGCAAACCTCGAAGTCCAAAGCC TTT GAACGCATTGAGGACCAGATAAAGCTCATTGGC	(126) 433
Phe Phe Lys Ser Glu Glu Ser Glu Tyr Tyr Lys Ala Phe Glu Glu Ala Ala Glu His Phe Gln Pro Tyr Ile Lys TTT TTTCAAGAGTGAGGAGTCAGAGTAT TATAAGGCTTT TGAGGAGGCAGCTGAACACTTCCAACCTTACATCAA	(151) 508
Phe Phe Ala Tyr Phe Asp Lys Gly Val Ala Lys Lys Leu Ser Leu Lys Met Asn Glu Val Asp Phe Tyr Glu Pro T TTT TTT GCTACCTTTGACAAAGGGGTTGCAAAGAAATTGTCCTTGAAGATGAATGAGGTTGACTTCTATGAGCCA	(176) 583
Phe Met Asp Glu Pro Ile Ala Ile Pro Asp Lys Pro Tyr Thr Glu Glu Glu Leu Val Glu Phe Val Lys Glu His TTTATGGATGAGCCATTGCCATCCCTGACAAACCTTACACAGAAGAGGAGCT TGTGGAGTTTGTGAAGGAACAC	(201) 658
Gln Arg Pro Thr Leu Arg Arg Leu Arg Pro Glu Asp Met Phe Glu Thr Trp Glu Asp Asp Leu Asn Gly Ile His CAAAGACCCACCCTACGTGCTACGCCAGAACAGATGT TTTGAAACATGGG AAGATG ATT TGAACGGCATCCAC	(226) 733
Ile Val Ala Phe Ala Glu Arg Ser Asp Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Leu Glu Ile Leu Lys Gln Val Ala Arg Asp ATTGTGGCCTTTGCAGAGAGGAGTGACCCAGATGGCTACGAGTTCTTGAAATCCTGAAACAGGTGGCCCGAGAC	(251) 808
Asn Thr Asp Asn Pro Asp Leu Ser Ile Val Trp Ile Asp Pro Asp Asp Phe Pro Leu Leu Val Ala Tyr Trp Glu AATACAGACAACCCTGACCTGAGCATCGTGTGGATTGACCCGATGACTTTCCTCTGCTTGTGCCTACTGGGAA	(276) 883
Lys Thr Phe Lys Ile Asp Leu Phe Lys Pro Gln Ile Gly Val Val Asn Val Thr Asp Ala Asp Ser Val Trp Met AAGACTTTCAGATTGACCTATTCAAGCCACAGATCGGGGTGGTGAATGTGACAGATGCCGACAGTGTCTGGATG	(301) 958
Glu Ile Pro Asp Asp Asp Asp Leu Pro Thr Ala Glu Glu Leu Glu Asp Trp Ile Glu Asp Val Leu Ser Gly Lys GAGATTCCTGATGCTGCTGACCTGCCACAGCTGAGGAGCTGGAGGACTGGATCGAGGATGTGCTTTCTGGAAAG	(326) 1033
Ile Asn Thr Glu Asp Asp Asp Asn Glu Glu Gly Asp Asp Gly Asp Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp Asp Gly ATAAACACTGAAGATGATGACAATGAAGAGGGGGATGACGGGGATGATGACGAGGACGACGACGACGATGATGGC	(351) 1108
Asn Asn Ser Asp Glu Glu Ser Asn Asp Asp Ser Asp Asp Asp Asp Asp Glu AAT AAT TCT GAG GAG TCT AAT GAC GAC AGT GAT GAT GAT GAT GAGTAG	(376) 1183

Abbildung 3: cDNA und Aminosäuresequenz des kardialen kaninen CSQ modifiziert nach Scott et al. (1988). Das Start- und das Stopcodon sind fett markiert. Die drei Phosphorylierungsstellen sind schwarz und die zwei Glykosylierungsstellen sind schwarzgestrichelt umrandet. Dargestellt sind die Anzahl der Aminosäurereste im 3-Buchstabencode in den Klammern sowie die Nummerierung der Basen auf der rechten Seite der Abbildung.

Zwischen den verschiedenen Spezies Mensch, Hund und Kaninchen ist die kardiale Form des CSQ auf Protein- sowie DNA-Ebene zu über 90 % homolog (Yano und Zarain-Herzberg 1994). Das CASQ2-Gen ist beim Menschen 14 kb lang (Kaninchen 8.6 kb) und besteht aus 11 Exons (Yano und Zarain-Herzberg 1993). CSQ wird neben dem Herzen auch im Ösophagus und zum Beispiel Musculus soleus exprimiert (Volpe et al. 1994). Scott et al. (1988) konnten Unterschiede zwischen dem adulten und dem neonatalen CSQ des Hundes aufzeigen. Das neonatale CSQ mit 367 Aminosäuren ist im Vergleich zu dem adulten CSQ mit 391 Aminosäuren kürzer, jedoch im Vergleich zu der Skelettmuskelform des CSQ mit 360 Aminosäuren länger. Trotzdem kommt es zu keiner Veränderung der CSQ-Expression zwischen fetalen, neonatalen und adulten Kardiomyozyten in Ratten, die alle eine gleiche CSQ-Proteinexpression zeigten (Imanaka-Yoshida et al. 1996). Die CSQ-Proteinsequenz des Hundes setzt sich aus 410 Aminosäuren zusammen (Yano und Zarain-Herzberg 1994). Das Protein besitzt somit ein errechnetes Molekulargewicht von 47,416 kDa. Nach Abspaltung der ersten 19 N-terminalen Aminosäuren, die als Signalpeptid angesehen und für die subzelluläre Lokalisation des CSQ verantwortlich gemacht werden, beträgt das Molekulargewicht 45,269 kDa (Scott et al. 1988; Yano und Zarain-Herzberg 1994). Das beobachtete Molekulargewicht in SDS-Gelen hingegen beträgt etwa 55 kDa, was durch die scheinbar eingeschränkte quartäre Struktur zu erklären wäre (Mitchell et al. 1988).

Die Hunde-Form des CSQ besteht zu 28 % aus sauren Aminosäuren (58 Aspargin- und 51 Glutaminsäuren; Scott et al. 1988). Dagegen beträgt der Anteil von basischen Aminosäuren nur 11 % (9 Arginin und 31 Lysin). Der sich daraus resultierende isoelektrische Punkt des CSQ liegt bei 3,75. Der Bereich des C-terminalen Endes zwischen den beiden Proteinen scheint für die Ca^{2+} -Bindung verantwortlich zu sein (Wang et al. 1998). Der größte Anteil der sauren Aminosäuren bildet Paare oder Triplets, welche vermutlich für die Ca^{2+} -Bindung verantwortlich sind (Yano and Zarain-Herzberg 1994). Nach Bindung der Ca^{2+} -Ionen an CSQ erfolgt eine Konformationsänderung des CSQ, die zur Internalisierung von hydrophoben Bereichen des Proteins führt (Mitchell et al. 1988). Hayakawa et al. (1994) konnten in Kristallisierungsstudien zeigen, dass eine Dimerisierung in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen stattfindet. Für die funktionell wichtige Oligomerisierung von CSQ sind mit hoher Wahrscheinlichkeit die Aminosäuren 337 - 357 verantwortlich (Gatti et al. 2001). Obwohl aufgereinigtes CSQ nicht an RyR binden kann, scheinen dennoch Interaktionen zu bestehen, da die stimulierende Wirkung von SR-luminalen Ca^{2+} -Ionen auf die Ca^{2+} -Freisetzung wesentlich durch CSQ beeinflusst wird (Zhang et al. 1997). CSQ wurde immunhistologisch sowie immunelektronenmikroskopisch im junktionalen SR nachgewiesen. Dort bildet es eine Art Netzwerk aus und kann sich so mit dem junktionalen SR verankern (Yano und Zarain-Herzberg 1994). Im freien SR konnte es hingegen nicht nachgewiesen werden.

1.4 Mausmodelle der kardialen Überexpression von Calsequestrin

Um präzisere Aussagen über die Funktion von CSQ während der Kontraktion und Relaxation sowie dessen Beeinflussung anderer Proteine wie RyR oder JCN beziehungsweise TRD geben zu können, etablierten Jones et al. (1998) eine Mauslinie mit kardialer Überexpression von CSQ. Bei dieser Mauslinie war die CSQ-cDNA des Hundes unter der Kontrolle des α -MHC-Promotors im Herzen 10fach überexprimiert. Es kam zu einer kardialen Hypertrophie sowie zu einer elektronenmikroskopisch nachweisbaren Erweiterung des SR. Im Vergleich zu WT-Mäusen war die Expression von RyR, TRD sowie JCN um mehr als 50 % vermindert (Jones et al. 1998). Die Expression von PLB und SERCA2a hingegen war unverändert. Weiterhin war die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in den Kardiomyozyten der CSQ-Tiere vermindert. Das durch Koffein-freisetzbare zytosolischen Ca^{2+} war in CSQ-Tieren höher als in WT. Durch die Applikation von Koffein kommt es zur gesamten Freisetzung des gespeicherten Ca^{2+} aus dem SR. Dies lässt somit auf eine erhöhte Ca^{2+} -Speicherung im SR schließen. Wang et al. (2000) konnten ein vermehrtes Auftreten von Ca^{2+} -Sparks (spontane Ca^{2+} -Freisetzung) in CSQ-Tieren beobachten. Dies wurde durch eine verschlechterte Ca^{2+} -Sensitivität des RyR erklärt. Zudem war die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung vermindert. Knollmann et al. (2000) zeigten für die CSQ-Mäuse im EKG eine 2fache Verlängerung der Aktionspotentialdauer, eine Blockade der Überleitung im AV-Knoten und eine Verlängerung des PR- und QT-Intervalls. Im Alter von 2 Monaten entwickelten die Mäuse eine kontraktile Dysfunktion. Die Überlebensrate betrug nur 40 % innerhalb der ersten 6 Monate. In den Herzen führte die Überexpression von CSQ zu einer dilatativen Kardiomyopathie verbunden mit einer Gewebefibrose, einer Gewebeverkalkung sowie einer verminderten kontraktilen Antwort auf β -adrenerge Stimulation (Knollmann et al. 2000). Zudem beschrieben Knollmann et al. (2000) auch eine Reduktion der Na^+ - und K^+ -Ströme in dem gegenwärtigen Mausmodell. Ähnliche Ergebnisse stellten auch Sato et al. (1998) in einem Mausmodell mit einer 20fachen Überexpression von CSQ fest. Hier wurde die Überexpression einer α -MHC-Maus-CSQ-cDNA beschrieben. Diese Überexpression führte ebenfalls zu einer kardialen Hypertrophie, verbunden mit einer verminderten Herzkontraktion sowohl im isoliert-perfundierten Herzen als auch in-vivo. Sato et al. (1998) erklärten sich ihre Ergebnisse durch die reduzierten Ca^{2+} -Transienten sowie die verringerten Ströme durch den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mauslinie von Jones et al. (1998) mit einer 10fachen kardialen Überexpression von CSQ verwendet.

Neben der Überexpression von CSQ können auch Mutationen im CASQ2-Gen zu physiologischen Veränderungen führen, die zu verschiedenen kardialen Erkrankungen bis hin zum Tod führen können. Lahat et al. (2001) und Postma et al. (2002) beschrieben bisher mehrere Mutationen im CASQ2-Gen beim Menschen, die zu katecholaminergen

polymorphen ventrikulären Tachykardie (CPVT) und somit zu einem verfrühten Tod führen können. Das klinische Bild der CPVT äußert sich bei jüngeren Patienten mit strukturell unauffälligen Herzen in lebensbedrohlichen Arrhythmien, die durch Stress, Emotionen sowie physische Anstrengung ausgelöst werden (Priori et al 2011). Patienten mit CPVT weisen zudem eine Ruhebradykardie und nur eine geringfügige Verlängerung des QT-Intervalls auf. Ohne Behandlung ist die Mortalität bei dieser Erkrankung sehr hoch. Ursache ist vielleicht eine mögliche Störung der Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit des CSQ. Eine verringerte Ca^{2+} -Bindung im SR könnte somit zu einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen und damit verbunden zu einer globalen, intrazellulären Ca^{2+} -Überladung. Diese könnte späte Nachdepolarisationen bedingen und getriggerte Arrhythmien auslösen.

Eine veränderte oder eingeschränkte Funktion des CSQ könnte zu Störungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase führen, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung von ventrikulären Tachykardien spielt (Bers 2001). Diesen Störungen liegt oft eine getriggerte Aktivität zugrunde, die wiederum bedingt durch intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung zur Entstehung später Nachdepolarisationen führen kann. Verschiedene Mechanismen, wie eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase des SR, können zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Überladung führen. Dies kann auf einer vermehrten Ca^{2+} -Aufnahme in das SR oder auf einer vermehrten Ca^{2+} -Speicherung beziehungsweise verminderte Ca^{2+} -Freisetzung im SR beruhen. Die späten Nachdepolarisationen bedingen das Entstehen von ventrikulären Tachykardien. Auch bei der menschlichen Herzinsuffizienz konnten pathophysiologische Veränderungen beobachtet werden, die zur Entstehung später Nachdepolarisationen führen können (Käab et al. 1996; Studer et al. 1994). Die Veränderungen in diesem Tiermodell sind ähnlich den Veränderungen, die bei menschlicher Herzinsuffizienz zu finden sind und lassen somit auf die Nützlichkeit dieses Tiermodells für Herzinsuffizienz-Studien schließen.

1.5 Herzinsuffizienz

Unter Herzinsuffizienz versteht man die Unfähigkeit des Herzens, die Organe und das Gewebe mit ausreichend Blut und damit genügend Sauerstoff zu versorgen. Somit kann der Gewebestoffwechsel sowohl in Ruhe als auch unter Belastung nicht sichergestellt werden. Das Pumpversagen des Herzens ist dadurch charakterisiert, dass das Herz entweder zu wenig Blut in das arterielle Gefäßsystem auswirft (Vorwärtsversagen) oder dass es dem venösen Zustrom durch eine insuffiziente Auswurfleistung nicht mehr gerecht wird und somit zu einer Rückstauung in das zum betroffenen Ventrikel proximal befindlichen Kreislaufsystem führt (Rückwärtsversagen; Hoppe et al. 2011). Klinisch liegt eine Herzinsuffizienz vor, wenn typische Symptome wie Dyspnoe, Müdigkeit sowie Flüssigkeitsretention auftreten und denen eine kardiale Funktionsstörung zugrunde liegt. Als Ursachen einer Herzinsuffizienz sind unter anderem die chronische Druckbelastung des Herzens, wie bei arterieller

Hypertonie, die koronare Herzerkrankung, insbesondere der Myokardinfarkt, sowie die dilatative Kardiomyopathie zu nennen (Daut et al. 2011). Dabei ist die Kontraktilitätsabnahme des Myokards ein häufiges gemeinsames Anzeichen verschiedener Formen der Herzinsuffizienz (Colucci und Braunwald 1997). Bei einer Herzinsuffizienz kommt es zu verschiedenen Kompensationsmechanismen, um trotz der Abnahme der Herzleistung eine ausreichende Organperfusion zu gewährleisten. Hierzu zählen neben der Erhöhung des Sympathikotonus auch die kompensatorische ventrikuläre Dilatation, das ventrikuläre Remodeling mit Myozytenhypertrophie, sowie die gesteigerte Renin- und Adiuretin-Freisetzung. Die ventrikuläre Dilatation führt über einen dehnungsinduzierten programmierten Zelltod (Apoptose) zu einer weiteren Dilatation und somit zu einer progredienten Myokardschädigung (Anversa et al. 1996). Die internationale Einteilung der Herzinsuffizienz erfolgt nach der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA). Herzinsuffiziente Patienten werden entsprechend ihrer Leistungsfähigkeit in vier Stadien eingestuft. Ein Patient im NYHA-Stadium I hat eine kardiale Dysfunktion, ist jedoch unter Therapie asymptomatisch. Im NYHA-Stadium IV hingegen weisen Patienten eine dekompensierte Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion, Stauungszeichen im großen und kleinen Kreislauf und einen kompensatorisch erhöhten peripheren Gefäßwiderstand auf.

Herzinsuffizienz ist die häufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern. Die chronische Herzinsuffizienz hat stadienabhängig je nach Krankheitsverlauf eine hohe Sterblichkeit von 20 - 30 % pro Jahr (Hoppe et al. 2011). Die Gesamtprävalenz der europäischen Bevölkerung liegt bei 0,4 - 2 % (Hoppe et al. 2011). Mit steigendem Alter steigt auch die Prävalenz bis auf ca. 10 % an. Männer sind 1,5fach häufiger betroffen als gleichaltrige Frauen (Hoppe et al. 2011). Eine chronische Herzinsuffizienz kann durch perikardiale, myokardiale beziehungsweise durch endokardiale Störungen, wie zum Beispiel Veränderungen der Herzklappen, sowie der großen Gefäße verursacht werden. Bei 80 - 90 % der herzinsuffizienten Patienten beruhen die Symptome auf einer ventrikulären Funktionsstörung. In etwa 60 % beruhen die Symptome auf einer systolischen Dysfunktion mit einer Ejektionsfraktion $\leq 40\%$ (Senni et al. 2001). Die häufigste Ursache einer Herzinsuffizienz in den westlichen Ländern ist jedoch die koronare Herzkrankheit, die oft von einer arteriellen Hypertonie begleitet ist (McMurray et al. 2000).

In Folge einer erhöhten β -adrenergen Stimulation durch Katecholamine bei einem gesteigerten Sympathikotonus kommt es zunächst zu einem positiv inotropen, chronotropen und lusitropen Effekt. Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sowie die Steigerung der Adiuretin-Sekretion bewirken eine Zunahme des Plasmavolumens. Im späteren Erkrankungsverlauf wirken sich jedoch diese Kompensationsmechanismen negativ aus. Die chronische β -adrenerge Stimulation durch Katecholamine führt letztendlich zu einer

Desensibilisierung der β -Rezeptoren am Herzen (Bristow et al. 1989). Gleichzeitig steigert die Katecholaminausschüttung den Hypertonus, was in einer Erhöhung der Nachlast resultiert und somit eine Druckbelastung darstellt. Die Erhöhung der Vor- sowie der Nachlast als Folge der Kompensationsmechanismen ist letztlich eine zusätzliche Belastung für das insuffiziente Herz. Darüber hinaus begünstigen Angiotensin II und eine β -Adrenozeptorstimulation weiterhin einen Zelltod durch Apoptose und Nekrose (Sabbah 2000; Goldspink et al. 2003). Die Herzinsuffizienz führt meist zu einer Störung der myokardialen Kontraktion und Relaxation. Kontraktile Dysfunktion, hervorgerufen durch die Herzinsuffizienz, ist maßgeblich auf eine Reduktion des SR- Ca^{2+} -Gehaltes zurückzuführen, die durch eine verminderte Aktivität von SERCA2a, durch einen Anstieg des Ca^{2+} -Ausstromes über den NCX oder durch einen erhöhten diastolischen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR durch Hyperphosphorylierung des RyR bedingt sein kann. (Flesch et al. 1996; Hasenfuss et al. 1999; Lindner et al. 1998; Marx et al. 2000). Bei Herzinsuffizienz sind die Ca^{2+} -Transienten vermindert und weisen einen langsameren Abfall auf. Die Ca^{2+} -Aufnahme sowie der Ca^{2+} -Gehalt im SR sind geringer (Pieske et al. 1995, 1999, 2002). In der Diastole wird Ca^{2+} langsam in das SR transportiert. Somit bleibt die diastolische Ca^{2+} -Konzentration hoch und zugleich steht im SR weniger Ca^{2+} für die folgende Kontraktion zur Verfügung. Diese Mechanismen führen zu einer verminderten Relaxation und Kontraktion (Hasenfuss et al. 1996; Münch et al. 2000; Pieske et al. 1995). Bei Herzinsuffizienz konnte trotz der verminderten mRNA-Expression kein verminderter Protein-Gehalt der SERCA2a nachgewiesen werden (Feldman et al. 1991; Schwinger et al. 1995; Linck et al. 1996). Andere Autoren hingegen zeigten am insuffizienten Herzen jedoch einen verminderten Protein-Gehalt der SERCA2a (Meyer et al. 1995; Hasenfuss et al. 1994). Kontroverse Ergebnisse erhoben zudem Movesian et al. (1994), die weder eine verminderte mRNA-Expression, noch einen verminderten Protein-Gehalt der SERCA2a, feststellen konnten. Dies verdeutlicht, dass die Bedeutung der mRNA-Expression und des Protein-Gehaltes der SERCA2a bei Herzinsuffizienz in der Literatur kontrovers diskutiert wird.

PLB ist auf mRNA-Ebene herunterreguliert, auf Proteinebene konnten jedoch keine Veränderung nachgewiesen werden (Frank et al. 2002, MacLennan et al. 2003). Eine verminderte Aktivität von SERCA2a bei Herzinsuffizienz könnte zu einer Abnahme des Ca^{2+} -Transports aus dem Zytoplasma in das SR und somit zu einer verminderten Ca^{2+} -Beladung des SR, verbunden mit einer verminderten Maximalkraftentwicklung, führen (Lindner et al. 1998). Ein Anstieg des NCX auf mRNA- sowie Protein-Ebene konnte sowohl bei der menschlichen Herzinsuffizienz (Flesch et al. 1996; Hasenfuss et al. 1999) als auch in Modellen der Herzinsuffizienz von Kaninchen, Meerschweinchen und Hunden beobachtet werden (Ahmmed et al. 2000; Pogwizd et al. 1999; Sipido et al. 2000). Der vermehrte Ca^{2+} -Ausstrom beziehungsweise der Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bedingt

durch den erhöhten NCX-Gehalt ist wahrscheinlich ein Kompensationsmechanismus der verminderten SERCA2a-Aktivität. Durch den vermehrten Ca^{2+} -Ausstrom über den NCX kommt es zu einer geringeren Ca^{2+} -Beladung des SR und somit zu einer Abnahme der Kontraktilität des Myokards. Weiterhin konnte bei menschlicher Herzinsuffizienz eine Hyperphosphorylierung von RyR durch die Proteinkinase A (PKA) beobachtet werden, die vermutlich auf eine verminderte Aktivität der Phosphatasen PP1 und PP2A zurückzuführen ist (Marx et al. 2000). Die erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR führt während der Diastole zu einem erhöhten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR und somit zu einem geringeren SR- Ca^{2+} -Gehalt. Inwieweit die Proteine des junktionalen SR und/oder deren Zusammenspiel eine Rolle bei der Entwicklung der menschlichen Herzinsuffizienz spielen, ist offen. Viele Veränderungen, die bei einer menschlichen Herzinsuffizienz auftreten, konnten auch in den CSQ-überexprimierenden Mäusen gefunden werden. Dazu gehören ein vergrößertes Herzgewicht, das Auftreten kardialer Fibrose, eine reduzierte ventrikuläre Kontraktilität, ein veränderter Ca^{2+} -Gehalt im SR, ein erhöhter basaler Ca^{2+} -Gehalt im Zytosol, eine verschlechterte Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung, Herzarrhythmien in der Oberflächenelektrokardiographie (EKG) sowie plötzlicher Tod (Cho et al. 1999; Jones et al. 1998; Linck et al. 2000).

1.6 Einfluss der Herzinsuffizienz auf den Skelettmuskel

Herzinsuffizienz wird begleitet durch eine schwerwiegende Hemmung der Skelettmuskel-funktion in Armen, Beinen sowie im Diaphragma. Der hauptsächlich limitierende Faktor für die allgemeine Leistungsfähigkeit bei Herzinsuffizienzpatienten stellt die auftretende körperliche Erschöpfung dar. Dies ist somit eine unabhängige Variable der erhöhten Morbidität und Mortalität dieser Patienten (Anker et al. 1997). In den letzten Jahren sind mehrere biochemische, physiologische und histologische Veränderungen im Skelettmuskel bei Tieren und auch beim Menschen mit Herzinsuffizienz umfassend untersucht worden (Adams et al. 2008; Massie et al. 1996; Nicoletti et al. 2003; Scarpelli et al. 1999; Schaufelberger et al. 1995; Spangenburg et al. 2002; Sullivan und Hawthorne, 1995; Toth et al. 2005, 2006a, 2006b, 2010). Aufgrund einer verminderten Durchblutung, bedingt durch die Herzinsuffizienz, kommt es zu einer geringeren Sauerstoffausschöpfung (Toth et al. 2010; Drexler et al. 1992). Histologisch ist bei der Herzinsuffizienz eine Verkleinerung der Muskelfasern, sowie eine Erhöhung des Anteils der Typ II-Fasern ersichtlich (Drexler et al. 1992). Gleichzeitig gibt es Hinweise auf eine gesteigerte Glykolyse. Bei Belastung können diese Veränderungen zu einer intramuskulären Azidose, einer erhöhten Laktatproduktion sowie zu einer metabolischen Insuffizienz führen (Harrington et al. 1997). Die reduzierte körperliche Aktivität der Herzinsuffizienzpatienten ist von Bedeutung für die spezifischen

Veränderungen der Muskelfasern. Neue Studien haben gezeigt, dass ACE-Hemmer und Angiotensin II-Rezeptorblocker die Skelettmuskeleigenschaften von Herzinsuffizienzpatienten verbessern können (Nicoletti et al. 2003; Vescovo et al. 1998). Jedoch sind die zu Grunde liegenden Mechanismen über die Wirkung der ACE-Hemmer und Angiotensin II-Rezeptorantagonisten noch unklar.

In früheren Studien konnte eine gestörte Skelettmuskelfunktion in kardiomyopatischen Hamstern, bei denen die distalen sowie die proximalen Muskeln unterschiedlich betroffen waren, beobachtet werden (Punkt und Erzen, 2000; Punkt et al. 2002). Modifizierungen in der Skelettmuskelfunktion werden häufig von Veränderungen im Fasermetabolismus und in der Faserpopulation begleitet (Fritzsche et al. 2008; Oberbach et al. 2006; Punkt 2002; Punkt et al. 2007).

Für ein besseres Verständnis der metabolischen Modifizierungen im Skelettmuskel sollten metabolischen Veränderungen in Bezug zueinander in definierten Fasertypen betrachtet werden. Zu diesem Zweck kann die Fasertypisierung in die SO- („slow-oxidative“), in die FOG- („fast-oxidative-glycolytic“) und in die FG-Fasern ("fast-glycolytic") erfolgen. Die Unterscheidung der verschiedenen Muskelfasertypen erfolgt unter physiologischen, metabolischen und morphologischen Gesichtspunkten (Polla et al. 2004; Punkt 2002; Schiebler et al. 2007). Die Kontraktionsgeschwindigkeit hängt von verschiedenen Isoformen der schweren Myosinketten ab, diese spalten ATP langsam oder schnell. Unter diesem Gesichtspunkt lassen sich die langsam kontrahierenden Slow-Fasern und die schnell kontrahierenden Fast-Fasern unterscheiden (Polla et al. 2004; Punkt 2002; Schiebler et al. 2007). Die Slow-Fasern enthalten die Myosin-Isoform MHC I und werden dementsprechend auch Typ I-Fasern genannt. Sie sind zu Ausdauerleistungen befähigt und ermüden relativ langsam (Schiebler et al. 2007). Die Fast-Fasern hingegen enthalten die Myosinisoformen MHC IIa, MHC IIb sowie MHC IIX und entsprechen den Typ II-Fasern. Sie können schnell viel Kraft entwickeln, aber auch schnell wieder ermüden (Schiebler et al. 2007). Nach den Stoffwechsellleistungen lassen sich die Slow- und Fast-Fasern in die SO-Fasern, FG-Fasern und FOG-Fasern typisieren. Bei den SO-Fasern überwiegt der oxidative Metabolismus und sie entsprechen so den Typ I-Fasern. Die FG-Fasern weisen hingegen bevorzugt den glykolytischen Metabolismus auf. Die FOG-Fasern mit sowohl oxidativem als auch glykolytischem Metabolismus gehören wie die FG-Fasern zu den Typ II-Fasern (Polla et al. 2004; Punkt 2002; Schiebler et al. 2007). Morphologische Unterschiede finden sich hauptsächlich zwischen den oxidativen und glykolytischen Fasern. Oxidative SO-Fasern haben viele Mitochondrien, sind reich kapillarisiert und enthalten viel Myoglobin. Früher wurden sie deshalb auch als „rote Fasern“ bezeichnet. Ihr Durchmesser ist mit etwa 50 µm kleiner als der von den glykolytischen FG-Fasern mit etwa 100 µm. Die FG-Fasern haben weniger Mitochondrien und Kapillaren. In einem Skelettmuskel als Einheit kommen alle

Fasertypen gleichzeitig vor, jedoch in einem unterschiedlichen Verhältnis. Diese metabolischen Eigenschaften der Muskelfasern können zum einem zytometrisch durch Aktivitätsmessungen der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPDH) sowie der Succinat-Dehydrogenase (SDH) in einer Reihe von histologischen Muskelquerschnitten und zum anderen durch photometrische Messungen der enzymatischen Aktivität der GPDH und SDH im gesamten Muskel charakterisiert werden (Punkt 2002). Die GPDH ist ein Marker für die glykolytische Aktivität und dient als Energielieferant der Atmungskette. Die SDH hingegen ist ein Enzym des Zitronensäurezyklus und somit ein Marker für die oxidative Aktivität. Als Komplex II der Atmungskette ist die SDH zudem direkt in die Elektronentransportkette der Mitochondrien eingebunden. Diese enzymatischen Aktivitäten charakterisieren somit das metabolische Profil der Muskelfasern. Zudem können metabolische Verschiebungen durch Veränderungen im GPDH/SDH-Aktivitätsquotienten gemessen werden.

Des Weiteren existiert im Skelettmuskel wahrscheinlich ein lokales RAAS (Phillips et al. 1993). Tatsächlich konnten hohe Spiegel von Angiotensin II im Skelettmuskel gemessen werden (Danser et al. 1992). Protektive Effekte können unabhängig von Veränderungen des Blutdrucks unter der Gabe von ACE-Hemmern und Angiotensin II-Rezeptorantagonisten vorkommen (Baker et al. 1990). Deutlich wird dies durch direkte Effekte des Angiotensin II in den Zielgeweben unabhängig von der Durchblutung des Zielorgans. Die direkten Effekte von Angiotensin II schließen die Kontrolle des Zellwachstums und der Vasokonstriktion mit ein. Jedoch kann Angiotensin II auch notwendig sein, um vasodilatorische Reaktionen, zumindest in den Skelettmuskelarterien aufrechtzuerhalten (Weber und Lombard, 2001). In einem Modell der primären Skelettmuskelerkrankung war Losartan in der Lage, die Skelettmuskelfunktion in-vivo zu normalisieren, die durch die Angiotensin II-induzierte TGF β -Induktion verändert war (Cohn et al. 2007). Folglich sprechen mehrere dieser Theorien (Cohn et al. 2007; Danser et al. 1992; Philipps et al. 1993; Weber und Lombard 2001) dafür, dass ein relevantes lokales RAAS im Skelettmuskel vorhanden ist und dieses medikamentös beeinflusst werden kann. Die Effekte der ACE-Hemmer auf die Skelettmuskelfunktion wurden bereits ausführlich studiert. Sie vermindern nicht nur die Bildung von Angiotensin II, sondern fördern auch die Anreicherung des Vasodilators Bradykinin. Ein neuer Therapieansatz zur besseren Beeinflussung des RAAS im Skelettmuskel ist somit vielleicht aufgrund der selektiven Blockade des AT $_1$ -Rezeptors durch die Angiotensin II-Rezeptorantagonisten möglich.

1.7 Eigenschaften des Angiotensin II-Rezeptorantagonisten Losartan

1.7.1 Pharmakologische Eigenschaften

1988 wurde Losartan, ein nicht-peptiderger Angiotensin II-Rezeptorantagonist, der spezifisch an den Angiotensin II-Rezeptor Subtyp I (AT₁) bindet (Abbildung 4), von DuPont Merck (USA) entwickelt. Losartan wurde zur Leitsubstanz in der Entwicklung weiterer AT₁-Rezeptorantagonisten. Allen gemein ist der Biphenyltetrazolring als Strukturmerkmal.

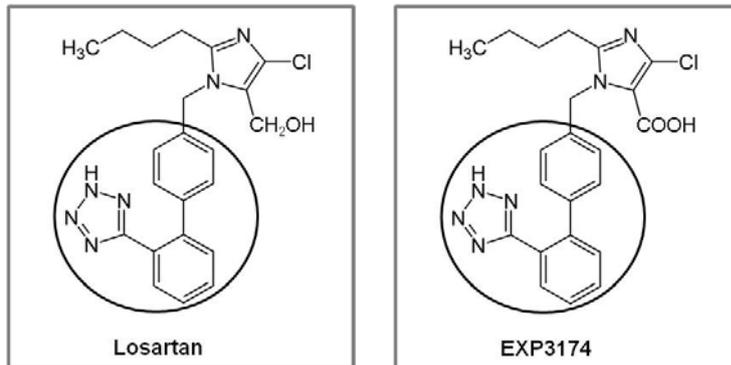


Abbildung 4: Darstellung der Strukturformel von Losartan (2-Butyl-4-chlor-1-{4-[2-(1H-tetrazol-5-yl) phenyl] benzyl} imidazol-5-methanol) und EXP3174 (2-Butyl-4-chlor-1-{4-[2-(1H-tetrazol-5-yl) phenyl] benzyl} imidazol-5-carbonsäure). Der Biphenyltetrazolring als gemeinsames Strukturmerkmal der AT₁-Rezeptorantagonisten ist schwarz umrandet.

1.7.2 Metabolismus

Losartan wird nach peroraler Applikation gut und nahrungsunabhängig resorbiert. Beim Menschen wird nach der Resorption etwa 14 % (8 % präsystemisch, 6 % systemisch) der intravenös beziehungsweise peroral applizierten Losartandosis durch hepatische Oxidation zum pharmakologisch aktiven und länger wirkenden Metaboliten EXP3174 biotransformiert (Christ et al. 1994; Lo et al. 1995). In menschlichem Lebergewebe konnten insgesamt drei Hauptwege für den Metabolismus des Losartans gefunden werden:

- 1) Oxidation des Alkohols der Hydroxyethylseitenkette zur Carbonsäure EXP3174
- 2) Monohydroxylierung der Butylseitenkette und
- 3) Glukuronidierung des Tetrazolringes.

Die Metabolisierung zu den oxidierten und glucuronidierten Produkten erfolgt annähernd zu gleichen Teilen (Stearns et al. 1992, 1995). EXP3174 als aktiver Metabolit hat eine 10fach höhere Aktivität als Losartan selbst. In Ratten sowie im Menschen wird EXP3174 als Hauptmetabolit für die ausgeprägte und langanhaltende Losartanwirkung verantwortlich gemacht (Wong et al. 1990a).

1.7.3 Pharmakokinetik

In klinisch relevanten Konzentrationen sind Losartan und EXP3174 im Plasma stark an Proteine gebunden. Der aktive Metabolit EXP3174 besitzt mit 99,7 % eine höhere Affinität zu den Plasmaproteinen als Losartan mit 98,6 - 98,7 % (Sica et al. 2005). Die Proteinbindung von Losartan ist speziesabhängig und ist in Ratten höher als in Hunden (Christ et al. 1995). Der aktive Metabolit EXP3174 hingegen wies keine Speziesunterschiede zwischen Ratte und Mensch auf (Christ et al. 1995). Die p. o.-Bioverfügbarkeit von Losartan liegt bei Ratten und beim Menschen zwischen 33 % und 36 % (Wong et al. 1990c). Nach oraler Applikation werden nach ungefähr 1 h Maximalkonzentrationen erreicht. Die mittlere terminale Halbwertszeit beträgt 1,5 - 2,5 h. Der aktive Metabolit EXP3174 erreicht hingegen erst nach 3 - 5 h seinen maximalen Plasmaspiegel. Die mittlere terminale Halbwertszeit beträgt 6 - 9 h (Sica et al. 2005). Weniger als 5 % der oralen Losartandosis werden unverändert mit dem Urin ausgeschieden. Die Ausscheidung von Losartan und seinem aktiven Metaboliten EXP3174 erfolgt beim Menschen zu etwa 58 % biliär und zu etwa 35 % renal. Bei Patienten mit einer Nierenfunktionsstörung ist keine Dosisanpassung notwendig, da keine klinisch relevanten Effekte auf pharmakokinetische Parameter nachgewiesen werden konnten (Sica et al. 2005).

1.7.4 Pharmakodynamik

Bei der Regulation des arteriellen Blutdrucks sowie bei der Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Elektrolytgleichgewichtes spielt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine essentielle Rolle (Abbildung 5). Ebenso hat das RAAS in der Pathogenese und Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen einen großen Stellenwert. Das Oktapeptid Angiotensin II ist als aktiver Mediator des RAAS für eine Vielzahl von physiologischen Effekten, wie Aldosteronsekretion, Katecholaminfreisetzung, Glykogenolyse, Gefäßkontraktion, Abnahme der renalen Filtration sowie Proliferation der glatten Muskelzellen und der vaskulären Gewebe verantwortlich (Bouley et al. 1998). Ein Eingriff in diese Kaskade kann an unterschiedlichen Angriffspunkten erfolgen. Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer) sowie Reninantagonisten inhibieren die Bildung Angiotensin II aus den entsprechenden Vorstufen. Die Wirkung des Angiotensin II wird hingegen durch Rezeptorblockade, speziell des AT₁-Rezeptors, gehemmt (Burnier et al. 1996). Der AT₁-Rezeptor vermittelt viele physiologischen Wirkungen des Angiotensin II auf kardiovaskulärer, renaler, neuronaler, endokriner sowie auf hepatischer Ebene und gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. In den 80iger Jahren wurden die zwei Angiotensin II-Rezeptorsubtypen AT₁ und AT₂ klassifiziert (Chiu et al. 1989).

Die spezifische Inhibition des AT₁-Rezeptors bedingt im Vergleich zu den ACE-Hemmern ein geringeres Nebenwirkungsprofil. Die Inzidenz von trockenem Reizhusten

als Nebenwirkung liegt nur bei ca. 3 % aufgrund der fehlenden bradykininpotenzierenden Wirkung: aufgrund der fehlenden Hemmung von ACE (Kinase II), die auch für den Bradykininabbau zuständig ist, kommt es zu keinem Anstieg des Bradykininspiegels, der mit der Entstehung des Reizhustens in Zusammenhang gebracht wird (CHARM-Studie, Swedberg et al. 1999; Wong et al. 1990b; Abbildung 5).

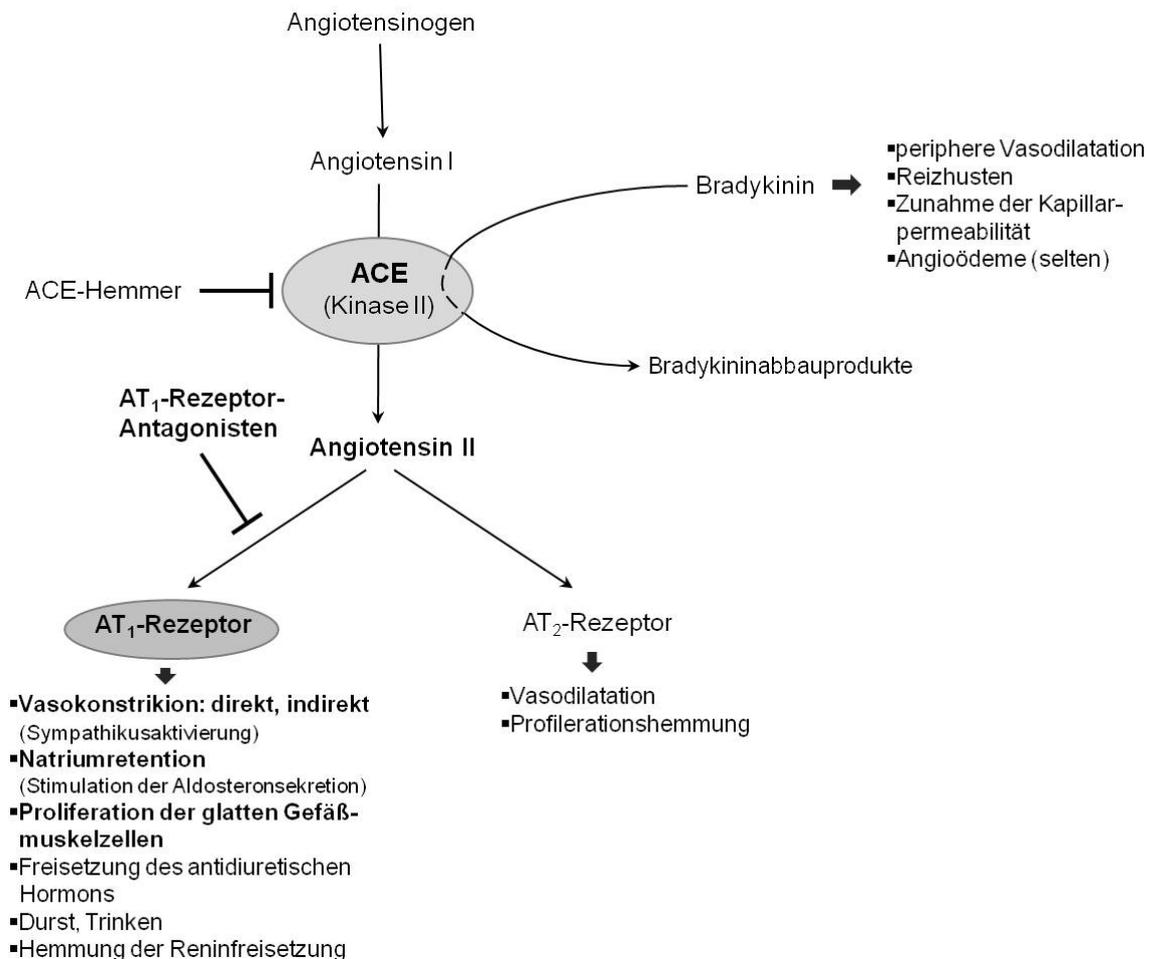


Abbildung 5: Schematische Darstellung der physiologischen sowie der pharmakologischen Interaktionen innerhalb des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (modifiziert nach Carr et al. 1996 und Mutschler et al. 2008).

Losartan war der erste oral wirksame AT₁-Rezeptorantagonist. 1995 wurde Losartan als Antihypertonikum in Deutschland zugelassen. Diese Arzneimittelklasse eröffnete durch die selektive Blockade des AT₁-Rezeptors einen neueren therapeutischen Weg für den Eingriff in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Als kompetitiver Antagonist greift Losartan spezifisch an den im Herzen, auf den glatten Gefäßmuskelzellen und in der Niere lokalisierten AT₁-Rezeptoren an (Hunyady et al. 1996). Der aktive Metabolit EXP3174 hingegen hemmt den AT₁-Rezeptor nichtkompetitiv (Chung et al. 1998). In-vitro-Studien

zeigten, dass Losartan 10.000-mal selektiver an den AT₁-Rezeptor bindet als an den AT₂-Rezeptor (Chiu et al. 1990). Der aktive Metabolit EXP3174 besitzt eine 10fach höhere Affinität zum AT₁-Rezeptor als Losartan. Somit wird deutlich, dass der Metabolit EXP3174 zu der in-vivo-Gesamtaktivität des Losartans beiträgt.

1.7.5 Klinische Studien

In den meisten Studien wurden Losartan-Dosierungen von 40 - 80 mg untersucht, die einen Maximaleffekt mit einer Blockade von über 90 % des AT₁-Rezeptors entfalten. Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurde hingegen eine gut wirksame Losartandosis von 25 mg beschrieben (Böhm et al. 2000). In einer großen Doppelblindstudie konnte gezeigt werden, dass Losartan in einer Dosierung von 50 mg ähnliche blutdrucksenkende Wirkungen erzielte wie Enalapril in einer Dosierung von 20 mg (Gradman et al. 1995). Bei Patienten mit mittelschwerer symptomatischer Herzinsuffizienz sowie einer Ejektionsfraktion von weniger als 40 % konnte in einer plazebokontrollierten, multizentrischen Studie gezeigt werden, dass die hämodynamische Wirkung durch Losartan günstig beeinflusst werden konnte. In dieser Studie wurde beobachtet, dass nach einer Behandlung über 12 Wochen mit Losartan in einer Dosierung von 50 mg der systemische Gefäßwiderstand, der pulmonale Kapillardruck, der Blutdruck, die Aldosteronkonzentration sowie die Herzfrequenz gesenkt werden konnten (Crozier et al. 1995). In weiteren klinischen Studien konnten auch andere Arbeitsgruppen zeigen, dass die Behandlung mit Angiotensin II-Rezeptorantagonisten die linksventrikuläre Funktion in Patienten mit Herzinsuffizienz verbessern konnte (Dickstein et al. 1995) sowie die Herzfunktionsstörung unter chronischer Behandlung minimierte (Lim et al. 2001; Nakamura et al. 1994; Qing und Garcia 1992). Außerdem kann durch die Angiotensin II-Rezeptorantagonisten die kardiale Fibrose vermindert werden (Otsuka et al. 2004; Paizis et al. 2001).

Angiotensin II spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der kardiovaskulären Homöostase (de Gasparo et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass zwei RAAS existieren (Dzau 1988). Das zirkulierende RAAS ist eher für die Regulation der Akut-beziehungsweise Kurzzeiteffekte der kardiovaskulären/renalen Homöostase verantwortlich, wie Vasokonstriktion oder Blutdruckerhöhung. Das gewebeständige RAAS ist hingegen eher für die Langzeiteffekte, wie Gefäß- und Herzhypertrophie sowie Proliferation von glatten Muskelzellen verantwortlich (Dzau 1988). Zudem stimuliert Angiotensin II direkt sowie über Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren die Proliferation und Hypertrophie der kardiomyozyten, der kardialen Fibroblasten sowie der glatten Gefäßmuskelzellen (Huckle und Earp 1994). Diese Prozesse sind von zentraler Bedeutung bei der Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie sowie beim funktionellen Umbau des Herzens (kardiales Remodeling) und damit verbunden für Herzversagen sowie Herztod.

2 Fragestellung

Aufgrund der Lokalisation des CSQ im SR und seiner Funktion als Ca^{2+} -bindendes Protein sowie seiner Bindung an den Ca^{2+} -Freisetzungskanal (RyR) könnte CSQ eine wichtige Rolle bei der Kopplung der Erregung sowie der Kraftentwicklung im Myokard spielen. Im Rahmen dieser Arbeit sollen unter anderem die funktionellen Auswirkungen einer 10fachen kardialen Überexpression von CSQ näher charakterisiert werden. CSQ bildet zusammen mit RyR, JCN und TRD einen quartären Komplex, der einen wesentlichen Anteil an der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase hat. Die Überexpression von CSQ kann demzufolge zu einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase führen, die als eine der Hauptursachen für die Herzinsuffizienz angesehen werden kann. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die Behandlung mit Losartan (Start: 4 Wochen nach der Geburt) diese pathophysiologischen Auswirkungen entgegenwirken und somit eine Besserung der klinischen Symptome, die ähnlich den Symptomen der menschlichen Herzinsuffizienz sind, erreichen kann.

Folgende Fragen sollten im Einzelnen geklärt werden:

- 1) Kann präventive und/oder therapeutische Losartan-Gabe die Sterblichkeit der CSQ-überexprimierenden Mäuse reduzieren?
- 2) Können eventuell auftretende morphologische Veränderungen wie die Entwicklung der Herzhypertrophie, die Fibrose, elektronenmikroskopische Veränderungen sowie biochemische Effekte im SR, Sarkolemm und in den Myofilamenten in den CSQ-überexprimierenden Mäusen unter Losartanbehandlung verbessert beziehungsweise sogar normalisiert werden und somit dazu beitragen die Sterblichkeit zu senken?
- 3) Können die Herzkontraktion sowie die elektrokardiographischen Parameter in den CSQ-überexprimierenden Mäusen unter Losartanbehandlung verbessert und/oder sogar normalisiert werden und somit dazu beitragen die Sterblichkeit zu senken?
- 4) Wie wirkt sich die Überexpression von CSQ in dem vorliegenden Mausmodell auf den Skelettmuskel aus?
- 5) Wie beeinflusst Losartan die GPDH- und SDH-Aktivität in den langsam und schnell kontrahierenden Fasern des Skelettmuskels der CSQ-überexprimierenden Mäuse?

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, mit Hilfe des speziellen CSQ-Mausmodells den Einfluss einer veränderten Ca^{2+} -Homöostase auf die chronische Herzinsuffizienz, die auch mit metabolischen Veränderungen der Skelettmuskulatur assoziiert sein kann, besser zu verstehen und somit Erkenntnisse über die menschliche Herzinsuffizienz auch im Bezug auf die gezielten medikamentösen Therapieoptionen sowie auf die Prävention durch eine AT_1 -Rezeptorblockade zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

3.1.1 Beschreibung der Mauslinie

Für die Versuche wurden heterozygote, transgene Mäuse von Jones et al. (1998) (DBA 2/J-ICR-Stamm; TG) mit herzspezifischer 10facher Überexpression von Calsequestrin (CSQ) verwendet. Als Kontrolle dienten gleichaltrige Wildtyp-Geschwistertiere (WT). Die Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung der α -MHC-CSQ-Expressionskassette. Die Herstellung von CSQ überexprimierenden transgenen Mäusen wurde bereits von Jones et al. (1998) ausführlich beschrieben. Dabei wurde der herzspezifische Hunde-CSQ-cDNA-Klon IC3A (Scott et al. 1988) verwendet und zwischen eine mausherzspezifische α -MHC-Promotor-Expressionskassette und dem SV40 Transkriptions-Terminator integriert. Das Transgen, welches aus dem α -MHC-Promotor, der kompletten Protein-kodierenden Region für CSQ und der SV40-Polyadenylierungssequenz besteht, wurde aus dem Ursprungsplasmid als 7,4 kb NruI-Fragment isoliert und für eine Mikroinjektion in befruchtete Maus-Oozyten benutzt.

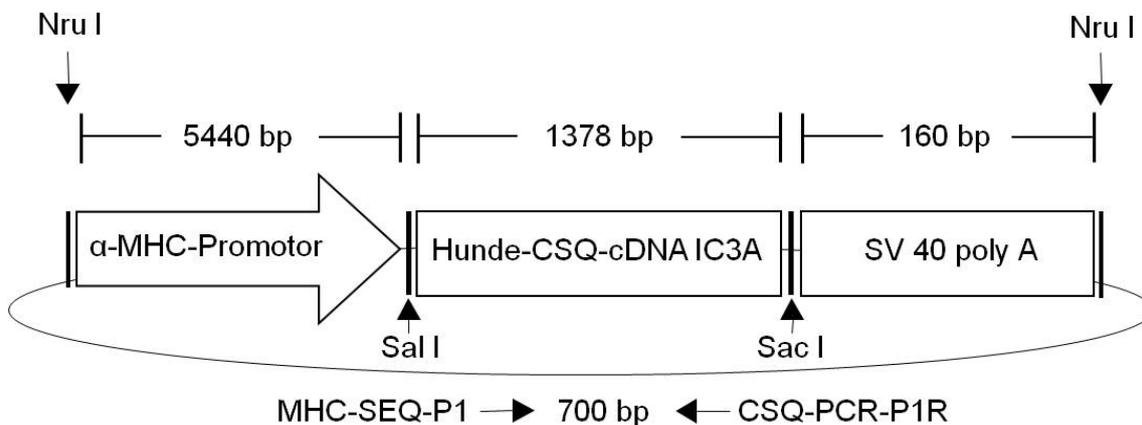


Abbildung 6: Schematische Darstellung der α -MHC-CSQ-Expressionskassette. Um die transgene Mauslinie mit herzspezifischer Überexpression von Calsequestrin herzustellen, wurde die α -MHC-CSQ-Expressionskassette in Maus-Oozyten injiziert. Die kodierende Sequenz für Calsequestrin wurde mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Sac I ausgeschnitten und in die Expressionskassette eingefügt, wobei die Transkription des Calsequestrins unter Kontrolle des α -MHC-Promotors stand. Mittels PCR unter Verwendung spezifischer Primer (CSQ-PCR-P1R und MHC-PCR-P1R) wurden die transgenen Mäuse in genomischer DNA nachgewiesen (Produktgröße: 700 bp; siehe auch Abbildung 8).

Transgen-positive Mäuse wurden mittels PCR (Abschnitt 3.5.2) der genomischen DNA der Schwanzspitze identifiziert. Die herzspezifische Expression wurde durch den α -MHC-Promotor kontrolliert, welcher eine geringe Expression während der Embryonalentwicklung und eine starke postnatale Expression der von diesem Promotor kontrollierten Gene gewährleistet (Gulick et al. 1991).

Die Tiere wurden in schallisolierten Räumen im 12:12 Licht-Dunkel-Zyklus mit handelsüblichem Labortierfutter (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum versorgt sowie zur Unterscheidung mit Ohrmarkierungen versehen.

3.1.2 Narkose und Organpräparation

Die Mäuse wurden mit 2,0 g/kg Körpergewicht frisch hergestellter Urethan-Lösung i. p. narkotisiert und das Körpergewicht ermittelt. Kurz vor der Narkose wurde ihnen zur Antikoagulation 1,5 U Heparin i. p. verabreicht. Das Einsetzen der Narkose zeigte sich durch die Abschwächung des Stellreflexes. Nachdem mit einer Pinzette die Reflexfreiheit mittels Zehenreizung überprüft wurde, wurde die Bauchdecke geöffnet und die Organe entnommen. Anschließend wurden die Organe zur Befreiung von Blutresten mit Krebs-Henseleit-Puffer gespült und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Organgewichte wurden mittels einer Fein-Waage (Mettler AT261 DeltaRange[®], Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) erfasst. Die Blutentnahme erfolgte mittels einer 1 ml-Spritze (BD-Biosciences, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) in ein EDTA enthaltendes Proberöhrchen (BD-Microtainer[®] K2E Tubes, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Bis zur weiteren Bearbeitung wurde das Blut auf Eis gelagert und anschließend für 20 min bei $2.300 \times g$ und $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer DuPont Sorvall RT 6000D-Zentrifuge (DuPont de Nemours GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.3 Applikation von Losartan

Losartan wurde den Mäusen in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht/Tag über das Trinkwasser nach Absetzen des Stillens (4 Wochen) verabreicht. Die Körpergewichte wurden alle 14 Tage kontrolliert. Die Behandlung erfolgte für 1 beziehungsweise 4 Monate abhängig vom Zeitpunkt der Studie. Daraus ergaben sich zwei Messzeitpunkte von 2 und 5 Monaten (entspricht dem Alter der Mäuse).

3.1.4 Bestimmung der laborchemischen Parameter

Die Konzentrationen von Na⁺, Harnstoff, Kreatinin und ACE wurden in den Plasmaproben aus Abschnitt 3.1.2 bestimmt. Die Messungen wurden im Labor von Dr. med. Annegret Heider (Universitätsklinikum Halle, Zentrallabor, Ernst-Grube-Straße 40, 06120 Halle (Saale), Deutschland) durchgeführt.

3.2 Histologische Untersuchungen

3.2.1 Histologische Färbungen und Fibrosequantifizierung

Zur Untersuchung mikroskopischer und histologischer Veränderungen des Herzgewebes wurden einzelne Längsschnitte entlang des Myokards angefertigt. Die Herzspitze wurde sofort nach der Organentnahme in Formalinlösung (4 %) fixiert, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die 5 µm dünnen Schnitte angefärbt. Hierbei werden die Zellkerne blau und das Zytoplasma sowie die Interzellulärsubstanz rot bis rosa eingefärbt. Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pathologie, Magdeburger Straße 14, 06097 Halle (Saale), Deutschland) durchgeführt. Zur densitometrischen Quantifizierung der Fibrose wurden die Schnitte (1 µm) mit Pikro-Siriusrot angefärbt (Baba et al. 1999). Die Erhebungen wurden mit Hilfe des vollautomatischen Bildanalysesystems KS 300 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Histologische Bilder der Schnittpräparate wurden mit einer Videokamera AxioCam HRc am Lichtmikroskop Axioplan (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) digitalisiert. Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Hideo A. Baba (Universitätsklinikum Essen, Institut für Pathologie und Neuropathologie, Hufelandstraße 55, 45122 Essen, Deutschland) durchgeführt.

3.2.2 Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die Darstellung der myofibrillären ATPase-Aktivität in Gewebeschnitten nach Padykula und Herman (1955) wurde bereits von Punkt und Erzen (2000) beschrieben. Die Proben wurden zusammen auf einem Kryostattisch befestigt und 10 µm starke Querschnitte mittels eines Microm HM 500 OM (Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland) angefertigt. Zunächst erfolgte die Präinkubation der Schnitte bei 37 °C. Anschließend wurde die Präinkubationslösung mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt, filtriert und nach 20 min abgossen. Die Schnitte wurden erneut bei 37 °C und pH 9,4 für 20 min inkubiert. Danach wurde die Inkubationslösung mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt, filtriert und abgossen. Die Schnitte wurden anschließend mit destilliertem Wasser gespült, für 5 min

mit Cobaltchloridlösung 2 % inkubiert und wieder für 2 min fließend gewässert. Danach wurden die Schnitte für 1 min in Ammoniumsulfidlösung 0,15 % inkubiert und für weitere 10 min fließend gewässert. Abschließend wurden die Objektträger mit Glyceringelatine eingedeckt. Die Methode beruht auf der enzymatischen Abspaltung einer Phosphatgruppe von dem Substrat ATP nach Zugabe der entsprechenden Aktivatoren. Die Phosphatgruppe bildet mit dem Ca^{2+} des Inkubationsmediums einen unlöslichen Komplex. Das dabei ausgefallene Calciumphosphat reagiert mit Cobaltchlorid und Ammoniumsulfid und wird in das braunschwarze Cobaltsulfid umgewandelt, welches gemessen werden kann. Die Messung der relativen Enzymaktivität der ATPase erfolgt aus der Messung der mittleren Absorption des Reaktionsproduktes von ATP mittels eines computerkontrollierten Photometer-Mikroskops mit Scantabelle (MPM 200, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. rer. nat. Karla Punkt (Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Anatomie, Liebigstraße 13, 04103 Leipzig, Deutschland) durchgeführt.

3.2.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die Herzproben in einer phosphatgepufferten Glutaraldehydlösung 3 % nach Schultz und Karlsson (1965) für 24 h bei 4 °C fixiert. Nach dem Waschen mit Phosphatpuffer, erfolgte die Nachfixierung mit Osmiumtetroxidlösung 1 % für 2 h bei Raumtemperatur sowie nach einem erneuten Waschschrift die Dehydrierung in einer aufsteigenden Acetonreihe. Anschließend wurden die Proben in DurcupanTM (Epoxidharz der Firma Fluka, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) eingebettet. Nach dem Anfertigen von Semidünnschnitten (35 µm Stärke) erfolgte die Selektion geeigneter Gewebebezirke mittels eines Lichtmikroskops bei relativ niedriger Vergrößerung (40fach). Für die Elektronenmikroskopie wurden ultradünne Schnitte (55 nm Stärke) mit Ultracut E (Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und nach einer Doppelkontrastierung mit Uranacetat und Bleicitrat am Transmissionselektronenmikroskop EM 902A (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet. Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Holzhausen (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pathologie, Magdeburger Straße 14, 06097 Halle (Saale), Deutschland) durchgeführt.

3.3 Hämodynamische Untersuchungen

3.3.1 Messung kontraktile Parameter des Herzens im „Working Heart“-Modus

Mit der „Working Heart“-Methode (isoliert-perfundiertes Arbeit-leistendes Herz) kann die Myokardfunktion unabhängig vom autonomen oder hämodynamischen Einflüssen oder anderen Kompensationen untersucht werden (Grupp et al. 1993). Bei dieser Methode wird das Herz anterograd bei kontrollierter Vor- und Nachlast perfundiert. Analog dem Körperkreislauf erfolgt der Zustrom in den linken Vorhof über die Pulmonalvene (Neely et al. 1967). Die Methode wurde bereits ausführlicher durch Grupp et al. (1993) beschrieben. Als Nachlast wurde 50 mmHg und als Vorlast 5 ml/min eingestellt. Nachlast bezeichnet die Wandspannung (Kraft pro cm^2 Muskelquerschnitt) im Ventrikel während der Systole, die hauptsächlich vom Aortendruck bestimmt wird (Daut et al. 2011). Unter Vorlast versteht man die Wandvorspannung im Ventrikel am Ende der Diastole (Daut et al. 2011).

Die Mäuse wurden, wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, narkotisiert, der Thorax eröffnet und die Herzen am Gefäßstamm abgetrennt. Anhaftendes Gewebe wurde in mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) begastem Krebs-Henseleit-Puffer entfernt. Nach der Präparation des Herzens wurde das Herz mit sauerstoffhaltigem Krebs-Henseleit-Puffer zunächst im Langendorff-Modus (retrograd) zur Kanülierung der Pulmonalvene über die Aorta zum linken Vorhof perfundiert. Danach wurde 5 min im „Working Heart“-Modus (anterograd) über den linken Vorhof zur Aorta perfundiert. Während der Perfusion wurden die Kontraktionsdaten mit Hilfe des Programms ChartTM 5 (PowerLab, ADInstruments, Spechbach, Deutschland) kontinuierlich aufgezeichnet und später ausgewertet. Die Kanäle 1 - 5 zeigen die Daten des linksventrikulären Drucks in mmHg, des linksatrialen Drucks in mmHg, des Aortendrucks in mmHg, der Frequenz in bpm und der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks in mmHg/s.

Von den linksventrikulären (LV) Druckkurven werden die maximale Druckanstiegs- ($+dP/dt_{\text{max}}$) und Druckabfallsgeschwindigkeit ($-dP/dt_{\text{max}}$) ermittelt (Abbildung 7). Ein gut geeigneter Parameter zur Beschreibung der Kontraktionsphase ist die LV-Druckanstiegs- geschwindigkeit (1. Ableitung des LV-Drucks, $+dP/dt_{\text{max}}$). Bei erhöhter myokardialer Kontraktilität steigt $+dP/dt_{\text{max}}$ an und sinkt bei verminderter myokardialer Kontraktilität wieder ab (Gleason und Braunwald 1962; Mason et al. 1971). Zur Charakterisierung der myo- kardialen Relaxationsphase wurde die LV-Druckabfallsgeschwindigkeit (1. Ableitung des LV- Drucks, $-dP/dt_{\text{max}}$) verwendet. Durch den Vergleich des Druck- und Volumenzylusses des Myokards konnte gezeigt werden, dass in der Austreibungsphase ab dem Punkt des steilsten Abfalls des Druckes ($-dP/dt_{\text{max}}$) das Volumen im Ventrikel konstant bleibt (Daut et al. 2011). Der Zeitpunkt von $-dP/dt_{\text{max}}$ stellt somit den Beginn der isovolumetrischen Relaxationsphase dar.

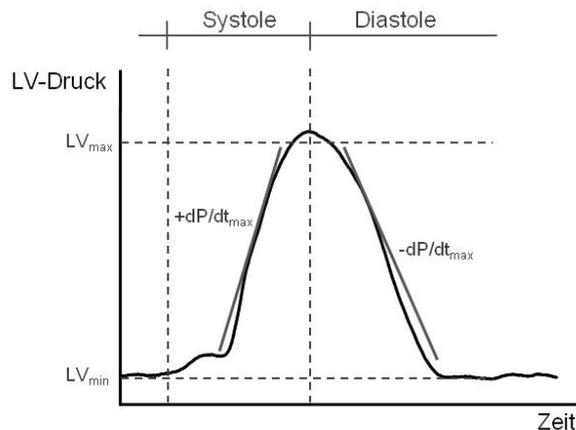


Abbildung 7: Darstellung der abgeleiteten Parameter der linksventrikulären Druckkurve aufgezeichnet bei einem WT unter Kontrollbedingung.

3.3.2 Elektrokardiographische Messungen

Elektrokardiogramme (EKGs) wurden an Urethan-anästhesierten Mäusen, wie unter Abschnitt 3.1.2 beschrieben, gemessen. Alle Messungen wurden mit einem kommerziell erhältlichen EKG-System (BioAmp, AD-Instruments, Spechbach, Deutschland) durchgeführt. Bei den EKG-Messungen wurden die Frequenz, die PQ-, die QRS-, die QT- und die QTc-Intervalle mittels des Programms ChartTM 5 (PowerLab, ADInstruments, Spechbach, Deutschland) kontinuierlich aufgezeichnet und ausgewertet. Alle Aufzeichnungen der transgenen Mäuse wurden auf Arrhythmien und hochgradigen AV-Blöcken hin untersucht.

3.3.3 Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an Herzvorhöfen

Die Kontraktionskraftmessungen wurden an elektrisch gereizten linken Vorhöfen von TG und WT nach Losartanbehandlung beziehungsweise unter Kontrollbedingung durchgeführt. Vor jedem Versuch wurde die Tyrode-Lösung für das Organbad frisch hergestellt. Dafür wurden jeweils 4 % (m/v) Stammlösung I, 3,8 % (m/v) Stammlösung II und 2 % (m/v) Stammlösung III mit bidestillierten Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Nach ungefähr 10 min Begasung mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) wurden 0,08 % (m/v) Calciumchlorid-Lösung (33,2 g CaCl₂/100 ml H₂O), 0,28 mM Ascorbinsäure sowie 0,05 mM Natrium-EDTA hinzugefügt. Während des gesamten Versuchszeitraums wurde die Tyrode-Lösung mit Carbogen begast und konstant auf einer Temperatur von 37 °C gehalten. Die Endkonzentration von Ca²⁺ betrug 1,8 mM.

Die Messanlage bestand aus jeweils vier beheizbaren Organbädern, in denen die Vorhöfe vertikal an zwei starren Metalldrähten in der Tyrode-Lösung aufgehängt werden konnten. Am oberen Metalldraht befand sich ein Kraftmesser, welcher die Kontraktionskraft auf den Schreiber mit integriertem Brückenverstärker (Hellige Servomed, Hellige Medizintechnik, Freiburg im Breisgau, Deutschland) weiterleitete. Die Geschwindigkeit des

Schreibers konnte, angepasst an die Versuchsbedingungen, frei eingestellt werden. In jedem Glasgefäß waren zwei Reizelektroden vorhanden, zwischen denen die Vorhöfe platziert wurden. Die linken Vorhöfe wurden mit einer Frequenz von 1 Hz für die „Post-Rest Potentiation“ (PRP)- sowie Koffein-Versuche elektrisch gereizt (Reizgerät: Stimulator Typ 215/II, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland). Für die Messung der Kraft-Frequenz-Beziehung hingegen erfolgte die Variation der Reizfrequenz entsprechend den vorgegebenen Reizfrequenzen von 1 Hz, 1,5 Hz, 2 Hz, 2,5 Hz, 3 Hz und 5 Hz. Zum jeweiligen Versuchsbeginn wurde der Nullpunkt des Schreibers festgelegt, indem ein 500 mg schwerer Drahttring zur Korrelation der wirkenden Zugkraft auf den Kraftmesser zur Auslenkung des Schreibers verwendet wurde. Dabei konnte auf verschiedene Empfindlichkeiten des Kraftmessers kalibriert werden. Die Kalibrierung ermöglichte die Berechnung der durch den linken Vorhof entwickelten Kraft anhand des Schreiberausschlages.

Ungefähr 30 min vor Versuchsbeginn wurden jeder Maus 500 I. E. Heparin i. p. gespritzt. Die Narkose erfolgte mit Urethan i. p. wie unter Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Das Herz wurde großzügig mit den Lungenlappen herausgeschnitten und sofort in kalter Tyrode-Lösung gelagert, um mit der Vorhofpräparation zu beginnen. Nach vorsichtigem Entfernen der anhaftenden Lungenteile sowie des Binde- und Fettgewebes konnte der linke Vorhof präpariert werden. Der linke Vorhof wurde mittels eines kleinen Metallhakens an den Drahtstangen vertikal aufgehängt und anhand der Kalibrierung optimal vorgespannt. Das Organbad wurde während des gesamten Versuchs konstant auf 37 °C gehalten sowie kontinuierlich mit Carbogen begast. Nach ungefähr 30 min Adaptationszeit sowie dreimaligem Spülen der linken Vorhöfe mit frischer Tyrode-Lösung wurden die Versuche nach den entsprechenden Protokollen durchgeführt. Bei den PRP-Versuchen erfolgte nach Stabilisierung der Kontraktion die Abschaltung des Reizes für die angegebene Dauer von 2,5 s, 5 s, 10 s, 15 s, 30 s, 60 s, 120 s, 180 s und 300 s. Zur Auswertung wurde die erste Kontraktion nach Anschalten des Reizgerätes herangezogen. Weiterhin wurde die Herzkontraktion vor und 10 min nach der Koffein-Gabe in einer Konzentration von 10 mM gemessen.

3.4 Methoden zur Untersuchung der RNA

3.4.1 RNA-Extraktion aus Herzgewebe

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden frisch entnommene Herzen von Mäusen bei -80 °C eingefroren. 10 - 30 mg des Gewebes wurde unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und in ein RNase-freies Eppendorf-Gefäß überführt. Das pulverisierte Gewebe wurde in 600 µl RLT-Puffer (Quiagen, Hilden, Deutschland) und 6 µl β-Mercaptoethanol mit einem ULTRA-TURRAX®-Homogenisator (ULTRA-TURRAX® T 25 mit Dispergierwerkzeug S 25 N-8 G, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) für 20 - 40 s bei 18.000 rpm homogenisiert. Anschließend wurden 590 µl destilliertes Wasser und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzupipettiert, gut vermischt und für 10 min bei 55°C inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze 3 min bei 13.000 rpm und 20 - 25 °C in einer Beckman Avanti™ 30-Zentrifuge mit dem Rotor F2402H (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein RNase freies Eppendorf-Gefäß überführt, mit 300 µl Ethanol 96 % versetzt und sofort mit der Pipette gemischt. 700 µl Probe wurden auf eine Säule in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 15 s bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert bis die Probe komplett auf der Säule war. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden 700 µl RW1-Puffer (Quiagen, Hilden, Deutschland) auf die Säule gegeben, erneut für 15 s bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. 500 µl RPE-Puffer (Quiagen, Hilden, Deutschland) wurde zweimal nacheinander auf die Säule appliziert, im ersten Schritt 25 s und im zweiten Schritt 2 min bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert und jeweils der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die Säule in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß gestellt, 1 min bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gestellt, 30 - 50 µl RNase freies Wasser (Molbio-Wasser von Sigma, München, Deutschland) wurden zupipettiert und anschließend 1 min bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde die RNA-Konzentration mit Hilfe des NanoVue™-Spectrophotometer (GE Healthcare, München, Deutschland) bestimmt. Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Jun. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Claudia Großmann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, Magdeburger Straße 6, 06097 Halle (Saale), Deutschland) durchgeführt.

3.4.2 cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase

Zunächst wurden 1 µg RNA mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 8 µl eingestellt und anschließend mit 1 µl 10x Reaktionspuffer vermischt. Nach Zugabe von 1 µl DNase I (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) wurden die Proben zuerst 10 min bei 37 °C,

dann 10 min bei 75 °C und zuletzt kurz auf Eis inkubiert. Zu dem Ansatz des DNase Verdaus wurden 4 µl DEPC-Wasser hinzugegeben, der Ansatz auf zwei Teile zu je 7 µl aufgeteilt und jeweils 18 µl Reaktionsmix hinzugefügt. Die entsprechenden Protokolle dieser Messung sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1: Ansatz reverse Transkription.

Reaktionsmix	Menge
5x First strand buffer	4 µl
DTT (100 mM)	0,25 µl
dNTPs (je 10 mM)	1 µl
RNase Out (40 U/µl)	0,5 µl
Random Primer (1:10 verdünnt, 0,3 µg/µl)	0,67 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
Wasser (Sigma)	10,58 µl

Tabelle 2: PCR-Programm reverse Transkription.

Temperatur	Zeit
25 °C	5 min
42 °C	30 min
95 °C	5 min
4 °C	Stop

Der Ansatz wurde anschließend, um später ein größeres Volumen für die Real Time PCR einsetzen zu können, mit 25 µl Wasser auf 50 µl aufgefüllt.

3.4.3 Quantitative RT-PCR

Die Bestimmung der mRNA-Expression der α -Untereinheit des kardialen L-Typ-Ca²⁺-Kanals (LTCC), des Kalium-Kanals (HERG) sowie des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy[®] Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Nach Verdau mit DNase I wurde die cDNA Synthese mit den dafür geeigneten Primern (SuperScript[™] II reverse transcriptase, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt (Abschnitt 3.4.2). Die quantitative PCR wurde in einem Stratagene Mx3005P[™] System mit dem Platinum[®] SYBR[®] Green Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und den unten aufgeführten Primern durchgeführt (Tabellen 3, 4 und 5). Die PCR Produkte wurden zur

Überprüfung der Spezifität im Agarosegel (2 %) nach Größe aufgetrennt und mit Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Die erwarteten Produkte hatten eine Größe von 184 bp für LTCC, von 242 bp für HERG und von 123 bp für ANP. Die Auswertung der relativen mRNA Expression wurde gemäß der $2^{-\Delta\Delta C}$ Methode nach Livak et al. (2001) vorgenommen. Zur Standardisierung diente die 18S rRNA.

Tabelle 3: Ansatz quantitative RT-PCR.

Substanzen	Menge
2x SuperMix	12,5 µl
Sense Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Antisense Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Template (1:1 verdünnt)	2 µl
Rox (Farbstoff, der nicht interkaliert)	0,05 µl
Wasser	8,45 µl

Tabelle 4: Verwendete Primer.

Primer	Sequenz	Annealingtemperatur
LTCC-alpha-1C sense	5'-tcactggctcacagaagtgc-3'	64 °C
LTCC-alpha-1C antisense	5'-gatcttcgtctccaccagga-3'	64 °C
HERG sense	5'-cgcaagttcatcatcgctaa-3'	64 °C
HERG antisense	5'-aggaagcagctccatcttt-3'	64 °C
ANP sense	5'-gtgcggtgccaacacagat-3'	64 °C
ANP antisense	5'-gcttctcagctgctcactca-3'	64 °C

Tabelle 5: RT-PCR-Programm zur Bestimmung der mRNA-Expression von LTCC, HERG und ANP.

Zyklen	Zeit	Temperatur
1 x	2:00 min	95 °C
	0:30 min	95 °C
35 x	0:30 min	64 °C
	0:30 min	72 °C
1 x	5:00 min	72 °C
1 x	Stop	10 °C

3.5 Methoden zur Untersuchung der DNA

3.5.1 DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen

Zur DNA-Gewinnung wurden jeder Maus ca. 0,5 cm Schwanzspitze mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten und mit 700 µl TE/SDS-Puffer und 30 µl Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht bei 55 °C auf einem Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) geschüttelt. Am darauf folgenden Tag wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, um die genomische DNA von Lipiden und Proteinen zu trennen (Sambrook et al. 1998). Jede Probe wurde mit 700 µl Phenol versetzt und gerüttelt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 14.000 x g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf-Centrifuge 5415C®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, 700 µl Chloroform-Isoamylalkohol-(24 : 1)-Gemisch hinzugefügt und gemischt. Ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 14.000 x g für 3 min folgte. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 70 µl Natriumacetat und 700 µl Ethanol 100 % versetzt, gerüttelt und 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Im darauf folgenden Schritt wurde das Sediment mit Ethanol 70 % gewaschen, 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert und kurz bei 65 °C getrocknet, danach in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und anschließend für 10 min bei 65 °C auf einem Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) geschüttelt bis die DNA sich gelöst hat. Die DNA wurde mindestens 4 h bei 4 °C gelagert und danach die Konzentration und Reinheit im Photometer (Eppendorf-BioPhotometer®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit dem Programm für dsDNA bestimmt.

3.5.2 PCR zur Genotypisierung der CSQ-transgenen Mäuse

Die entsprechenden Protokolle und Primer zur Bestimmung des Genotyps sind in den Tabellen 6, 7 und 8 dargestellt.

Tabelle 6: PCR-Ansatz zur Genotypisierung der CSQ-DBA-Mauslinie.

Substanzen	Menge	Endkonzentration
DNA	1 µl	etwa 0,1 - 0,5 µg
10x Standard Puffer (Ampliqon) mit 15 mM Magnesiumchlorid	5 µl	1x
dNTP – Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	1 µl	200 µM
Forward-Primer	0,5 µl	1 µM
Reverse-Primer	0,5 µl	1 µM
Taq DNA-Polymerase (Ampliqon)	0,5 µl	2,5 U
DEPC-Wasser	41,5 µl	

Tabelle 7: PCR-Primer zur Genotypisierung der CSQ-DBA-Mauslinie.

Primer	Sequenz	Annealingtemperatur
MHC-SEQ-P1	5'-accctaccccacatagacc-3'	60 °C
CSQ-PCR-P1R	5'-catccaccataaagcc-3'	60 °C

Tabelle 8: PCR-Programm zur Genotypisierung der CSQ-DBA-Mauslinie.

Zyklen	Zeit	Temperatur
1 x	3:00 min	94 °C
	1:00 min	94 °C
34 x	1:00 min	60 °C
	1:30 min	72 °C
1 x	10:00 min	72 °C
1 x	Stop	10 °C

Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Größe von 700 bp. Die PCR wurde je nach Verfügbarkeit entweder in einer Thermocycler von Eppendorf (Eppendorf Mastercycler Gradient®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) oder Biometra (Biometra T Gradient®, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

3.5.3 Gelelektrophorese

Zu den Proben wurden 8 µl Ladepuffer zugegeben und diese zusammen mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle, sowie einem DNA-Standard auf ein Agarosegel (1 %) mit Ethidiumbromid (9 µl/100 ml) aufgetragen. Als DNA-Standard wurde eine 100 bp-DNA-Leiter (GeneRuler™ Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 80 mA (Biometra Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Das Gel wurde unter UV-Licht (256 nm) mit einem Geldokumentationssystem (AlphaDigiDoc™ RT-Geldokumentationssystem mit AlphaEase-FC-Software, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) fotografiert. In Abbildung 8 ist ein repräsentatives Agarosegel von WT und TG mit Positiv- sowie Negativkontrolle dargestellt.

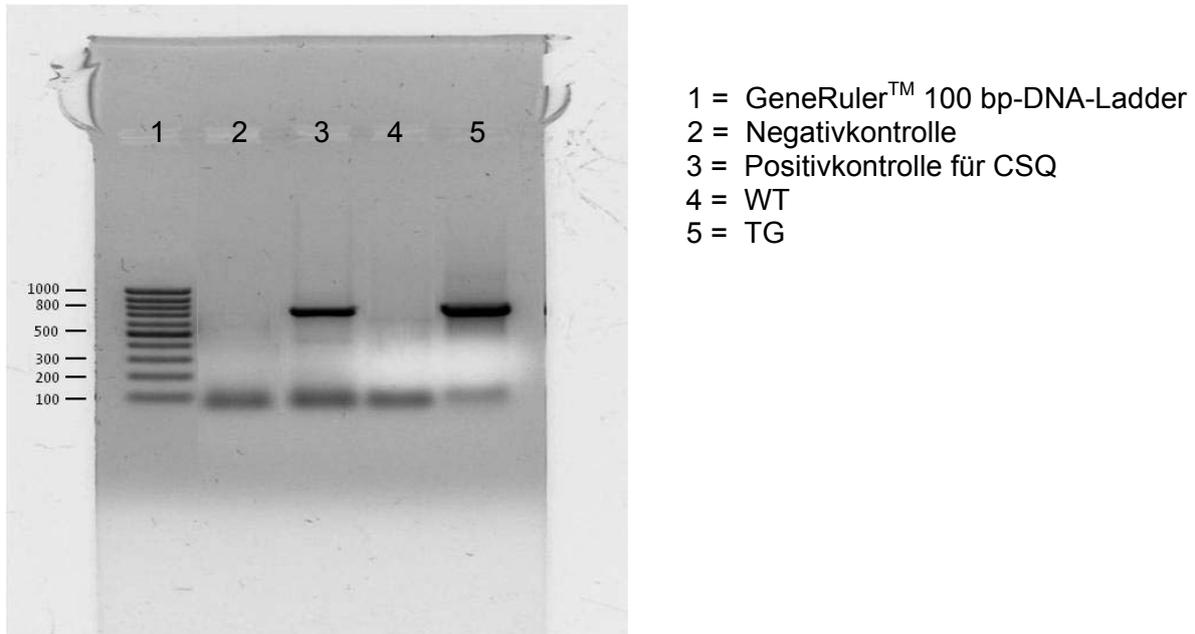


Abbildung 8: Darstellung eines repräsentativen PCR-Gels von transgenen Mäusen mit 10facher Überexpression von CSQ (TG) und Wildtyp-Mäusen ohne CSQ-Überexpression (WT) mit einer Positivkontrolle für CSQ und einer Negativkontrolle ohne DNA.

3.6 Proteinchemische Methoden

3.6.1 Herstellung von Homogenaten

Bei -80 °C gelagerte Herzen wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff im Mikro-Dismembrator S mit Schüttelbehälter aus PTFE und Mahlkugeln aus Wolframcarbid (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) 1 min bei 2.100 rpm vollständig pulverisiert. Das Pulver wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Herstellung von Homogenaten für den Western Blot wurde eine Spatelspitze Gewebepulver in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt mit 100 µl Homogenisierungspuffer versetzt und durch Behandlung mit dem Ultraschall-Homogenisator (Sonopuls Homogenisator HD 2070, Bandelin, Berlin, Deutschland) für dreimal 15 s auf Eis gelöst. Anschließend wurde das Gemisch für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, und danach 30 min bei 14.000 x g bei Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf-Centrifuge 5415C®, Eppendorf Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und der Proteingehalt bestimmt (Abschnitt 3.6.2). 100 µg Probe wurden in einem weiteren Schritt mit Homogenisierungspuffer auf 55 µl aufgefüllt, 55 µl 2x Lämmli ohne SDS und 6 mg/ml DTT hinzugefügt, die Eppendorf-Gefäße kurz gerüttelt und bis zum Auftragen auf das Proteingel bei -20 °C gelagert.

3.6.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte bei SDS-haltigen Proben nach Lowry et al. (1951). Als Standard wurde hierfür BSA verwendet.

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot

Die Proben mit jeweils 100 µg Protein wurden bei 60 mA und 4 °C elektrophoretisch in der Hoefer™ SE 600 Elektrophorese-Einheit (Hoefer, San Francisco, CA, USA) getrennt (Stromquelle: Biometra Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Für die Nachweise der herzspezifischen Proteine SERCA2a, CSQ und PLB wurden Porzio-Trenngele (10 %) und Sammelgele (4 %) benutzt (Porzio und Pearson, 1977). Ein handelsüblicher Molekulargewicht-Standard (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) wurde zuvor 5 min bei 95 °C gekocht. Alle weiteren Proben wurden nicht gekocht. Die Elektrophorese wurde mit Elektrophoresepuffer durchgeführt bis die Lauffront etwa 1 cm vor dem unteren Ende des Gels angelangt war. Die Gele wurden bei 0,28 A 16 h bei 4 °C in einer Hoefer™ TE 62 Tank-Transfer-Einheit (Hoefer, San Francisco, CA, USA, Stromquelle: Bio-Rad Modell 200/2.0 Stromquelle, Bio-Rad GmbH, München, Deutschland) mit Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) transferiert. Die Qualität des Transfers wurde mittels Ponceaurot-Färbung überprüft (Salinovich und Montelaro, 1986).

3.6.4 Coomassie-Färbung

Die Gele wurden 1 h in Coomassie-Färbelösung (2,5 g/l) gefärbt, über Nacht in Entfärbelösung entfärbt und am nächsten Morgen mit einem Scanner (CanoScan LiDE 35, Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland) aufgenommen.

3.6.5 Immunologische Identifizierung von Proteinen

Die Größenbereiche für das nachzuweisende Protein wurden aus den Ponceaurot gefärbten Blots ausgeschnitten (Tabelle 9).

Tabelle 9: Größenbereiche für Proteinnachweise im Western Blot.

Größenbereich (kDa)	nachzuweisendes Protein	Größe des Proteins (kDa)
67-110	SERCA2a	94
35-67	Calsequestrin	55
0-35	Phospholamban	25 (Pentamer), 6 (Monomer)

Die Blots wurden zweimal 10 min mit TBST-Puffer gespült und danach 1 h mit 2 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) beziehungsweise 5 % (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer geblockt. Über Nacht bei 4 °C folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper. Am nächsten Morgen wurden die Blots dreimal 10 min mit TBST-Puffer gewaschen und 2 h mit dem 2. Antikörper (1 : 1000) in 5 % (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 10 dargestellt. Danach wurden die Blots dreimal 10 min mit TBST-Puffer und zweimal 2 min mit AP-Puffer gespült. Zur quantitativen Auswertungen wurden die Blots mit ECF inkubiert und die Signale in STORM 860 Phosphor Imager (GE Healthcare, München, Deutschland) ausgelesen. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mittels dreidimensionaler Densitometrie durch die ImageQuantTM-Software (GE Healthcare, München, Deutschland), unspezifische Hintergrundsignale wurden vom Signal subtrahiert. Die Detektion von ECF (Anregung max. 440 nm und Emission max. 560 nm) erfolgte im "Blue Fluorescence mode". Als interner Standard diente das zuvor mit Ponceaurot-angefärbte Actin. Zur quantitativen Auswertung für die Proteinabhängigkeit wurden die Blots mit NBT und BCIP entwickelt

Tabelle 10: Übersicht der benutzten Antikörper.

1. Antikörper	Medium für 1. Antikörper	Verdünnung für 1. Antikörper	2. Antikörper
anti-Calsequestrin	5 % (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer	1 : 10.000	anti-rabbit IgG
anti-Phospholamban	2 % (w/v) BSA in TBST-Puffer	1 : 5.000	anti-mouse IgG
anti-SERCA2a	5 % (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer	1 : 3.000	anti-mouse IgG

3.7 Skelettmuskel-Untersuchungen

3.7.1 Muskelpräparation und Gewebepvorbereitung

Die Tiere im Alter von 4 Monaten wurden mit Pentobarbital in einer Dosis von 50 - 75 mg/kg Körpergewicht narkotisiert. Der Musculus rectus femoris wurde entfernt, in Talkum gewälzt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Muskelproben der rechten hinteren Extremitäten wurden für biochemische Messungen der Enzymaktivität verwendet. Die Muskelproben der linken hinteren Gliedmaßen wurden hingegen für Western Blots und für Gefrierschnittaufbereitungen verwendet. Zur Verhinderung von Unterschieden in der Fasereigenschaft, wurden die Proben für die Schnitte genau vom mittleren Teil der

Längsachse des Muskels entnommen. Die Proben wurden zusammen auf einem Kryostat beseftigt und 10 µm starke Kreuzschnitte mittels eines Microm HM 500 OM (Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland) angefertigt. Die Schnitte wurden nach dem Kryostatschneiden für immunohistochemische, enzymhistochemische sowie zytophotometrische Messungen verwendet. Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. rer. nat. Karla Punkt (Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Anatomie, Liebigstraße 13, 04103 Leipzig, Deutschland) durchgeführt.

3.7.2 Messungen der Enzymaktivität in Muskelhomogenaten

Die eingefrorenen Muskelproben wurden im RIPA-Puffer (pH 7,4) homogenisiert. Die Aktivitäten von Succinat-Dehydrogenase (SDH) und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPDH) wurden spektrophotometrisch vermessen (Bücher et al. 1964). Die Proteinbestimmung der Proben erfolgte nach Lowry et al. (1951). Als Standard wurde hierfür BSA verwendet. Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. habil. Volker Adams (Herzzentrum Leipzig, Strümpellstraße 39, 04289 Leipzig, Deutschland) durchgeführt.

3.7.3 Immunhistochemie

MHC-Isoformen wurden mit Hilfe eines kommerziellen monoklonalen Mausantikörpers gegen langsame und schnelle MHC-Isoformen nach den vom Hersteller empfohlenen Anweisungen identifiziert (Novocastra, Newcastle bei Tyne, das UK). Die fortlaufenden Schnitte wurden mit primären Antiseren (WB-MHCs, Verdünnung 1 : 50; WB-MHCf, Verdünnung 1 : 10) für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit Kaninchen-Antimaus-Immunoglobulin (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) in einer Verdünnung von 1 : 500. Die Schnitte wurden dann mit dem Maus-Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex (PAP; Jackson Immuno Research) in einer Verdünnung von 1 : 500 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Visualisierung erfolgte durch Inkubation mit 3,3-Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich Chemical Co, St Louis, MO, USA) und 0,1 % (v/v) H₂O₂ als ein Peroxidase-Substrat für 1 min bei Raumtemperatur. Nach Wasserentzug mittels einer abgestuften Vinylalkohol-Reihe wurden die Schnitte in Entellan[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingebettet. Negativkontrollen wurden durchgeführt, indem zum einen der primäre Antikörper weggelassen und zum anderen der primärer Antikörper durch Kaninchen-IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland) mit derselben Endkonzentration wie der primäre Antikörper ersetzt wurden.

3.7.4 Enzymhistochemie

Die Aktivitäten der Succinat-Dehydrogenase (SDH, E.C. 1.3.5.1) und der mitochondrialen Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPDH, E.C. 1.1.99.5) wurden nach Lojda et al. (1976) bestimmt. Für die GPDH-Darstellung erfolgte eine Modifizierung der Methode: das Inkubationsmedium für die Bestimmung der GPDH-Aktivität bestand aus 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) mit 5 mM DL-3-Glycerinphosphat x 2 Na⁺, 0,01 % (w/v) Menadion und 0,5 mg/ml NBT. Das Inkubationsmedium für die Bestimmung der SDH-Aktivität war aus 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) mit 5 mM Natriumsuccinat und 0,5 mg/ml NBT zusammengesetzt. Die Inkubationen erfolgten für jeweils 20 min bei 37 °C in den jeweiligen Inkubationsmedien. Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal mit destilliertem Wasser gespült und in Glyceringelatine eingebettet. Als Kontrollen wurden Inkubationen ohne Substrat durchgeführt.

3.7.5 Zytophotometrie

Die Endpunktmessungen wurden mit dem computergesteuerten Photometermikroskop MPM 200 mit einer „scanning table“-Einheit (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Die mittlere Absorption des Endreaktionsproduktes der jeweiligen Enzymreaktionen (GPDH und SDH) wurde in fortlaufenden Schnitten vermessen und als ein Maß für die relative Enzymaktivität verwendet. Um Unterschiede bezüglich der Absorption zu vermeiden, verursacht durch Schwankungen der Schnittdicke und durch verschiedene Objektträger, wurde der Absorptionshintergrund (unreduziertes NBT, Gewebebestandteile) auf „0“ gesetzt. Die Korrelation der Absorption des Endreaktionsproduktes mit der jeweiligen Enzymaktivität wurde dargestellt (Punkt 2002). Anschließend wurde der GPDH/SDH-Aktivitätsquotient zur Charakterisierung jedes Fasertyps berechnet. Änderungen des GPDH/SDH-Aktivitätsquotienten deuten Veränderungen im metabolischen Profil an. Die zytophotometrische Messmethode wurde bereits als anerkanntes Hilfsmittel zur metabolischen Fasercharakterisierung etabliert (Punkt 2002). Bei jedem Muskelschnitt wurden etwa 30 Fasern, die alle Fasertypen enthielten, vermessen. Drei Schnitte wurden je Muskel und Enzymreaktion analysiert

3.7.6 Fasertypisierung und -quantifizierung

Die Methoden der Fasertypisierung sind bereits vorher detailliert beschrieben worden (Punkt 2002). Die Fasern wurden in langsame und schnelle Fasertypen gemäß ihrer langsamen oder schnellen MHC-Isoformen immunhistochemisch eingeteilt. Die physiologisch metabolische Fasertypisierung in SO (langsam oxidativ), in FOG (schnell oxidativ-glykolytisch) und FG (schnell glykolytisch) beruht auf zytophotometrisch gemessenen Aktivitäten von SDH und GPDH und der Immunreaktivität gegen langsames

und schnelles Myosin in fortlaufenden Schnitten derselben Faser. Diese Enzymaktivitäten charakterisieren das metabolische Profil von Muskelfasern (Punkt 2002). Eine Subtypisierung der schnellen Fasern in FOG und FG war durch Verwendung des GPDH/SDH-Aktivitätsquotienten der Fasern möglich. Die FOG-Fasern konnten in weitere Subtypen, welche sich geringfügig in ihrem metabolischen Profil unterschieden, unterteilt werden (Punkt et al. 2006). Das Zählen der Fasern wurde mit Hilfe des Bildaufbereitungssystem KS 100 (Kontron Elektronik GmbH, Eching, Deutschland) durchgeführt. Das Messfeld wurde über den kompletten Muskelquerschnitt gelegt.

3.7.7 Quantifizierung der Calcineurin A-Expression

Die eingefrorenen Gewebeproben wurden in Lysis-Puffer homogenisiert (Dimmeler et al. 1998). Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper für Calcineurin A in einer Verdünnung von 1 : 2.000 (Abcam, Cambridge, UK) bestimmt. Nach der Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1 : 1.000 wurden spezifische Banden (Tabelle 11) mittels Chemilumineszenz (SuperSignal West Pico Chemilumineszenzsubstrat, Pierce, Bonn, Deutschland) sichtbar gemacht. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Proteinexpression wurde mit dem 1D-Scan-Softwarepaket (Scanalytics Inc., Rockville, Maryland, USA) densitometrisch vermessen. Als interner Standard diente GAPDH (Hytest, Turku, Finnland). Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. habil. Volker Adams (Herzzentrum Leipzig, Strümpellstraße 39, 04289 Leipzig) durchgeführt.

Tabelle 11: Größenbereich für Proteinnachweis im Western Blot.

nachzuweisendes Protein	Größe des Proteins (kDa)
Calcineurin A	59

Tabelle 12: Übersicht der benutzten Antikörper.

1. Antikörper	Medium für 1. Antikörper	Verdünnung für 1. Antikörper	2. Antikörper
Calcineurin A	1 % (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer	1 : 2.000	goat anti-rabbit-IgG POD

3.8 HPLC-Bestimmung von Losartan und EXP3174

Die Entnahme der Blut- und Leberproben erfolgte wie in Abschnitt 3.1.2 erwähnt. Der Losartangehalt sowie der Gehalt seines aktiven Metaboliten wurden in Plasma- und Leberproben, wie bei Daul et al. 1995 beschrieben, mittels HPLC ermittelt. Zur Untersuchung der Proben wurde die HPLC-Anlage von Merck-Hitachi (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit Autosampler AS-4000, Pumpe L-6200A und Fluoreszenzdetektor F1050 verwendet. 100 mg Lebergewebe wurde in 500 µl Kaliumhydrogenphosphatpuffer homogenisiert. Anschließend wurden 200 µl Plasma beziehungsweise Leberextrakt mit 100 µl Phosphorsäure gemischt und in 4 ml tert-Butylmethylether bei Raumtemperatur homogenisiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (10 min bei 3.000 x g und 10 °C in einer DuPont Sorvall RT 6000D-Zentrifuge, DuPont de Nemours GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) wurden 3,5 ml der organischen Phase abgehoben, mit 100 µl 1 N Natriumhydroxidlösung versetzt und 5 min geschüttelt. Danach wurden die Proben erneut zentrifugiert, die wässrige Phase durch Ausfrieren von der organischen Phase getrennt und mit 50 µl 0,1 N Zitronensäure sowie 15 µl Isopropanol versetzt. Die Proben wurden sofort auf die HPLC-Säule (MN 100-5C18, 10 cm, Macherey Nagel GmbH & Co KG, Düren, Deutschland) injiziert und mit 32 % Acetonitril und 68 % 0,01 M Kaliumhydrogenphosphatpuffer (pH 2,5) als mobile Phase bei einer Flussrate von 1,2 ml/min und Raumtemperatur isokratisch aufgetrennt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte bei der Wellenlänge 370 nm (Anregung: 260 nm).

3.8 Behördliche Genehmigungen und Sicherheitsbestimmungen

Alle notwendigen behördlichen Genehmigungen zur Durchführung der Organentnahme und Tierversuchen lagen vor (Aktenzeichen: 42502-02-691 MLU und 42502-5.14 MLU). Genetische Arbeiten erfolgte gemäß des Gentechnikgesetz (GenTG vom 16. Dezember 1993) zur Regelung der Gentechnik unter Beachtung der in § 7 Abs. 1 GenTG formulierten Sicherheitsstufen und -maßnahmen. Die Genehmigung sowie die Anmeldung der Arbeiten mit Gentechnik erfolgte gemäß § 8, § 9, § 11 und § 12 GenTG.

3.9 Statistische Auswertung

Alle aufgeführten Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Mit „N“ wurde die Anzahl der Mäuse und mit „n“ die Anzahl der Fasern angegeben. Die Überlebenskurven sowie die Interventionsstudie wurden mittels der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse mit Hilfe der Log-Rank-Statistik analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit entsprechenden Post-Hoc-Tests ermittelt. Dabei wurden p-Werte kleiner 0,05 als signifikant angesehen. Die statistische Analyse wurde mit der Software Prism[®]4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Phänotyp der CSQ-überexprimierenden Mäuse

4.1.1 Kaplan-Meier-Überlebenswahrscheinlichkeit

Mittels Kaplan-Meier-Statistik wurde zuerst die Überlebenswahrscheinlichkeit von transgenen Mäusen unter Losartanbehandlung (TG/L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung; TG) untersucht und analysiert. Die CSQ-transgenen Mäuse unter Kontrollbedingung wiesen eine höhere Sterblichkeit auf als die WT-Geschwistertiere (Abbildung 9). Die Überlebensrate sank nach 122 Tagen auf 44,4 % (Abbildung 9). Losartan reduzierte die Sterblichkeit in TG/L und erhöhte die mittlere Überlebensrate von 116 auf 192,5 Tage (N = 18 Ende, $p < 0,05$; Abbildung 9). Keines der Wildtypen (WT und WT/L) starb innerhalb des Beobachtungszeitraums.

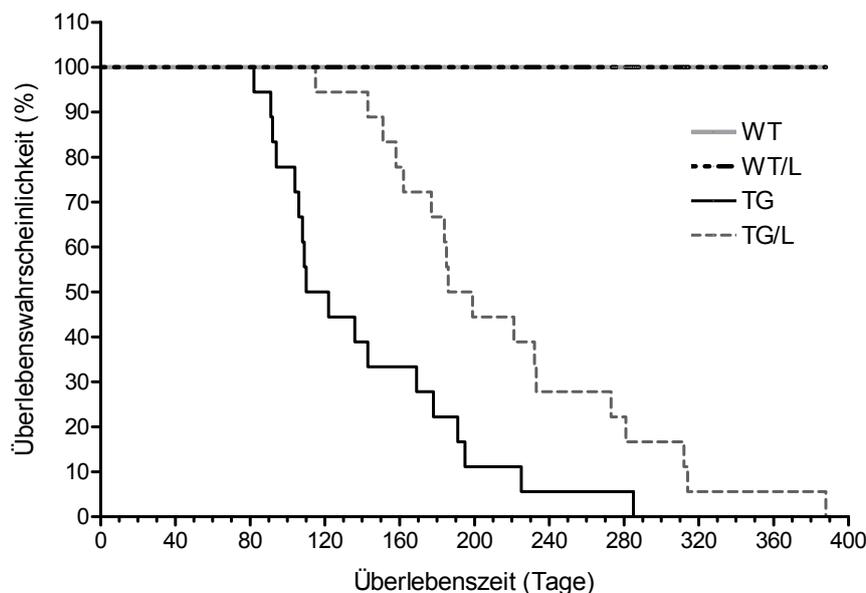


Abbildung 9: Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit von TG und WT unter Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung) mit Hilfe der Kaplan-Meier Statistik, N = 18 Ende, $p < 0,05$ TG vs. WT, TG/L vs. WT/L und TG vs. TG/L.

Unter Betrachtung der geschlechtsspezifischen Unterschiede ergab sich unter Losartanbehandlung eine Erhöhung der mittleren Überlebenswahrscheinlichkeit von 109,5 auf 221 Tage bei den weiblichen transgenen Tieren (N = 8 - 10 Ende, $p < 0,05$; Abbildung 10) im Gegensatz zu den männlichen transgenen Tieren von 139,5 auf 184 Tage (N = 8 - 10 Ende, $p < 0,05$; Abbildung 11).

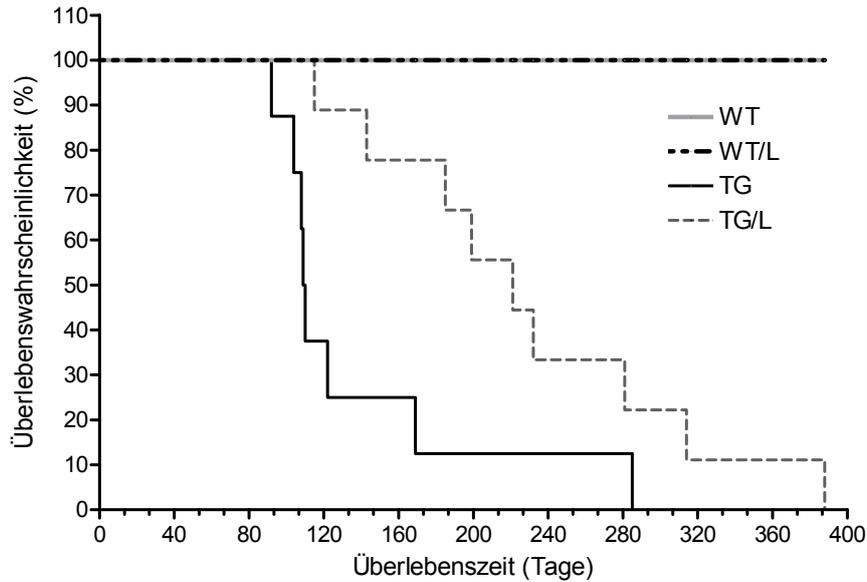


Abbildung 10: Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit von weiblichen TG und WT unter Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung) mit Hilfe der Kaplan-Meier Statistik, $N = 8$ Ende für WT, $N=9$ Ende für WT/L und TG/L und $N = 10$ Ende für TG, $p < 0,05$ TG vs. WT, TG/L vs. WT/L und TG vs. TG/L.

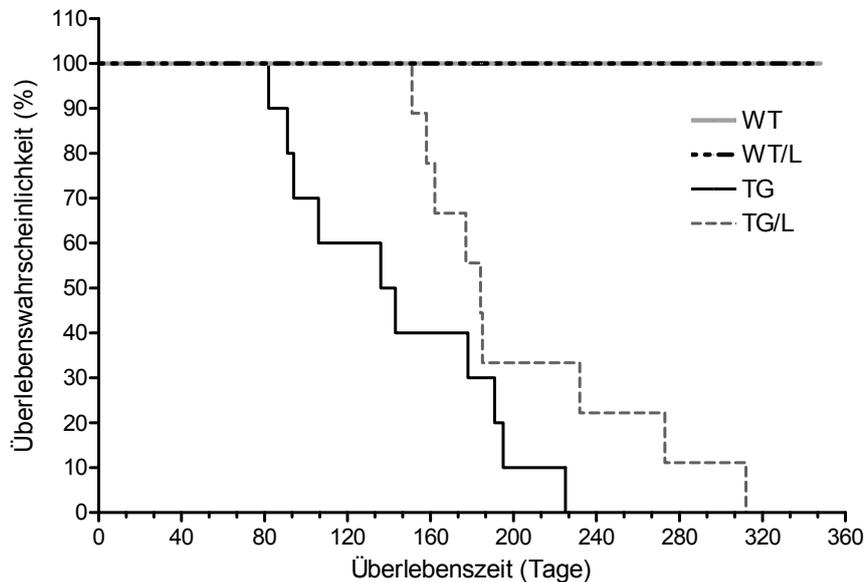


Abbildung 11: Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit von männlichen TG und WT unter Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung) mit Hilfe der Kaplan-Meier Statistik, $N = 8$ Ende für TG, $N = 9$ Ende für WT/L und TG/L und $N = 10$ Ende für WT, $p < 0,05$ TG vs. WT, TG/L vs. WT/L und TG vs. TG/L.

Die Überlebensrate der weiblichen transgenen Tiere sank nach 122 Tagen auf 25 % (Abbildung 10) und die Überlebensrate der männlichen transgenen Tiere sank erst nach 136 Tagen auf 50 % (Abbildung 11). Bei den WT lag die Überlebensrate nach 4 Monaten sowohl unter Losartanbehandlung als auch unter Kontrollbedingung bei 100 % (Abbildungen 10 und 11).

Um die Wirkung von Losartan auf eine bereits ausgebildete Herzinsuffizienz hin zu untersuchen, wurde eine Interventionsstudie durchgeführt. Nach einem Zeitraum von 120 Tagen erhielten die Mäuse in der Gruppe WT/L beziehungsweise TG/L Losartan über das Trinkwasser. Den Mäusen in der Gruppe WT beziehungsweise TG wurde weiter Trinkwasser verabreicht. Losartan reduzierte auch hier die Sterblichkeit in TG/L und erhöhte die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit von 138,5 auf 175,5 Tage (N = 7 - 8 Ende, $p < 0,05$; Abbildung 12). Innerhalb des Beobachtungszeitraums starb keiner der WT beziehungsweise WT/L.

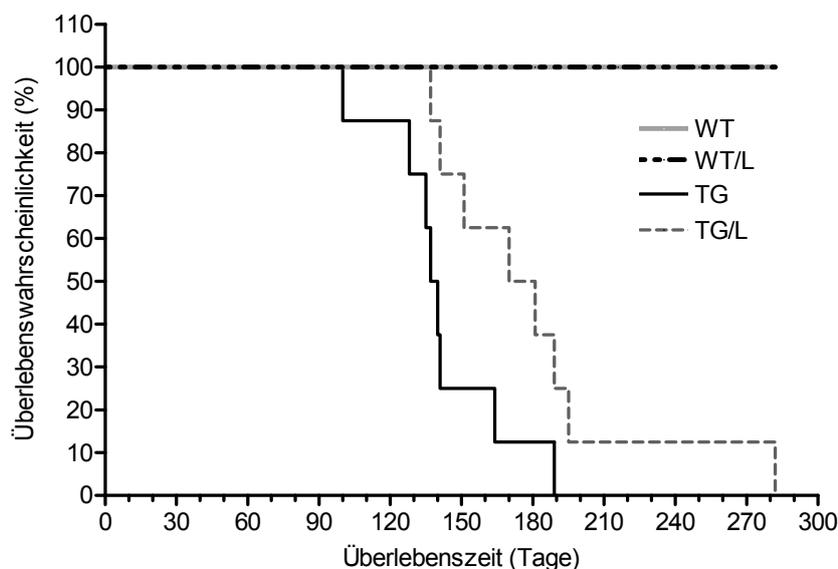


Abbildung 12: Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit der Interventionsstudie von TG und WT unter Losartanbehandlung nach 120 Tagen (L) oder unter Trinkwasser allein über den gesamten Zeitraum mit Hilfe der Kaplan-Meier Statistik, N = 8 Ende für WT, TG und TG/L und N = 7 Ende für WT/L, $p < 0,05$.

4.1.2 Morphologische Parameter

Zur genaueren Charakterisierung des Phänotyps der CSQ-Mäuse wurden zunächst verschiedene morphologische Parameter analysiert. In TG waren im Vergleich zu WT die Herzgewichte sowie die Herzgewicht-Körpergewicht-Quotienten vergrößert, was ein Anzeichen für eine Herzhypertrophie in TG darstellt (Tabellen 13 und 14). Eine verschlechterte Herzfunktion konnte in 2 sowie 5 Monate alten TG gezeigt werden.

Die Herzen der TG unter Kontrollbedingung waren gegenüber den Herzen von WT stark vergrößert (Abbildungen 13 und 14). Dies betraf auch den linken Vorhof (Abbildung 14). Unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung nahmen die Herzgewichte sowie die Herzgewicht-Körpergewicht-Quotienten (Tabelle 14) und allgemein die Herzgröße (Abbildung 13) in TG im Alter von 5 Monaten ab.

Die Lungengewichte waren im Alter von 5 Monaten in den TG höher im Vergleich zu WT, welche jedoch unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung verringert werden konnten (Tabelle 14). Hingegen wiesen die Lungengewichte von TG und WT im Alter von 2 Monaten kaum sichtbare Unterschiede auf (Tabelle 13). Ebenso wenig konnten die Herzgewichte in TG unter Losartan (nach 1 Monat Losartanbehandlung) verringert werden. Die Nierengewichte und Lebergewichte wiesen keine Veränderungen zwischen WT und TG im Alter von 2 und 5 Monaten auf (Tabellen 13 und 14). Ebenfalls wiesen die Körpergewichte von TG und WT im Alter von 2 Monaten unter einer 1-monatigen Losartanbehandlung oder Trinkwasser allein keine Unterschiede auf (Tabelle 13). Allerdings, war nach 5 Monaten das Körpergewicht der TG im Vergleich zu WT verringert (Tabelle 14). Jedoch konnte hier nach einer 4-monatigen Losartanbehandlung das Körpergewicht nicht beeinflusst werden; es war allerdings eine Tendenz ersichtlich (Tabelle 14).

Tabelle 13: Morphologischen Parameter von TG und WT unter einer 1-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrolle) im Alter von 2 Monaten.

Parameter	<u>Mäuse im Alter von 2 Monaten</u>			
	<u>Kontrolle</u>		<u>Losartan</u>	
	WT	TG	WT/L	TG/L
<i>N</i>	7	7	7	7
Körpergewicht (g)	28,1 ± 1,0	30,0 ± 1,1	27,7 ± 0,8	29,8 ± 1,0
Herzgewicht (mg)	180 ± 7	336 ± 19*	178 ± 4	324 ± 14*
Herzgewicht-Körpergewicht-Quotient (mg/g)	6,4 ± 0,2	11,2 ± 0,3*	6,4 ± 0,1	10,9 ± 0,4*
Lungengewicht (mg)	160 ± 3	164 ± 5	170 ± 3	173 ± 6
Nierengewicht (mg)	404 ± 34	400 ± 24	323 ± 29	429 ± 36
Lebergewicht (g)	1,46 ± 0,06	1,66 ± 0,12	1,46 ± 0,05	1,50 ± 0,04

* $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, * $p < 0,05$ TG vs. TG/L

Tabelle 14: Morphologischen Parameter von TG und WT unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrolle) im Alter von 5 Monaten.

Parameter	<u>Mäuse im Alter von 5 Monaten</u>			
	<u>Kontrolle</u>		<u>Losartan</u>	
	WT	TG	WT/L	TG/L
<i>N</i>	11	11	11	11
Körpergewicht (g)	35,8 ± 1,2	30,3 ± 1,5*	35,2 ± 1,4	34,5 ± 1,2
Herzgewicht (mg)	200 ± 11	459 ± 23**	213 ± 12	373 ± 26*
Herzgewicht-Körpergewicht-Quotient (mg/g)	5,6 ± 0,2	15,5 ± 1,1**	6,0 ± 0,2	10,9 ± 0,8*
<i>N</i>	7	7	7	7
Lungengewicht (mg)	185 ± 5	248 ± 18**	181 ± 7	198 ± 12
Nierengewicht (mg)	473 ± 41	361 ± 35	498 ± 46	453 ± 41
Lebergewicht (g)	1,86 ± 0,16	1,55 ± 0,10	1,86 ± 0,14	1,71 ± 0,11

* $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, ** $p < 0,05$ TG vs. TG/L



Abbildung 13: Darstellung charakteristischer Mausherzen im Alter von 5 Monaten unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung).

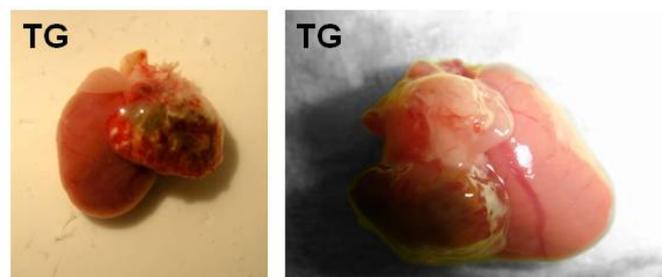


Abbildung 14: Darstellung charakteristischer Herzen von TG im Alter von 5 Monaten.

4.1.3 Laborchemische Parameter

Eventuell auftretende Veränderungen des Wasser-Elektrolyt-Haushalts wurden durch die Analyse verschiedener laborchemischer Parameter aus Plasmaproben der jeweiligen Mausgruppen näher analysiert. Die Plasmakonzentrationen von Natrium und ACE waren in TG und WT unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung oder unter Kontrollbedingung unverändert (Tabelle 15). Die Plasmakonzentration von Kreatinin war nur in TG/L erhöht; in den anderen Gruppen blieb sie hingegen unverändert (Tabelle 15). Außerdem war in den TG die Plasmakonzentration von Harnstoff deutlich erhöht, welche jedoch unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung nicht vermindert werden konnte (Tabelle 15). In den WT unter Kontrollbedingung sowie unter Losartanbehandlung blieb die Plasmakonzentration von Harnstoff unverändert (Tabelle 15).

Tabelle 15: Vergleich der laborchemischen Parameter der Plasmaproben von TG und WT unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrolle) im Alter von 5 Monaten.

<u>Mäuse im Alter von 5 Monaten</u>				
Plasmakonzentration	<u>Kontrolle</u>		<u>Losartan</u>	
	WT	TG	WT/L	TG/L
<i>N</i>	5	5	5	4
Natrium (mmol/l)	149,4 ± 2,7	150,6 ± 2,0	154,0 ± 2,2	152,5 ± 0,9
Kreatinin (µmol/l)	21,6 ± 0,8	22,4 ± 1,9	21,4 ± 0,5	29,3 ± 1,7*
Harnstoff (mmol/l)	9,3 ± 0,8	14,6 ± 1,2*	8,0 ± 0,5	15,7 ± 1,3*
ACE (U/l)	2,0 ± 0,5	2,6 ± 0,6	3,1 ± 0,6	1,6 ± 0,5

* $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L

4.2 Herzmorphologie und Histopathologie

4.2.1 Histologische Färbungen und Fibrosequantifizierung

In histologischen Gewebeschnitten wurden strukturelle Veränderungen in den Herzen von TG im Vergleich zu WT untersucht. In den TG konnten histologische Anzeichen für eine dilatative Kardiomyopathie im Vergleich zu WT nachgewiesen werden (Abbildung 15). Zwischen WT unter Kontrollbedingung oder unter Losartanbehandlung konnten hingegen keine Unterschiede in der Herzmorphologie festgestellt werden (Abbildung 15).

Des Weiteren waren in Nierenschnitten von TG keine histopathologischen Abnormitäten sichtbar (Abbildung 16).

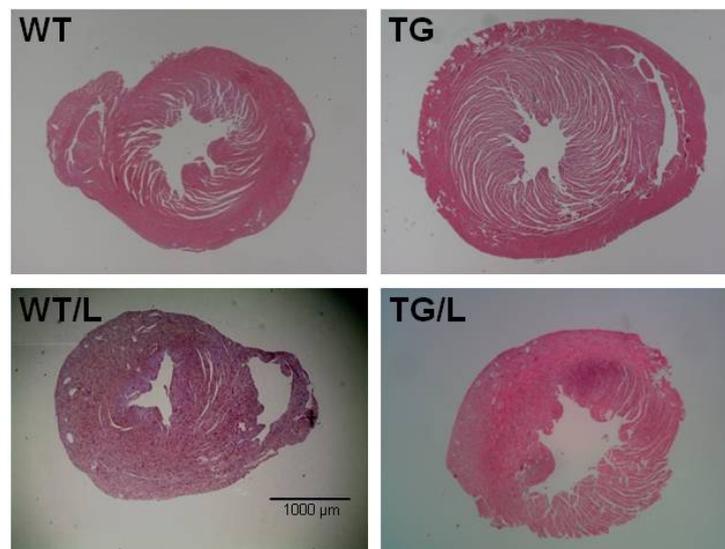


Abbildung 15: Darstellung charakteristischer Färbungen von Herzschnitten mit Hämatoxylin-Eosin (Vergrößerung, 20fach). Die kardiale Hypertrophie in den TG ist deutlich zu erkennen.

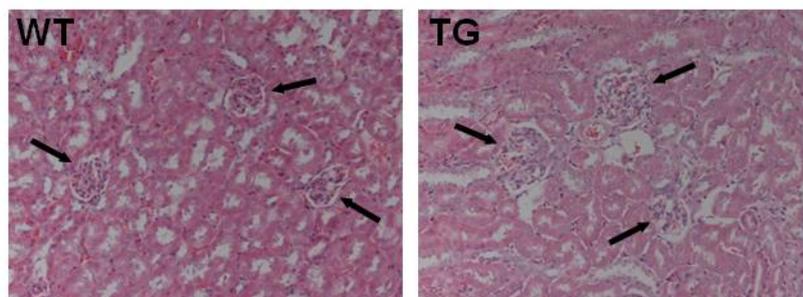


Abbildung 16: Darstellung charakteristischer Färbungen von Nierenschnitten mit Hämatoxylin-Eosin (Vergrößerung, 40fach). Die Pfeile zeigen die Glomeruli, die von Tubuli, Ateriolen und Sammelrohren umgeben sind. Zwischen WT und TG sind keine Unterschiede zu erkennen.

Zusätzlich zur Herzhypertrophie zeigten die TG einen erhöhten Grad an Fibrose im Vergleich zu WT, dargestellt mittels Siriusrot-Färbung (Abbildungen 17 und 18, Abschnitt 3.2.1). Unter einer 1-monatigen sowie einer 4-monatigen Losartanbehandlung konnte diese Zunahme vermindert werden (Abbildungen 17 und 18) und in 2 Monate alten TG (nach 1 Monat Losartanbehandlung) sogar fast auf Normalniveau des WT reduziert werden (Abbildung 18a). Die Fibroserate in WT-Herzen war minimal (Abbildung 18).

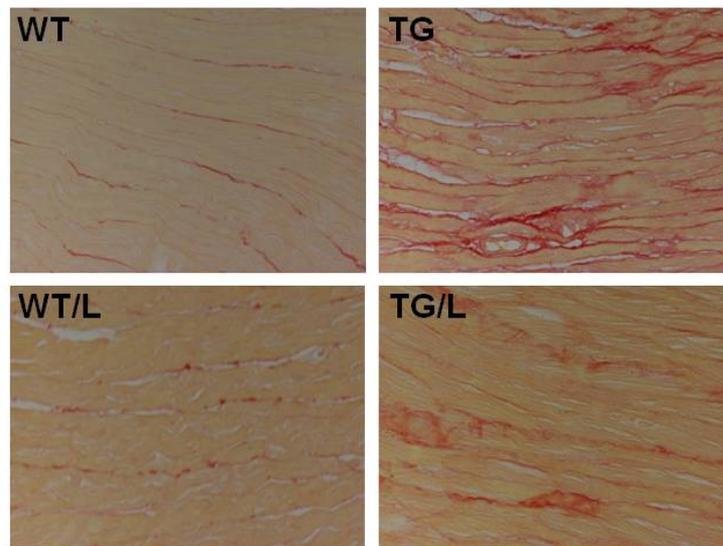


Abbildung 17: Darstellung charakteristisch gefärbter Herzschnitte mit Piko-Siriusrot zur Quantifizierung der Fibrose (Vergrößerung, 40fach). Fibrotisches Gewebe ist rot eingefärbt.

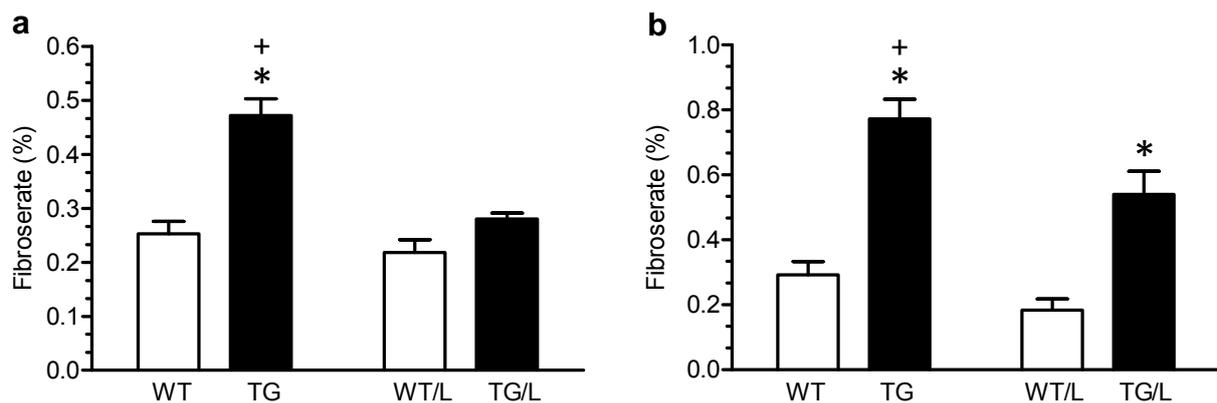


Abbildung 18: Darstellung der Fibroserate von 2 Monate (a; N = 9; nach 1 Monat Losartanbehandlung) alten sowie 5 Monate (b; N = 8 für WT, TG und WT/L und N = 6 für TG/L; nach 4 Monaten Losartanbehandlung) alten Mäusen unter Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). * $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, + $p < 0,05$ TG vs. TG/L.

4.2.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Zur näheren Betrachtung von Veränderungen in den Myofibrillen und Mitochondrien wurden elektronenmikroskopische Messungen durchgeführt. In der Elektronenmikroskopie von TG im Alter von 5 Monaten (Abbildung 19a und b) waren die Myofibrillen und Mitochondrien unregelmäßiger angeordnet als beim WT (Jones et al. 1998). Losartan (nach 4 Monaten Losartanbehandlung) bedingt eine regelmäßigere Anordnung der Myofibrillen und Mitochondrien (Abbildung 19c). Außerdem waren in TG zahlreiche Vakuolen (Abbildung 19a) und mitochondriale Cluster (Abbildung 19b) präsent, welche unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (Abbildung 19c) fehlten. Lipofuscin-Anhäufungen wurden nur in den Herzen von unbehandelten TG, aber nicht in mit Losartan-behandelten Herzen entdeckt (Abbildung 19b). Lipofuscin, auch als Alterspigment bezeichnet, ist ein gelb-braunes oxidiertes quervernetztes Aggregat, bestehend aus oxidierten Protein- (30-58 %) und Lipidclustern (19-51 %), das in Herzmuskelzellen mit der Zeit akkumuliert.

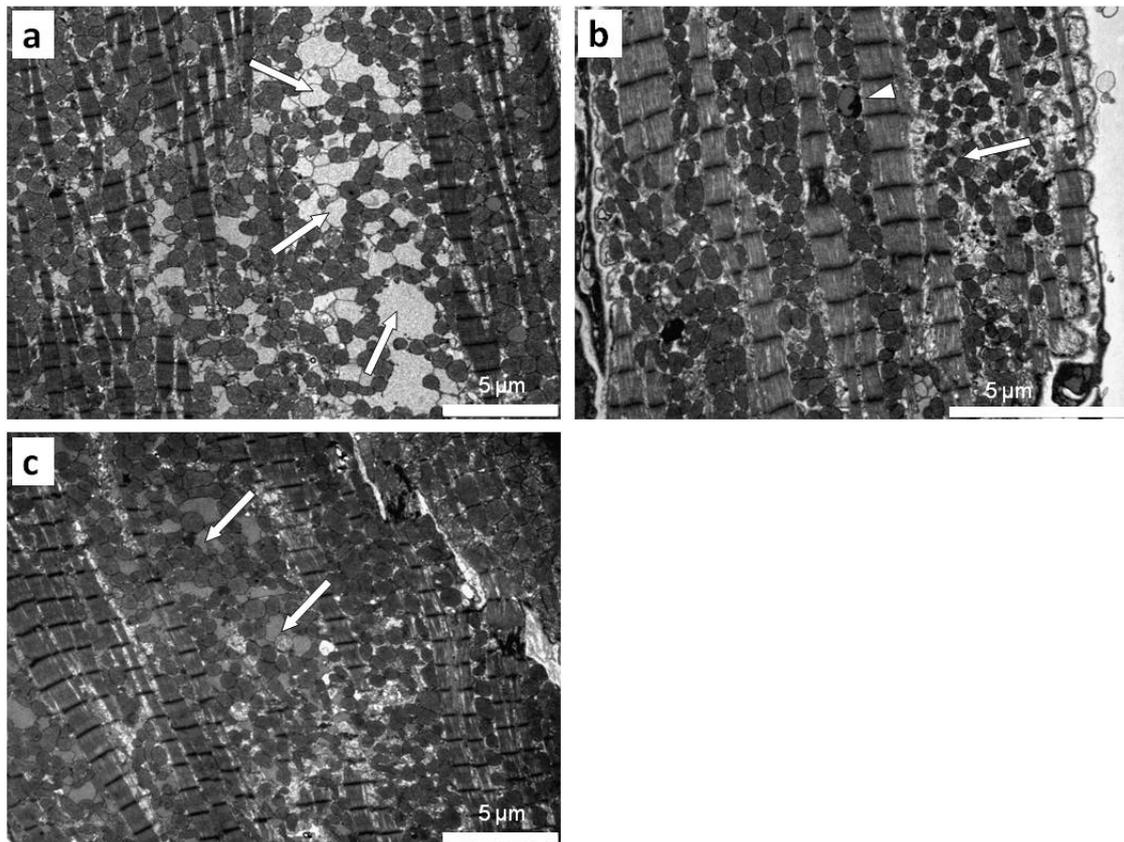


Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Darstellung der TG-Herzen im Alter von 5 Monaten unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). Abbildung a zeigt die unregelmäßige Anordnung der Myofibrillen und der Mitochondrien sowie die hohe Anzahl an Vakuolen (Pfeile) in TG. Abbildung b zeigt die mitochondrialen Cluster (Pfeil) und das Alterspigment Lipofuscin (Pfeilkopf) in TG. Abbildung c zeigt eine regelmäßigere Anordnung der Myofibrillen und Mitochondrien in TG unter Losartanbehandlung.

4.3 Hämodynamische Untersuchungen

4.3.1 „Working Heart“-Untersuchungen

Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit die Veränderung der morphologischen Parameter, die Fibrose sowie die Veränderungen auf zellulärer Ebene zu Störungen der Herzfunktion führen können. Durch Messungen am isolierten Arbeit-leistenden Herzen („Working Heart“) konnte die linksventrikuläre Funktion unabhängig von neuronalen oder endokrinen Einflüsse untersucht werden. In isolierten „Working Heart“-Präparationen wurden verminderte Herzfrequenzen und LV-Drücke gemessen, genauso wie verminderte maximale ($+dP/dt_{\max}$) und minimale ($-dP/dt_{\max}$) Werte der 1. Ableitung des LV-Drucks unter Basalbedingungen in TG-Herzen verglichen mit WT (Tabellen 16 und 17). Im Alter von 5 Monaten (nach 4 Monaten Losartanbehandlung) zeigten die hämodynamischen Parameter, einschließlich des LV-Drucks (Abbildung 20a) sowie $\pm dP/dt_{\max}$ (Tabelle 17), in TG/L-Herzen eine geringere Verschlechterung und eine konstantere Herzfrequenz im Vergleich zu TG (Abbildung 20b). Jedoch blieben die kontraktile Parameter in TG/L im Alter von 2 Monaten (nach 1 Monat Losartanbehandlung) im Vergleich zu TG unverändert. Nur die Herzfrequenz von 2 Monate alten TG-Tieren wurde unter der Losartanbehandlung von 1 Monat verbessert (Tabelle 16).

Tabelle 16: Vergleich der hämodynamischen Parameter von TG und WT unter einer 1-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrolle) im Alter von 2 Monaten.

<u>Mäuse im Alter von 2 Monaten</u>				
Parameter	<u>Kontrolle</u>		<u>Losartan</u>	
	WT	TG	WT/L	TG/L
<i>N</i>	6	6	6	6
Herzfrequenz (bpm)	311 ± 11	127 ± 19 ⁺ *	309 ± 14	210 ± 26*
LV-Druck (mmHg)	85 ± 1.8	31 ± 4,2*	93 ± 7,1	35 ± 4,4*
+dP/dt _{max} (mmHg/s)	2261 ± 170	367 ± 98*	3194 ± 328	592 ± 134*
-dP/dt _{max} (mmHg/s)	-1594 ± 139	-249 ± 50*	-2010 ± 308	-424 ± 93*

* $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, ⁺ $p < 0,05$ TG vs. TG/L

Tabelle 17: Vergleich der hämodynamischen Parameter von TG und WT unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrolle) im Alter von 5 Monaten.

<u>Mäuse im Alter von 5 Monaten</u>				
Parameter	<u>Kontrolle</u>		<u>Losartan</u>	
	WT	TG	WT/L	TG/L
<i>N</i>	5	5	5	5
Herzfrequenz (bpm)	257 ± 23	$120 \pm 28^{*+}$	307 ± 10	$223 \pm 8^*$
LV-Druck (mmHg)	$102 \pm 7,7$	$14 \pm 1,2^{*+}$	$93 \pm 2,8$	$54 \pm 9,8^*$
+dP/dt _{max} (mmHg/s)	3639 ± 226	$84 \pm 17^{*+}$	3480 ± 99	$1095 \pm 305^*$
-dP/dt _{max} (mmHg/s)	-1998 ± 268	$-76 \pm 16^{*+}$	-2177 ± 137	$-749 \pm 168^*$

* $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, + $p < 0,05$ TG vs. TG/L

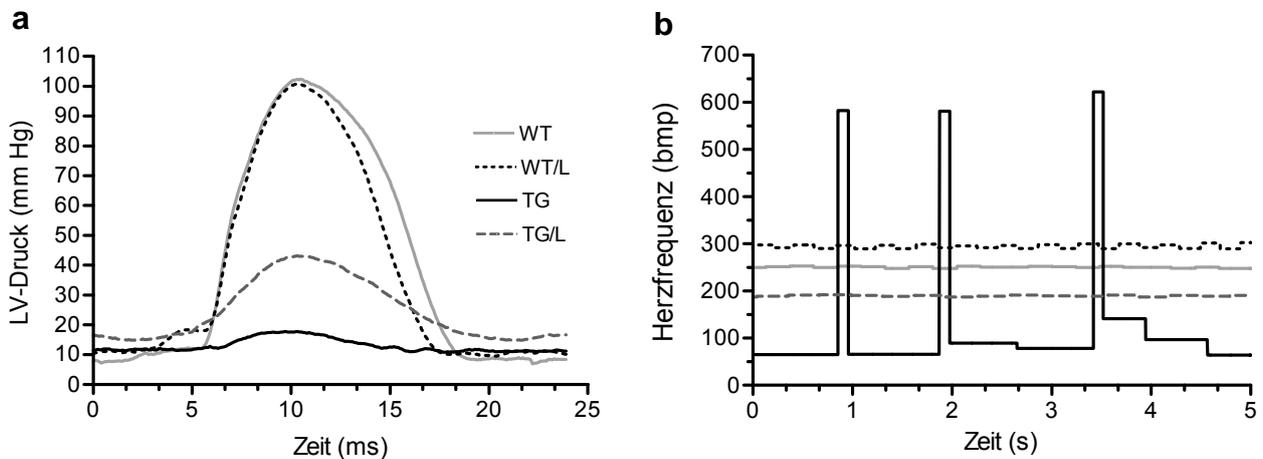


Abbildung 20: Darstellung repräsentativer Beispiele von isolierten „Working Heart“-Präparationen. Abbildung a zeigt den linksventrikulären Druck und Abbildung b die Herzfrequenz von TG und WT unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung) im Alter von 5 Monaten.

4.3.2 Elektrokardiographische Messungen

Zur Kontrolle der elektrischen Herzfunktion wurden Oberflächen-EKGs verwendet. Die EKG-Aufnahmen wurden hinsichtlich Anzeichen für Herzhypertrophie und Arrhythmien untersucht. TG unter Kontrollbedingung wiesen breitere QRS-Komplexe und längere QT-Intervalle im Vergleich zu WT auf (Tabelle 18). Die QT-Intervalle blieben sogar nach der Anpassung an die verlangsamte Herzfrequenz (QTc) verlängert. Losartan verminderte deutlich die Dauer der QRS-Komplexe und die QT-Intervalle, genau wie die QTc-Intervalle in TG/L. Die EKG-Aufnahmen von gleichaltrigen WT-Geschwistertieren wiesen keine Veränderungen in der Erregungsbildung und Erregungsweiterleitung auf (Abbildung 21a). Abbildung 21b demonstriert deutlich die verschiedenen Typen von EKG-Veränderungen, wie verschiedene Grade des AV-Blocks, ventrikuläre Extrasystolen und die Verbreiterung sowie das Aufspalten der P-Welle, welche nur in TG gefunden wurden. Die EKG-Messungen sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Vergleich der EKG-Messungen von TG und WT unter Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrolle) im Alter von 2 und 5 Monaten.

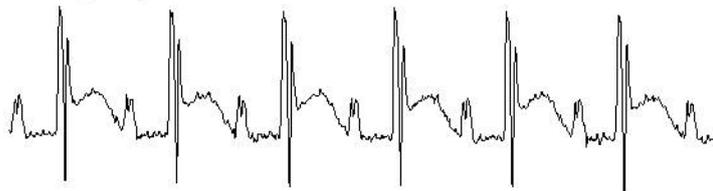
Parameter	<u>Kontrolle</u>		<u>Losartan</u>	
	WT	TG	WT/L	TG/L
<i>N</i>	12	12	12	12
Herzfrequenz (bmp)	367 ± 20	351 ± 30	346 ± 25	378 ± 19
QRS-Komplex (ms)	13 ± 1	26 ± 1 ^{*+}	12 ± 1	16 ± 1
<i>N</i>	12	8	12	8
PR-Intervall (ms)	41 ± 2	47 ± 4	37 ± 2	42 ± 5
<i>N</i>	6	11	5	5
QT-Intervall (ms)	19 ± 3	71 ± 7 ^{*+}	22 ± 1	32 ± 4
QTc-Intervall (ms)	46 ± 7	173 ± 16 ^{*+}	46 ± 2	79 ± 10

**p < 0,05 TG vs. WT, ⁺p < 0,05 TG vs. TG/L*

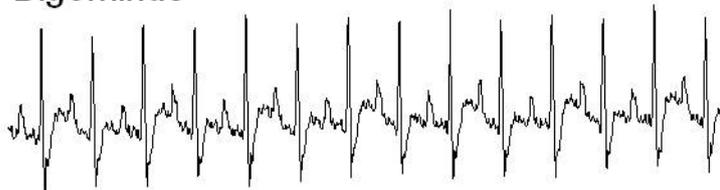
a WT



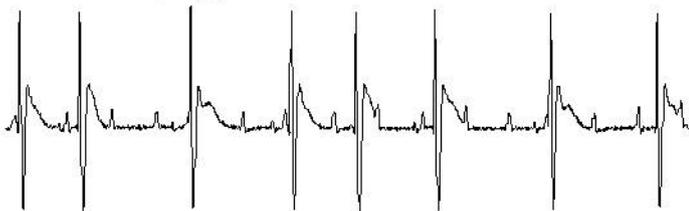
b TG: gespaltene P-Welle



Bigeminus



AV-Block II, Typ Wenckebach



Trigeminus



Abbildung 21: Repräsentative EKG-Aufnahmen von TG und WT unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). In Abbildung b sind verschiedene Unregelmäßigkeiten dargestellt, welche in TG beobachtet worden sind, wie die Verbreiterung und das Aufspalten der P-Welle (oberer Graph), ventrikuläre Extrasystolen (mittlerer und unterer Graph) und AV-Blockierung II. Grades des Typ Wenckebach (mittlerer Graph).

4.3.3 Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an linken Herzvorhöfen

Um eine Aussage über die Veränderung der Kontraktionskraft unter Einwirkung von Koffein beziehungsweise nach Abschalten der elektrischen Stimulation für einen bestimmten Zeitraum („Post-Rest Potentiation“, PRP) oder bei verschiedenen Reizfrequenzen zu erhalten, wurden Untersuchungen an linken, isolierten Vorhöfen von WT und TG unter Kontrollbedingung beziehungsweise unter Losartanbehandlung an 5 Monate alten Mäusen (nach 4 Monaten Losartanbehandlung) durchgeführt.

Typische Mechanogramme der PRP-Messungen der einzelnen Gruppen sind in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt. Auffällig war die geringe Kontraktionskraft der isolierten linken Vorhöfe der CSQ-Mäuse unter Kontrollbedingung im Vergleich zu WT (Abbildung 24a). Unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung konnte die Kontraktionskraft hingegen in TG deutlich verbessert werden (Abbildung 24a). Auch in WT wurde die Kontraktionskraft unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung verbessert (Abbildung 24a). Bei den PRP-Messungen zeigten TG unter Kontrollbedingung gegenüber WT eine geringere Kontraktionskraft (angegeben als Prozent der Kraft im Gleichgewicht vor den Reizpausen) nach Abschalten der elektrischen Stimulation (Abbildung 24b und Tabelle 19). Eine Verbesserung wurde unter Losartan nur nach der niedrigsten Reizpause von 2,5 s in TG erreicht (Abbildung 24b und Tabelle 19). In den weiteren Reizpausen über längere Zeiträume war nur eine verbesserte Tendenz zum Anstieg der Kontraktionskraft in TG/L gegenüber TG ersichtlich (Tabelle 19). Zwischen den WT gab es bei der prozentualen Auswertung der Kontraktionskraft (Kontraktionskraft in Prozent der Kraft im Gleichgewicht vor den Reizpausen) keine Unterschiede (Abbildung 24b und Tabelle 19). Allerdings war unter alleiniger Betrachtung der Absolut-Werte die Kontraktionskraft aufgrund der höheren Ausgangswerte im Vergleich zu WT, unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung stärker (Abbildung 24a). Die PRP-Messungen zeigen deutlich einen Anstieg der Kontraktionskraft (angegeben als Prozent der Kraft im Gleichgewicht vor den Reizpausen) bis zu einer Reizpause von 30 s in TG und TG/L (Abbildung 24b). Danach fiel die Kontraktionskraft unter Zunahme der Reizpausen in TG unter Kontrollbedingung beziehungsweise unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung ab (Abbildung 24b). Bei den WT und WT/L hingegen stieg die Kontraktionskraft bis zu einer Reizpause von 60 s an (Abbildung 24b). Danach fiel auch hier die Kontraktionskraft in WT und WT/L unter Zunahme der Reizpausen ab (Abbildung 24b und Tabelle 19). Darüber hinaus zeigten die WT-Vorhöfe unter Kontrollbedingung eine sehr große Zunahme der Kontraktionskraft nach Reizpausen von 5 und 120 s (Abbildung 24b). Unter Betrachtung der Kontraktionskraft, angegeben als mN, ergaben sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Reizpausen, außer bei WT/L (Abbildung 24a). Hier konnte für Reizpausen von 30 s und vor allem 60 s ein starker Anstieg der Kontraktionskraft gezeigt werden (Abbildung 24a).

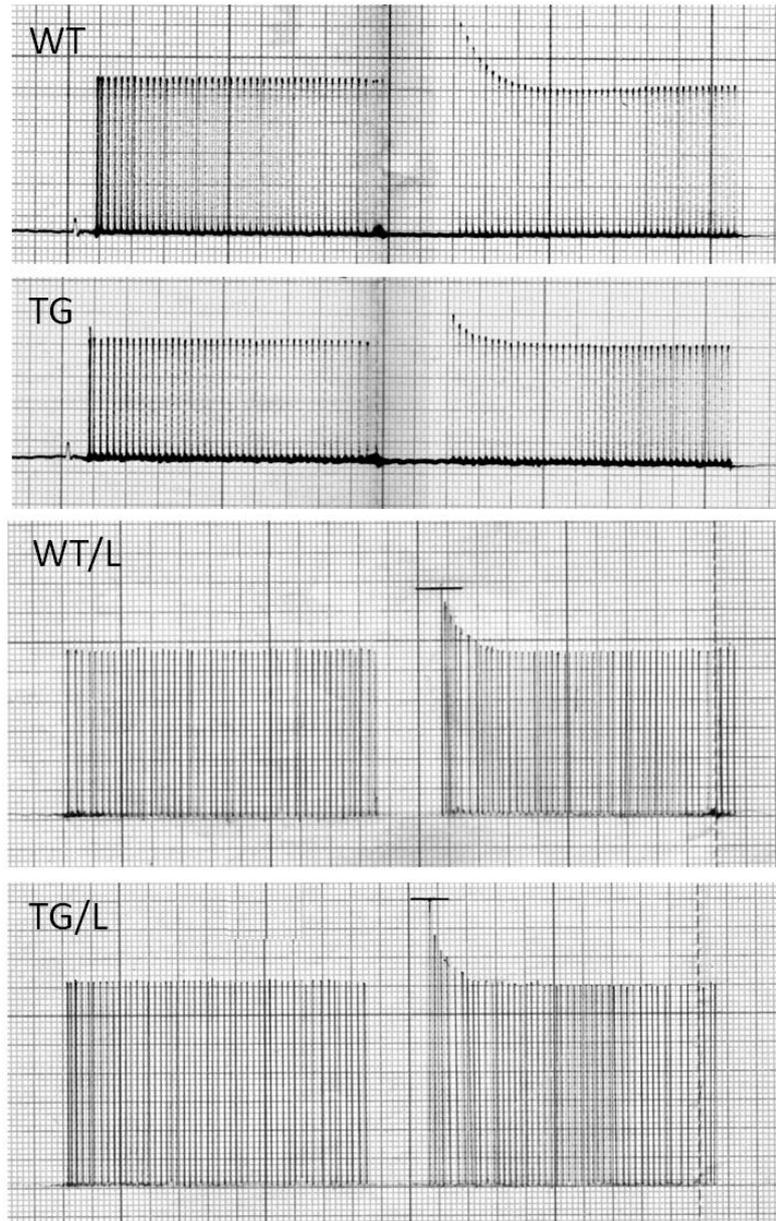


Abbildung 22: Darstellung der PRP-Messungen von 5 Monate alten Mäusen als repräsentative Mechanogramme zum Zeitpunkt von 10 s unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung).

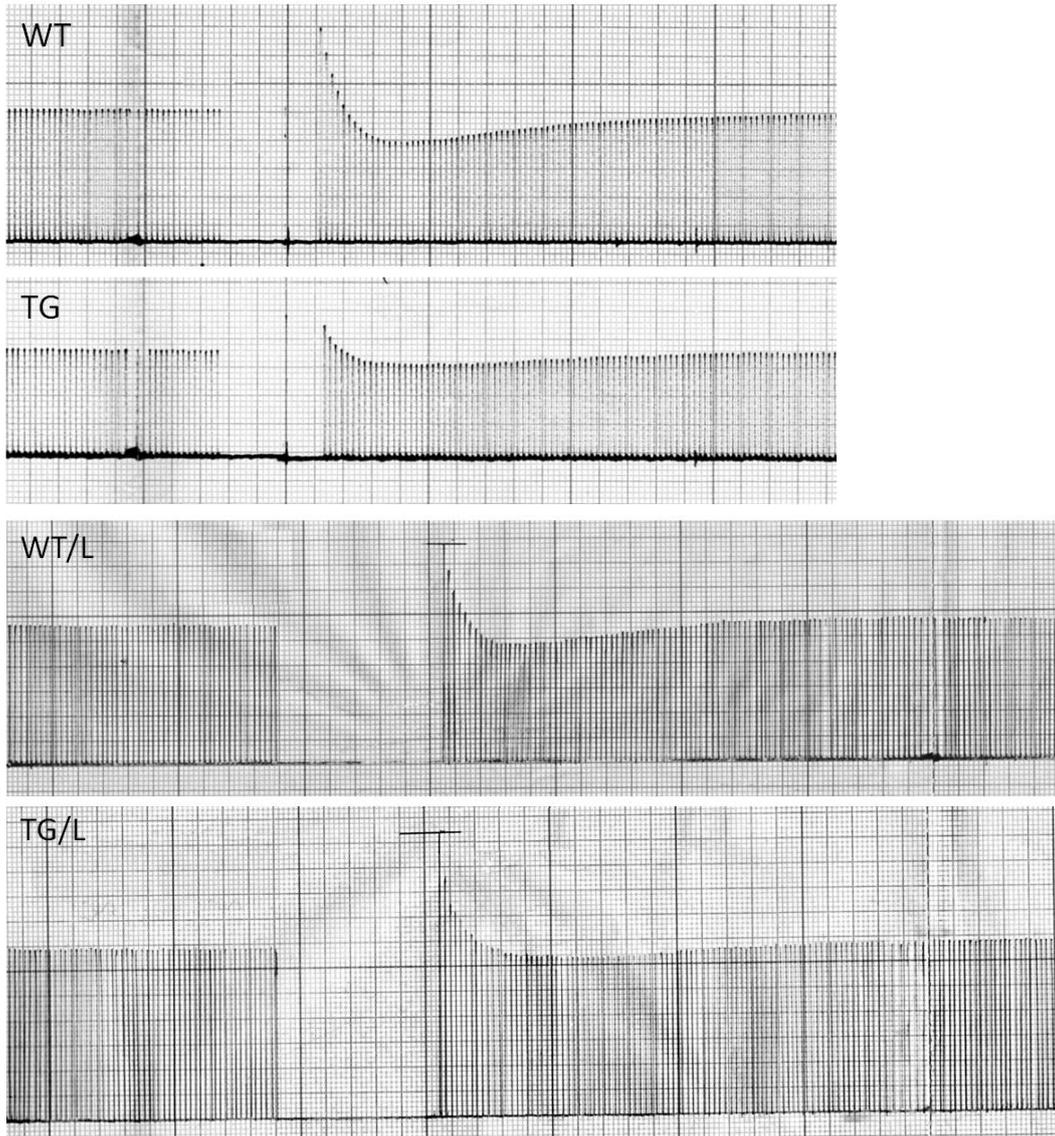


Abbildung 23: Darstellung der PRP-Messungen von 5 Monate alten Mäusen als repräsentative Mechanogramme zum Zeitpunkt von 60 s unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung).

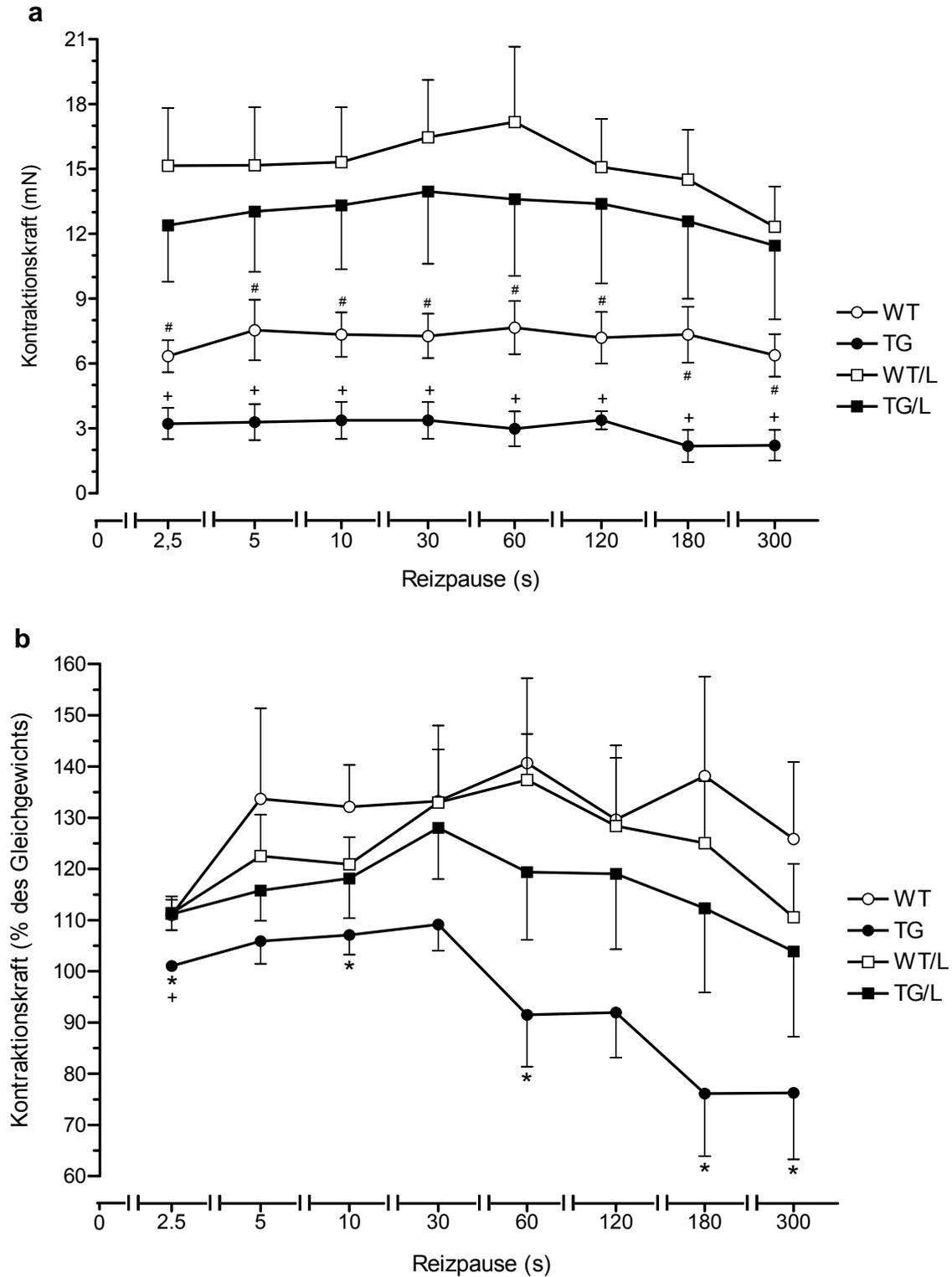


Abbildung 24: Darstellung der PRP-Messungen von 5 Monate alten Mäusen (N = 5) als Diagramm unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). Die Kontraktionskraft wurde zum einen ausgewertet in mN (a) und zum anderen als Prozent der Kraft im Gleichgewicht vor den fest definierten Reizpausen (b). * $p < 0,05$ TG vs. WT, + $p < 0,05$ TG vs. TG/L, # $p < 0,05$ WT vs. WT/L

Tabelle 19: Vergleich der Kontraktionskraft der PRP-Messungen, angegeben als Prozent der Kraft im Gleichgewicht vor den angegebenen Reizpausen, von TG und WT unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung oder unter Trinkwasser allein (Kontrolle) im Alter von 5 Monaten.

Reizpause	<u>Kontrolle</u>		<u>Losartan</u>	
	WT	TG	WT/L	TG/L
N	5	5	5	5
2,5 s	111,0 ± 3,3 %	101,1 ± 0,9 %**	111,4 ± 2,4 %	111,2 ± 2,8 %
5 s	133,7 ± 15,8 %	105,9 ± 3,9 %	122,5 ± 7,2 %	115,8 ± 5,3 %
10 s	132,2 ± 8,2 %	107,1 ± 3,9 %*	120,9 ± 5,3 %	118,2 ± 7,8 %
30 s	133,2 ± 13,2 %	109,1 ± 4,6 %	133,0 ± 9,3 %	128,0 ± 8,9 %
60 s	140,7 ± 14,8 %	91,5 ± 9,0 %*	137,4 ± 8,0 %	119,4 ± 11,8 %
120 s	129,9 ± 12,9 %	91,9 ± 7,9 %	128,4 ± 11,9 %	119,1 ± 13,2 %
180 s	138,2 ± 17,4 %	76,1 ± 11,0 %*	125,1 ± 10,8 %	112,3 ± 14,7 %
300 s	125,9 ± 13,4 %	76,3 ± 11,0 %*	110,6 ± 9,3 %	103,9 ± 15,0 %

* $p < 0,05$ TG vs. WT, † $p < 0,05$ TG vs. TG/L

Weiterhin wurden zur Untersuchung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR Messungen an isolierten linken Vorhöfen vor und nach Koffein-Gabe mit einer Konzentration von 10 mM durchgeführt. Auch bei diesen Messungen wurde deutlich, dass die Ausgangskontraktionskraft der TG-Herzen im Vergleich zu den drei anderen Gruppen erniedrigt war (Abbildung 25b). Unter der Zugabe von Koffein nahm zunächst die Kontraktionskraft zu (Abbildung 25a und c), fiel jedoch kurz danach wieder ab und pendelte sich nach einen Zeitraum von 10 min auf einen konstanten Wert ein (Abbildung 25a und d). Dieser Abfall der Kontraktionskraft nach 10 min war besonders stark bei den WT unter Kontrollbedingung beziehungsweise unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung ausgeprägt (Abbildung 25d). Bei den TG sowie bei den TG/L fiel die Kontraktionskraft hingegen nur minimal auf einen Wert von 76 ± 9 % für TG und 83 ± 9 % für TG/L ab (Abbildung 25d). Bei der maximal zu erreichenden Kontraktionskraft nach Koffein-Gabe konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden (Abbildung 25c).

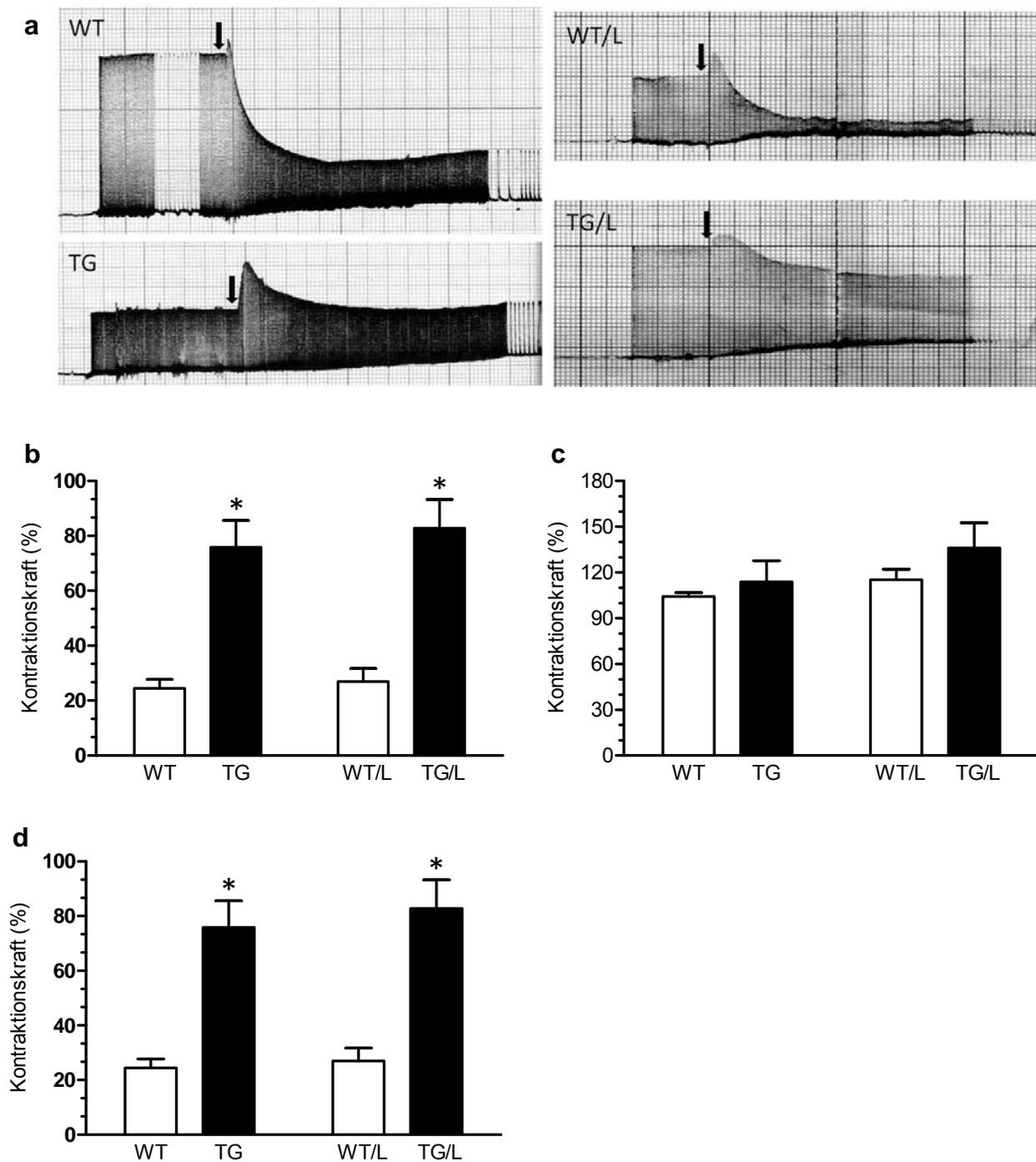


Abbildung 25: Darstellung der Koffein-Messungen von 5 Monate alten Mäusen ($N = 5$) als repräsentative Mechanogramme (a) und als Säulendiagramme unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). Angegeben ist die Ausgangskontraktionskraft in mN (b), sowie die maximale Kontraktionskraft nach der Koffein-Gabe von 10 mM (c) und die Kontraktionskraft 10 min nach der Koffein-Gabe (d). * $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, † $p < 0,05$ TG vs. TG/L.

Im Gegensatz zum menschlichen Herzen führt die Erhöhung der Reizfrequenz im Mäuse- und Rattenherzen zu einer Verminderung der Kontraktionskraft (Hoffman und Kelly 1959, Henderson et al. 1969). Dieses Phänomen wird auch als negative Kraft-Frequenz-Beziehung oder als „negative Treppe“ bezeichnet. Diese wurde in allen Gruppen, außer in den TG unter Kontrollbedingung, beobachtet (Abbildung 26, Tabellen 20 und 21). Der Abfall der Kontraktionskraft mit Erhöhung der Reizfrequenz bei den TG/L war schwächer ausgeprägt als bei den WT beziehungsweise WT/L (Tabellen 20 und 21). Unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung war jedoch die Kontraktionskraft in den TG-Mäusen mit Erhöhung der Reizfrequenz ab 2,5 Hz im Vergleich zu den TG-Mäusen unter Kontrollbedingung deutlich verringert (Tabellen 20 und 21). Die TG hingegen wiesen eine „positive Treppe“ auf; bei Erhöhung der Reizfrequenz erhöhte sich auch die Kontraktionskraft in den linken Vorhöfen (Abbildung 26, Tabellen 20 und 21).

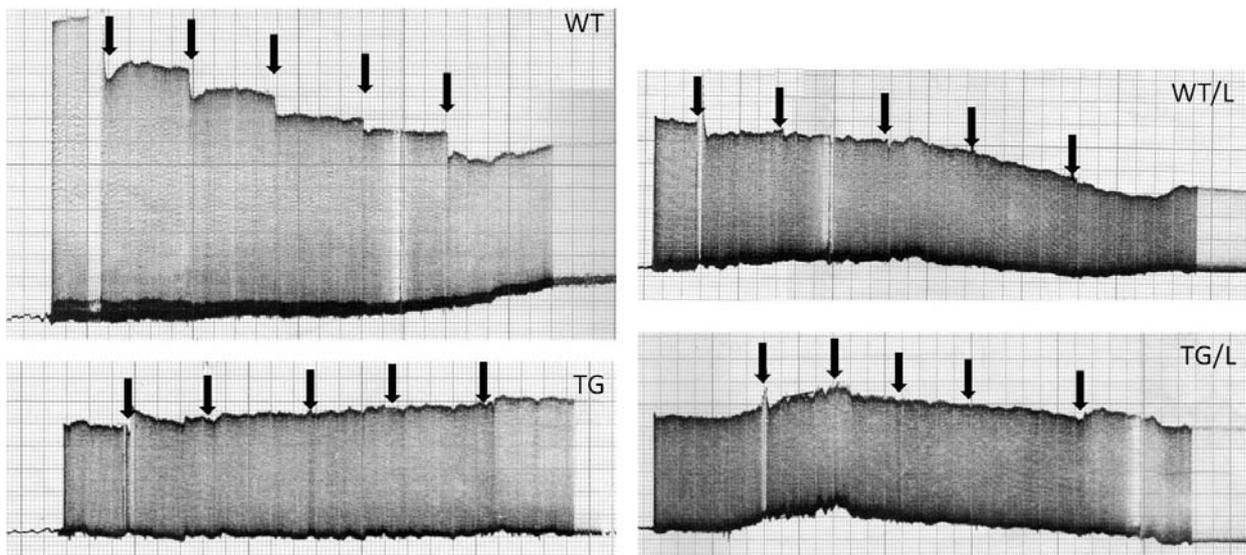


Abbildung 26: Darstellung repräsentativer Mechanogramme der Kraft-Frequenz-Beziehung von 5 Monate alten Mäusen unter Losartanbehandlung (L) beziehungsweise unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung).

Tabelle 20: Vergleich der Kontraktionskraft nach Erhöhung der Herzfrequenz, angegeben als mN, von TG und WT unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrolle) im Alter von 5 Monaten.

Reizfrequenz	<u>Kontrolle</u>		<u>Losartan</u>	
	WT	TG	WT/L	TG/L
N	5	4	5	5
1,0 Hz	11,6 ± 2,2 mN	2,3 ± 0,8 mN*	9,5 ± 1,6 mN	7,4 ± 1,6 mN
1,5 Hz	9,6 ± 1,5 mN	2,5 ± 0,8 mN**	7,8 ± 1,3 mN	13,0 ± 2,5 mN
2,0 Hz	8,8 ± 1,4 mN	2,7 ± 0,9 mN*	7,0 ± 1,3 mN	7,0 ± 1,3 mN
2,5 Hz	8,1 ± 1,3 mN	2,9 ± 0,8 mN*	6,3 ± 1,3 mN	6,9 ± 1,4 mN
3 Hz	7,1 ± 1,0 mN	3,0 ± 0,9 mN*	5,4 ± 1,0 mN	6,6 ± 0,5 mN
5 Hz	5,2 ± 0,9 mN [#]	3,3 ± 0,8 mN ⁺	4,0 ± 0,9 mN	6,4 ± 0,2 mN

* $p < 0,05$ TG vs. WT, ⁺ $p < 0,05$ TG vs. TG/L, [#] $p < 0,05$ WT vs. WT/L.

Tabelle 21: Vergleich der Kontraktionskraft nach Erhöhung der Herzfrequenz, angegeben als Prozent der Ausgangskontraktion, von TG und WT unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrolle) im Alter von 5 Monaten.

Reizfrequenz	<u>Kontrolle</u>		<u>Losartan</u>	
	WT	TG	WT/L	TG/L
N	5	4	5	5
1,0 Hz	100 %	100 %	100 %	100 %
1,5 Hz	84,4 ± 2,5 %	105,2 ± 3,4 %*	82,5 ± 1,0 %	100,6 ± 4,2 %*
2,0 Hz	77,4 ± 2,7 %	114,5 ± 5,2 %*	74,3 ± 3,2 %	99,5 ± 7,7 %*
2,5 Hz	71,5 ± 3,1 %	128,8 ± 8,3 %**	65,7 ± 3,5 %	97,4 ± 8,4 %*
3 Hz	63,9 ± 4,2 %	133,6 ± 11,1 %**	57,4 ± 3,3 %	93,0 ± 10,9 %*
5 Hz	48,0 ± 7,0 %	161,1 ± 16,2 %**	42,2 ± 4,7 %	91,0 ± 11,1 %*

* $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, ⁺ $p < 0,05$ TG vs. TG/L.

4.4 mRNA-Expression kardialer Ionenkanäle

Zusätzlich wurde die mRNA-Expression der α -Untereinheit des kardialen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals (LTCC) sowie des Kalium-Kanals (HERG) gemessen. In TG war die mRNA-Expression von LTCC im Vergleich zu WT vermindert (Abbildung 27a). Allerdings blieb der Gehalt der LTCC-Expression in TG/L, verglichen mit TG, unverändert (Abbildung 27a). Weiterhin konnte keine Veränderung in der mRNA-Expression von HERG zwischen TG und WT unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung oder unter Kontrollbedingung beobachtet werden (Abbildung 27b).

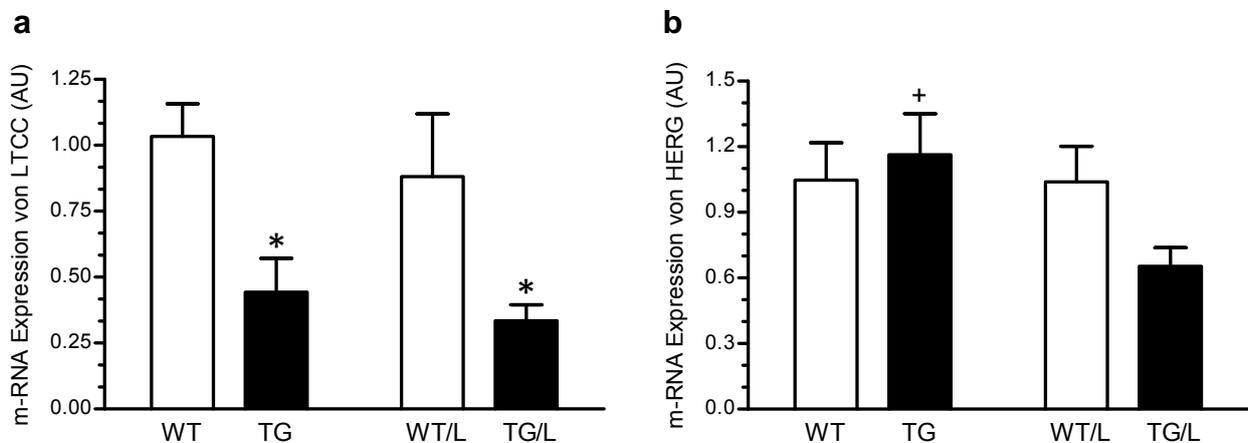


Abbildung 27: Darstellung der m-RNA-Expression von LTCC (a) sowie HERG (b) in 5 Monate alten Mäusen ($N = 5$ für WT und TG, $N = 6$ für TG/L und $N = 4$ für WT/L) unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). * $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, + $p < 0,05$ TG vs. TG/L.

4.5 Biochemische Effekte von Losartan im Myofilament

4.5.1 ATPase-Aktivität

Ein Anstieg im Verhältnis des Myofibrillen- zum Mitochondrien-Gehalt der Myozyten sowie eine reduzierte Myosin-ATPase-Aktivität sind ebenfalls für die verminderte Kraftentwicklung im insuffizienten Herzen verantwortlich. In TG im Alter von 4 Monaten war die ATPase-Aktivität im rechten sowie im linken Herzventrikel im Vergleich zu WT reduziert (Abbildung 28). Unter Losartan (nach 3 Monaten Losartanbehandlung) konnte die ATPase-Aktivität teilweise verbessert werden (Abbildung 28).

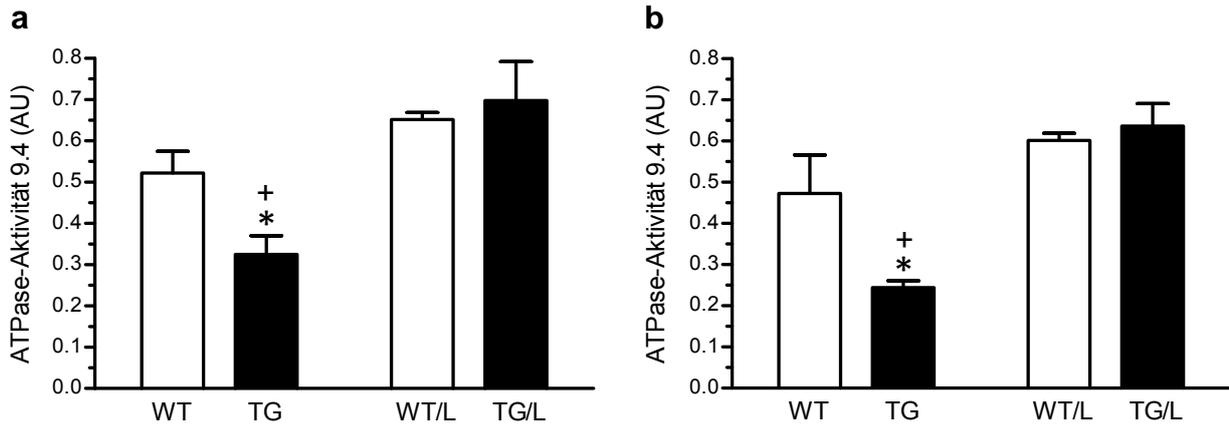


Abbildung 28: Darstellung der ATPase-Aktivität im linken (a) und im rechten (b) Ventrikel von 4 Monate alten Mäusen ($N = 4$) unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). * $p < 0,05$ TG vs. WT, + $p < 0,05$ TG vs. TG/L.

4.5.2 mRNA-Expression von ANP

Mittels RT-PCR wurde die mRNA-Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) in Herzen von 5 Monate alten Mäusen gemessen. Unter Kontrollbedingung war die mRNA-Expression von ANP in TG vergrößert, konnte jedoch unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (Abbildung 29) reduziert werden.

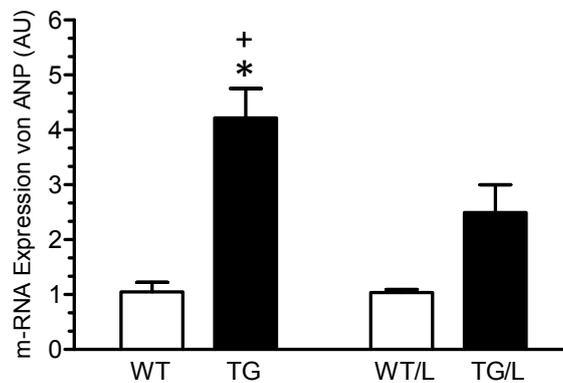


Abbildung 29: Darstellung der kardialen m-RNA-Expression von ANP in 5 Monate alten Mäusen ($N = 5$ für WT und TG, $N = 6$ für TG/L und $N = 4$ für WT/L) unter Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). * $p < 0,05$ TG vs. WT, + $p < 0,05$ TG vs. TG/L.

4.6 Expression kardialer Proteine

An der Ca^{2+} -Speicherung und -Freisetzung sind verschiedene Proteine des SR beteiligt und üben so einen direkten Einfluss auf die Regulation der Herzkontraktion aus. Um zu überprüfen, ob Losartan die Proteinexpression beeinflussen kann und ob Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase ersichtlich sind, wurde die Expression von wichtigen Ca^{2+} -regulierenden Proteinen des SR mittels Western Blot in TG und WT im Alter von 5 Monaten unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung oder unter Kontrollbedingung untersucht. In Abbildung 30 ist die Proteinabhängigkeit des CSQ repräsentativ dargestellt.

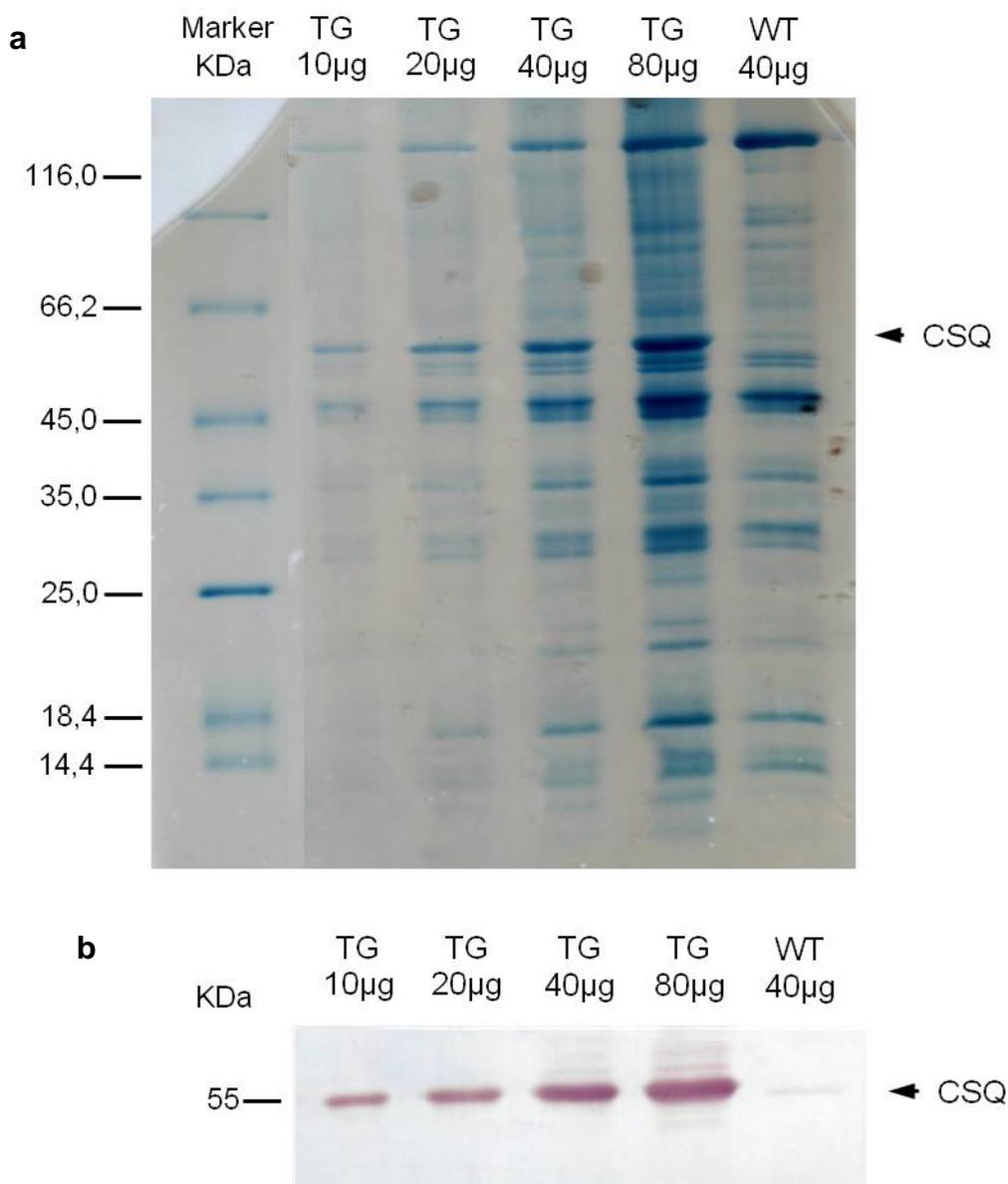


Abbildung 30: Darstellung der Signalstärke in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge des CSQ als repräsentatives Coomassie-gefärbtes Gel (a) und als repräsentativer Western Blot nach NBT/BCIP-Färbung (b).

Die kardiale Proteinexpression von CSQ in den TG war im Vergleich zu den WT vermehrt (Abbildung 31a und b). Allerdings waren keine Unterschiede in der Expression von SERCA2a und PLB zwischen TG und WT sichtbar (Abbildung 31a, c und d). Unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung blieb die Proteinexpression von CSQ, SERCA2a und PLB unverändert (Abbildung 31).

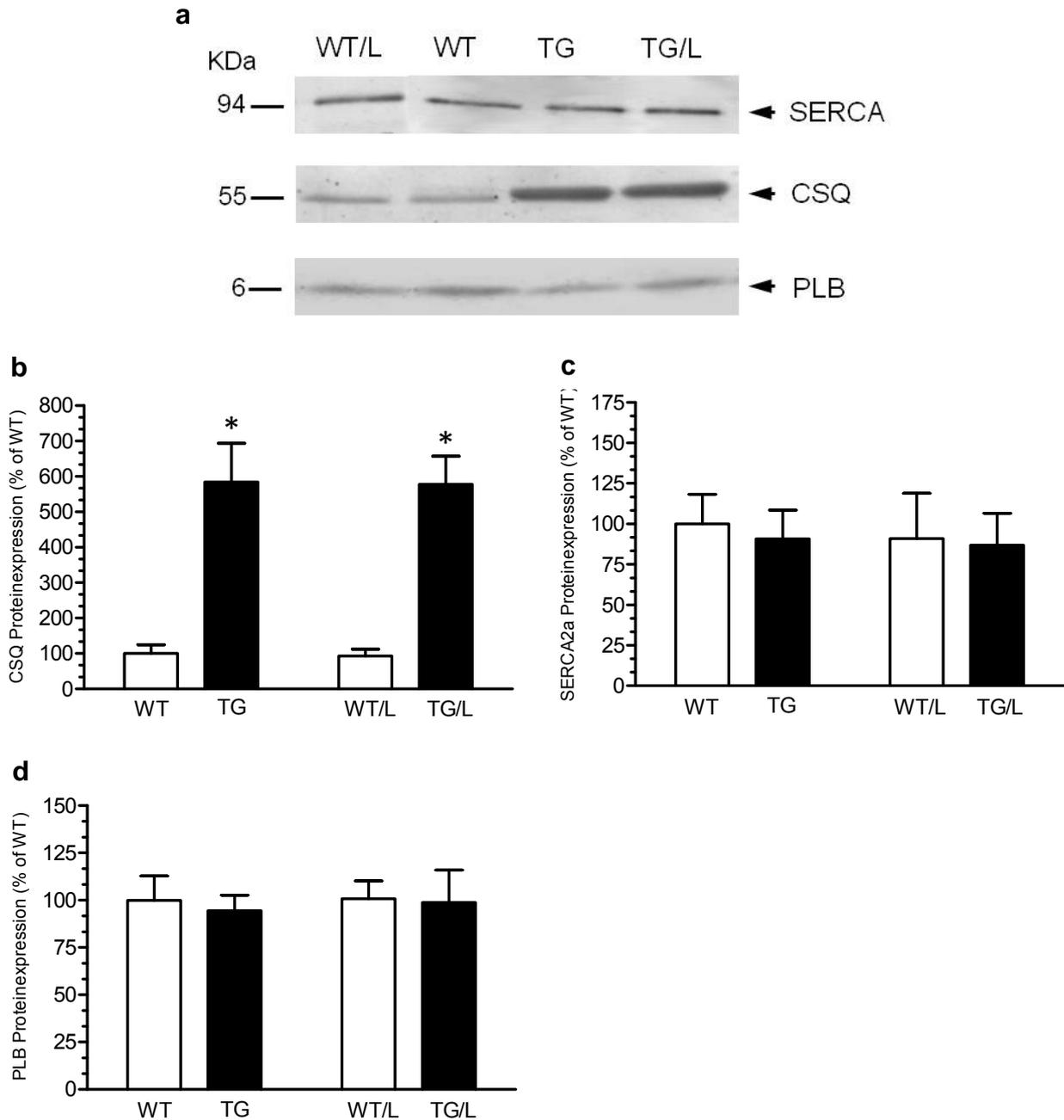


Abbildung 31: Darstellung der Proteinexpression als repräsentativer Western Blot (a) und als Säulendiagramm. Gezeigt sind die CSQ-Expression (b), die SERCA2a-Expression (c) und die PLB-Expression (d) im Herzen von 5 Monate alten Mäusen ($N = 4$) unter einer 4-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). * $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L.

4.7 Skelettmuskel-Messungen

Zur Klärung des Pathomechanismus, der für die intrinsischen Skelettmuskelveränderungen verantwortlich ist, wurden Enzymmessungen der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPDH, Energielieferant für die Atmungskette) und der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität (SDH, Enzym des Zitronensäurezyklus und Komplex II der Atmungskette) im Musculus rectus femoris in WT und TG unter Losartanbehandlung beziehungsweise unter Kontrollbedingung durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten zum einem in Skelettmuskelhomogenaten und zum anderen in Skelettmuskelquerschnitten unter der Betrachtung der einzelnen langsamen, oxidativen Typ I Fasern (SO-Fasern, „slow-oxidative“-Fasern), der schnellen glykolytischen Typ II Fasern (FG-Fasern, „fast-glykolytic“-Fasern) und der schnellen oxidativ-glykolytischen Typ I Fasern (FOG-Fasern, „fast-oxidative-glykolytic“-Fasern). Zudem wurde der GPDH-SDH-Quotient in den Skelettmuskelhomogenaten sowie in den Skelettmuskelquerschnitten berechnet.

4.7.1 Messung der enzymatischen Aktivität in Muskelhomogenaten

Um eine genauere Vorstellung der Enzymaktivität von GPDH und SDH im gesamten Muskel zu erhalten, wurden zuerst die Messungen in den Muskelhomogenaten durchgeführt. Die Enzymaktivitäten im Musculus rectus femoris von WT und TG im Alter von 4 Monaten unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung beziehungsweise unter Kontrollbedingung ist in Abbildung 32 dargestellt. In TG war die SDH-Aktivität im gesamten Muskel im Vergleich zu WT deutlich erhöht. Diese konnten unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung fast auf das Niveau der WT reduziert werden (Abbildung 32a). Zwischen WT und WT/L gab es keine Unterschiede (Abbildung 32a). Die GPDH-Aktivität in TG sowie in WT wurde hingegen unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen reduziert (Abbildung 32b). Bezüglich des GPDH-SDH-Aktivitätsquotienten konnte eine Verminderung in TG und somit eine Veränderung im metabolischen Profil im Vergleich zu WT beobachtet werden (Abbildung 32c). Zwischen TG und TG/L hingegen waren keine Unterschiede bezüglich des GPDH-SDH-Aktivitätsquotienten ersichtlich (Abbildung 32c). Jedoch war der GPDH-SDH-Aktivitätsquotient in WT unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung im Vergleich zu WT unter Kontrollbedingung deutlich vermindert (Abbildung 32c).

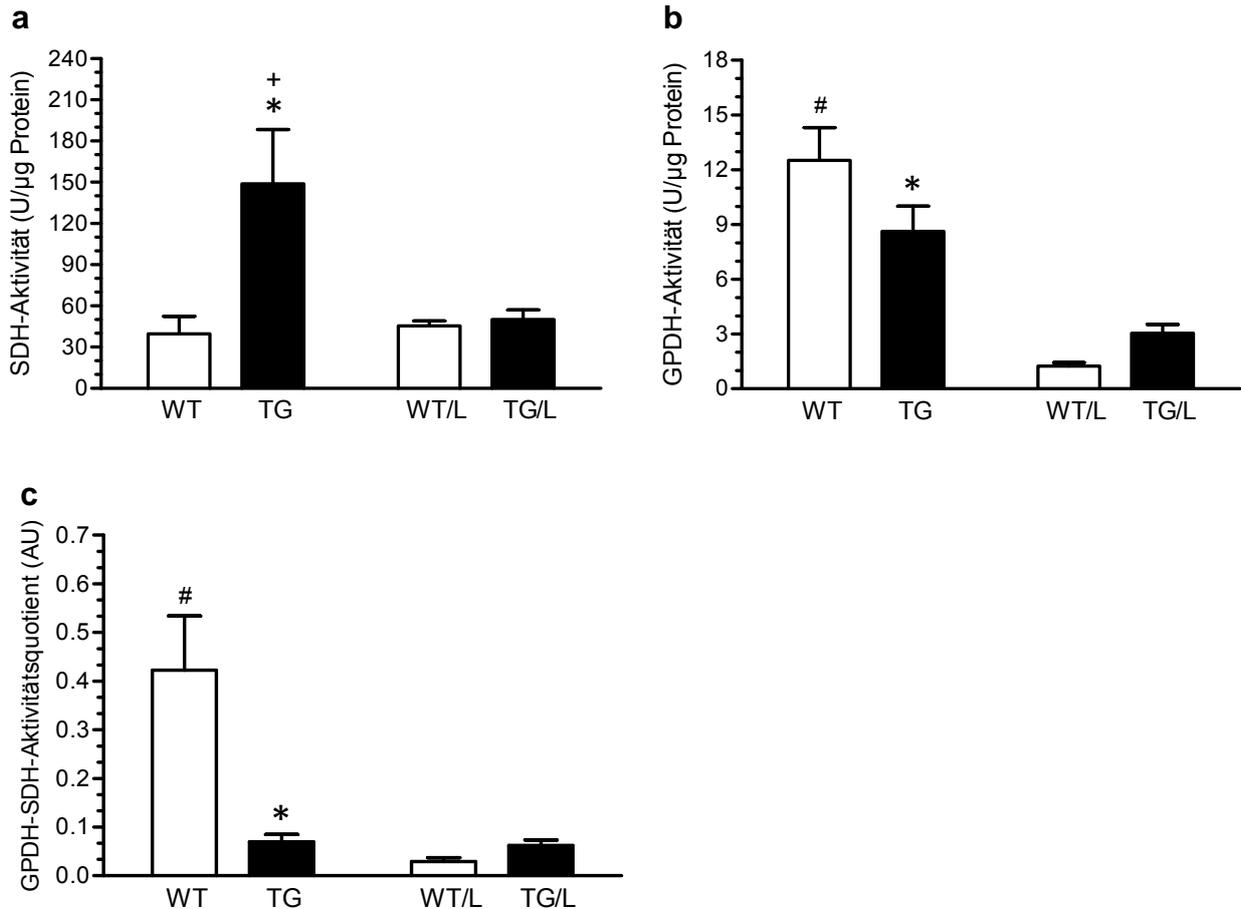


Abbildung 32: Darstellung der enzymatischen Aktivität von SDH (a), GPDH (b) und des GPDH-SDH-Aktivitätsquotienten (c) von 4 Monate alten Mäusen ($N = 4$) unter Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). $*p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, $+p < 0,05$ TG vs. TG/L, $\#p < 0,05$ WT vs. WT/L.

4.7.2 Zusammensetzung der Fasertypen

Zur Vermessung der Faserumwandlung wurden zunächst die einzelnen Fasertypen in WT und TG unter Losartanbehandlung beziehungsweise unter Kontrollbedingung bestimmt. Um ein genaueres Bild über diese Faserumwandlung zu erhalten und die daraus resultierenden Veränderungen bezüglich der Enzymaktivität der GPDH und SDH im Kontrast zum gesamten Muskel zu betrachten, wurden zuerst die Messungen in den Muskelhomogenaten durchgeführt. Die Unterscheidung der einzelnen Fasern wird in der Abbildung 33 veranschaulicht.

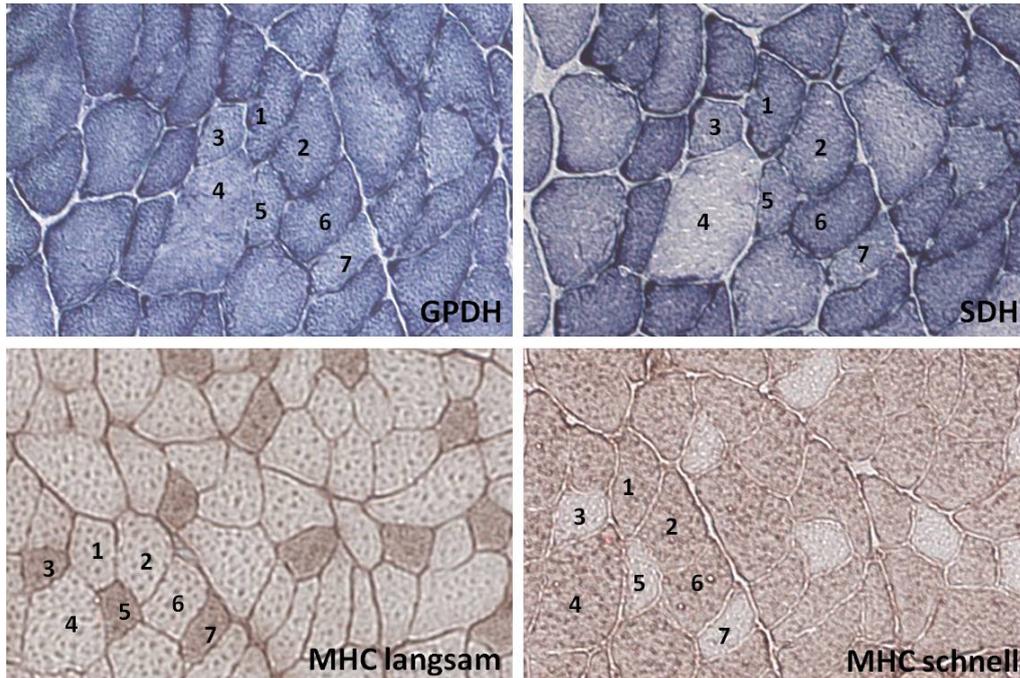


Abbildung 33: Repräsentative Darstellung von Serienschritten des Skelettmuskels von WT. Dargestellt sind die GPDH-Aktivität, SDH-Aktivität und die immunhistochemische Reaktionsfähigkeit der Myosinisoformen MHC langsam und MHC schnell. Die Fasern 3, 5 und 7 stellen die langsamen Fasern (Typ I, SO-Fasern) und die Fasern 1, 2, 4 und 6 stellen die schnellen Fasern (Typ II) dar, die wiederum in die FOG-Fasern (1, 2 und 6) und FG-Fasern (4) unterteilt werden können.

Die Population der einzelnen Fasertypen im Musculus rectus femoris von WT und TG im Alter von 4 Monaten unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung beziehungsweise unter Kontrollbedingung ist in Abbildung 34 dargestellt. Im Vergleich zum WT konnten in den TG eine Zunahme an SO-Fasern um etwa 57 % sowie eine Abnahme an FG-Fasern um etwa 23 % beobachtet werden (Abbildung 34). Unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung hingegen konnte der Anteil an SO-Fasern in TG um 18 % verringert werden (Abbildung 34). Im Gegensatz dazu erhöhte Losartan die Population der FG-Fasern in TG/L um etwa 15 % im Vergleich zu TG. Losartan bewirkte jedoch auch in WT Muskeln eine Veränderung in der Faserpopulation, indem es den Anteil an SO- um etwa 29 % und FG-Fasern um etwa 16 % im Vergleich zu WT unter Kontrollbedingung erhöhte sowie den Anteil an FOG-Fasern um etwa 26 % erniedrigte (Abbildung 34).

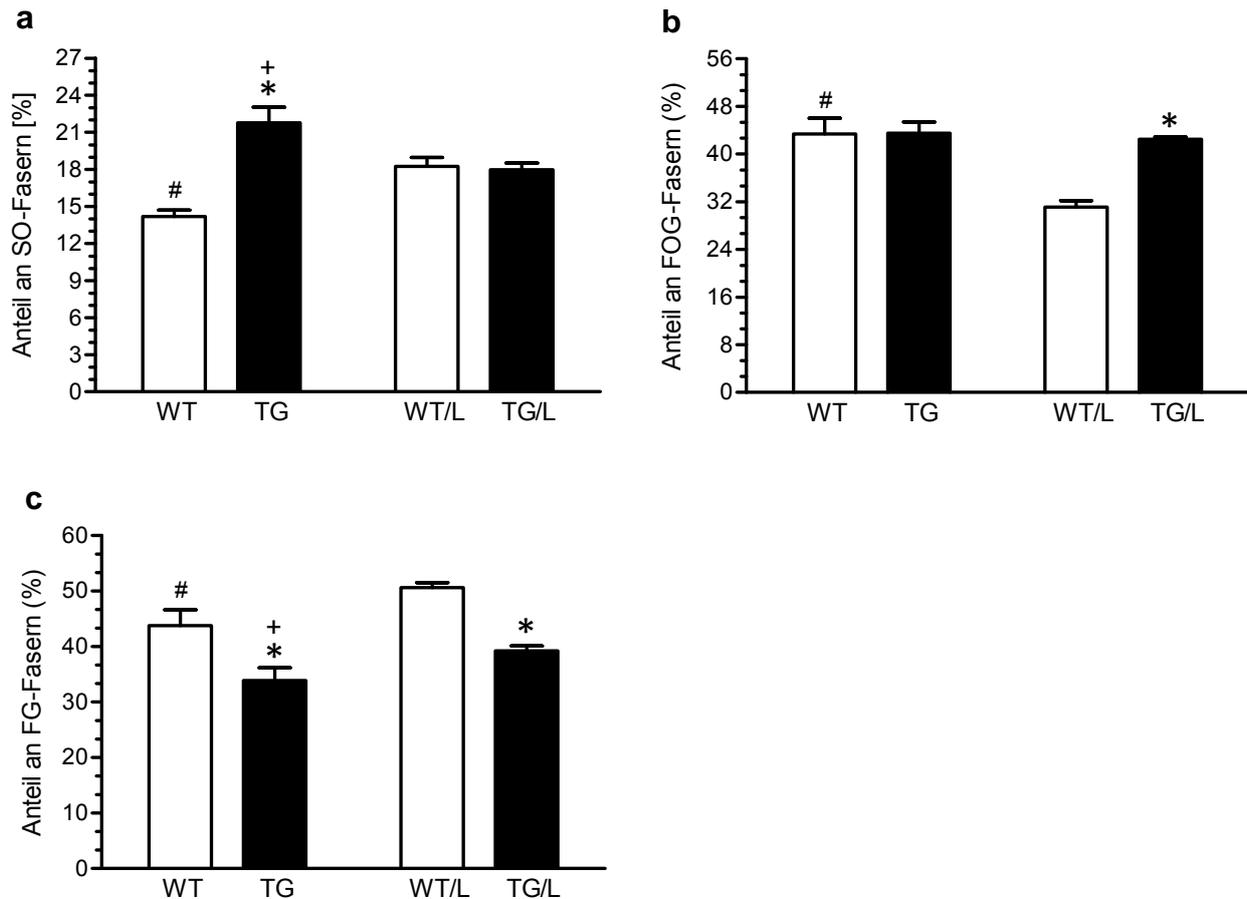


Abbildung 34: Darstellung der Zusammensetzung der einzelnen Fasertypen von 4 Monate alten Mäusen ($N = 4$) unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). * $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, + $p < 0,05$ TG vs. TG/L, # $p < 0,05$ WT vs. WT/L.

4.7.3 Zytphotometrische Messungen der Enzymaktivitäten

Die relative Enzymaktivität der GPDH und SDH der verschiedenen Fasertypen wurde in TG und WT im Alter von 4 Monaten unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung beziehungsweise unter Kontrollbedingung mittels Zytphotometrie vermessen. Alle Fasern der TG zeigten eine verminderte GPDH- sowie SDH-Aktivität im Vergleich zu WT mit Ausnahme der SDH-Aktivität in den SO-Fasern, die eine erhöhte Aktivität zeigten (Abbildungen 35 und 36). Der GPDH-SDH-Aktivitätsquotient wies hingegen zwischen WT und TG unter Kontrollbedingung keine Unterschiede in den FOG-Fasern (Abbildung 37b) sowie in den FG-Fasern (Abbildung 37c) auf. Jedoch zeigte der GPDH-SDH-Aktivitätsquotient der SO-Fasern eine deutliche Verringerung in den TG gegenüber den WT (Abbildung 37a).

Unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung konnten die SDH- sowie die GPDH-Aktivitäten in den TG-Muskeln in allen Fasern vermindert werden (Abbildungen 35 und 36). Die SDH-GPDH-Quotienten wiesen keine Unterschiede zwischen TG und TG/L auf (Abbildung 37). Losartan wirkte sich auch auf die Muskelfasern der WT aus, indem es die SDH- sowie GPDH-Aktivität und dadurch resultierend den GPDH-SDH-Aktivitätsquotienten in allen Fasern reduzierte (Abbildungen 35, 36 und 37). Nur allein die SO-Fasern wiesen keinen Unterschied zwischen WT und WT/L auf (Abbildung 35a).

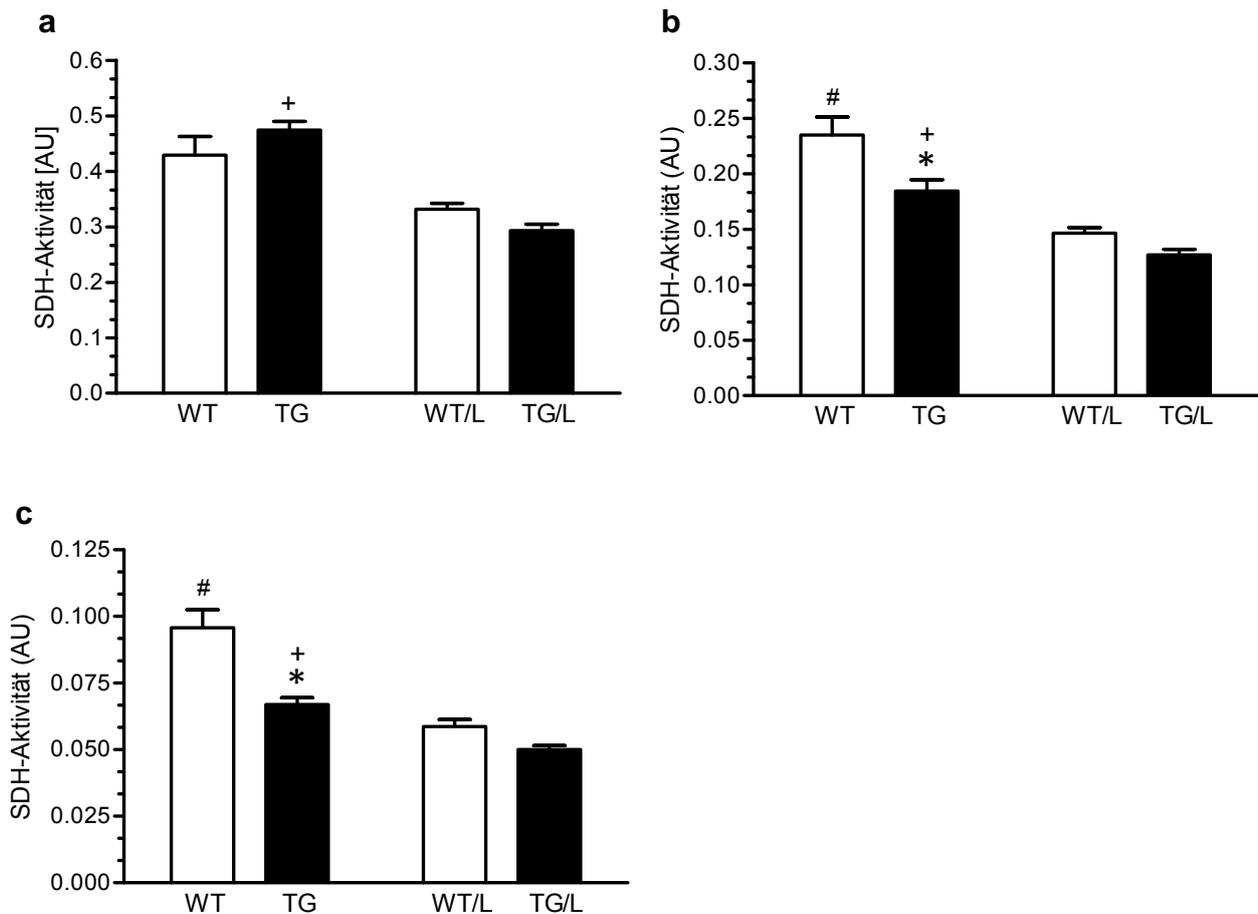


Abbildung 35: Darstellung der enzymatischen Aktivität der SDH der einzelnen Fasern, wie SO-Fasern (a; $n = 40$ für WT, $n = 38$ für TG, $n = 39$ WT/L und $n = 37$ für TG/L), FOG-Fasern (b; $n = 36$ für WT und TG, $n = 38$ WT/L und $n = 35$ für TG/L) und FG-Fasern (c; $n = 39$ für WT und WT/L, $n = 32$ für TG und $n = 38$ für TG/L) von 4 Monate alten Mäusen ($N = 4$) unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). * $p < 0,05$ TG vs. WT, ⁺ $p < 0,05$ TG vs. TG/L, [#] $p < 0,05$ WT vs. WT/L.

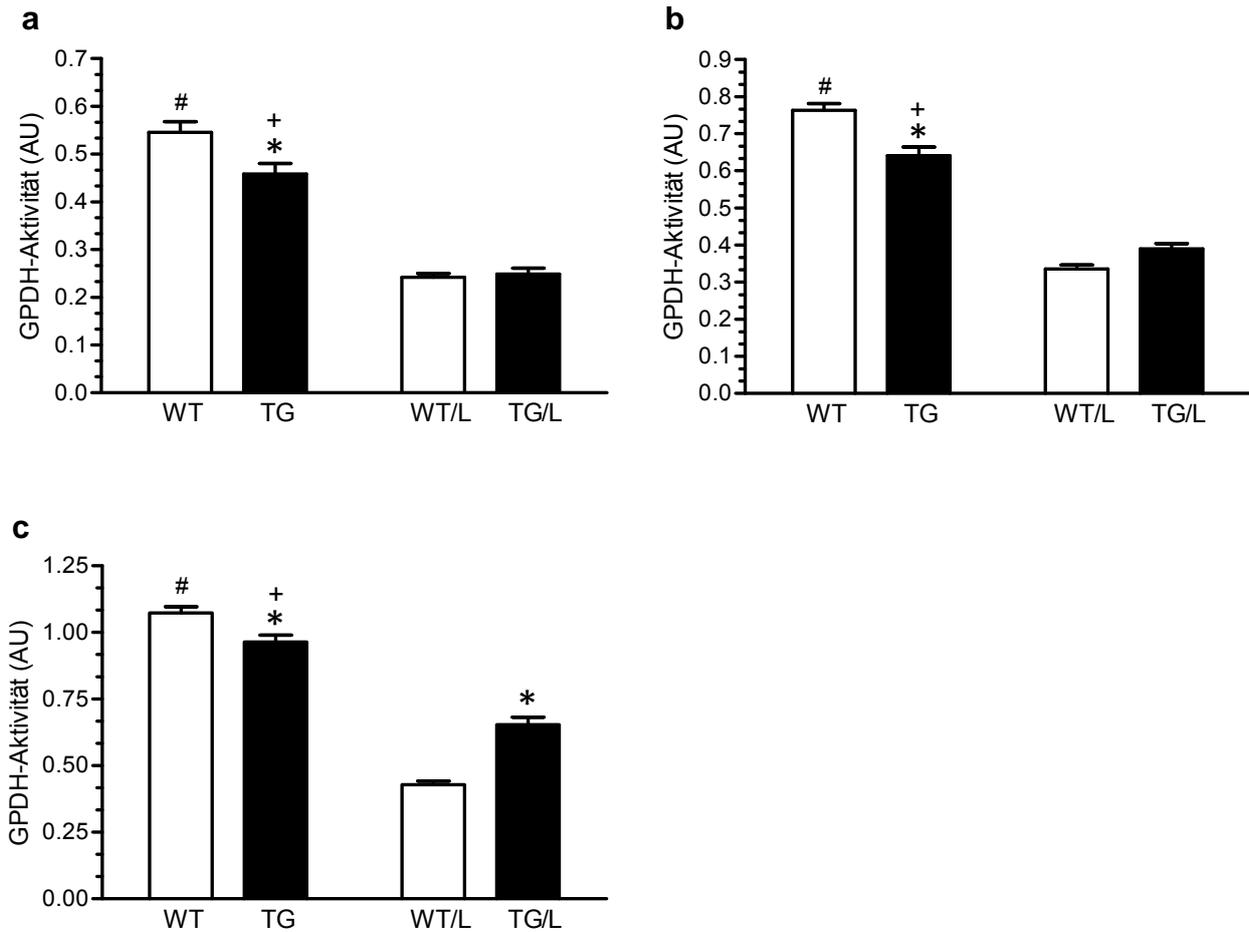


Abbildung 36: Darstellung der enzymatischen Aktivität der GPDH der einzelnen Fasern, wie SO-Fasern (a; $n = 35$ für WT, $n = 25$ für TG und $n = 27$ WT/L und TG/L), FOG-Fasern (b; $n = 33$ für WT, $n = 37$ für TG, $n = 32$ WT/L und $n = 38$ für TG/L) und FG-Fasern (c; $n = 27$ für WT und WT/L, $n = 38$ für TG und $n = 16$ für TG/L) von 4 Monate alten Mäusen ($N = 4$) unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). * $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, + $p < 0,05$ TG vs. TG/L, # $p < 0,05$ WT vs. WT/L.

Eine metabolische Verschiebung zu einem vermehrt glykolytischen Metabolismus, ersichtlich durch eine Zunahme des GPDH-SDH-Aktivitätsquotienten, konnte in den FG-Fasern der TG-Muskeln im Vergleich zu WT, aufgrund der im höheren Ausmaß verminderten SDH-Aktivität im Gegensatz zur GPDH-Aktivität, beobachtet werden (Abbildungen 35, 36 und 37). In den WT Muskelfasern nahmen jedoch beide Enzymaktivitäten in einem unterschiedlichen Ausmaß ab, sodass eine Verschiebung zu einem vermehrt oxidativen Metabolismus, ersichtlich durch eine Abnahme des GPDH-SDH-Aktivitätsquotienten, hauptsächlich in FG-Fasern der WT/L ersichtlich war (Abbildungen 35, 36 und 37).

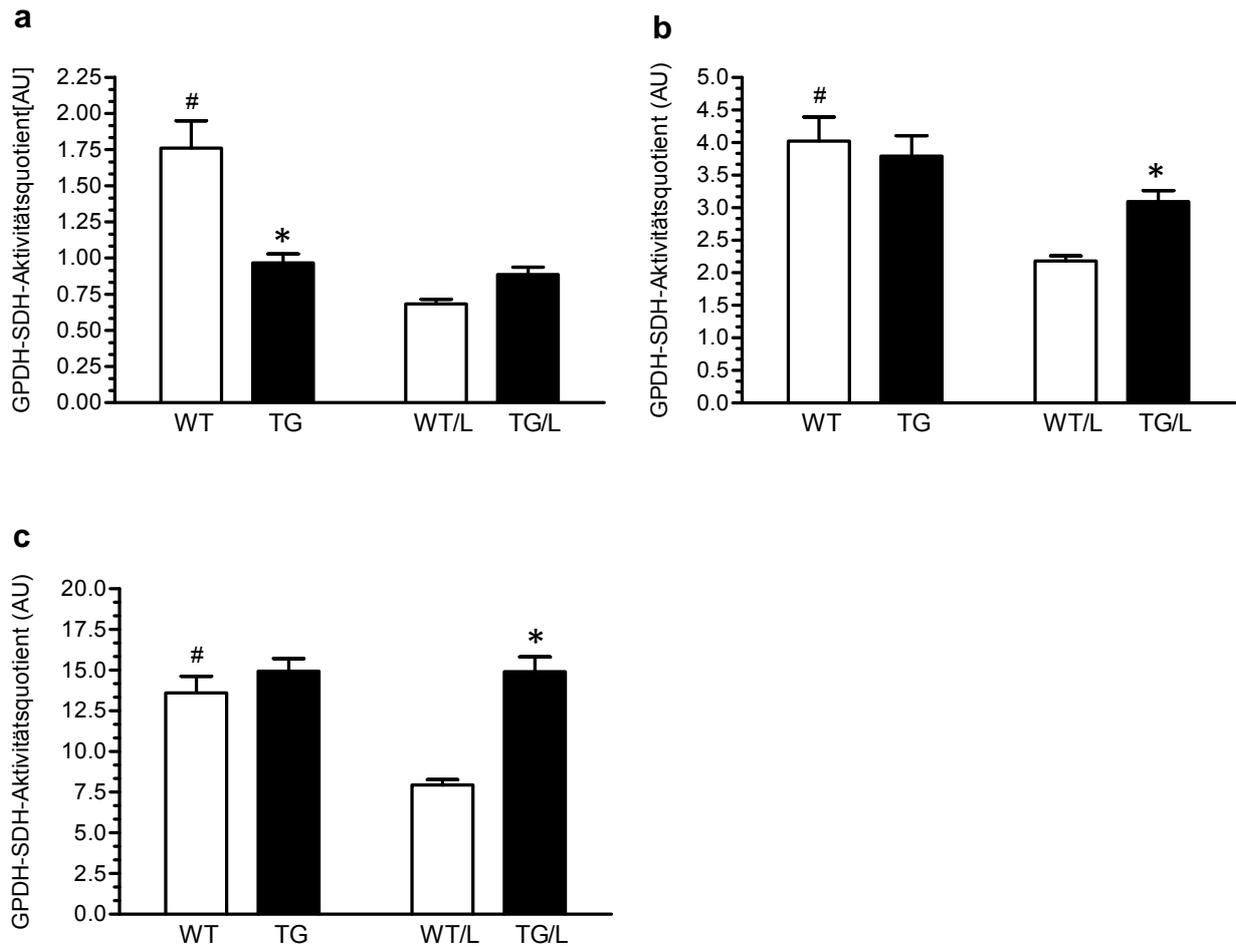


Abbildung 37: Darstellung der enzymatischen Aktivität des GPDH-SDH-Quotienten der einzelnen Fasern, wie SO-Fasern (a; $n = 35$ für WT, $n = 25$ für TG und $n = 27$ für WT/L und TG/L), FOG-Fasern (b; $n = 31$) und FG-Fasern (c; $n = 27$ für WT und WT/L, $n = 32$ für TG und $n = 16$ für TG/L) von 4 Monate alten Mäusen ($N = 4$) unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). * $p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, # $p < 0,05$ WT vs. WT/L.

4.7.4 Expression von Calcineurin A

Die Expression von Calcineurin A im Skelettmuskel der WT und TG im Alter von 4 Monaten unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung beziehungsweise unter Kontrollbedingung wurde mittels Western Blot untersucht (Abbildung 38a). In den TG war die Calcineurin A-Expression gegenüber den WT deutlich erhöht (Abbildung 38). Unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung konnte diese Expression hingegen fast auf das Niveau der WT reduziert werden (Abbildung 38).

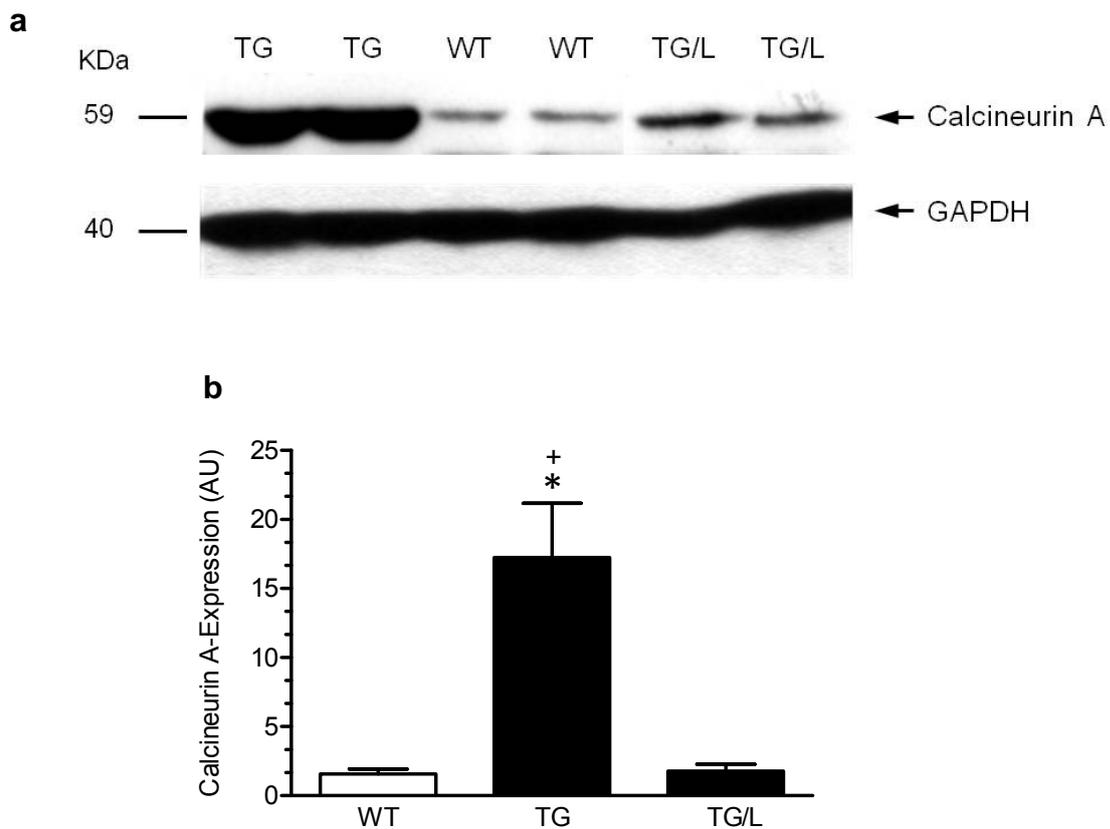


Abbildung 38: Darstellung der Calcineurin A-Expression als repräsentativer Western Blot (a) und als Säulendiagramm (b) von 4 Monate alten Mäusen ($N = 4$) unter einer 3-monatigen Losartanbehandlung (L) oder unter Trinkwasser allein (Kontrollbedingung). GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) diente als interner Standard. $*p < 0,05$ TG vs. WT und TG/L vs. WT/L, $+p < 0,05$ TG vs. TG/L.

4.8 HPLC- Messungen

Der Gehalt von Losartan und seinem aktiven Metaboliten (EXP3174) im Plasma (Abbildung 39a - c) und im Lebergewebe (Abbildung 39d - f) wurde mit einer sensitiven HPLC-Methode bestimmt. Der Gehalt von Losartan und EXP3174 im Plasma wies keine Unterschiede zwischen TG und WT Mäusen auf (Abbildung 40).

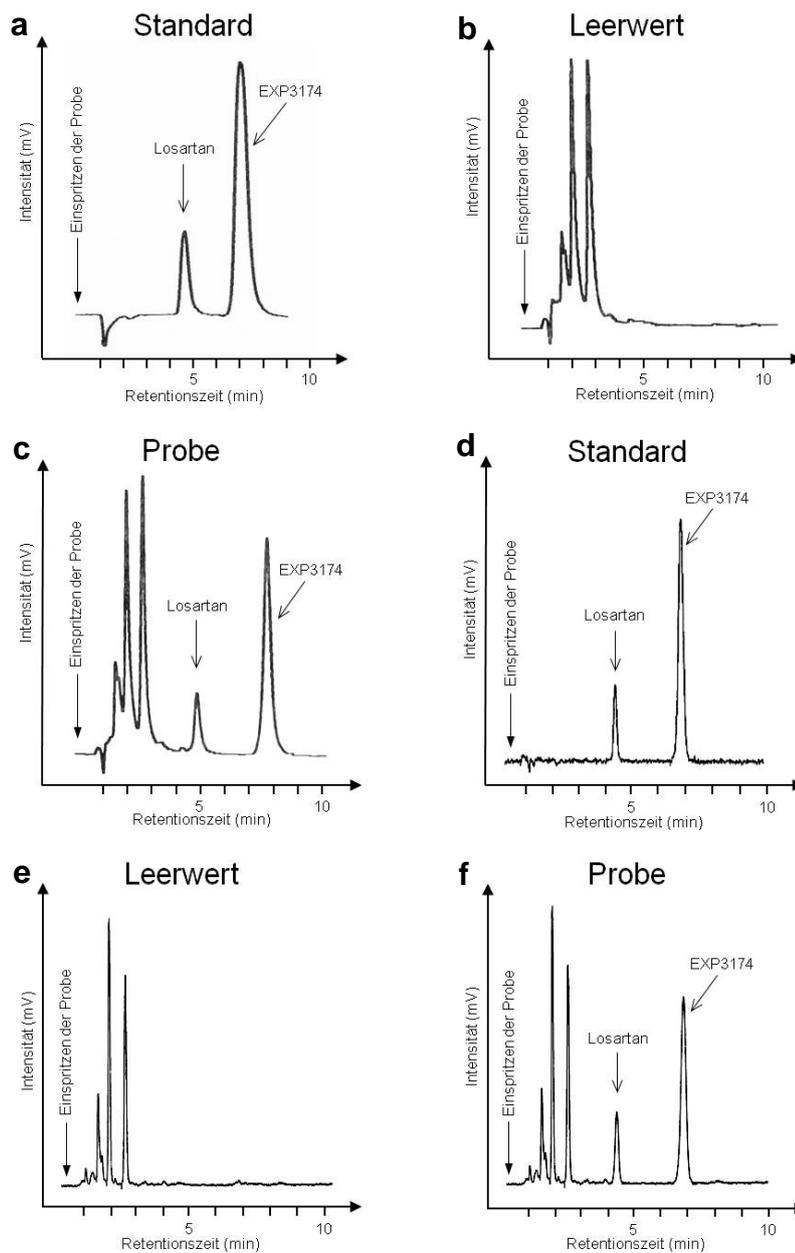


Abbildung 39: Repräsentative HPLC-Messungen von Plasma und Lebergewebe ohne (Leerwert) und mit Losartanbehandlung (Probe). Dargestellt sind jeweils Standard, Leerwert sowie die Probe von Plasma (a-c) und Lebergewebe (d-f).

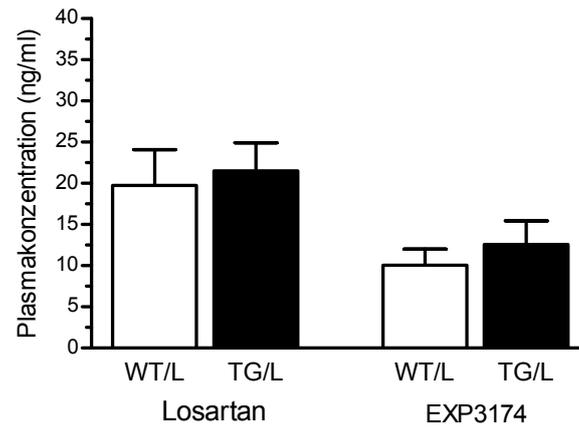


Abbildung 40: Darstellung der Plasmakonzentrationen von Losartan (N = 10) und EXP3174 (N = 13) von 5 Monate alten Mäusen unter Losartanbehandlung (L). Die Säulen stellen Mittelwerte \pm SEM der Anzahl der Mäuse dar.

5 Diskussion

Die Herzinsuffizienz stellt eine der bedeutendsten kardiovaskulären Erkrankungen in den industrialisierten Ländern dar. Zur Entwicklung neuer Therapieansätze müssen die Pathomechanismen der Herzinsuffizienz intensiver verstanden werden. Störungen der Ca^{2+} -Homöostase sowie der an der Ca^{2+} -Freisetzung beteiligten Proteine des quartären Komplexes scheinen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu spielen. Um zu überprüfen, welche Veränderungen durch eine 10fache Überexpression von Calsequestrin (CSQ) auftreten und inwieweit diese durch eine AT_1 -Rezeptorblockade beeinflusst werden können, wurden die CSQ-Mäuse mit Losartan in einer Konzentration von 5 mg/kg Körpergewicht pro Tag ab einem Alter von 4 Wochen nach der Geburt behandelt.

5.1 Effekte von Losartan auf die Morphologie und Sterblichkeit

Unter Betrachtung zellphysiologischer Gesichtspunkte ist die Pathogenese des Kontraktilitätsversagens zum Teil auf der Basis einer myozytären Veränderung durch ein Missverhältnis zwischen Myofibrillen und Mitochondrien bei Myokardhypertrophie bedingt. In früheren Studien wurden zelluläre sowie subzelluläre Veränderungen in CSQ-überexprimierenden Herzen beobachtet. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt und sogar erweitert werden. Wie zuvor bereits von Jones et al. (1998) berichtet, wurden zum einen zahlreiche Vakuolen und zum anderen eine unregelmäßige Anordnung der Myofibrillen sowie Mitochondrien in den TG mittels Ultrastrukturanalysen gefunden (Abbildung 19a und b). Dies könnte die zelluläre Basis für die verschlechterte kontraktile Funktion in den TG-Tieren sein. Weiterhin könnte unter Losartan die Unterbindung dieser zellulären Veränderungen (Abbildung 19c) zum Teil dessen günstigen Effekte auf die Kontraktilität erklären. Jedoch konnten die schädlichen Veränderungen nicht vollständig beseitigt werden. Somit erklärt sich wiederum die immer noch höhere Sterblichkeit der CSQ/L-Tiere gegenüber der Kontrollgruppe (WT). Durch die eingeschränkte kardiale Kontraktionsfähigkeit und die vorliegende kardiale Hypertrophie sank die Lebenserwartung der CSQ-überexprimierenden Mäuse deutlich, während die WT und WT/L eine übliche Lebenserwartung für Mäuse von 2½ - 3 Jahre erreichten.

Zur Betrachtung des Gesamtkollektivs wurden in allen durchgeführten Experimenten sowohl weibliche als auch männliche Mäuse gemeinsam betrachtet. Die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit der CSQ-Tiere lag bei 116 Tagen, konnte aber unter Losartanbehandlung auf 192,5 Tage erhöht werden (Abbildung 9). Bereits Knollmann et al. (2000) konnten für die CSQ-Mäuse eine verminderte Überlebenswahrscheinlichkeit im Gegensatz zu den WT-Geschwistertieren beobachten. Ebenso zeigten Yang et al. (2004) für die CSQ-Mäuse eine mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit von $71,3 \pm 25,4$ Tagen.

Unterschiede in den mittleren Überlebenswahrscheinlichkeiten der verschiedenen Studien könnten auf der unterschiedlichen Zusammensetzung der Gruppen mit männlichen und weiblichen Tieren beruhen.

Eine daraufhin nachträglich durchgeführte Subgruppenanalyse ergab geschlechtsspezifische Unterschiede in der Überlebenszeit. So überlebten die männlichen TG unter Kontrollbedingung mit einer mittleren Überlebenswahrscheinlichkeit von 139,5 Tagen länger als die weiblichen TG mit einer mittleren Überlebenswahrscheinlichkeit von 109,5 Tagen (Abbildungen 10 und 11). Unter Losartanbehandlung war die Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit in der Gruppe der weiblichen Tiere deutlicher ausgeprägt. Die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit bei den weiblichen TG/L mit 221 Tagen war im Vergleich zu den männlichen TG/L mit 184 Tagen länger (Abbildungen 10 und 11). Da in den aufgeführten Studien (Knollmann et al. 2000; Yang et al. 2004) jedoch keine geschlechtsspezifischen Aussagen getroffen wurden, gibt es auch keine Angaben über die Zusammensetzung des Gesamtkollektivs. Die grundsätzlichen Unterschiede der Überlebenswahrscheinlichkeiten in den einzelnen Studien sollten in weiterführenden Versuchen ausführlicher analysiert werden. Zum einen sollte näher untersucht werden, ob die ermittelte Überlebenszeit auch unter einer höheren n-Zahl bestätigt werden kann und zum anderen, ob sich die geschlechtsspezifischen Unterschiede auch in den hämodynamischen und elektrophysiologischen Parametern widerspiegeln.

Auch bei der menschlichen Herzinsuffizienz sind Unterschiede zwischen Frauen und Männern bekannt. Die Prävalenz der Herzinsuffizienz zeigt altersadjustiert geschlechtsspezifische Unterschiede: bis zu einem Alter von 75 Jahren ist sie bei Männern höher und ab dem 75. Lebensjahr bei Frauen (Stangl et al. 2006). Die Framingham-Studie konnte zeigen, dass die Prognose der 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen mit Herzinsuffizienz mit 38 % besser ist als bei Männern mit 25 % (Strömberg et al. 2003). Die Ursachen hierfür könnten in der besseren linksventrikulären Funktion, der vermehrt auftretenden diastolischen anstelle der systolischen Dysfunktion, sowie der selteneren ischämischen Genese der Herzinsuffizienz bei Frauen liegen (Stangl et al. 2006). Im Gegensatz dazu lag in der SOLVD-Studie in der Frauen-Gruppe häufiger eine ischämische Ätiologie der Herzinsuffizienz zugrunde und die 1-Jahr-Überlebensrate wies mit 78 % eine schlechtere Prognose im Vergleich zu der Männer-Gruppe mit 83 % auf (SOLVD Investigators 1992). Somit müssen sowohl die Ätiologie als auch der Schweregrad der linksventrikulären Funktionsstörungen für geschlechtsspezifische Aussagen in Betracht gezogen werden. Ursachen hierfür könnten in der Anpassung der Druckbelastung liegen (Stangl et al. 2006). Bei Frauen geht die chronische Druckbelastung mit einer stärkeren linksventrikulären Hypertrophie einher als bei Männern. Demzufolge ist das weibliche Myokard besser in der Lage die linksventrikuläre Wandspannung konstant und die linksventrikuläre Funktion aufrecht zu erhalten (Stangl et al.

2006). In fortgeschrittenen Stadien mit ausgeprägter Herzhypertrophie kommt es zu einer linksventrikulären Füllungsbehinderung (Rückwärtsversagen) infolge der diastolischen Dysfunktion (Stangl et al. 2006). Dies könnte unter anderem auch in den in dieser Arbeit verwendeten weiblichen CSQ-Tieren der Fall gewesen sein, da dieses Mausmodell eine ausgeprägte Herzhypertrophie bereits im frühen Alter von 2 Monaten aufweist. Eine besondere Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz bei Frauen könnten auch hormonelle Veränderungen spielen. Ob diese allerdings per se einen Risikofaktor darstellen, ist noch nicht geklärt (Regitz-Zagrosek et al. 2008). In verschiedenen Studien wurden außerdem Unterschiede im Ca^{2+} -Transport im SR und in der Ca^{2+} -Homöostase zwischen weiblichen und männlichen Myozyten gezeigt (Dash et al. 2001; Vizgirda et al. 2002). Diese Effekte könnten möglicherweise durch Östrogene beeinflusst werden (Regitz-Zagrosek et al. 2008). Die verschiedenen Einflüsse der Östrogene auf die Ca^{2+} -Homöostase und den Ca^{2+} -Transport im SR sowie das Rückwärtsversagen infolge der diastolischen Dysfunktion wären eine Erklärung für die kürzere Überlebenszeit der weiblichen gegenüber den männlichen CSQ-Mäusen.

Die Datenlage zur Wirksamkeit vieler Pharmaka und somit die leitliniengerechte Betreuung bei Frauen ist deutlich schlechter als bei Männern. Der Frauenanteil bei großen Herzinsuffizienz-Studien ist mit 30 % oder weniger relativ gering; außerdem sind vorliegende Studien nicht angelegt gewesen, in der Subgruppenanalyse die geschlechtsspezifische Fragestellung näher zu beantworten (Stangl et al. 2006).

Für ACE-Hemmer scheint die Evidenz der Herzinsuffizienz-Therapie für Frauen weniger gesichert zu sein als für Männer, da die Anzahl der Frauen in den Studien unterrepräsentiert war und sogar Trends zu einem geringeren Nutzen der Therapie unter ACE-Hemmern bei Frauen beobachtet werden konnten (Garg et al. 1995; Shekelle et al. 2003). Garg et al. (1995) konnten sogar eine Reduktion der Mortalität und/oder Hospitalisation von 37 % der Männer im Vergleich zu 22 % der Frauen zeigen. Die Frage jedoch, ob Frauen von einer Therapie unter ACE-Hemmern profitieren oder nicht, ist noch nicht endgültig geklärt. Lediglich in Bezug auf den Reizhusten als Nebenwirkung der ACE-Hemmer ist bekannt, dass er bei Frauen 1,5 - 2fach häufiger als bei Männern auftritt (Mackay et al. 1999; Wing et al. 2003).

In den größeren Studien (CHARM-Studie, Swedberg et al. 1999; ELITE II-Studie, Pitt et al. 2000; Val-HeFT-Studie, Cohn et al. 1999), die die Effektivität der AT_1 -Rezeptor-Antagonisten bei Herzinsuffizienz untersuchten, wurde über keine geschlechtsspezifischen Unterschiede berichtet. Allerdings war insgesamt der Anteil der weiblichen Probanden mit Ausnahme der LIFE-Studie (Frauenanteil bei 54 %) in den anderen Studien mit 20 - 30 % deutlich geringer als der Männeranteil (Stangl et al. 2006). Israili et al. (2000) konnten für Losartan und Telmisartan allerdings eine 2fach höhere Plasmakonzentration bei Frauen im

Vergleich zu Männern zeigen. Dies könnte ebenfalls eine mögliche Erklärung für die verbesserte Wirksamkeit von Losartan auf die Überlebenszeit der weiblichen CSQ-Tiere in dieser Arbeit sein. Jedoch sollten in weiterführenden Versuchen die zugrundeliegenden geschlechtsspezifischen molekularen Mechanismen im Hinblick auf eine verbesserte Arzneimitteltherapie herzinsuffizienter Frauen ausführlicher untersucht werden.

Ohne Losartanbehandlung entwickelten die TG-Mäuse eine Herzhypertrophie, die durch die vergrößerten Herzgewichte sowie die vergrößerten Herzgewicht-Körpergewicht-Quotienten in 2 und 5 Monate alten TG-Mäusen unter Kontrollbedingung ersichtlich waren (Tabellen 13 und 14). Auch in vorherigen Studien konnten in den CSQ-Mäusen eine vermehrt auftretende dilatative Kardiomyopathie, sowie eine Herzhypertrophie beobachtet werden (Cho et al. 1999; Jones et al. 1998; Knollmann et al. 2000; Sato et al. 1998). Herzhypertrophie ist ein Anpassungsmechanismus des Myokards auf pathologische Stimuli, die bei kardiovaskulären Erkrankungen auftreten. Durch hämodynamische Überbelastung wird eine Hypertrophie im insuffizienten humanen Myokard induziert. Diese ist eher durch eine Größenzunahme der einzelnen Myozyten als durch zahlenmäßige Vermehrung der Myozyten beziehungsweise durch Zunahme des durchschnittlichen Myozytendurchmessers charakterisiert (Anversa et al. 1992). Anfangs stellt dies eine physiologische Anpassung an die gesteigerten Anforderungen dar, im weiteren Verlauf hingegen führt dies jedoch durch nicht ausreichende Kompensation zur Herzinsuffizienz. Auch im CSQ-Mausmodell konnte eine Vergrößerung der isolierten Kardiomyozyten beobachtet werden (Knollmann et al. 2000; Jones et al. 1998). Des Weiteren konnten Knollmann et al. (2000) in den CSQ-Mäusen histologische Anhaltspunkte für eine dilatative Kardiomyopathie sowie in histologischen Untersuchungen Vergrößerungen der Nuklei finden.

Bei Linksherzinsuffizienz kommt es aufgrund des Rückwärtsversagens zu einem Blutrückstau in die Lunge. Dies führt zum Anstieg des pulmonal-arteriellen Druckes, wodurch Flüssigkeit in das Interstitium und die Bronchiallumina übertritt. Als Folge manifestiert sich ein Lungenödem, was zu Dyspnoe und konsekutiver Leistungsschwäche führt. In diesem Mausmodell konnten bei den TG im Alter von 5 Monaten neben erhöhten Herzgewichten auch vergrößerte Lungengewichte beobachtet werden, die unter Losartanbehandlung vermindert wurden (Tabelle 14). In diesem Mausmodell war Losartan außerdem im Stande, die Herzhypertrophie in 5 Monate alten Mäusen zu reduzieren (Tabelle 14).

Bei einer Rechtsherzinsuffizienz staut sich hingegen Blut zurück in die Körpervenen bis hin zu einigen Organen. In der Leber kann dies zu einer Vergrößerung des Organs (Stauungsleber) führen. In diesem Mausmodell konnte zu beiden Zeitpunkten keine Vergrößerung der Lebergewichte in den TG beobachtet werden (Tabellen 13 und 14). Außerdem konnten in den Nierenschnitten der TG des hier verwendeten Mausmodells der

kardialen Überexpression von CSQ, ebenso wie bei Knollmann et al. (2000) keine histopathologischen Veränderungen gefunden werden.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass eine Überexpression von CSQ zunächst zu einer veränderten intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase führt, welche eine konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie bedingt und letztendlich in einer dilatativen Kardiomyopathie mündet. Knollmann et al. (2000) konnten in den Lungenschnitten von einigen CSQ-Mäusen Anzeichen für eine pulmonale Blutstauung und Hämosiderin-beladene Makrophagen in den alveolären Zwischenräumen zeigen. Neben den aufgetretenen atrioventrikulären Reizleitungsblockaden in den CSQ-Mäusen sind auch andere Mechanismen wie zum Beispiel die Lungenembolie möglich, die zum verfrühten Tod der CSQ-Tiere führen könnten, besonders, da von Knollmann et al. (2000) arterielle und ventrikuläre Thromben in fast allen TG beobachtet worden sind. Dies lässt letztendlich darauf schließen, dass dem Mausmodell der CSQ-Überexpression eher eine Linksherzinsuffizienz zugrunde liegt.

Die Natrium- und ACE-Plasmakonzentrationen waren in allen vier Gruppen unverändert (Tabelle 15). Hingegen konnte eine erhöhte Harnstoff-Plasmakonzentration in TG- und TG/L-Tieren beobachtet werden (Tabelle 15). Bereits in der frühen Phase einer Herzinsuffizienz kann die Nierenfunktion beeinträchtigt werden. Die Zunahme der Harnstoffkonzentration in den TG-Tieren lässt sich durch eine verminderte renale Ausscheidung erklären. Diese ist wiederum bedingt durch eine verminderte Nierendurchblutung aufgrund der schweren Herzinsuffizienz. Zudem war unter Losartanbehandlung die Plasmakreatinin-Konzentration in TG im Vergleich zu WT-Mäusen erhöht (Tabelle 15). Im Wirkungsmechanismus begründet kommt es unter Losartan zu einer verminderten Durchblutung der Glomeruli und somit zu einem geringfügigen Anstieg der Plasmakreatinin-Konzentration ohne klinische Relevanz. Dadurch konnte zudem die Losartan-Aufnahme der Mäuse kontrolliert werden.

Ein weiteres Anzeichen für eine Herzinsuffizienz in den CSQ-Tieren ist der erhöhte Fibrosegrad. Diese histopathologischen Veränderungen wurden auch in insuffizienten Herzen beim Menschen gefunden (Anversa et al. 1996; Beltrami et al. 1994). Auch bei den CSQ-Mäusen konnte in vorausgegangenen Studien eine erhöhte Fibrose beobachtet werden (Jones et al. 1998; Knollmann et al. 2000). Dieser vergrößerte Fibrosegrad wurde unter Losartanbehandlung vermindert und im Alter von 2 Monaten sogar auf WT-Niveau gesenkt (Abbildung 18). Auch Baba et al. (1999) fanden unter Losartan in einem Rattenmodell der Aortenbogenstenose (druckinduzierte linksventrikuläre Hypertrophie) eine Verminderung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose. Im Verlauf der Hypertonie kommt es zu einer fortschreitenden Akkumulation von Kollagen in den interstitiellen und perivaskulären Bereichen (Weber und Brilla 1991). Angiotensin II bedingt unter anderen das Auftreten einer Fibrose sowie eine erhöhte Kollagenablagerung im kardialen Interstitium (Weber und Brilla 1991). Eine Losartanbehandlung führte außerdem zu einer Unterdrückung der interstitiellen

und perivaskulären Kollagenfraktion (Baba et al. 1999). Dies könnte eine Begründung für die verminderte Fibrose unter Losartanbehandlung in diesem Rattenmodell und somit auch in den hier verwendeten Mausmodell der kardialen Überexpression von CSQ sein.

In Rattenmodellen des akuten Myokardinfarkts sowie in Rattenmodellen der chronischen Herzinsuffizienz (CHF) reduzierte Losartan die Sterblichkeit in einem ähnlichen Ausmaß wie bei den Ratten, die mit Captopril behandelt wurden (Milavetz et al. 1996; Zhu et al. 2000). Losartan reduzierte den fibrillären Kollagengehalt und verhinderte eine Zunahme des relativen Herzgewichts in den genetischen Modellen einer durch die herzspezifische Überexpression des Tumornekrose-Faktors (TNF) oder Troponin T (TnT) bedingten Herzinsuffizienz (Flesch et al. 2003; Lim et al. 2001). Über die protektiven Effekte von Losartan bezüglich der Verminderung der Fibrose, der Herzhypertrophie sowie der Hämodynamik in Rattenmodellen des akuten Myokardinfarkts oder der volumeninduzierten Herzinsuffizienz „High-output-failure“ (aortocavaler Shunt) wurde bereits berichtet (Qing und Garcia 1992; Sladek et al. 1996). Die Autoren erklärten diese günstigen Effekte einerseits durch die Bildung von neuen Kapillaren im Herzen in Gegenwart von Losartan (Sladek et al. 1996). Andererseits wiesen sie darauf hin, dass der biochemische Mechanismus von Losartan in der Hemmung der Angiotensin-induzierten Proteinsynthese liegen kann (Schunkert et al. 1995; Smits et al. 1992).

Das CSQ-Modell ist aufgrund der primären Abnormalität dieser Mauslinie bezüglich einer beeinträchtigten Ca^{2+} -Regulierung einmalig. Diese Veränderungen der Ca^{2+} -Regulierung, welche auch bei menschlichem Herzversagen beobachtet wurden (Philips et al. 1998), spricht für die klinische Relevanz des hier verwendeten Mausmodells.

5.2 Biochemische Effekte von Losartan im Sarkoplasmatischen Retikulum

Veränderungen der kontraktilen Funktion sowie der Ausbildung einer Hypertrophie in Herzen von CSQ-Mäusen könnten durch Expressionsveränderungen der Ca^{2+} -regulierenden Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) hervorgerufen werden. Über die genauen biochemischen Ursachen für die verbesserte physiologische Funktion in den TG-Herzen unter Losartanbehandlung werden zurzeit verschiedene Hypothesen diskutiert. Die Proteinexpression von CSQ im SR in den TG-Herzen blieb unter Losartanbehandlung unverändert hoch (Abbildung 31). Somit kann ausgeschlossen werden, dass Losartan die erhöhte Expression des CSQ normalisiert und die günstigen Effekte von Losartan dadurch zu erklären wären. Es wäre denkbar, dass die Wirkung von Losartan auf einer erhöhten Expression der SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) oder einer Verringerung der Phospholamban (PLB)-Expression beruhen könnte. Beide Änderungen allein oder gemeinsam würden die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR erleichtern, und konnten zumindest in einigen

genetischen Mausmodellen die Kontraktilitätsleistung des Herzens verbessern (del Monte et al. 2001; He et al. 1999; Minamisawa et al. 1999). Des Weiteren führte die Herzinsuffizienz in Ratten-Infarkt-Modellen zu einer reduzierten kardialen Expression von SERCA2a und PLB. Dieser Abfall konnte zumindest teilweise durch eine Behandlung mit Imidapril aufgehoben werden (Shao et al. 2005). Losartan mit einem ähnlichen Angriffspunkt, im RAAS, wie Imidapril (ein ACE-Hemmer) könnte somit auch in ähnlicher Weise wirken. Jedoch wurden in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede in den Proteinexpressionen von SERCA2a und PLB zwischen TG und WT sowie TG/L und WT/L gefunden (Abbildung 31). Folglich kann dies aufgrund der hier vorliegenden Daten als Erklärung für die Verbesserung der Überlebensrate der TG-Tiere unter Losartanbehandlung ausgeschlossen werden. Auch Jones et al. (1998) konnten in diesem Mausmodell mittels Western Blot nur eine geringfügige beziehungsweise keine Veränderung für die SR Proteine SERCA2a und PLB nachweisen. Im SR wird die Interaktion zwischen CSQ und RyR über TRD und JCN vermittelt (Zhang et al. 1997). Diese Proteine bilden einen quartären Komplex an der junktionalen Membran des SR aus und sind an der Ca^{2+} -Freisetzung mitbeteiligt. Durch die Überexpression von CSQ kommt es zu einer Herunterregulierung der SR Proteine RyR, JCN und TRD von über 50 % (Jones et al. 1998). Jedoch ist noch unklar, ob die CSQ-Überexpression selbst die Herunterregulierung bedingt, oder ob der CSQ-Gehalt im SR mit der funktionalen Aktivität des RyR gekoppelt ist. Györke et al. (2004b) zeigten zu einem späteren Zeitpunkt, dass CSQ während der Bindung an TRD und/oder JCN als Inhibitor der funktionalen Aktivität des RyR bei geringer luminaler Ca^{2+} -Konzentration im SR fungiert. Bei steigender Ca^{2+} -Konzentration im Lumen des SR lässt sich diese Hemmung jedoch aufheben und die Ca^{2+} -Ionen besetzen die Ca^{2+} -Bindungsstellen des CSQ. Da JCN und TRD auch in den quartären Komplex mit eingebunden sind, kann sich somit auch die CSQ-Überexpression auf die Expression von JCN und TRD auswirken. Die Veränderungen einiger Ca^{2+} -regulierender Proteine im SR weisen auf eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase in dem CSQ-Mausmodell hin. Allerdings sollte der Einfluss von Losartan auf den quartären Komplex sowie die eventuelle Aufhebung der Herunterregulierung speziell dieser Proteine in nachfolgenden Studien noch untersucht werden.

5.3 Biochemische Effekte von Losartan im Sarkolemm

In einer früheren Studie konnten elektrophysiologische Veränderungen in TG-Myozyten gezeigt werden, wie zum Beispiel verminderte K^+ - und Ca^{2+} -Ströme (Knollmann et al. 2000). In dieser Arbeit konnte zudem eine reduzierte mRNA-Expression des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals (LTCC; Abbildung 27) beobachtet werden. Diese verminderte LTCC-Proteinexpression auf mRNA-Ebene könnte zu verminderten Ca^{2+} -Strömen führen, was wiederum mit den Daten

über den Verlust der Ca^{2+} -Stromamplitude im Einklang steht (Knollmann et al. 2000). Jedoch kann diese Entdeckung nicht die protektiven Effekte von Losartan erklären, da Losartan die LTCC-Expression von TG nicht beeinflussen konnte. Die mRNA-Expression des LTCC war zwischen TG- und TG/L-Mäusen unverändert und vermindert gegenüber WT- und WT/L-Mäusen (Abbildung 27). Die Abnahme der LTCC-Expression in den TG-Mäusen bei vorliegender Herzinsuffizienz wird kontrovers diskutiert (Hu et al. 2009; Kääb et al. 1998; Schwinger et al. 1999; Tsoutsman et al. 2008). Hu et al. (2009) und Tsoutsman et al. (2008) konnten in unterschiedlichen Herzinsuffizienzmodellen eine Herunterregulierung der LTCC-Expression auf mRNA-Ebene beobachten. Hingegen konnten Kääb et al. (1998) und Schwinger et al. (1999) keine Veränderungen der mRNA-Expression des LTCC bei menschlicher Herzinsuffizienz zeigen. Zudem konnte in dem hier verwendeten Mausmodell der kardialen Überexpression von CSQ keine Abnahme in der HERG-Expression auf mRNA-Ebene gefunden werden (Abbildung 27), welche wiederum für die verminderten K^+ -Ströme verantwortlich sein könnte. Die Verminderung der kardialen Kontraktilität in CSQ-Mäusen spiegelt verminderte Ca^{2+} -Transienten wieder. Dennoch war die Ca^{2+} -Freisetzung im SR erhöht, was durch die Koffein-Messungen gezeigt werden konnte. Die Koffein-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung war wie die CSQ-Proteinexpression um ein 10faches erhöht (Jones et al. 1998). Diese Proportionalität zwischen Koffein-induzierter Ca^{2+} -Freisetzung und dem Ausmaß der CSQ-Expression weist deutlich auf die Rolle von CSQ als Speicher der freizusetzenden Ca^{2+} -Ionen hin (Jones et al. 1998). Durch die vermehrte Ca^{2+} -Speicherung im SR, bedingt durch die CSQ-Überexpression, waren die Ca^{2+} -Transienten vermindert. Die Ca^{2+} -Beladung im SR an sich könnte als entscheidender Faktor der negativen Rückregulation des Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus fungieren (Jones et al. 1998). Bei einer geringeren Ca^{2+} -Konzentration wird die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR beeinflusst. Eine verringerte Ca^{2+} -Sensitivität des RyR bei einer CSQ-Überexpression lässt somit eine verminderte Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung vermuten (Wang et al. 2000). Auch Sato et al. (1998) beobachteten eine offensichtliche Beeinträchtigung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Diese scheint zum einen durch die erhöhte Ca^{2+} -Pufferkapazität im SR, die mit einer geringeren Ca^{2+} -Freisetzung assoziiert ist, und durch einen reduzierten Ca^{2+} -Einstrom über LTCC aufgrund der geringeren Stromdichte bedingt zu sein. Zum anderen kann die Ca^{2+} -Pufferkapazität auch aufgrund der gesteigerten Calreticulin-Expression erhöht sein (Sato et al. 1998). Ergänzend hierzu sollten in nachfolgenden Studien weitere Untersuchungen bezüglich aller für die Leitfähigkeit von K^+ -Ionen verantwortlichen Proteine auf mRNA-Ebene, ebenso wie direkte Strommessungen aller für die Kontraktion verantwortlichen Ionenkanalströme mittels Patch-Clamp-Technik durchgeführt werden.

Zudem bemerkten Suzuki et al. (1999) bei den transgenen Tieren eine Verminderung der mRNA-Expression des AT_1 -Rezeptors, der die AP-1 und GATA-4 Gentranskription bedingt.

Diese Verminderung ist bezeichnend für die Modifizierungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System der CSQ-Mäuse. Zudem wurde darauf hingewiesen, dass die reduzierte mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors in diesem Modell aus reduzierten Spiegeln der Transkriptionsfaktoren AP-1 und GATA-4, die zum Beispiel die Gentranskription des AT₁-Rezeptors regulieren, resultieren könnten (Suzuki et al. 1999).

5.4 Biochemische Effekte von Losartan in Myofilamenten

Die ATPase-Aktivität im rechten und linken Ventrikel von TG war vermindert (Abbildung 28). Eine wichtige Erkenntnis dieser Untersuchung ist, dass diese Abnahme in den TG unter Losartanbehandlung zumindest teilweise verhindert werden konnte (Günther et al. 2010). Auch andere Autoren beschrieben eine verminderte ATPase-Aktivität im ventrikulären Gewebe von Patienten mit Herzinsuffizienz (Alpert und Gordon 1962; LeClercq et al. 1976; Pagani et al. 1988). Diese Ergebnisse könnten eine biochemische Begründung für die verminderte kontraktile Phase bei menschlicher Herzinsuffizienz liefern. Zudem lassen diese Ergebnisse vermuten, dass eine Zunahme der ATPase-Aktivität in TG/L zumindest teilweise die hämodynamischen und womöglich die elektrophysiologischen Parameter (Huke und Knollmann 2010) sowie das Überleben in den TG verbessern könnte.

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) ist ein biochemischer Marker der Herzinsuffizienz. Dieses Hormon, welches an der Blutdruckregulation beteiligt ist, wird bei Herzinsuffizienz, besonders wenn eine Vorhofdilataion vorhanden ist, vermehrt gebildet und kann in erhöhten Konzentrationen im Plasma nachgewiesen werden. Eine Zunahme der mRNA-Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) wurde bereits früher in den CSQ-Mäusen beschrieben und als Folge einer Induktion des fetalen Genprogramms im Anschluss an hypertrophe Stimuli betrachtet (Cho et al. 1999; Rockman et al. 1991). Auch in dieser Arbeit konnte in dem Mausmodell der kardialen Überexpression von CSQ eine erhöhte ANP-Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Abbildung 29) und somit die Daten von Cho et al. (1999) bestätigt werden. In Übereinstimmung mit Sato et al. 2001 kann die in dieser Arbeit beobachtete Abnahme der ANP-Expression in Gegenwart von Losartan (TG/L, Abbildung 29) als Anzeichen für eine geringeren Beeinträchtigung der Kardiomyozytenfunktion gedeutet werden. Diese fiel allerdings im Vergleich zu Sato et al. 2001 schwächer aus.

5.5 Effekte von Losartan auf die Herzkontraktilität

Die hämodynamischen Parameter (Tabellen 16 und 17) verdeutlichen, dass in TG-Mäusen typische Anzeichen der Herzinsuffizienz, wie eine verminderte Druckentwicklung im linken Ventrikel, auftraten. Diese Parameter, insbesondere der LV-Druck sowie dessen 1. Ableitung ($\pm dP/dt_{\max}$), waren in TG/L-Mäusen im Alter von 5 Monaten im Vergleich zu TG-Mäusen unter Kontrollbedingung deutlich verbessert (Tabelle 17). Die Kontraktion und Relaxation des Myokards werden im Wesentlichen durch die freie Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol beeinflusst. Die Druckabfallgeschwindigkeit ($-dP/dt$) beschreibt den Kurvenverlauf der Relaxationsphase als mathematische Ableitung der linksventrikulären Druckkurve nach der Zeit. Hingegen liefert die Druckanstiegsgeschwindigkeit ($+dP/dt$) eine Aussage über die Kontraktionsphase. Hier konnten, wie auch bei Sato et al. (1998), verminderte Kontraktions- sowie Relaxationsgeschwindigkeiten in den TG im Vergleich zu WT zu beiden Zeitpunkten gemessen werden (Tabellen 16 und 17). Unter Losartanbehandlung konnten beide Parameter in den 5 Monate alten TG verbessert werden und somit aufgrund der verbesserten Kontraktilität die höhere Überlebenswahrscheinlichkeit erklärt werden. Unter der kürzeren 1-monatigen Losartanbehandlung wurden diese Parameter jedoch in den 2 Monate alten TG nicht verbessert (Tabelle 16).

Die CSQ-Überexpressionsmäuse unter Kontrollbedingung hatten signifikant niedrigere Herzfrequenzen im Vergleich zu WT (Tabellen 16 und 17). Interessanterweise war die Herzfrequenz zwischen 2 und 5 Monaten alten TG-Mäusen unverändert (127 ± 19 bpm zu 127 ± 27 bpm). Andere Studien zeigten schwere Bradykardien auch in jüngeren CSQ-Mäusen ohne Hinweise auf eine bestehende Herzinsuffizienz (Knollmann et al. 2000; Cho et al. 1999).

Des Weiteren wurden Kontraktionskraft- sowie Herzfrequenzmessungen an den linken Vorhöfen in allen vier Gruppen durchgeführt. Die Kraft-Frequenz-Beziehung charakterisiert eher die Funktion des SR, indem die Beziehung der Herzmuskelzelle mit zunehmendem Ca^{2+} -Angebot während der Diastole parallel zur Herzfrequenz gemessen wird. Hingegen charakterisieren die PRP-Messungen eher die Ca^{2+} -Homöostase als Ganzes. Insbesondere der Vergleich der verschiedenen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen bezüglich deren Verhalten nach Ausschalten des Stimulationsreizes charakterisiert den sarkoplasmatischen und sarkolemmlen Ca^{2+} -Transportmechanismus in den Kardiomyozyten. Durch die „Post-Rest Potentiation“ (PRP)-Messungen konnte die funktionelle Kapazität des SR in Bezug auf die Akkumulation und Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen experimentell untersucht werden. Die Kontraktion der PRP-Messungen kann indirekt als Indikator für den Ca^{2+} -Gehalt im SR angesehen werden (Bers 1995; Koch-Weser et al. 1985; Pieske et al. 1996). Eine Potenzierung der Kontraktionskraft spricht für einen erhöhten Ca^{2+} -Gehalt im SR.

Am gesunden menschlichen Ventrikel konnten Pieske et al. (1996) bei den PRP-Messungen unter physiologischen Versuchsbedingungen eine ausgeprägte Verstärkung der Kontraktionskraft mit einhergehender Erhöhung der Amplitude des intrazellulären Ca^{2+} -Transienten zeigen. Hingegen konnten Davia et al. (1997) diese Potenzierung nicht bestätigen. Hier wurde sogar ein Verlust der Kontraktionskraft in den PRP-Messungen an den Kardiomyozyten nachgewiesen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, wie bei Davia et al. (1997), in den WT unter Kontrollbedingung beziehungsweise unter Losartanbehandlung ebenfalls eine Abnahme der PRP-Kraftentwicklung bei den Pausenintervallen ab 60 s (Abbildung 24 und Tabelle 19).

Am insuffizienten menschlichen Ventrikel hingegen kommt es in den PRP-Messungen zu einem Verlust oder sogar zu einer Umkehr der Potenzierung der Kontraktionskraft (negative PRP-Beziehung; Pieske et al. 1996). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Muskelstreifenpräparaten von terminal insuffizienten Herzen unter längeren Pausenintervallen von 120 s und 240 s die PRP-Kraftentwicklung bei einer extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen von 2,5 mM und einer basalen Stimulationsfrequenz von 1 Hz abnahm (Pieske et al. 1996). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in den TG bei höheren Pausenintervallen ab 60 s eine Abnahme der PRP-Kraftentwicklung vorlag (Abbildung 24 und Tabelle 19). Mit zunehmenden Pausenintervallen kommt es zu einer Akkumulation des freien zytosolischen Ca^{2+} im SR und somit zu einer Abnahme der Kontraktionskraft.

Koffein aktiviert den RyR des SR und führt somit zu einer kompletten Ca^{2+} -Entleerung des SR in das Zytosol (Lukyanenko et al. 2001). Das Ausmaß der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung kann daher als Maß für die Speicherkapazität des SR angesehen werden. Die Koffein-Gabe führt in den TG im Vergleich zu WT zu einem geringeren Abfall der Kontraktionskraft und somit zu einer verminderten Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen über den RyR (Abbildung 25). Die CSQ-Mäuse sind nicht in der Lage, die an das CSQ-gebundenen Ca^{2+} -Ionen über den RyR in das Zytosol abzugeben. Bisherige Untersuchungen und auch die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine vermehrte Ca^{2+} -Speicherung im SR, verbunden mit einer verringerten Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung, hin (Jones et al. 1998; Knollmann et al. 2000; Wang et al. 2000). Es kommt somit zu einer Ca^{2+} -Überladung im SR. Der verminderte freie Ca^{2+} -Gehalt im SR könnte wiederum die Abnahme der Kontraktionskraft bei höheren Stimulationspausen in den PRP-Messungen erklären. Unter Losartanbehandlung konnte jedoch keine Verbesserung der Kontraktionskraft hinsichtlich der höheren Stimulationspausen beobachtet werden (Abbildung 24 und Tabelle 19). Auch nach der Applikation von Koffein war in TG/L im Vergleich zu TG keine erhöhte Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aus dem SR zu beobachten (Abbildung 25). Lediglich die Ausgangskonzentration war in den TG unter Losartanbehandlung deutlich verbessert. Dem Verlust dieser Kontraktionskraftpotenzierung im insuffizienten Myokard scheint eine gestörte Funktion der

Ca²⁺-Homöostase zugrunde zu liegen. Dies kann durch eine verminderte Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR im Zusammenhang mit einer gesteigerten NCX-Aktivität, einer verminderten Ca²⁺-Aufnahme durch SERCA2a, als auch auf Veränderungen am RyR, die letztendlich zu einer intrazellulären Ca²⁺-Entleerung führen, erklärt werden (Pieske et al. 1996; Hasenfuss et al. 1994). Auch Veränderungen der einzelnen Proteine neben RyR, die am quartären Komplex beteiligt sind, könnten eine intrazellulären Ca²⁺-Entleerung bedingen und demnach könnte somit die Überexpression von CSQ eine wichtige Rolle spielen.

CSQ Knock-out Mäuse sind anfällig für verfrühte, spontane Ca²⁺-Freisetzungen aus dem SR sowie getriggerte Herzschläge und ventrikuläre Tachykardien als Folge der fehlenden Hemmung der Ca²⁺-Freisetzung durch CSQ bei hohem Ca²⁺-Gehalt im SR. Die SR-Proteine JCN und TRD sind in diesen Mäusen reduziert, während RyR und SERCA2a unverändert blieben, was auf eine Erhöhung der freien Ca²⁺-Konzentration schließen lässt (Knollmann et al. 2006). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Erhöhung des SR-Volumens um etwa 50 %. Desweiteren könnte eine Hochregulierung weiterer Ca²⁺-bindender Proteine im SR die Abwesenheit von CSQ kompensieren. Jedoch konnten Knollmann et al. (2006) dies nicht beobachten. Allerdings zeigten Song et al. (2007) in einem anderen CSQ-Null-Mausmodell eine Erhöhung von Calreticulin. Im Gegensatz zu dem verwendeten Mausmodell von Knollmann et al. (2006) war das Alter der Mäuse höher und zudem wiesen diese eine Herzhypertrophie auf, die wiederum die Erhöhung des Calreticulins erklären könnte. Knollmann et al. (2006) konnten demnach keinen kompensatorischen Mechanismus finden, der die Ca²⁺-Speicherungskapazität im SR trotz der Abwesenheit von CSQ erklärt. Demnach scheint CSQ nicht ganz so essentiell für die Ca²⁺-Speicherung im Herzen zu sein.

Desweiteren sind CSQ Knock-out Mäuse trotz normaler Herzkontraktion und ohne Anzeichen einer Herzhypertrophie anfällig für catecholaminerge ventrikuläre Arrhythmien. Diese konnten auch bei menschlichen CSQ-Mutationen beobachtet werden. Nach Isoprenalin-Gabe treten häufig verfrühte multifokale ventrikuläre Komplexe auf und bei telemetrischen Untersuchungen nach Durchführung von Belastungstests polymorphe ventrikuläre Tachykardien (Knollmann et al. 2006). Interessanterweise wiesen die polymorphen ventrikulären Tachykardien in den CSQ Knock-out Mäusen häufig alternierende QRS-Komplexe auf, was auch charakteristisch für CPVT-Patienten ist. Die CSQ Knock-out Mäuse phänokopieren somit die menschlichen Arrhythmien (Knollmann et al. 2006).

Beim Menschen führt die Erhöhung der Herzfrequenz zu einer Steigerung der Kontraktilität (Bowditch 1871). Diese sogenannte positive Kraft-Frequenz-Beziehung oder „positive Treppe“ ist durch eine häufigere Depolarisation bei hoher Stimulationsfrequenz mit einem erhöhten Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellulärraum sowie einer nachfolgenden Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zu erklären (Piot et al. 1996). Zudem führt ein intrazellulärer Ca²⁺-Anstieg zu einer vermehrten Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR und somit

letztendlich zu einer frequenzinduzierten Ca^{2+} -abhängigen Kontraktionssteigerung. Durch diese Frequenzinotropie wird der erhöhte kardiale Blutauswurf während körperlicher Belastung unterstützt. Bei menschlicher Herzinsuffizienz kommt es auf molekularer Ebene zu einer Umwandlung der normalerweise positiven Kraft-Frequenz-Beziehung in eine negative (Hasenfuss et al. 1994; Pieske et al. 1999) und die myokardiale Kontraktilität ist mit zunehmenden Schweregrad der Herzinsuffizienz abgeschwächt. Bei erhöhter Stimulationsfrequenz kommt es zu einer geringeren Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration spielt dabei eine entscheidende Rolle: bei zu hohen Konzentrationen kann auch mit steigender Stimulationsfrequenz kein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration bewirkt werden. Bei CHF-Patienten führt eine Frequenzsteigerung von mehr als 60 bpm zu keiner weiteren Kontraktionssteigerung (Phillips et al. 1990). Als Ursache für die Umkehr der Kraft-Frequenz-Beziehung wird eine Funktionsstörung im SR diskutiert (Alpert et al. 2000).

Abhängig von der Spezies konnten unterschiedliche physiologische Kraft-Frequenz-Beziehungen beobachtet werden. Kaninchen weisen wie Menschen eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung auf. Des Weiteren konnten Schwinger et al. (1993) eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung sowohl an isoliert elektrisch gereizten Vorhof- als auch an Ventrikelpräparaten von gesunden menschlichen Herzen beobachten. Hingegen zeigen gesunde Ratten- und Mäuseherzen eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung (Bluhm et al. 2000, Hoffman und Kelly 1959; Henderson et al. 1969). Der Mechanismus ist bis heute unklar. Diskutiert werden ein verminderter transmembranöser Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol (Shattock und Bers 1989), eine erhöhte Na^+ -Aktivität (Grupp et al. 1985), eine abnehmende Ca^{2+} -Sensitivität (Narayan et al. 1995) sowie ein verminderter Ca^{2+} -Gehalt des SR zum einem durch eine verringerte SERCA2a-Aktivität (Schwinger et al. 1993; Hasenfuss et al. 1994) und zum anderen durch eine geringere Speicherkapazität im SR (Bluhm et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenso an nicht-insuffizienten Vorhofpräparaten von WT sowie WT/L eine Abnahme der Kontraktionskraft mit Erhöhung der Stimulationsfrequenz (negative Kraft-Frequenz-Beziehung) gezeigt werden (Abbildung 26). In den insuffizienten Vorhofpräparaten der CSQ-Mäuse konnte wie auch bei den Muskelstreifenpräparaten von Herzinsuffizienzpatienten eine inverse Kraft-Frequenz-Beziehung beobachtet werden (Abbildung 26). Mit Erhöhung der Stimulationsfrequenz nahm die Kontraktionskraft im Gegensatz zu den WT zu. Diese sogenannte „positive Treppe“ kann durch eine Ca^{2+} -Überladung im SR, die auch bei Koffein-Gabe in den TG gefunden wurde, erklärt werden. Mit steigender Stimulationsfrequenz kommt es aufgrund einer zu kurzen Relaxationszeit und/oder möglicherweise aufgrund einer verstärkten Bindung von CSQ an TRD zu einer verschlechterten Ca^{2+} -Bindung an CSQ. Bei einem erneut ausgelösten Aktionspotential können die Ca^{2+} -Ionen sofort aus dem SR über den RyR freigesetzt werden und es kommt zu einer Kontraktionszunahme. Auch Pieske et al. (1996, 1999) konnten in

den Kardiomyozyten des chronisch insuffizienten menschlichen Myokards eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung sowie einen verminderten Ca^{2+} -Gehalt im SR nachweisen. Diese inverse Kraft-Frequenz-Beziehung ist auf eine frequenzabhängige Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zurückzuführen, die wiederum auf einer verminderten SERCA2a-Aktivität basieren könnte. In dieser Arbeit konnte in den CSQ-Mäusen unter Losartanbehandlung eine Umkehr der positiven Kraft-Frequenz-Beziehung der TG unter Kontrollbedingung beobachtet werden. Die TG/L wiesen einen frequenzinduzierten negativ inotropen Effekt wie die WT und WT/L auf (Abbildung 26). Als Ursache ist eine verringerte Ca^{2+} -Freisetzung vorstellbar. Während der Relaxation kann das gespeicherte Ca^{2+} im SR möglicherweise nicht sofort wieder zur Verfügung gestellt werden und die Kontraktion nimmt somit ab.

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse bezüglich der verschiedenen Parameter zur Charakterisierung der Herzkontraktilität weisen darauf hin, dass der verminderten Kontraktilität bei Herzinsuffizienz pathophysiologisch eine gestörte Funktion des SR und eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase zugrunde liegen. Weitere Untersuchungen der PRP- sowie der Frequenz-Kraft-Beziehungen mit parallelen Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Transienten sowie der Ca^{2+} -Ströme und des Ca^{2+} -Gehaltes des SR an den CSQ-überexprimierenden Mäusen unter Losartanbehandlung und unter Trinkwasser allein sind notwendig. So können der intrazelluläre Wirkmechanismus der Kontraktilitätsänderung, die Rolle des CSQ im Zusammenspiel des quartären Komplexes sowie der Einfluss von Losartan im Rahmen der Herzinsuffizienz besser verstanden werden.

5.6 Effekte von Losartan auf das EKG

Histopathologische sowie fibrotische Veränderungen in CSQ-Herzen können mit EKG-Veränderungen assoziiert sein (Abbildung 21). Ein typisches Zeichen für die atriale Herzhypertrophie ist die Verbreiterung und das Aufspalten der P-Welle, welche nur in TG vorkamen. Knollmann et al. (2000) beschrieben auch breitere QRS-Komplexe und längere QT-Intervalle für das CSQ-Maus-Modell, sowie verschiedene Grade von atrioventrikulären Reizleitungsblockaden wie die Verbreiterung der P-Welle und ventrikuläre Extrasystolen. Auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten eine Verbreiterung des QRS-Komplexes, längere QT-Intervalle sowie verschiedene AV-Blockaden in den TG unter Kontrollbedingung beobachtet werden (Abbildung 21 und Tabelle 18). Diese auftretenden Reizleitungsblockaden können mit den fibrotischen Veränderungen in den CSQ-Mäusen zusammenhängen. Neu in diesem Zusammenhang ist, dass eine Losartanbehandlung die veränderten QRS-Komplexe sowie die veränderten QT-Intervalle in den TG teilweise verhindern konnte. Aufgrund dieser Daten lässt sich vermuten, dass die durch den plötzlichen Herztod hervorgerufene Sterblichkeit der Mäuse reduziert und somit zu der

höheren Überlebenswahrscheinlichkeit in der Losartan-Behandlungsgruppe beigetragen wurde. Jedoch konnten bei den EKG-Messungen keine typischen ventrikulären Arrhythmien, wie ektope Extrasystolen oder ventrikulär anhaltende Tachykardien, in den CSQ-Mäusen gemessen werden. Möglicherweise kann dies durch die kurzen Zeitintervalle der EKG-Untersuchung über 5 Minuten erklärt werden. Weiterführende telemetrische Untersuchungen über einen längeren Zeitraum wären für die Ermittlung von ventrikulärer Arrhythmien in dem CSQ-Mausmodell sowie zur besseren Erklärung der Ursachen für die protektiven Effekte von Losartan auf die EKG-Parameter sinnvoll.

5.7 Pharmakokinetische Aspekte von Losartan

Um ausschließen zu können, dass die protektiven Effekte von Losartan aus teilweise höheren Plasmaspiegeln des Losartans resultieren könnten, da die TG mehr Wasser tranken als die Kontrollmäuse, oder dass die Bioverfügbarkeit und/oder die Gewebekonzentrationen unter Herzinsuffizienz verschieden sind, wurden HPLC-Messungen der Plasmaproben durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Annahme bezüglich der unterschiedlichen Plasmakonzentrationen bei WT/L und TG/L in dem hier verwendeten Mausmodell nicht bestätigen konnte (Abbildung 40). Des Weiteren könnte über einen unterschiedlichen Metabolismus von Losartan in TG zu WT spekuliert werden. In einer Vergleichsstudie von gesunden mit herzinsuffizienten Patienten berichteten Lo et al. (1998) bei Herzinsuffizienzpatienten über niedrigere Maximalplasmawerte von Losartan und seinem aktiven Metaboliten EXP3174 (in derselben peroralen Dosierung). Hingegen konnten in dem hier verwendeten Mausmodell keine unterschiedlichen Plasmalevel von Losartan sowie seines aktiven Metaboliten in TG und WT beobachtet werden (Günther et al. 2010).

5.8 Der Vergleich mit anderen Interventionsstudien in CSQ-Mäusen

In früheren Studien konnte die Herzinsuffizienz in den CSQ-Mäusen mittels genetischer Ansätze oder pharmakologischer Behandlung abgemildert werden. Der Phänotyp der Mäuse wurde verbessert, und die Sterblichkeit wurde durch Kreuzung mit Phospholamban Knock-out-Mäusen reduziert (Sato et al. 2001). Ähnlich zu den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen konnte die Herzhypertrophie in doppeltransgenen Mäusen im Alter von 2 - 3 Monaten, jedoch nicht zu einem späteren Zeitpunkt im Alter von 7 Monaten durch die Kreuzung abgemildert werden. Die kontraktile Funktion wurde erhöht, während die Verlängerung des Aktionspotentials aufgehoben wurde (Sato et al. 2001). Eine weitere Ähnlichkeit zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen war, dass Sato et al. (2001) keine Veränderung in der CSQ-Expression beobachten konnten, was durch den Vergleich

der CSQ-Mäuse mit den doppeltransgenen Mäusen ersichtlich war. Über Daten zur Sterblichkeit wurde hingegen nicht berichtet. In einer anderen Studie hatten die CSQ-Mäuse eine mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit von 71 Tage, welche durch die Co-Expression des P2X₄-Rezeptors in Herzen von Mäusen auf 182 Tage verlängert werden konnte (Yang et al. 2004). Zudem lassen sich deutliche Anzeichen für die Veränderung der β -Adrenorezeptor-Signalkaskade in den CSQ transgenen Mäusen finden. Dies konnte für verschiedene Schritte im Signalübertragungsweg gezeigt werden. Zum Beispiel ist die inotrope und chronotrope Wirkung der β -Adrenorezeptor-Stimulation in TG-Herzen vor der Entwicklung der Herzinsuffizienz außerordentlich vermindert (Cho et al. 1999). Dies wurde begleitet und erklärt durch die erhöhten β ARK1-Expression. Durch Paarung mit Mäusen, die eine Überexpression eines Peptidhemmstoffes der β ARK1 aufwiesen, konnte die kontraktile Funktion und somit das Überleben in den doppeltransgenen Mäusen verbessert werden (Harding et al. 2001). Weil β ARK1 mit der Phosphoinositid-3-kinase interagiert, verbessert die gezielte Hemmung dieses Enzyms zumindest teilweise den Phänotyp der CSQ-Mäuse hinsichtlich der kontraktiven Parameter sowie der Sterblichkeit. Hingegen konnte die Herzhypertrophie nicht beeinflusst werden (Perrino et al. 2005). Im Einklang mit diesen Ergebnissen verbesserte die Behandlung mit dem selektiven β_1 -Adrenorezeptorblocker Metoprolol die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit in den CSQ transgenen Mäusen von 63 ± 7 auf 98 ± 7 Tage sowie die echokardiographischen Parameter der Inotropie (Harding et al. 2001). Der protektive Effekt von Metoprolol lief auf eine 56 %ige Verbesserung des Überlebens hinaus. Unter Losartanbehandlung hingegen lag die Verbesserung bei 66 % (Günther et al. 2010).

5.9 Effekte von Losartan auf den Skelettmuskel

Die Lebensqualität der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ist stark durch die ausgeprägte Belastungsintoleranz beeinträchtigt. Frühere Studien beobachteten, dass die metabolischen sowie die strukturellen Veränderungen in der peripheren Skelettmuskulatur einen wesentlichen Beitrag zu der eingeschränkten Belastbarkeit bei Herzinsuffizienzpatienten beitragen (Adams et al. 2008, Nicoletti et al. 2003, Schaufelberger et al. 1995). Zudem ist bekannt, dass bei diesen Patienten die Glykolyse sowie die oxidative Aktivität des Zitronensäurezyklus gestört ist (Harrington et al. 1997).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp der Herzinsuffizienz hervorgerufen durch die Überexpression von CSQ zusätzlich auch von metabolischen Modifizierungen in den Skelettmuskelfasern begleitet wird. Dies stellt einen völlig neuen Befund dar. Weiterhin ist bis jetzt noch nicht bekannt gewesen, inwiefern und mit welchem Ausmaß ein primär genetischer Defekt im Herzen, wie in diesem Mausmodell

gezeigt, zu einer veränderten metabolischen Funktion im Skelettmuskel führen kann. Wahrscheinlich spielen humorale Faktoren wie zum Beispiel der Tumornekrose-Faktor-Alpha (TNF α), das Angiotensin II oder die Interleukine eine wichtige Rolle (Testa et al. 1996). Des Weiteren ist bekannt, dass in Tiermodellen der Herzinsuffizienz ebenso wie bei der menschlichen Herzinsuffizienz der zirkulierende Gehalt von TNF α , Angiotensin II und/oder Interleukinen außerordentlich erhöht ist. Zudem wird über eine Beteiligung dieser humoralen Faktoren an der Kachexie in stark erkrankten Herzpatienten der NYHA-Klasse IV diskutiert. Außerdem wird bei menschlicher Herzinsuffizienz angenommen, dass eine Abnahme der Herzleistung zu einer reduzierten Versorgung mit Nährstoffen für die Skelettmuskulatur und somit zum Schwund und Verfall der Muskelfunktion führen könnte (Punkt et al. 2011). Zurzeit kann hier noch nicht zwischen diesen verschiedenen Effekten differenziert werden, welche jedoch sehr wohl in dem gegenwärtigen Modell synergistisch interagieren könnten.

Der Skelettmuskel besteht aus verschiedenen Fasertypen, die sich physiologisch, metabolisch und morphologisch unterscheiden (Polla et al. 2004; Punkt 2002; Schiebler et al. 2007). Alle Fasertypen kommen gleichzeitig in einer Einheit vor, jedoch in einem unterschiedlichen Verhältnis. So bestehen die Ausdauerermuskeln hauptsächlich aus den langsamen Fasern mit hohem oxidativen Stoffwechsel, zu dem die SO-Fasern gehören. In den schnell kontrahierenden Muskeln hingegen überwiegen die Fast-Fasern mit einem hohen glykolytischen Stoffwechsel, zu dem die FG-Fasern zählen. Die FOG-Fasern nehmen eine Zwischenstellung ein. Sie gehören zu den Fast-Fasern mit sowohl oxidativem als auch glykolytischem Stoffwechsel. Die Muskelfasern können sich den Veränderungen des Stoffwechsels sowie der molekularen Zusammensetzung aufgrund funktioneller Beanspruchung, wie bei Herzinsuffizienz, anpassen. Dies kann zur Umwandlungen von Fasertypen führen.

Im Vergleich zu WT konnte eine erhöhte Succinat-Dehydrogenase (SDH)-Aktivität sowie eine Tendenz zu verminderter Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPDH)-Aktivität in Muskelhomogenaten von TG-Mäusen gemessen werden, welche durch die erhöhte Menge an SO-Fasern und durch die verminderte Menge an FG-Fasern zu erklären ist (Abbildung 32). Dies resultierte in einem verminderten GPDH/SDH-Aktivitätsquotienten (Abbildung 32c), was wiederum eine Verschiebung zum oxidativen Phänotyp in den Muskeln charakterisiert. Unter Losartanbehandlung konnte die erhöhte SDH-Aktivität in TG-Mäusen fast auf den Gehalt der WT reduziert werden (Abbildung 32a). Dies kann durch das verminderte SO-Faserverhältnis sowie durch die verminderte SDH-Aktivität in allen Fasertypen erklärt werden. Auch die GPDH-Aktivität im Musculus rectus femoris der transgenen Mäusen unter Losartanbehandlung war niedriger (Abbildung 32b). Während in den TG die GPDH-Aktivitäten in den einzelnen Fasern vermindert waren, zeigten die SDH-Aktivitäten der einzelnen Fasern eine Tendenz zu unveränderter und/oder verminderter Expression im Gegensatz zu den Muskelhomogenaten (Punkt et al. 2011). Dieses Ergebnis

demonstriert deutlich, dass metabolische Veränderungen in den einzelnen Fasern nicht unbedingt die metabolischen Veränderungen des gesamten Muskels widerspiegeln. Veränderungen in der Zusammensetzung der Fasertypen tragen wesentlich zu einem veränderten Metabolismus in den Muskeln bei. Die zunehmende Dichte der Fasertypen mit hoher SDH-Aktivität in den SO-Fasern führte zu einer erhöhten SDH-Aktivität im gesamten TG-Muskel, obwohl die SDH-Aktivität in den einzelnen Fasern abnehmend beziehungsweise unverändert war (Abbildung 35).

Unter Losartanbehandlung kam es zu keiner Verschiebung des metabolischen Profils der TG-Muskeln, da beide Enzymaktivitäten in annähernd demselben Ausmaß abnahmen (Punkt et al. 2011). Diese Effekte spiegelten sich in allen Fasertypen wider. Unter Losartanbehandlung konnten auch verminderte GPDH-Aktivitäten sowie unveränderte SDH-Aktivitäten im WT Muskeln gefunden werden. Dies könnte durch verminderte GPDH-Aktivitäten in allen Fasern und durch gegenläufige Effekte der verminderten SDH-Aktivität in FOG- und FG-Fasern sowie den erhöhten SO-Faseranteil bedingt sein. Die drastische Verschiebung zu einem vermehrt oxidativen Metabolismus, Abnahme des GPDH/SDH-Aktivitätsquotienten, im ganzen WT/L-Muskel wurde hauptsächlich durch eine metabolische Verschiebung in den FG-Fasern verursacht. Durch die direkte Hemmung der GPDH-Aktivität unter Losartanbehandlung könnte die Wirkung in WT sowie in TG-Muskeln erklärt werden. Jedoch stört Losartan nicht den GPDH-Nachweis (Brücher et al. 2007). Im Gegenteil: Losartan veränderte unter chronischer Gabe, wie auch Enalapril, die mitochondriale Aktivität in den Nieren der Ratten (Lasaitiene et al. 2006).

Li et al. (2007) konnten keine Veränderungen in der Faserpopulation des Musculus plantaris in den TG-Mäuse desselben Modells der kardialen Überexpression von CSQ finden und schlussfolgerten daraus, dass die eingeschränkte körperliche Belastung der Skelettmuskeln bei Patienten mit CHF ohne Wechsel der Fasertypen im Skelettmuskel einhergehen kann. In der vorliegenden Arbeit konnte ein erhöhter Prozentsatz an oxidativen Fasern des Typs I und Typ IIa im Musculus rectus femoris der TG gefunden werden, was auf eine Modifizierung der Faserzusammensetzung von TG-Mäusen hinweisen könnte (Abbildung 34). Jedoch ist zu bedenken, dass die TG aus der Studie von Li et al. (2007) mit 2 Monaten viel jünger waren als jene in der vorliegenden Arbeit mit 4 Monaten. Zudem war die gemessene Zusammensetzung der Fasern im Musculus plantaris, ein Muskel, der nur 1 - 2 % oxidative Fasern des Typs I (langsame Fasern) enthält, bei Li et al. (2007) unterschiedlich zu der Zusammensetzung der Fasern im verwandten Musculus rectus femoris. Des Weiteren konnten Li et al. (2007) eine Tendenz beobachten, die mit den gegenwärtigen Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Zusätzlich sind die Effekte der TG in einem Muskel mit weniger glykolytischer Kapazität (Musculus rectus femoris) ausgeprägter als in einem

Muskel mit erhöhter glykolytischer Kapazität (Musculus plantaris). Folglich können diese Ergebnisse mit denen von Li et al. (2007) in Übereinstimmung gebracht werden.

Ein Schlüsselenzym in der Faserneugestaltung zum oxidativen Stadium und zur funktionellen Muskeladaptation ist Calcineurin (Mallison et al. 2009). Die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin fördert in den Mäusen die Bildung von langsamen Fasern (Frey et al. 2008). In TG-Muskeln konnte eine erhöhte Calcineurin-Expression gemessen werden (Abbildung 38). Dies steht wiederum im Einklang mit einer Verschiebung der Fasertypen von schnellen zu langsamen Fasern (Punkt et al. 2011). Die Signalübertragung vom insulinähnlichen Wachstumsfaktor (IGF 1) über Calcineurin löst unter anderem eine Muskelhypertrophie aus (Bodine et al. 2001; Rommel et al. 2001). Eine Herunterregulierung des IGF 1 führt zur Apoptose sowie zum Verlust der Muskelmasse und -kraft und somit zu einer verschlechterten Prognose der Herzinsuffizienzpatienten. Unter Losartanbehandlung konnte die Calcineurin-Expression der TG auf den Gehalt von WT reduziert werden, was wiederum auf normalisierte Level des IGF 1 hindeuten und somit die protektiven Effekte von Losartan auf den Skelettmuskel erklären könnte (Punkt et al. 2011). Eine hemmende Wirkung von Losartan auf die Calcineurin-Expression wurde auch in Angiotensin II-stimulierten kardialen Myozyten von Ratten gefunden (Fu et al. 1999).

Bei CHF-Patienten kommt es zu zahlreichen Veränderungen der Skelettmuskulatur wie Muskelatrophie und Umwandlung der Muskelfasern vom oxidativen Typ I zum glykolytischen Typ IIa (Niebauer et al. 2008). Bei der Faserumwandlung ändert sich immer auch der Stoffwechsel der Skelettmuskelzellen. Unter niedrigeren Belastungen werden vermehrt langsame Muskelfasern mit hoher oxidativer Kapazität gebildet, die eine hohe Fettverbrennung aufweisen. Hingegen kommt es bei steigender Belastung zu einer vermehrten Bildung von schnellen Muskelfasern mit hoher glykolytischer Kapazität und infolgedessen zu einer hohen Kohlenhydratverbrennung (Roberts et al. 1996). Weiterhin kommt es zu einer Abnahme der MHC I-Fasern, der mitochondrialen Enzyme, des oxidativen Fettstoffwechsels, der Cytochrom-C-Oxidase sowie der mitochondrialen Volumendichte. All diese Veränderungen können in unterschiedlichem Ausmaß durch körperliches Training positiv beeinflusst werden und somit die Prognose der Herzinsuffizienzpatienten verbessern, da die körperliche Leistungsfähigkeit auch vom Zustand der Skelettmuskulatur abhängig ist (Niebauer et al. 2008). Auch Nicoletti et al. (2003) konnten in CHF-Patienten eine Umwandlung von langsamen zu schnellen Fasern zeigen. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit ein erhöhtes Vorkommen an SO-Fasern sowie einer erhöhten SDH-Aktivität in CSQ-Mäusen nachgewiesen werden. Toth et al. (2005, 2006a, 2006b und 2010) fanden in Herzinsuffizienzpatienten eine verminderte oxidative Kapazität sowie einen niedrigeren Gehalt an MHC I codierender mRNA. MHC I ist größtenteils in SO-Fasern exprimiert. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz kann in der unterschiedlichen Wirkungsweise der

Herzinsuffizienz auf den zirkulierenden Gehalt des IGF 1 in Menschen sowie dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell liegen (Punkt et al. 2011). Toth et al. (2006a) konnten bei Herzinsuffizienzpatienten keine Veränderungen in der Zirkulation des IGF 1 im Vergleich zu Gesunden finden. Jedoch konnte eine Tendenz zu einem erhöhten IGF 1-Gehalt nachgewiesen werden. IGF 1 kann Calcineurin aktivieren (Toth et al. 2006a). Somit könnte die Aktivierungswirkung von IGF 1 in diesem Mausmodell der Herzinsuffizienz die erhöhte Calcineurin-Expression in den TG-Mäusen unter Kontrollbedingung hervorrufen. Die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin fördert die Ausbildung der langsamen und der für die Ausdauer verantwortlichen Muskelfasern und bewirkt somit eine Transformation hin zum vermehrt oxidativen Stoffwechsel (Frey et al. 2008, Mallison et al. 2009). Demnach kann die Umwandlung der Fasertypen, von schnellen zu langsamen Fasern, als Folge der erhöhten Calcineurin-Expression in den TG-Mäusen erklärt werden. Folglich unterscheiden sich die Veränderungen der Skelettmuskulatur bei menschlichen Herzinsuffizienzpatienten deutlich von den beobachteten Veränderungen des in dieser Arbeit verwendeten CSQ-Mausmodells und lassen unter diesem Gesichtspunkt eine Beschränkung des Mausmodells ersichtlich werden. In weiterführenden Versuchen sollten deshalb der Skelettmuskelmetabolismus sowie die Veränderungen der Faserzusammensetzung des Skelettmuskels auch in anderen genetischen Modellen der Herzinsuffizienz näher untersucht werden.

5.10 Einordnung der Daten im Hinblick auf die Therapie der menschlichen Herzinsuffizienz

Angiotensin II-Rezeptorblocker wie Telmisartan, Candesartan, Valsartan und Losartan haben einen festen Stellenwert in der Therapie der Herzinsuffizienz, da sie die Sterblichkeit und zum Teil auch die Arrhythmien in Herzinsuffizienzpatienten reduzieren können (CHARM-Studie, Swedberg et al. 1999; ELITE I- und II-Studie, Pitt et al. 1997, 2000; ONTARGET-Studie, ONTARGET Investigators et al. 2008; und Val-HeFT-Studie, Cohn et al. 1999). Die CHARM-Studie liefert unter anderem den wichtigen Beweis, dass Angiotensin II-Rezeptorblocker genau wie die ACE-Hemmer die Mortalität und die Morbidität von Herzinsuffizienzpatienten vermindern können. Die Angiotensin II-Rezeptorblocker weisen zusätzlich ein verbessertes Nebenwirkungsprofil auf. Über den Einsatz der Angiotensin II-Rezeptorantagonisten anstelle der ACE-Hemmern in der Herzinsuffizienztherapie wird kontrovers diskutiert. Bei Patienten, die ACE-Hemmer aufgrund ihrer Nebenwirkungen nicht vertragen, stellt dies jedoch die Therapie der 1. Wahl dar. In internationalen Richtlinien (Writing Group 2009) wird basierend auf der SOLVD-Präventionsstudie (SOLVD Investigators 1992) eine Prävention empfohlen, die bereits eine Behandlung von asymptomatischen Herzinsuffizienzpatienten (entspricht klinisch der NYHA Klasse I) vorsieht. Diese klinische

Studie fand heraus, dass Patienten mit normaler Auswurfraction ohne klinisch manifeste Herzinsuffizienz, aber mit einer Vorgeschichte des Myokardinfarkts und somit Risikopatient für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz von der vorbeugenden Arzneimittelbehandlung (Enalapril) profitierten. Ähnliche Präventionsstudien für AT₁-Rezeptor-Antagonisten sind noch nicht verfügbar. In der LIFE-Studie konnte in Bluthochdruckpatienten für Losartan eine verminderte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei gleicher blutdrucksenkender Wirkung sowie besserer Verträglichkeit im Vergleich zu den β -Blocker Atenolol gezeigt werden (Dahlöf et al. 2002). Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde unter präventiver sowie therapeutischer Losartan-Gabe in den TG des hier verwendeten Mausmodells der CSQ-Überexpression verbessert (Abbildungen 9 und 12). Die klinische Relevanz einer Losartanbehandlung zu einem späteren Zeitpunkt, wie zum Beispiel nach 4 Monaten, sollte in weiteren Untersuchungen im Hinblick auf die Verminderung des Fortschreitens der Erkrankung, einer möglichen Reduktion der vorhandenen Fibrose und damit verbunden dem Einfluss auf die Anzeichen der Herzinsuffizienz tiefergehend untersucht werden. Das hier verwendete Mausmodell mit einer Losartanbehandlung ab dem ersten Monat, in der die TG-Mäuse anfällig für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz sind (ähnlich NYHA Klasse I), ähnelt in Grundzügen stark dem Studiendesigns der SOLVD-Studie. Anstatt eines ischämischen Insultmodells zur Nachahmung eines menschlichen Myokardinfarkts, wurde hier jedoch ein genetisches Mausmodell verwendet.

Aufgrund der hier dargestellten Daten ist es sehr wahrscheinlich, dass ein Teil der Verbesserung der Lebensqualität in mit AT₁-Antagonisten behandelten Patienten aufgrund ihrer protektiven Effekte auf die Skelettmuskelfunktion zustande kommt. Vom pharmakologischen Gesichtspunkt aus deuten diese Ergebnisse stark auf die Relevanz der Blockade des Angiotensin II-Rezeptors zum Schutz vor Herzinsuffizienz und Muskelschwund der Skelettmuskulatur hin. Es kann jedoch nicht unterschieden werden, ob die günstigen Effekte von Losartan aufgrund seiner alleinigen Blockade des Angiotensin II-Rezeptors im Herzen resultieren oder ob die zusätzliche Blockade dieses Rezeptors im Skelettmuskel eine Rolle spielt. Dies sollte in nachfolgenden Studien unbedingt aufgeklärt werden. Drexler et al. (1989) konnten des Weiteren eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion im Muskel durch ACE-Hemmer erkennen und voraussichtlich dadurch die erhöhte Sauerstoffförderung in den Beinen von Ratten und vor allem in Herzinsuffizienzpatienten erklären. Diese Verbesserungen wurden durch Verminderung der Plasmalevel von Angiotensin II und Noradrenalin begleitet, die wiederum zu einer funktionellen Verbesserung bezüglich der Skelettmuskulatur beitragen könnten (Drexler et al. 1989). Aufgrund dieser Ergebnisse scheint es möglich, dass ähnliche Mechanismen auch in der Losartanbehandlung in Frage kommen könnten.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welchen Einfluss Losartan auf transgene Mäuse mit herzspezifischer 10facher Überexpression von CSQ (TG) hat. Dieses genetische Mausmodell eignet sich als Herzinsuffizienzmodell, da viele Veränderungen bei CSQ-Mäusen auch bei menschlicher Herzinsuffizienz beobachtet werden können. Die Überexpression von CSQ führt zu Hypertrophie, Fibrose, Beeinträchtigungen der Ca^{2+} -Regulation im SR, Modifikationen auf zellulärer Ebene, Veränderungen hämodynamischer und elektrophysiologischer Parameter, Herzarrhythmien sowie plötzlichem Herztod im Vergleich zu Wildtyp (WT). Die Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit von Herzinsuffizienzpatienten ist nicht allein durch die verminderte kardiale Auswurfleistung bedingt, sondern auch durch Störungen der peripheren Zirkulation und des Skelettmuskelmetabolismus. In den TG-Mäusen wurden Veränderungen in der Faserzusammensetzung und im Skelettmuskelmetabolismus im Vergleich zu WT gefunden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Losartan-Gabe (L) bereits vor Manifestation der Hypertrophie die Sterblichkeit der CSQ-Mäuse reduzieren konnte. Die Verbesserung der hämodynamischen sowie elektrophysiologischen Parameter und dadurch die höhere Überlebenswahrscheinlichkeit sind durch ein vermindertes Herzgewicht, eine regelmäßige Anordnung der Myofibrillen und Mitochondrien auf zellulärer Ebene, eine verminderte ANP-Expression auf mRNA-Ebene sowie eine erhöhte ATPase-Expression in den TG/L bedingt. Zudem deuten die vorliegenden Ergebnisse auf eine mögliche Beteiligung des Renin-Angiotensin-Systems, speziell des AT_1 -Rezeptors, an der Entstehung der Herzinsuffizienz hin, da dessen Blockade die Überlebenswahrscheinlichkeit der CSQ-Mäuse erhöhte. Des Weiteren könnte der protektive Effekt von Losartan über die Herunterregulierung der Fibrose, die durch das endogene Angiotensin II induziert wird, erklärt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiterhin metabolische Veränderungen in definierten Fasertypen (SO-, FOG- und FG-Fasern) sowie im gesamten Skelettmuskel. Die verminderte beziehungsweise unveränderte SDH-Aktivität der verschiedenen Fasern im Gegensatz zu der erhöhten SDH-Aktivität im gesamten Muskel deutet an, dass die metabolischen Veränderungen in einer einzelnen Faser nicht die metabolischen Veränderungen des gesamten Muskels widerspiegeln. In den TG-Muskeln konnte eine Verschiebung zum oxidativen Phänotyp, charakterisiert durch die erhöhte SDH-Aktivität, beobachtet werden, die durch eine Umwandlung der Fasertypen von FG zu SO sowie durch eine erhöhte Calcineurin A-Expression bedingt ist. Unter Losartanbehandlung konnten diese Veränderungen zumindest teilweise wieder aufgehoben werden und somit den protektiven Effekt von Losartan auf den Metabolismus der Muskulatur, verbunden mit einer verbesserten Muskelfunktion, erklären.

7 Anhang

7.1 Puffer und Lösungen

AP-Puffer:	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 1,49 % (w/v) Triethanolamin pH 9,4
APS 10 %:	1 g APS/10 ml H ₂ O
BCIP:	50 mg BCIP in 1 ml DMF
Coomassie-Entfärbelösung:	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung:	45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 2,5 g/l Brilliant-Blue G
DEPC-Wasser:	0,2 % (w/v) DEPC über Nacht durch Rühren gemischt autoklaviert
Elektrophoresepuffer:	51,6 mM Tris-Base 150 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Homogenisierungspuffer:	10 mM NaHCO ₃ 20 % (w/v) SDS
Inkubationslösung:	75 mg ATP 10 ml 2 % (w/v) Natriumbarbitat 5 ml 2 % (w/v) CaCl ₂

Krebs-Henseleit-Puffer:	118 mM NaCl 25 mM NaHCO ₃ 0,5 mM EDTA 4,7 mM KCl 1,2 mM KH ₂ PO ₄ 1,2 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O 2,5 mM CaCl ₂ 11 mM Glukose pH 7.4, mit Carbogen begast
Ladepuffer:	10 % TAE-Puffer 10 % (v/v) Glycerin Spur Bromphenolblau
Lämmli 2 x ohne SDS:	20 mM Tris-Base 2 mM EDTA 10 % (v/v) Glycerin pH 7,8 Spur Bromphenolblau
Lysis-Puffer:	5 mM Tris-HCl 20 mM EDTA 0,5 % (v/v) Triton X-100 pH 8,0
Natriumacetat:	3 M Na-Acetat pH 6,0
NBT :	50 mg NBT 300 µl H ₂ O 700 µl DMF
Pikro-Siriusrot :	0,1 % Siriusrot in gesättigter, wässriger Pikrinsäure
Ponceaurot-Färbelösung:	0,2 % (w/v) Ponceau S 3 % (w/v) TCA

Porziopuffer 2 x:	0,4 % (w/v) Polyacrylamid 0,2 M Tris-Base 0,6 M Glycin 0,12 mM EDTA 0,2 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerin pH 8,8
Porzio-Trenngel (10 %):	37,5 ml Porziopuffer 2x 24,5 ml Rotiphorese® Gel 30 6,25 ml Glycerin 6,385 ml H ₂ O 65 µl TEMED 300 µl 10 % (w/v) APS
Präinkubationslösung:	10 ml 2 % (w/v) Natriumbarbitat 5 ml 2 % (w/v) CaCl ₂
Sammelgel:	4,7 ml Sammelgelpuffer 2,55 ml Rotiphorese® Gel 30 11,8 ml H ₂ O 12 µl TEMED 190 µl 10 % (w/v) APS
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
Stammlösung I :	3 M NaCl 134,8 mM KCl 27,5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O
Stammlösung II :	0,6 M NaHCO ₃
Stammlösung III :	6 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O

RIPA-Puffer :	50 mM Tris-HCl 1 % (w/v) NP-40 0,25 % (w/v) Natriumdeoxycholat 150 mM NaCl 1mM EDTA 1mM PMSF 1 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM NaF
TAE-Puffer (50 x):	2 M Tris/Acetat 5 M Na-Acetat 0,5 M EDTA pH 7,8
TBST-Puffer:	10 mM Tris-Base 154 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20 pH 7,4 Lagerung bei 4 °C
TE/SDS-Puffer:	50 mM Tris/HCl 100 mM EDTA 0,5 % (w/v) SDS pH 8,0
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl 0,25 mM EDTA pH 8,0
Transferpuffer:	210 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 40 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O

Literaturverzeichnis

- Adams V, Doring C, Schuler G (2008) Impact of physical exercise on alterations in the skeletal muscle in patients with chronic heart failure. *Front Biosci* 13:302-311
- Ahmed GU, Dong PH, Song G, Ball NA, Xu Y, Walsh RA, Chiamvimonvat N (2000) Changes in Ca^{2+} cycling proteins underlie cardiac action potential prolongation in pressure-overloaded guinea pig model with cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 86:558-570
- Alpert N, Gordon M (1962) Myofibrillar adenosine triphosphatase activity in congestive heart failure. *Am J Physiol* 20:940-946
- Alpert NR, Hasenfuss G, Leavitt BJ, Littleman FP, Pieske B, Mulieri LA (2000) A mechanistic analysis of reduced mechanical performance in human heart failure. *Jpn Heart J* 41: 103-115
- Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb-Peploe KM, Harrington D, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ (1997) Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet* 349:1050-1053
- Anversa P, Capasso J, Olivetti G, Sonnenblick E (1992) Cellular basis of ventricular remodeling in hypertensive cardiomyopathy. *Am J Hypertens* 5:758-770
- Anversa P, Kajstura J, Olivetti G (1996) Myocyte death in heart failure. *Curr Opin Cardiol* 11: 245-251
- Baba HA, Iwai T, Bauer M, Irlbeck M, Schmid KW, Zimmer HG (1999) Differential effects of angiotensin II receptor blockade on pressure-induced left ventricular hypertrophy and fibrosis in rats. *J Mol Cell Cardiol* 31:445-455
- Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF (1990) Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 259:H324-H332
- Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Purcelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P (1994) Structural basis of end-stage heart failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation* 89:151-163
- Bers DM (1985) Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during post-rest recovery. *Am J Physiol* 248:H366-H381
- Bers DM (2001) *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*, 2. Auflage, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London, pp. 1-452
- Bers DM (2006) Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 21:380-387
- Bers DM, Despa S (2006) Cardiac myocytes Ca^{2+} and Na^{+} regulation in normal and failing hearts. *J Pharmacol Sci* 100:315-322
- Bluhm W, Kranias E, Dillmann W, Meyer M (2000) Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H249-H255
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3:1014-1019

-
- Böhm M. (2002) Herzinsuffizienz und AT₁-Antagonisten. In: Erdmann E (Hrsg.) Herzinsuffizienz: Ursachen, Pathophysiologie und Therapie, 2. Auflage, Wiss. Verl.-Ges. mbH Stuttgart, pp. 273-282
- Bouley R, Pérodin J, Plante H, Rihakova L, Bernier SG, Maletínská L, Guillemette G, Escher E (1998) N- and T-terminal structure-activity study of angiotensin II on the angiotensin AT₂ receptor. *Eur J Pharmacol* 343:323-331
- Bowditch H (1871) Über die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber Sächs Akad Wiss* 23:652-689
- Brandl CJ, deLeon S, Martin DR, MacLennan DH (1987) Adult form of the Ca²⁺ ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem* 262: 3768-3774
- Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Minobe W, Rasmussen R (1989) β_1 - and β_2 -adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol* 35:295-303
- Brücher R, Cifuentes M, Acuña MJ, Albala C, and Rojas CV (2007) Larger anti-adipogenic effect of angiotensin II on omental preadipose cells of obese humans. *Obesity (Silver Spring)* 15: 1643-1646
- Bücher T, Luh W, Pette D (1964) Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnukleotiden. In: Lang K, Lelnartz E (Eds) Hoppe-Seyler Thierfelder Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. 6/A, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, pp. 293-339
- Burnier M, Buclin T, Biollaz J, Nussberger J, Waeber B, Brunner H (1996) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of three angiotensin II receptor antagonists in normal volunteers. *Kidney Int* 49:S24-29
- Cala SE, Jones LR (1991) Phosphorylation of cardiac and skeletal muscle calsequestrin isoforms by casein Kinase II. Demonstration of a cluster of unique rapidly phosphorylated sites in cardiac calsequestrin. *J Biol Chem* 266:391-398
- Carr AA, Prisant LM (1996) Losartan: first of a new class of angiotensin antagonists for the management of hypertension. *J Clin Pharmacol* 36:3-12
- Casewell AH, Brandt NR, Brunschwig JP, Pukerson S (1991) Localisation and partial characterisation of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95.000 protein (triadin) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadin vesicles. *Biochemistry* 30:7507-7513
- Chiu AT, Herblin WF, Ardecky RJ, McCall DE, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wexler RR, Wong PC, Johnson AL, Timmermans PB (1989) Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 165:196-203
- Chiu AT, McCall DE, Price WA, Wong PC, Carini DJ, Duncia JV, Wexler RR, Yoo SE, Johnson AL, Timmermans PB (1990) Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VII. Cellular and biochemical pharmacology of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 252:711-718
- Cho MC, Rapacciuolo A, Koch WJ, Kobayashi Y, Jones LR, Rockman HA (1999) Defective β -adrenergic receptor signaling precedes the development of dilated cardiomyopathy in transgenic mice with calsequestrin overexpression. *J Bio Chem* 274:22251-22256
-

- Chopra N, Yang T, Asghari P, Moore ED, Huke S, Akin B, Cattolica RA, Perez CF, Hlaing T, Knollmann-Ritschel BE, Jones LR, Pessah IN, Allen PD, Franzini-Armstrong C, Knollmann BC (2009) Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca^{2+} release units, impaired excitation-contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:7636-7641
- Christ DD, Wong PC, Wong YN, Hart SD, Quon CY, Lam GN (1994) The pharmacokinetics and pharmacodynamics of the angiotensin II receptor antagonist losartan potassium (DuP 753/MK 954) in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 26:1199-1205
- Christ DD. (1995) Human plasma protein binding of the angiotensin II receptor antagonist losartan potassium (DuP 753/MK 954) and its pharmacologically active metabolite EXP3174. *J Clin Pharmacol* 35:515-520
- Chung O, Unger T (1998) Pharmacology of angiotensin receptors and AT_1 receptor blockers. *Basic Res Cardiology* 93:15-23
- Cohn JN, Tognoni G, Glazer R, Sporman D, Hester A (1999) Rationale and design of the Valsartan Heart Failure Trial: a large multinational trial to assess the effects of valsartan, an angiotensin-receptor blocker, on morbidity and mortality in chronic congestive heart failure. *J Card Fail* 5:155-160
- Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MT, Gamradt M, ap Rhys CM, Holm TM, Loeys BL, Ramirez F, Judge DP, Ward CW, Dietz HC (2007) Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med* 13:204-210
- Colucci WS, Braunwald E (1997) Pathophysiology of heart failure. In: E Braunwald (Hrsg.) *Heart disease*, 5. Auflage, WB Saunders company, Philadelphia, pp. 394-420
- Crozier I, Ikram H, Awan N, Cleland Z, Stephen N, Dickstein K, Frey M, Young J, Klinger G, Makris L, Ruscinska E (1995) Losartan in heart failure. Hemodynamic effects and tolerability. Losartan Hemodynamic Study Group. *Circulation* 91:691-697
- Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H; LIFE Study Group (2003) Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359:995-1003
- Danser AH, Koning MM, Admiraal PJ, Sassen LM, Derkx FH, Verdouw PD, Schalekamp MA (1992) Production of angiotensins I and II at tissue sites in intact pigs. *Am J Physiol* 263:H429-H437
- Dash R, Frank KF, Carr AN, Moravec CS, Kranias EG (2001) Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -handling in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 33:1345-1353
- Daul A, Elter-Schulz M, Poller U, Jockenhovel F, Pönicke K, Boomsma F, Man in't Veld AJ, Schäfers RF, Brodde OE (1995) Dose-dependent separation of dopaminergic and adrenergic effects of epinine in healthy volunteers. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352:429-437
- Daut J (2011) Herzmechanik. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hrsg.) *Physiologie des Menschen*, 31. Auflage, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, pp. 540-564
- Davia K, Davies CH, Harding SE (1997) Effects of inhibitions of sarcoplasmic reticulum calcium uptake on contraction in myocytes isolated from failing human ventricle. *Cardiovasc Res* 33:88-97

- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52: 415-472
- del Monte F, Williams E, Lebeche D, Schmidt U, Rosenzweig A, Gwathemy JK, Lewandowski ED, Hajjar RJ (2001) Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in a rat model of heart failure. *Circulation* 104:1424-1429
- Dickstein K, Chang P, Willenheimer R, Haunsø S, Remes J, Hall C, Kiekskus J (1995) Comparison of the effects of losartan and enalapril on clinical status and exercise performance in patients with moderate or severe chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 26:438-445
- Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher A (1998) Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res* 83:334-341
- Drexler H, Banhardt U, Meinertz T, Wollschläger H, Lehmann M, Just H (1989) Contrasting peripheral short-term and long-term effects of converting enzyme inhibition in patients with congestive heart failure. A double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 79: 491-502
- Drexler H, Riede U, Münzel T, König H, Funke E, Just H (1992) Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation* 85:1751-1759
- Dzau VJ (1988) Circulation versus local renin angiotensin systems in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77:14-113
- Fabiato A, Fabiato F (1975) Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249:469-495
- Feldmann AM, Ray PE, Sitan CM, Mercer JA, Miobe W, Bristow MR (1991) Selective gene expression in failing human heart. Quantification of steady-state levels of messenger RNA in andomyocardial biopsies using the polymerase chain reaction. *Circulation* 83: 1866-1872
- Flesch M, Höper A, Dell'Italia L, Evans K, Bond R, Peshock R, Diwan A, Brinsa TA, Wei CC, Sivasubramanian N, Spinale FG, Mann DL (2003) Activation and functional significance of the renin-angiotensin system in mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* 108:598-604
- Flesch M, Schwinger RH, Schiffer F, Frank K, Sudkamp M, Kuhn-Regnier F, Arnold G, Böhm M (1996) Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na^{+} - Ca^{2+} -exchanger in failing human myocardium. *Circulation* 94:992-1002
- Frank KF, Bolck B, Brixius K, Kranias EG, Schwinger RH (2002) Modulation of SERCA: implications for the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 97:172-178
- Frey N, Frank D, Lippl S, Kuhn C, Kögler H, Barrientos T, Rohr C, Will R, Müller OJ, Weiler H, Bassel-Duby R., Katus HA, Olson EN (2008) Calsarcin-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation. *J Clin Invest* 118: 3598-3608
- Fritzsche K, Blüher M, Schering, S, Buchwalow IB, Kern M, Linke A, Oberbach A, Adams V, Punkt K (2008) Metabolic profile and nitric oxide synthase expression of skeletal muscle fibres are altered in patients with type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116:606-613

- Fu M, Xu S, Zhang J, Pang Y, Liu N, Su J, Tang C (1999) Involvement of calcineurin in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibroblast hyperplasia of rats. *Heart Vessels* 14:283-288
- Garg R, Yusuf S (1995) Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *JAMA* 273:1450-1456
- Gatti G, Trifari S, Mesaeli N, Parker JMR, Michalak M, Meldolesi J (2001) Head-to-tail oligomerization of calsequestrin: a novel mechanism for heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum luminal proteins. *J Cell Biol* 154:525-534
- Gleason W, Braunwald E (1962) Studies on the first derivative of the ventricular pressure pulse in man. *J Clin Invest* 41:80-91
- Goldspink DF, Burniston JG, Tan LB (2003) Cardiomyocyte death and the ageing and failing heart. *Exp Physiol* 88:447-458
- Gradman AH, Arcuri KE, Goldberg AI, Ikeda LS, Nelson EB, Snavely DB, Sweet CS (1995) A randomized, placebo-controlled, double-blind, parallel study of various doses of losartan potassium compared with enalapril maleate in patients with essential hypertension. *Hypertension* 25:1345-1350
- Grupp I, Im W, Lee C, Lee S, Pecker M, Schwartz A (1985) Relation of sodium pump inhibition to positive inotropy at low concentrations of ouabain in rat heart muscle. *J Physiol* 360:149-160
- Grupp I, Subramaniam A, Hewett T, Robbins J, Grupp G (1993) Comparison of normal, hypodynamic, and hyperdynamic mouse hearts using isolated work-performing heart preparations. *Am J Physiol* 265:H1401-H1410
- Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes; *J Biol Chem* 266:9180-9185
- Günther S, Baba HA, Hauptmann S, Holzhausen HJ, Grossmann C, Punkt K, Kusche T, Jones LR, Gergs U, Neumann J (2010) Losartan reduces mortality in a genetic model of heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 382:265-278
- Guo W, Jorgensen AO, Jones LR, Campbell KP (1996) Biochemical characterization and molecular cloning of cardiac triadin. *J Biol Chem* 271:357-360
- Györke I, Hester N, Jones LR, Györke S (2004a) The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys J* 86:2121-2128
- Györke S, Györke I, Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Williams SC (2004b) Modulation of sarcoplasmic reticulum calcium release by calsequestrin in cardiac myocytes. *Biol Res* 37: 603-607
- Harding VB, Jones LR, Lefkowitz RL, Koch WJ, Rockman HA (2001) Cardiac β ARK1 inhibition prolongs survival and augments β blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5809-5814
- Harrington D, Coats AJ (1997) Skeletal muscle abnormalities and evidence for their role in symptom generation in chronic heart failure. *Eur Heart J* 18:1865-1872
- Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994) Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75:434-442

-
- Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Pieske B, Meyer M, Drexler H, Just H (1996) Calcium cycling proteins and force-frequency relationship in heart failure. *Basic Res Cardiol* 91: 17-22
- Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999) Relationship between Na^+ - Ca^{2+} -exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 99:641-648
- He H, Meyer M, Martin JL, McDonough PM, Ho P, Lou X, Lew WY, Hilal-Dandan R, Dillmann WH (1999) Effects of mutant and antisense RNA of Phospholamban on SR Ca^{2+} -ATPase activity and cardiac myocyte contractility. *Circulation* 100:974-980
- Henderson A, Brutseart D, Parmley W, Sonnenblick E (1969) Myocardial mechanics in papillary muscles of rat and cat. *Am J Physiol* 217:1273-1279
- Hoffman B, Kelly JJ Jr (1959) Effects of rate and rhythm on contraction of rat papillary muscle. *Am J Physiol* 197:1273-1204
- Hoppe UC (2010) Physiologie und Pathophysiologie der elektromechanischen Kopplung. In: Erdmann E (Hrsg.) *Herzinsuffizienz: Ursachen, Pathophysiologie und Therapie*, 5. Auflage, Wiss. Verl.-Ges. mbH Stuttgart, pp. 9-17
- Hoppe UC, Erdmann E (2011) Chronische Herzinsuffizienz. In: Erdmann E (Hrsg.): *Klinische Kardiologie*, 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York: pp. 123-179
- Houdusse A, Love ML, Dominguez R, Grabarek Z, Cohen C (1997) Structures of four Ca^{2+} -bound troponin C at 2.0 Å resolution: further insights into the Ca^{2+} -switch in the calmodulin superfamily. *Structure* 5:1695-1711
- Hu ST, Shen YF, Liu GS, Lei CH, Tang Y, Wang JF, Yang YJ (2010) Altered intracellular Ca^{2+} regulation in chronic rat heart failure. *J Physiol Sci* 60:85-94
- Huckle WR, Earp HS (1994) Regulation of cell proliferation and growth by Angiotensin II. *Prog Growth Factor Res* 5:177-194
- Huke S, Knollmann BC (2010) Increased myofilament Ca^{2+} -sensitivity and arrhythmia susceptibility. *J Mol Cell Cardiol* 48:824-833
- Hunyady L, Balla T, Catt KJ (1996) The ligand binding site of the angiotensin AT_1 receptor. *TIPS* 17:135-140
- Ikemoto N, Ronjat M, Mészáros LG, Koshita M (1989) Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 28:6764-6771
- Imanaka-Yoshida K, Amitani A, Ioshii SO, Koyabu S, Yamakado T, Yoshida T (1996) Alterations of expression of the Ca^{2+} -storing proteins in endo/sarcoplasmic reticulum during differentiation of rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 28:553-562
- Israili ZH (2000) Clinical pharmacokinetics of angiotensin II AT_1 receptor blockers in hypertension. *J Hum Hypertens* 14:S73-S86
- Jones LR, Suzuki YJ, Kobayashi YM, Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Cleemann L, Morad M (1998) Regulation of Ca^{2+} signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *J Clin Invest* 101:1385-1393
- Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J (1995) Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Bio Chem* 270: 30787-30796
- Käab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marban E, Tomaselli GF (1996) Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 78: 262-273
-

- Karlsson U, Schultz RL (1965) Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion. Effect of osmolarity, pH or perfusate, and fixative concentration. *J Ultrastruct Res* 12:160-206
- Kim E, Youn B, Kemper L, Campbell C, Milting H, Varsanyi M, Kang C (2007) Characterization of human cardiac calsequestrin and its deleterious mutants. *J Mol Biol* 373:1047-1057
- Kim KC, Caswell AH, Talvenheimo JA, Brandt NR (1990) Isolation of a terminal cisterna protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. *Biochemistry* 29:9281-9289
- Kirchhefer U, Neumann J, Baba HA, Begrow F, Kobayashi YM, Reinke U, Schmitz W, Jones LR (2001) Cardiac hypertrophy and impaired relaxation in transgenic mice overexpressing triadin 1. *J Biol Chem* 276:4142-4149
- Kirchhefer U, Neumann J, Bers DM, Buchwalow IG, Fabritz L, Hanske G, Justus I, Riemann B, Schmitz W, Jones LR. (2003) Impaired relaxation in transgenic mice overexpressing junctin. *Cardiovasc Res* 59:369-379
- Knollmann BC, Knollmann-Ritschel BEC, Weissman NJ, Jones LR, Morad M (2000) Remodelling of ionic currents in hypertrophied and failing hearts of transgenic mice overexpressing calsequestrin. *J Physiol* 525: 483-498
- Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Etensohn K, Knollmann BE, Horton KD, Weissman NJ, Holinstat I, Zhang W, Roden DM, Jones LR, Franzini-Armstrong C, Pfeifer K (2006) Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest* 116:2510-2520
- Kobayashi YM, Alseikhan A, Jones LR. (2000) Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged β -strand in mediating the protein-protein interaction. *J Biol Chem* 275:17639-17646
- Kobayashi YM, Jones LR (1999) Identification of triadin 1 as the predominant triadin isoform expressed in mammalian myocardium. *J Biol Chem* 274:28660-28668
- Koch-Weser J, Blinks JR (1963) The influence of the interval between beats on myocardial contractility. *Pharmacol Rev* 15:601-652
- Lahat H, Pras E, Olender T, Avidan N, Ben-Asher E, Man O, Levy-Nissenbaum E, Khoury A, Lorber A, Goldman B, Lancet D, Eldar M (2001) A missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel. *Am J Hum Genet* 59:1378-1384
- Lasaitiene D, Chen Y, Mildaziene V, Nauciene Z, Sundelin B, Johansson BR, Yano M, Friberg P (2006) Tubular mitochondrial alterations in neonatal rats subjected to RAS inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F1260-F1269
- LeClercq JF, Swynghedauw B, Bouveret P, Faucomprez C, Piguet V (1976) Myofibrillar ATPase, DNA and hydroxyproline content of human hypertrophied heart. *Eur J Clin Invest* 6:27-34
- Li P, Waters RE, Redfern SI, Zhang M, Mao L, Annex BH, Yan Z (2007) Oxidative phenotype protects myofibers from pathological insults induced by chronic heart failure in mice. *Am J Pathol* 170:599-608

- Lim DS, Lutucuta S, Bachireddy P, Youker K, Evans A, Entman M, Roberts R, Marian AJ (2001) Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 103:789-791
- Linck B, Bokník P, Eschenhagen T, Müller FU, Neumann J, Nose M, Jones LR, Schmitz W, Scholz H (1996) Messenger RNA expression and immunological quantification of phospholamban and SR-Ca²⁺-ATPase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 31:625-632
- Linck B, Bokník P, Huke S, Kirchhefer U, Knapp J, Lüss H, Müller FU, Neumann J, Tanriseven Z, Vahlensieck U, Baba HA, Jones LR, Philipson KD, Schmitz W (2000) Functional properties of transgenic mouse hearts overexpressing both calsequestrin and the Na⁺-Ca²⁺-exchanger. *J Pharmacol Exp Ther* 294:648-657
- Lindner M, Erdmann E, Beuckelmann DJ (1998) Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30:743-749
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the ^{2-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25:402-408
- Lo MW, Goldberg MR, McCrea JB, Lu H, Furtek CI, Bjornsson TD (1995) Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. *Clin Pharmacol Ther* 58: 641-649
- Lo MW, Toh J, Emmert SE, Ritter MA, Furtek CI, Lu H, Colucci WS, Uretsky BF, and Rucinska E (1998) Pharmacokinetics of intravenous and oral losartan in patients with heart failure. *J Clin Pharmacol* 38:525-532
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Lukyanenko V, Viatchenko-Karpinski S, Smirnov A, Wiesner TF, Györke S (2001) Dynamic Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content and release by luminal Ca²⁺-sensitive Leak in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 81:785-792
- Lytton J, Mac Lennan DH (1988) Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca²⁺ ATPase gene. *J Biol Chem* 263:15024-15031
- Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 267:14483-14489
- Mackay FJ, Pearce GL, Mann RD (1999) Cough and angiotensin II receptor antagonists: cause or confounding? *Br J Clin Pharmacol* 47:111-114
- MacLennan DH, Kranias EG (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:566-577
- MacLennan DH, Wong PT (1971) Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:1231-1235
- Mallison J, Meissner J, Chang KC (2009) Chapter 2. Calcineurin signalling and the slow oxidative skeletal muscle fibre type. *Int Rev Cell Mol Biol* 277:67-101
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Roseblit N, Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101:365-376

- Mason DT, Braunwald E, Covell JW, Sonnenblick EH, Ross J Jr (1971) Assessment of cardiac contractility. The relation between the rate of pressure rise and ventricular pressure during isovolumic systole. *Circulation* 44: 47-58
- Massie BM, Simonini A, Sahgal P, Wells L, Dudley GA (1996) Relation of systemic and local muscle exercise capacity to skeletal muscle characteristics in men with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 27:140-145
- McMurray JJ, Stewart S (2000) Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83:596-602
- Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G (1995) Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92:778-784
- Milavetz JJ, Raya TE, Johnson CS, Morkin E, Goldman S (1996) Survival after myocardial infarction in rats: captopril versus losartan. *J Am Coll Cardiol* 27:714-719
- Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross J Jr, Kranias G, Giles WR, Chien KR (1999) Chronic phospholamban sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell* 99:313-322
- Mitchell RD, Simmerman HKB, Jones LR (1988) Ca²⁺ binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J Biol Chem* 263:1376-1381
- Movesian MA, Karimi M, Green K, Jones LR (1994) Ca²⁺-transporting, ATPase, phospholamban, and calsequestrin levels in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation* 90:653-657
- Münch G, BölcK B, Brixius K, Reuter H, Mehlhorn U, Bloch W, Schwinger RH (2000) SERCA2a activity correlates with the force-frequency relationship in human myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H1924-H1932
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M (2008) Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmazie und Toxikologie, Kapitel Hypertonie und Antihypertonika, 9. Auflage, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, pp 539-557
- Nakamura F, Nagano M, Kobayashi R, Higahi J, Mikami H, Kawaguchi N, Onishi S, Ogihara T. (1994) Chronic administration of angiotensin II receptor antagonist, TCV-116, in cardiomyopathic hamsters. *Am J Physiol* 267:H2297-H2304
- Narayan P, McCune S, Robitaille P, Hohl C, Altschuld R (1995) Mechanical alternans and the force-frequency relationship in failing rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 27:523-530
- Neely JR, Liebermeister H, Battersby EJ, Morgan HE (1967) Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am J Physiol* 212:804-814
- Nicoletti I, Cicoira M, Zanolla L, Franceschini L, Brighetti G, Pilati M, Zardini P (2003) Skeletal muscle abnormalities in chronic heart failure patients: relation to exercise capacity and therapeutic implications. *Congest Heart Fail* 9:148-154
- Niebauer J (2008) Effects of exercise training on inflammatory markers in patients with heart failure. *Heart Fail Rev* 13:39-49
- Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R, Schön MR, Blüher M, Punkt K (2006) Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29: 1-6

-
- ONTARGET Investigators, Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, Dagenais G, Sleight P, Anderson C (2008) Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 358:1547-1559
- Otsuka M, Takahashi H, Shiratori M, Chiba H, Abe S (2004) Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 receptor antagonist. *Thorax* 59:31-38
- Padykula HA, Herman E (1955) Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques. *J Histochem Cytochem* 3: 161-169
- Pagani ED, Alousi AA, Grant AM, Older TM, Dziuban SW Jr, Allen PD (1988) Changes in myofibrillar content and Mg-ATPase activity in ventricular tissues from patients with heart failure caused by coronary artery disease, cardiomyopathy, or mitral valve insufficiency. *Circ Res* 63:380-385
- Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, Rumble JR, Kelley DJ, Tikellis C, Cox A, Smallwood RA, Angus PW (2001) Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 35:376-385
- Perrino C, Naga Prasad SV, Patel M, Wolf MJ, Rockman HA (2005) Targeted inhibition of β -adrenergic receptor kinase-1-associated phosphoinositide-3 kinase activity preserves β -adrenergic receptor signaling and prolongs survival in heart failure induced by calsequestrin overexpression. *J Am Coll Cardiol* 45:1862-1870
- Phillips MI, Speakman EA, Kimura B (1993) Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept* 43:1-20
- Phillips P, Gwathmey J, Feldman M, Schoen F, Grossman W, Morgan J (1990) Post-extrasystolic potentiation and the force-frequency relationship: differential augmentation of myocardial contractility in working myocardium from patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 22:99-110
- Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G (1995) Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92: 1169-1178
- Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G (1999) Ca^{2+} handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 85:38-46
- Pieske B, Maier LS, Schmidt-Schweda S (2002) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} load in human heart failure. *Basic Res Cardiol* 97:163-171
- Pieske B, Sütterlin M, Schmidt-Schweda S, Minami K, Meyer M, Oleschewski M, Holubarsch C, Just H, Hasenfuss G (1996) Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy. Functional evidence for alterations in intracellular Ca^{2+} handling. *J Clin Invest* 98:764-776
- Piot C, Lemaire S, Albat B, Seguin J, Nargeot J, Richard S (1996) High frequency-induced upregulation of human cardiac calcium currents. *Circulation* 93:120-128
- Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm JA, Konstam MA, Riegger G, Klingner GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B (2000) Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial – the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet* 355: 1582-1587
-

-
- Pitt B, Segal R, Martinez FA, Meurers G, Cowley AJ, Thomas I, Deedwania PC, Ney DE, Snively DB, Chang PI (1997) Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). *Lancet* 349: 747-752
- Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM (1999) Upregulation of Na⁺/Ca²⁺-exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res* 85:1009-1019
- Polla B, D'Antona G, Bottinelli R, Reggiani C (2004) Respiratory muscle fibres: specialisation and plasticity. *Thorax* 59: 808–817
- Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyamide gel electrophoresis. *Biochem Biophys Acta* 490:27-34
- Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TH, Lupoglazoff J-M, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MM, Wilde AA, Guicheney P (2002) Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 91:21-26
- Priori SG, Chen SR (2011) Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and arrhythmogenesis. *Circ Res* 108:871-883
- Punkt K (2002) Fibre types in skeletal muscles. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 162:1-112
- Punkt K, Erzen I (2000) Changes of enzyme activities in the myocardium and skeletal muscle fibres of cardiomyopathic hamsters. A cytophotometrical study. *Exp Toxicol Pathol* 52: 103-110
- Punkt K, Fritzsche M, Stockmar C, Hepp P, Josten C, Wellner M, Schering S, Buchwalow IB (2006) Nitric oxide synthase in human skeletal muscles related to defined fibre types. *Histochem Cell Biol* 125:567-573
- Punkt K, Schering S, Fritzsche M, Asmussen G, Minin EA, Samoilova VE, Müller FU, Schmitz W, Hasselblatt M, Paulus W, Müller-Werdan U, Slezak J, Koehler G, Boecker W, Buchwalow IB (2007) Fibre-related nitric oxide synthase (NOS) in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Histochem* 109:228-236
- Punkt K, Zaitsev S, Wellner M, Schreiter T, Fitzl G, Buchwalow IB (2002) Myopathy-dependent changes in activity of ATPase, SDH and GPDH and NOS expression in the different fibre types of hamster muscles. *Acta Histochem* 104:15-22
- Punkt K, Kusche T, Günther S, Adams V, Jones LR, Neumann J. (2010) Changes in metabolic profile and population of skeletal muscle fibers of mice overexpressing calsequestrin: Influence of losartan. *Acta Histochem* 113: 547-555
- Qing G, Garcia R (1992) Chronic captopril and losartan (DuP753) administration in rats with high-output heart failure. *Am J Physiol* 263:H833-H840
- Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Lehmkuhl HB (2008) Heart failure – are there gender aspects? *Internist (Berl)* 49:422-428
- Roberts AC, Reeves JT, Butterfield GE, Mazzeo RS, Sutton JR, Wolfel EE, Brooks GA (1996) Altitude and β -blockade augment glucose utilization during submaximal exercise. *J Appl Physiol* 80:605-615
- Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J Jr, Chien KR (1991) Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8277-8281
-

-
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001) Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3:1009-1013
- Sabbah HN (2000) Apoptotic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 45:704-712
- Salinovich O, Montelaro RC (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156:341-347
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Chapter 6: Preparation and analysis of eucaryotic genomic DNA, Third edition, Volume 1, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 6.1-6.62
- Sato Y, Ferguson DG, Sako H, Dorn GW 2nd, Kadambi VJ, Yatani A, Hoit BD, Walsh RA, Kranias EG (1998) Cardiac-specific overexpression of mouse cardiac calsequestrin is associated with depressed cardiovascular function and hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* 273:28470-28477
- Sato Y, Kiriazis H, Yatani A, Schmidt AG, Hahn H, Ferguson DG, Sako H, Mitarai S, Honda R, Mesnard-Roiller L, Frank KF, Beyermann B, Wu G, Fujimori K, Dorn GW 2nd, Kranias EG (2001) Rescue of contractile parameters and myocyte hypertrophy in calsequestrin overexpressing myocardium by phospholamban ablation. *J Biol Chem* 276:9392-9399
- Scarpelli M, Belardinelli R, Tulli D, Provinciali L (1999) Quantitative analysis of changes occurring in muscle vastus lateralis in patients with heart failure after low-intensity training. *Anal Quant Cytol Histol* 21:374-380
- Schaufelberger M, Eriksson BO, Grimby G, Held P, Swedberg K (1995) Skeletal muscle fiber composition and capillarization in patients with chronic heart failure: relation to exercise capacity and central hemodynamics. *J Card Fail* 1:267-272
- Schiebler TH, Korf HW (2007) *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, Makroskopische und Mikroskopische Anatomie, Topographie*, Kapitel 2.3.2 Skelettmuskulatur, 10. Auflage, Steinkopff Verlag, Darmstadt, pp. 61-67
- Schunkert H, Sadoshima J, Cornelius T, Kagaya Y, Weinberg EO, Izumo S, Riegger G, Lorell BH (1995) Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult rat hearts. Evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by angiotensin II. *Circ Res* 76:489-497
- Schwinger RH, Böhm M, Schmidt U, Karczewski P, Bavendiek U, Flesch M, Krause EG, Erdmann E (1995) Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} -ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation* 92:3220-3228
- Schwinger RH, Hoischen S, Reuter H, Hullin R (1999) Regional expression and functional characterization of the L-type Ca^{2+} -channel in myocardium from patients with end-stage heart failure and in non-failing human hearts. *Am J Cardiol* 83: 507-514
- Scott BT, Simmerman HK, Collins JH, Nadal-Ginard B, Jones LR (1988) Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning. *J Biol Chem* 263:8958-8964
- Senni M, Redfield MM (2001) Heart failure with preserved systolic function. A different natural history? *J Am Coll Cardiol* 38:1277-1282
-

-
- Shao Q, Ren B, Saini HK, Netticadan T, Takeda N, Dhalla NS (2005) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -transport and gene expression in congestive heart failure are modified by imidapril treatment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1674-H1682
- Shattock M, Bers D (1989) Rat vs. rabbit ventricle: Ca flux and intracellular Na assessed by ion-selective microelectrodes. *Am J Physiol* 256: C813-C822
- Shekelle PG, Rich MW, Morton SC, Atkinson CS, Tu W, Maglione M, Rhodes S, Barrett M, Fonarow GC, Greenberg B, Heidenreich PA, Knabel T, Konstam MA, Steimle A, Warner Stevenson L (2003) Efficacy of angiotensin-converting enzyme inhibitors and beta-blockers in the management of left ventricular systolic dysfunction according to race, gender, and diabetic status: a meta-analysis of major clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 41:1529-1538
- Sica DA, Gehr TW, Ghosh S (2005) Clinical pharmacokinetics of losartan. *Clin Pharmacokinet* 44:797-814
- Simmermann HK, Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78:921-947
- Sipido KR, Volders PG, de Groot SH, Verdonck F, Van de Werf F, Wellens HJ, Vos MA (2000) Enhanced Ca^{2+} -release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation* 102:2137-2144
- Sladek T, Sladkova J, Kolar F, Papousek F, Cicutti N, Korecky B, Rakusan K (1996) The effect of AT_1 receptor antagonist on chronic cardiac response to coronary artery ligation in rats. *Cardiovasc Res* 31:568-576
- Smits JF, van Krimpen C, Schoemaker RG, Cleutjens JP, Daemen MJ (1992) Angiotensin II receptor blockade after myocardial infarction in rats: effects on hemodynamics, myocardial DNA synthesis, and interstitial collagen content. *J Cardiovasc Pharmacol* 20:772-778
- Solaro RJ, Robertson SP, Johnson JD, Holroyde MJ, Potter JD (1981) Troponin-I phosphorylation: A unique regulator of the amounts of calcium required to activate cardiac myofibrils. *Cold Spring Harb Conf Cell Prolif* 8:901-911
- SOLVD Investigators (1992) Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *N Engl J Med* 327:685-691
- Song L, Alcalai R, Arad M, Wolf CM, Toka O, Conner DA, Berul CI, Eldar M, Seidman CE, Seidman JG (2007) Calsequestrin 2 (CASQ2) mutations increase expression of calreticulin and ryanodine receptors, causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest* 117:1814-1823
- Spangenburg EE, Talmadge RJ, Musch TI, Pfeifer PC, McAllister RM, Williams JH (2002) Changes in skeletal muscle myosin heavy chain isoform content during congestive heart failure. *Eur J Appl Physiol* 87:182-186
- Stangl V (2006) Herzinsuffizienz bei Frauen. In: Zerkowski HR, Baumann G (Hrsg.) *HerzAkutMedizin*, 2. Auflage, Steinkopff-Verlag Darmstadt, pp. 642-644
- Stearns RA, Chakravarty PK, Chen R, Chiu SH (1995) Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes: Role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members. *Drug Metab Dispos* 23:207-215
-

-
- Stearns RA, Miller RR, Doss GA, Chakravarty PK, Rosegay A, Gatto GJ, Chiu SH (1992) The metabolism of DuP753, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, by rat, monkey and human liver slices. *Drug Metab Dispos* 20:281-287
- Strömberg A, Mårtensson J (2003) Gender differences in patients with heart failure. *Eur J Cardiovasc Nurs* 2:7-18
- Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994) Gene expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺-exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75:443-453
- Sullivan MJ, Hawthorne MH (1995) Exercise intolerance in patients with chronic heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 38:1-22
- Suzuki YJ, Ikeda T, Shi SS, Kitta K, Kobayashi YM, Morad M, Jones LR, Blumberg JB (1999) Regulation of GATA-4 and AP-1 in transgenic mice overexpressing cardiac calsequestrin. *Cell Calcium* 25:401-407
- Swedberg K, Pfeffer M, Granger C, Held P, McMurray J, Ohlin G, Olofsson B, Östergren J, Yusuf S (1999) Candesartan in heart failure – assessment of reduction in mortality and morbidity (CHARM): rationale and design. *Charm-Programme Investigators. J Card Fail* 5:276-282
- Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW, LeJemtel TH (1996) Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol* 28:964-971
- Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmabhatt B, Brown K, Bauce B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A (2001) Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet* 10:189-194
- Toth MJ, Ades PA, LeWinter MM, Tracy RP, Tschernol A (2006a) Skeletal muscle myofibrillar mRNA expression in heart failure: relationship to local and circulating hormones. *J Appl Physiol* 100:35-41
- Toth MJ, Ades PA, Tischler MD, Tracy RP, LeWinter MM (2006b) Immune activation is associated with reduced skeletal muscle mass and physical function in chronic heart failure. *Int J Cardiol* 109:179-187
- Toth MJ, Matthews DE, Ades PA, Tischler MD, VanBuren P, Previs M, LeWinter MM (2005) Skeletal muscle myofibrillar protein metabolism in heart failure: relationship to immune activation and functional capacity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E686-E692
- Toth MJ, Shaw AO, Miller MS, VanBuren P, LeWinter MM, Maughan DWS, Ades PA (2010) Reduced knee extensor function in heart failure is not explained by inactivity. *Int J Cardiol* 143:276-282
- Tsoutsman T, Kelly M, Ng DC, Tan JE, Tu E, Lam L, Bogoyevitch MA, Seidman CE, Seidman JG, Semsarian C (2008) Severe heart failure and early mortality in a double-mutation mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 117: 1820-1831
- Vescovo G, Dalla Libera L, Serafini F, Leprotti C, Facchin L, Volterrani M, Ceconi C, Ambrosio GB (1998) Improved exercise tolerance after losartan and enalapril in heart failure: correlation with changes in skeletal muscle myosin heavy chain composition. *Circulation* 98: 1742-1749
-

-
- Vizgirda VM, Wahler GM, Sondgeroth KL, Ziolo MT, Schwertz DW (2002) Mechanisms of sex differences in rat cardiac myocyte response to β -adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H256-H263
- Volpe P, Martini A, Furlan S, Meldolesi J (1994) Calsequestrin is a component of smooth muscles: the skeletal- and cardiac- muscle isoforms are both present, although in highly variable amounts and ratios. *Biochem J* 301:465-569
- Wagenknecht T, Grassucci R, Frank J, Saito A, Inui M, Fleischer S (1989) Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 338:167-170
- Wang S, Trumble WR, Liao H, Wesson CR, Dunker AK, Kang CH (1998) Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Biol* 5: 476-483
- Wang W, Cleemann L, Jones LR, Morad M (2000) Modulation of focal and global Ca^{2+} release in calsequestrin-overexpressing mouse cardiomyocytes. *J Physiol* 524: 399-414
- Ward DG, Cornes MP, Trayer IP (2002) Structural consequences of cardiac Troponin I phosphorylation. *J Biol Chem* 277:41795-41801
- Weber DS, Lombard JH (2001) Angiotensin II AT_1 receptors preserve vasodilator reactivity in skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2196-H2202
- Wing LM, Reid CM, Ryan P, Beilin LJ, Brown MA, Jennings GL, Johnston CI, McNeil JJ, Macdonald GJ, Marley JE, Morgan TO, West MJ (2003) Second Australian National Blood Pressure Study Group. A comparison of outcomes with angiotensin-converting-enzyme inhibitors and diuretics for hypertension in the elderly. *N Engl J Med* 348: 583-592
- Wong PC, Price WA, Chiu AT, Duncia JV, Carini DJ, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PB (1990a) Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP3174: an active metabolite of DuP753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 255:211-217
- Wong PC, Price WA, Chiu AT, Duncia JV, Carini DJ, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PB (1990b) Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. IX. Antihypertensive activity in rats of DuP753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 252:726-732
- Writing Group to Review New Evidence and Update the 2005 Guideline for the Management of Patients with Chronic Heart Failure Writing on Behalf of the 2005 Heart Failure Writing Committee 2009 focused update: ACCF/AHA guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (2009) *Circulation* 119:1977-2016
- Yahiro E, Ideishi M, Wang LX, Urata H, Kumagai K, Arakawa K, and Saku K (2003) Reperfusion-induced arrhythmias are suppressed by inhibition of the angiotensin II type 1 receptor. *Cardiology* 99:61-67
- Yang A, Sonin D, Jones LR, Barry WH, Liang BT (2004) A beneficial role of cardiac $P2X_4$ receptors in heart failure: rescue of the calsequestrin overexpression model of cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H1096-H1103
- Yano K, Zarain-Herzberg A (1994) Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties. *Mol Cell Biochem* 135:61-70
-

- Yuan Q, Fan GC, Dong M, Altschafli B, Diwan A, Ren X, Hahn HH, Zhao W, Waggoner JR, Jones LR, Jones WK, Bers DM, Dorn GW 2nd, Wang HS, Valdivia HH, Chu G, Kranias EG (2007) Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity. *Circulation* 115:300-309
- Zarain-Herzberg A, Fliegel L, MacLennan DH (1988) Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle calsequestrin gene. *J Biol Chem* 263:4807-4812
- Zarain-Herzberg A, MacLennan DH, Periasamy M (1990) Characterisation of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene. *J Biol Chem* 265:4670-4677
- Zhang L, Kelley J, Schmeiser G, Kobayashi YM, Jones LR (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 272:23389-23397
- Zhu B, Sun Y, Sievers RE, Browne AE, Pulukurthy S, Sudhir K, Lee RJ, Chou TM, Chatterjee K, Parmley WW (2000) Comparative effects of pretreatment with captopril and losartan on cardiovascular protection in a rat model of ischemia-reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 35:787-795

Veröffentlichungen

Publikationen

- Günther S, Baba HA, Hauptmann S, Holzhausen HJ, Grossmann C, Punkt K, Kusche T, Jones LR, Gergs U, Neumann J (2010) Losartan reduces mortality in a genetic model of heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 382:265-278
- Gergs U, Baumann M, Böckler A, Buchwalow IB, Ebel H, Fabritz L, Günther S, Hauptmann S, Kirchhof P, Klöckner U, Pönicke K, Rückschloß U, Schmitz W, Schulz N, Werner F, Neumann J (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT₄-receptor in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H788-H798
- Punkt K, Kusche T, Günther S, Adams V, Jones LR, Neumann J (2011) Changes in metabolic profile and population of skeletal muscle fibers of mice overexpressing calsequestrin: Influence of losartan. *Acta Histochem* 113:547-555

Kongressbeiträge

- Günther S, Baba HA, Kusche T, Punkt K, Adams V, Jones LR, Hauptmann S, Gergs U, Neumann J (2009) Effect of losartan on cardiac and skeletal muscle functions in a heart failure model. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377:54
- Günther S, Jones LR, Hauptmann S, Neumann J (2009) Losartan reduces mortality in a model of heart failure. *DPhG-Tagung in Pichlarn*
- Kusche T, Punkt K, Günther S, Adams V, Jones LR, Neumann J (2009) Changes in metabolic profile and population of skeletal muscle fibres of mice overexpressing calsequestrin: influence of Losartan. *Research Festival in Leipzig*
- Neumann J, Guenther S, Jones LR, Hauptmann S, Gergs U (2009) Losartan reduces mortality in a model of heart failure. *FASEB J* 23:577-583
- Günther S, Klöckner U, Kirchhefer U, Neumann J (2008) Cardiac-specific overexpression of mutated calsequestrin leads to impaired Ca²⁺ handling. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 379:55
- Neumann J, Ebel H, Klöckner U, Böckler A, Günther S, Baumann M, Schulz N, Werner F, Gergs U (2008) The human serotonin 5-HT_{4a} receptor. *Circulation* 118:E169-E170
- Neumann J, Günther S, Klöckner U, Gergs U (2007) Calcium signaling in transgenic mice overexpressing a human serotonin 5HT₄ receptor. *J Mol Cell Cardiol* 42:S32-S33

CURRICULUM VITAE

Sophie Günther

Persönliche Daten

.....

Geburtsdatum 16.12.1981
Geburtsort Halle (Saale)

Berufliche Tätigkeiten

.....

seit 04/2010 Weiterbildung zur Fachapothekerin für klinische Pharmazie
seit 04/2010 Apothekerin in der Apotheke des Universitätsklinikum Leipzig (Abteilung: klinische Pharmazie)
10/2006 – 03/2010 wissenschaftliche Mitarbeiterin / Doktorandin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle (Saale) sowie Seminarbetreuung zum Thema „Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie“ der Medizinstudenten im 5. Semester
03/2006 – 07/2006 Apothekerin in der Engel-Apotheke Halle (Saale)

Studium

.....

02/2006 Abschluss: Approbation als Apothekerin
06/2005 – 11/2005 Zweite Hälfte des praktischen Jahres in der Pelikan-Apotheke in Mannheim
12/2004 – 05/2005 Erste Hälfte des praktischen Jahres mit Schwerpunkt Klinikbetreuung am Institut für Spitalpharmazie in Basel, Schweiz
10/2001 – 02/2006 Fachschaftsratsmitglied in der Fachschaft Pharmazie und Kurssprecherin
10/2001 – 02/2003 Teilnahme am Englischfachkurs für Pharmazie
10/2000 – 11/2004 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität in Halle (Saale)
Abschluss: 2. Staatsexamen

Schulbildung

.....

09/1992 – 05/2000 Elisabeth-Gymnasium in Halle (Saale)
Abschluss: Abitur
Auslandsaufenthalt in Jerusalem, Israel

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Passagen, die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Leipzig, den 11.09.2011

Sophie Günther