

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität Dresden

Direktor: Prof. Dr. Ali El-Armouche

Auswirkung eines Knockouts des Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 auf den Verlauf der druckinduzierten Herzinsuffizienz in Mäusen

Dissertationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von

Knut Hartmann

aus Göttingen

Dresden (2016)

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

gez. _____

Vorsitzender der Prüfungskommission

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einführung _____	1
1.1 Epidemiologische und sozioökonomische Bedeutung der Herzinsuffizienz	1
1.2 Ätiologie der Herzinsuffizienz	1
1.3 Definition der Herzinsuffizienz und klinische Einteilungen	2
1.4 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	3
1.5 Die β -adrenerge Kaskade in Kardiomyozyten	4
1.5.1 Aufbau und Funktion	4
1.5.2 Eigenschaften und Funktionen des Inhibitor-1	6
1.5.3 Veränderungen der β -adrenergen Kaskade in der Herzinsuffizienz	6
1.6 Die Rolle des I-1 in Modellen der Herzinsuffizienz	7
1.6.1 Modelle mit erhöhter Aktivität bzw. erhöhter Expression des I-1	7
1.6.2 Modelle mit Deletion von I-1	9
1.7 Fragestellung dieser Arbeit	10
2. Material und Methoden _____	12
2.1 Auswahl, Herkunft und Betreuung der Mäuse	12
2.2 Die echokardiographische Untersuchung	12
2.2.1 Anästhesie	12
2.2.2 Transthorakale Echokardiographie	13
2.2.3 Auswahl der echokardiographischen Parameter	16
2.2.4 Speckle Tracking Echokardiographie	17
2.3 Homogenität der Tier- und Untersuchungsgruppen	19
2.4 Statistische Auswertung	20
2.5 Das Modell der Transverse Aortic Constriction	20

2.5.1 TAC als Tiermodell der Herzinsuffizienz	20
2.5.2 Durchführung der TAC	21
2.6 Organentnahme	21
2.7 Histologische Analysen	22
2.8 Expressionsanalyse	25
2.8.1 Erstellung der cDNA	25
2.8.2 Quantitative Real-Time PCR	27
3. Ergebnisse	29
3.1 Kardiale Funktion und Morphologie in der präoperativen Phase	29
3.1.1 Vergleich der kardialen Funktion von WT und I-1KO	29
3.1.2 Geschlechtsbezogener Vergleich der kardialen Funktion von WT und I-1KO	30
3.2 Mortalität in der akuten Phase nach TAC	31
3.2.1 Ausmaß der intra- und perioperativen Mortalität	31
3.2.2 Vergleich der akuten Mortalität zwischen WT ^{TAC} und I-1KO ^{TAC}	31
3.2.3 Geschlechtsbezogener Vergleich der akuten Mortalität in WT ^{TAC} und I-1KO ^{TAC}	32
3.3 Kardiale Funktion und Morphologie im Verlauf der Herzinsuffizienz	33
3.3.1 Induktion einer kardialen Hypertrophie durch TAC in WT ^{TAC} und I-1KO ^{TAC}	33
3.3.2 Vergleich der Entwicklung kardialer Funktion und Morphologie in WT ^{TAC} und I-1KO ^{TAC}	34
3.3.3 Geschlechtsbezogener Vergleich der Entwicklung kardialer Funktion und Morphologie in WT ^{TAC} und I-1KO ^{TAC}	36
3.3.4 Vergleich der kardialen Reaktion auf β -adrenerge Stimulation in WT ^{TAC} und I-1KO ^{TAC}	38
3.3.5 Geschlechtsbezogener Vergleich der kardialen Reaktion auf β -adrenerge Stimulation in WT ^{TAC} und I-1KO ^{TAC}	40
3.4 Mortalität im Verlauf der Herzinsuffizienz	41
3.4.1 Vergleich der Mortalität in WT ^{TAC} und I-1KO ^{TAC}	41
3.4.2 Geschlechtsbezogener Vergleich der Mortalität in WT ^{TAC} und I-1KO ^{TAC}	42

3.5 Prognostischer Wert der Gradientenbestimmung	43
3.6 Transthorakale Echokardiographie und Speckle Tracking Echokardiographie im Vergleich	44
3.6.1 Korrelation des STE mit FAS	44
3.6.2 Vergleich von STE und TTE anhand der präoperativen Daten	45
3.6.3 Vergleich von STE und TTE im Verlauf der Herzinsuffizienz	46
3.7 Postmortale Analysen	48
3.7.1 Makroskopische Organveränderungen in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}	48
3.7.2 Histologische Organveränderungen in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}	49
3.7.3 Vergleich kardialer Hypertrophiemarker in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}	51
3.7.4 Geschlechtsbezogener Vergleich kardialer Hypertrophiemarker in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}	52
4. Diskussion	53
<hr/>	
4.1 Präoperative Vergleichbarkeit der basalen kardialen Funktion in WT und I-1KO	53
4.2 I-1KO zeigen eine verminderte kontraktile Antwort auf Dobutamin	53
4.3 Die herabgesetzte Kontraktilität nach β-adrenerger Stimulation betrifft I-KO(f)	54
4.4 Erhöhte Mortalität in der akuten Phase nach TAC in KO^{TAC}	54
4.5 Die erhöhte Mortalität in der akuten Phase betrifft I-1KO^{TAC}(m)	55
4.6 WT^{TAC} und I-1KO^{TAC} zeigen eine vergleichbare initiale Hypertrophiereaktion nach TAC	55
4.7 Typischer Verlauf der Herzinsuffizienz in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}	56
4.8 Die kontraktile Reaktion unterscheidet sich zwischen WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}	57
4.9 Aufhebung geschlechtsspezifischer Unterschiede durch den I-1-Knockout	58
4.10 Erhöhtes Langzeit-Überleben in KO^{TAC}(f)	59
4.11 Der Stenosegrad korreliert nicht mit kardialer Morphologie, Funktion oder Überleben	60
4.12 STE bestätigt TTE trotz größerer Varianz	60
4.13 Organische Veränderungen post mortem bestätigen Herzinsuffizienz in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}	61
4.14 α-MHC ist vermindert in WT^{TAC}, aber erhöht in KO^{TAC}	62
4.15 KO^{Sham} zeigen vermindertes Niveau von ANP, BNP, α- und β-MHC gegenüber WT^{Sham}	63

5. Zusammenfassung und Ausblick	64
6. Kurzfassung / Abstract	67
7. Abkürzungen	71
8. Literaturverzeichnis	72
9. Anhang	79
10. Anlagen	83

1. Einführung

1.1 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist in sozioökonomischer Hinsicht von großer Bedeutung. 1-2% der Bevölkerung der westlichen Welt sind von ihr betroffen (Mosterd et al 2007). Die Kosten für das öffentliche Gesundheitssystem werden für verschiedene Länder der westlichen Hemisphäre auf ebenfalls 1-2% des nationalen Gesundheitsbudgets berechnet (Stewart et al 2001, Szucs 2003). In Deutschland zählt die Herzinsuffizienz zu den häufigsten Todesursachen und lag 2012 mit 5,3% insgesamt an dritter Stelle, wobei die Sterblichkeitsrate bei Frauen mit 6,8% höher lag als bei Männern mit 3,7%. Bei vollstationären Krankenhauspatienten gehörte die Herzinsuffizienz zu den drei häufigsten gestellten Hauptdiagnosen (www.destatis.de).

Neben dieser ökonomischen Bedeutung muss die Herzinsuffizienz auch aufgrund ihrer Mortalität als schwerwiegende Erkrankung aufgefasst werden. Die 5-Jahres-Mortalität für die Framingham-Population in den 90er Jahren betrug ca. 50% (Levy 2002). Damit ist die Herzinsuffizienz prognostisch ungünstiger als manche Krebserkrankung.

1.2 Ätiologie der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist als klinisches Syndrom die Endstrecke verschiedener Erkrankungen und kann Folge verschiedener Pathomechanismen sein. Allen Ursachen gemeinsam ist, dass sie zu strukturellen Abweichungen und Funktionsverlust des Herzens führen. Die Framingham-Studie fand als häufigste Wegbereiter Herzkreislauferkrankungen, insbesondere die koronare Herzkrankheit und den arteriellen Hypertonus (Ho et al 1993). Letzterer ist der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz: Der Hypertonus geht der Herzinsuffizienz in 91% der Fälle voraus und erhöht das Erkrankungsrisiko um den Faktor 2 bei Männern und um den Faktor 3 bei Frauen (Levy et al 1996). Neben dieser chronischen Druckbelastung kann auch eine chronische Volumenbelastung, z.B. infolge einer Mitralklappeninsuffizienz, die Entwicklung einer Herzinsuffizienz begünstigen. Als weitere Ursachen kommen auch Medikamente, Infektionen, Alkoholabusus und genetische Dispositionen in Betracht (Lip et al 2000). Zudem erhöht Übergewicht als eigenständiger Risikofaktor die Wahrscheinlichkeit an einer Herzinsuffizienz zu erkranken (Mosterd et al 2007).

1.3 Definition der Herzinsuffizienz und klinische Einteilungen

Die Herzinsuffizienz ist klinisch definiert als die Unfähigkeit des Herzens, die Sauerstoffversorgung der Körpergewebe aufrecht zu erhalten. Sie ist als klinisches Syndrom ein Komplex aus den Symptomen (Belastungs-) Dyspnoe, Leistungsminderung und Ödemneigung. Als weitere Anzeichen können zentralvenöse Stauungszeichen (inklusive pulmonaler und hepatischer Kongestion), Atemgeräusche und Verlagerung des Herzspitzenstoßes hinzutreten (McMurray et al 2012).

Klinisch wird die Herzinsuffizienz in verschiedene Kategorien weiter unterteilt (McMurray et al 2012). Allgemein üblich ist die Unterscheidung in Links-, Rechts- und Globalherzinsuffizienz. Symptomatisch steht bei der sehr viel häufigeren Linksherzinsuffizienz neben dem stauungsbedingten Lungenödem das Vorwärtsversagen (Dyspnoe) im Vordergrund. Hierbei kann es zu Fehlfunktionen infolge Minderdurchblutung praktisch aller Organe kommen, beispielsweise der Niere (Niereninsuffizienz) oder des Gehirns (ischämischer Schlaganfall). Die Rechtsherzinsuffizienz imponiert primär durch die Stauungssymptome des Rückwärtsversagens (Leberkongestion, periphere Ödeme). Eine weitere Unterscheidung erfolgt in systolische und diastolische Dysfunktion. Hierbei entsteht die systolische Dysfunktion infolge einer beeinträchtigten Kontraktionsfähigkeit des Myokards, die diastolische Dysfunktion hingegen ist Resultat einer Störung der Füllung der Herzkammern, etwa durch mangelnde Dehnbarkeit (z.B. bei konstriktiver Perikarditis) oder mechanische Einschränkung (z.B. Perikardtamponade). Beide Fehlfunktionen führen im Ergebnis zur inadäquaten Sauerstoffversorgung der Körpergewebe und zu entsprechenden Symptomen des Rückwärtsversagens. Schließlich müssen Herzinsuffizienzen mit verminderter Ejektionsfraktion (HF-rEF) bzw. erhaltener (HF-pEF) voneinander abgegrenzt werden. Hierbei ist die HF-rEF die typische linksventrikuläre systolische Insuffizienz. Die HF-pEF hingegen stellt ein Syndrom dar, dass von den therapeutischen Fortschritten der letzten Jahrzehnte kaum profitierte (vgl. Senni et al 2014) und das daher aktuell intensiv beforscht wird.

Der Schweregrad der Herzinsuffizienz folgt der Einteilung der *New York Heart Association* (NYHA), in der Dyspnoe und körperliche Belastbarkeit die ausschlaggebenden Parameter darstellen. Die Behandlung erfolgt in erster Linie durch die neurohumorale Blockade mittels β -Rezeptor-Blockern und ACE-Hemmern (bzw. Sartanen) und Aldosteronantagonisten, zusätzlich mit Diuretika zur symptomatischen Therapie von Ödemen. Der therapeutische Nutzen anderer Medikamente ist weniger gut belegt, sodass Digitalis, Hydralazin-Isosorbiddinitrat und Kalziumantagonisten erst in zweiter Linie zum Einsatz kommen.

1.4 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (mit primär systolischer Dysfunktion, HFrEF) wird in der Regel als eine Sequenz von kardialer Hypertrophie, kompensierter und schließlich dekompensierter Herzinsuffizienz beschrieben. Der Pathomechanismus beginnt dabei mit einer akuten oder häufiger chronisch-akkumulierenden Schädigung, des Myokards, z.B. im Rahmen eines arteriellen Hypertonus. Typischerweise reagiert das Myokard initial mit einer (konzentrischen) Hypertrophie, d.h. einer Zunahme von Herzgröße und -gewicht. Diese lässt sich sowohl klinisch/echokardiographisch feststellen als auch histologisch als Größenzunahme der Kardiomyozyten dokumentieren. Die Hypertrophie dient zunächst einer ausgleichenden Erhöhung bzw. Aufrechterhaltung des benötigten Herzzeitvolumens sowie – nach dem Laplace'schen Gesetz – einer Reduktion des mechanischen Drucks auf die Herzwand. Dieses Stadium kann als physiologische Hypertrophie ohne Krankheitswert sein oder das Stadium einer kompensierten Herzinsuffizienz darstellen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass unabhängig von der Herzfunktion bereits Hypertrophie und Zunahme des Herzgewichts eigenständige Risikofaktoren für den plötzlichen Herztod sind (Haider et al 1998).

Mit zunehmender Differenz zwischen Pumpleistung der Herzens sowie dem Sauerstoffbedarf der Körpergewebe kommt es neben der Hypertrophie auch zur chronischen neurohumoralen Aktivierung mit schädlichen Auswirkungen auf das Herz (Abb. 1.1). Zunächst kommt es zur Steigerung des Sympathikotonus mit Erhöhung der Plasmaspiegel von Noradrenalin, deren Höhe direkt mit der Mortalität der Erkrankung korreliert (Francis et al 1993). In der akuten Anpassung erhöht das Herz insgesamt seine Pumpleistung unter vermehrtem Sauerstoffbedarf. Im Rahmen einer chronischen Aktivierung treten jedoch negative Effekte in den Vordergrund, z.B. ein erhöhtes Risiko ventrikulärer Herzrhythmusstörungen (Meredith et al 1991) sowie eine direkte kardiotoxische Wirkung (Mann et al 1992). Die Kardiomyozyten reagieren darauf in vielfältiger Weise mit einem veränderten Stoffwechsel bzw. mit Veränderungen der Signaltransduktion (vgl. Kap 1.5.3). Parallel dazu wird im Rahmen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems der Blutdruck kurzfristig durch die vasokonstriktorische Wirkung von Angiotensin erhöht. Durch Aldosteron kommt es zur Volumenretention, was langfristig ebenfalls den intravasalen Druck stabilisiert. Die hierbei zunehmende Vorlast sowie die durch Angiotensin hervorgerufene Nachlasterrhöhung führen – obwohl es sich grundsätzlich um physiologische Adaptionsmechanismen handelt – im vorgeschädigten Herzen zu einer verstärkten Volumen- und Druckbelastung des Myokards. Die resultierende Zunahme der Wandspannung und die relative Ischämie wirken sich gemeinsam mit der direkt kardiotoxischen Wirkung des Noradrenalins nachteilig aus und führen zum sog. kardialen *remodelling* (Heusch et al 2014). Zudem ist die Gefahr ventrikulärer Herzrhythmusstörungen erhöht (Middlekauff et al 1998).

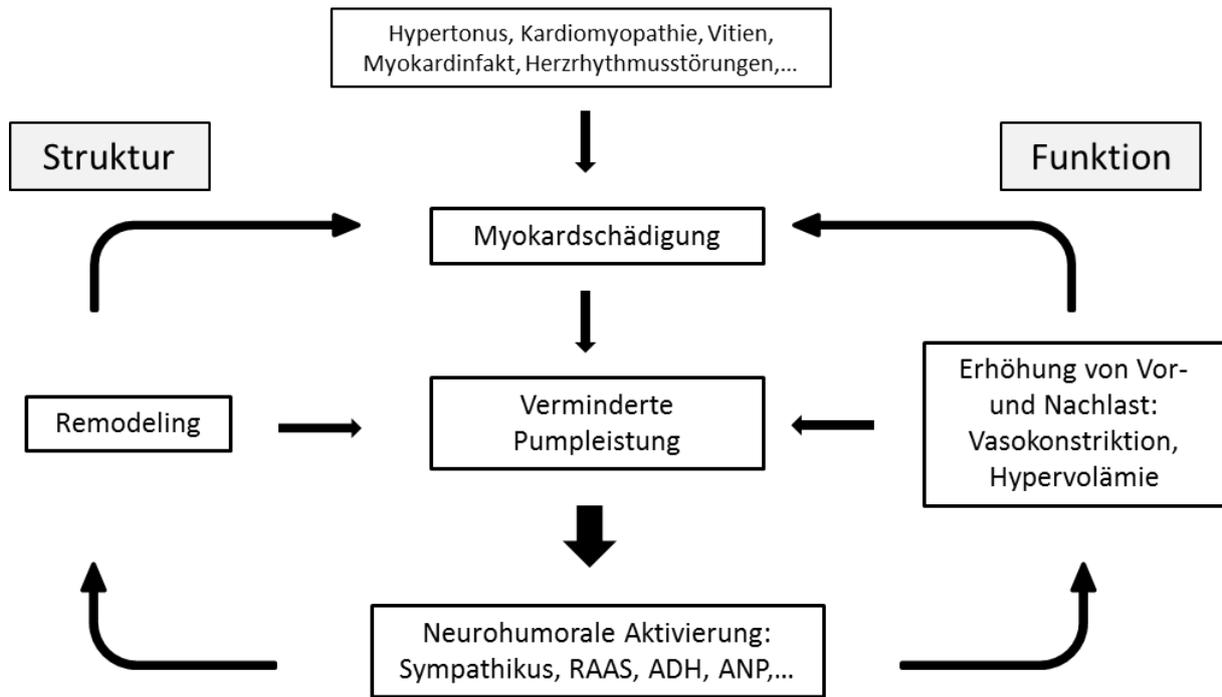


Abb. 1.1: *Circulus vitiosus* der Herzinsuffizienz.

1.5 Die β -adrenerge Kaskade in Kardiomyozyten

1.5.1 Aufbau und Funktion

Das Herz zeichnet sich durch eine starke Anpassungsfähigkeit an den variablen Sauerstoffbedarf des Körpers aus. Die Herzleistung kann in Extremsituationen innerhalb kürzester Zeit auf das Fünffache seines Basalwerts ansteigen. Hierbei stellt die β -adrenerge Kaskade der Kardiomyozyten den wichtigsten Regulationsmechanismus der Herzleistung dar (Lohse et al 2003). Die membranständigen β -Adrenorezeptoren werden v.a. durch das Noradrenalin des sympathischen Nervensystems aktiviert, aber auch durch das systemisch freigesetzte Adrenalin aus dem Nebennierenmark. Der häufigste Rezeptorsubtyp (75-80%) am Herzen ist der β_1 -Rezeptor (β_1 -AR), dessen Erregung die Adaptation der Herzleistung auf dem „klassischen Weg“ in erster Linie vermittelt (Saucerman et McCulloch 2006). Daneben gibt es jedoch auch β_2 - und evtl. β_3 -AR, deren Einfluss auf die Regulation weniger gut geklärt ist, sowie in geringerem Umfang α -Rezeptoren (Rockman et al 2002).

Die Bindung der adrenergen Substanzen an den G-Protein-gekoppelten β_1 -AR führt zur Aktivierung der Adenylylcyclase (AC) und damit zur Erhöhung des intrazellulären Spiegels von zyklischem Adenosin-3'-5'-Monophosphat (cAMP) (Levitzki 1988). Der *second messenger* cAMP aktiviert in erster Linie die Proteinkinase A (PKA), die ihrerseits verschiedene Proteine als Zielstrukturen phosphoryliert und so deren Aktivität steuert (Rapundalo 1998). Die regulierten Proteine nehmen zentrale Stellen in der Anpassung der kardialen Funktion ein. Unter anderem erhöht die Aktivierung des L-

Typ Kalziumkanals den Kalziueinstrom in die Zelle (Trautwein u. Hescheler 1990). Die Phosphorylierung des Phospholambans (PLB) bewirkt eine zusätzliche Beladung des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) mit Kalzium (Tada et al 1974, Toyofuku et al 1993), während die Aktivierung des Ryanodinrezeptors (RyR) den Transfer von Kalziumionen aus dem SR ins Zytosol beschleunigt (Fabiato et Fabiato 1977). Auf diese Weise werden die positiv inotropen Effekte der β -adrenergen Erregung vermittelt. Positiv lusitrope Effekte ergeben sich aus der Phosphorylierung von Troponin I (Zhang et al 1995) und Myosin-Bindungsprotein C (Nagayama et al 2007), die eine beschleunigte Relaxation der Myofilamente bewirken. Zusätzlich wird eine positive Chronotropie durch die Phosphorylierung der HCN-Kanäle in den Schrittmacherzellen des Herzens hervorgerufen (El-Armouche et Eschenhagen 2008).

Neben dem maßgeblichen Einfluss der PKA auf den β -adrenergen Signalweg wurde zunehmend die Bedeutung ihrer Gegenspieler, der Proteinphosphatasen bekannt (Cohen et Cohen 1989). Im Herz wird die Aktivität der Proteinphosphatasen vor allem durch die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen PP-1 und PP2A bestimmt (MacDougall et al 1991), wobei PP-1 den größten Teil der kardialen Phosphataseaktivität bewirkt. Die PPs können die durch die PKA hervorgerufene Phosphorylierung rückgängig machen und wirken somit direkt antagonistisch zur PKA. Diese Reversibilität der Phosphorylierungen stellt einen zentralen Mechanismus der dynamischen Anpassungsfähigkeit der kontraktile Funktion der Kardiomyozyten dar (Hunter 1995). Die Regulierung der PPs erfolgt zum einen generell durch Kompartimentierung in makromolekularen Komplexen zusammen mit PKA, *A-kinase anchoring proteins* (AKAPs) und Phosphodiesterasen (PDEs) (Dodge-Kafka et al 2006). Zum anderen wird eine weitere Regulation der PP-1 durch spezifische inhibitorische Untereinheiten ermöglicht, die Proteinphosphatase-1-Inhibitoren I-1 und I-2 (Cohen 1989).

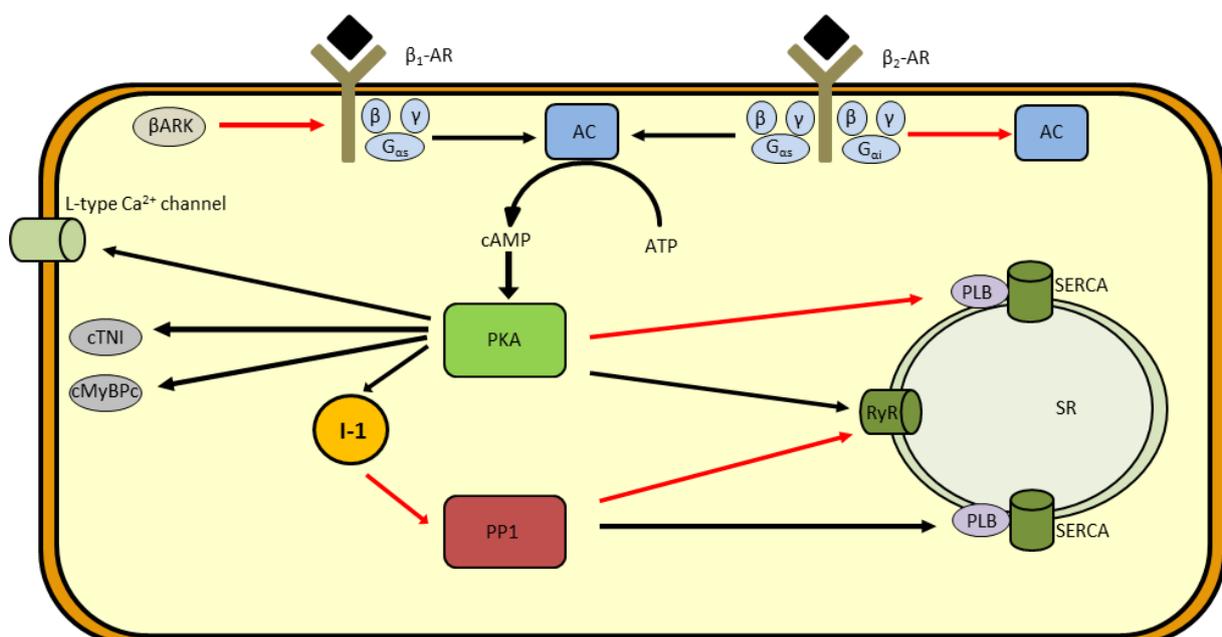


Abb. 1.2: Vereinfachtes Schema der β -adrenergen Kaskade. \blackrightarrow = Aktivierung ; $\color{red}\rightarrow$ = Hemmung

1.5.2 Eigenschaften und Funktion des Inhibitor-1

I-1 ist ein potenter Inhibitor der PP-1 (Cohen 1989). Das Molekül wurde bereits 1976 beschrieben (Huang et Glinzmann 1976) und zunächst vor allem im Kontext des Glykogenstoffwechsels untersucht. Das zytosolische Protein wird in zahlreichen Geweben und in unterschiedlichen funktionellen Zusammenhängen exprimiert, hierzu zählen neben dem Glykogenstoffwechsel auch die synaptische Plastizität, das Zellwachstum und die Muskelkontraktion (Oliver et Shenolikar 1998). I-1 ist mit ca. 19 kDa ein kleines Protein (Aitken et al 1982) und sehr stabil gegenüber Hitze, Säure, Detergenzien und organischen Lösungsmitteln. Im Rahmen der Polyacrylamid-Gelelektrophorese läuft das Protein bei ca. 26 kDa. Es kann durch die Proteinase Trypsin abgebaut werden. I-1 trägt eine konservierte N-terminale Bindungsstelle. Seine Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung an Threonin³⁵ (Cohen 1977) und führt zu einer Abnahme der Phosphatase-Aktivität der katalytischen Untereinheit der PP-1. Die Spezifität der Wirkung auf PP-1 gegenüber PP-2 ist insbesondere auf die geringe IC₅₀ von 1nM für PP-1 (gegenüber 25µM für PP-2) zurückzuführen (Endo et al 1996). Weitere Phosphorylierungsstellen liegen an Ser⁶⁷ und Thr⁷⁵, diese dienen jedoch der kalziumabhängigen Proteinkinase C α (PKCα) (Braz et al 2004, Sahin et al 2006) und erschweren die Phosphorylierung von I-1 an Thr³⁵. Hierdurch ist die Möglichkeit einer Integration verschiedener Signalwege gegeben. Die Regulation des Inhibitor-1 erfolgt außerdem gewebespezifisch durch verschiedene Phosphatasen (Higuchi et al 2000, Mulkey et al 1994). In Kardiomyozyten sind sowohl PP2A als auch PP2B (Calcineurin) an der Dephosphorylierung von I-1 beteiligt (El-Armouche et al 2006). Hierin liegt die Möglichkeit einer Verknüpfung der cAMP- und Ca²⁺-abhängigen Signalwege.

Die Phosphorylierung des Inhibitor-1 erfolgt durch die PKA und ist somit Resultat einer β₁-adrenergen Aktivierung (Neumann et al 1991). Es konnte gezeigt werden, dass ein Knockout des I-1 die PP-1-Aktivität erhöht sowie die PLB-Phosphorylierung reduziert, was im Resultat zu einer verminderten Kontraktilität führte (Carr et al 2002). Demgegenüber bewirkte eine übermäßige Expression von I-1 eine erhöhte PLB-Phosphorylierung sowie eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Isoprenalin (Carr 2002, El-Armouche 2003). I-1 ist somit ein PKA-abhängiger Modulator der Phosphatase-Aktivität. Es ergibt sich eine positive Feedbackschleife (vgl. Abb. 1), in der I-1 eine Verstärkerfunktion im β-adrenergen Signalweg der Kardiomyozyten besitzt (El-Armouche et al 2003).

1.5.3 Veränderungen der β-adrenergen Kaskade in der Herzinsuffizienz

Die klinisch erfassbare Herzinsuffizienz ist von zahlreichen Veränderungen im Gefüge der β-adrenergen Kaskade begleitet. Bisher bleibt unklar, ob diese Veränderungen primär protektiv sind oder im Gegenteil die Entwicklung einer Herzinsuffizienz begünstigen (vgl. Lohse et al 2003). Die

Anzahl der β_1 -Rezeptoren auf der Zelloberfläche wird deutlich verringert (Bristow 1982), ebenso ist die Expression der Rezeptoren vermindert (Ungerer et al 1993). Die GPCR-Kinase-2 (GRK-2) hingegen ist erhöht. Dies führt zu einer verstärkten Phosphorylierung der β_1 -AR, deren Empfindlichkeit für adrenerge Substanzen dadurch abnimmt (Freedman et al 1995). Die Folge dieser Veränderungen ist eine Desensitivierung des Kardiomyozyten gegenüber β -adrenergen Substanzen, welche durch eine Erhöhung der inhibitorischen $G\alpha_i$ -Proteine zusätzlich verstärkt wird (Eschenhagen 1993). Die Aktivität der AC ist gleichfalls reduziert (Bristow 1982). Alle diese Veränderungen münden in einer verminderten Konzentration von cAMP und daraus folgend in einer geringeren Aktivität der cAMP-abhängigen PKA. Als Konsequenz kommt es zu einer Reduktion der Phosphorylierung des PLB an Ser¹⁶ (Schmidt et al 1999, Schwinger et al 1999), während die Expression des PLB nicht verändert ist (Movsesian et al 1994).

Neben dieser partiellen Inaktivierung des β -adrenergen Signalwegs sind mit gleichbedeutender Wirkung die Expression und die Aktivität der Protein-Phosphatasen im insuffizienten Herzen erhöht (Neumann et al 1997; Neumann 2002). Auch I-1 ist von den pathologischen Abweichungen betroffen: Entsprechend der reduzierten Signalintensität in der β -adrenergen Kaskade ist I-1 durch geringere Phosphorylierung in größerem Umfang inaktiviert. Zudem ist die Expression selbst deutlich reduziert (El-Armouche et al 2003). Als ein auslösender Mechanismus der I-1-Reduktion konnte im Rahmen eines Mausmodells die langfristige β -adrenerge Aktivierung nachgewiesen werden (El-Armouche et al 2007). Hierbei korrelierte die PLB-Phosphorylierung mit der Menge an I-1. Die ausgeprägte Reduktion der Wirksamkeit des Inhibitor-1 trägt seinerseits zu der erhöhten Phosphataseaktivität bei und moduliert so in gewissem Umfang das Kinase-Phosphatase-Gleichgewicht innerhalb des β -adrenergen Signalwegs.

1.6 Die Rolle des I-1 in Modellen der Herzinsuffizienz

1.6.1 Modelle mit erhöhter Aktivität bzw. erhöhter Expression des I-1

Die Feststellung einer erhöhten Aktivität der PP-1 im insuffizienten Herzen führte zu der Frage, ob diese protektive oder schädlich ist. Carr et al (2002) untersuchten die Funktion der PP-1 im Herzen und nutzten dafür I-1. Hier führte der adenovirale Gentransfer eines trunkierten, konstitutiv aktiven I-1 (I-1_{T35D}) in isolierten Kardiomyozyten aus insuffizienten menschlichen Herzen zu einer verstärkten Antwort auf β -adrenerge Stimulation. Pathak et al (2005) widmeten sich ebenfalls der Frage nach den Auswirkungen einer Hemmung der PP-1 und nutzten hierfür I-1_{T35D} in ca. 25-facher Überexpression. Auch hier wurde eine erhöhte kardiale Kontraktilität in transgenen Mäusen erzeugt. Darüber hinaus verhinderte die Expression des konstitutiv aktiven I-1 die Entwicklung einer

druckinduzierten Herzinsuffizienz im Rahmen des TAC Modells in männlichen Tieren. Schließlich wurde in einem Modell der druckinduzierten Herzinsuffizienz in Ratten eine beginnende Hypertrophie / Herzinsuffizienz durch den akuten Gentransfer von I-1_{T35D} rückgängig gemacht (Pathak et al 2005).

El-Armouche et al (2003) nutzen den adenoviralen Gentransfer des I-1-Gens um die Expression des I-1 zu steigern. Sie fanden als Resultat eine um 73% verringerte PP-1-Aktivität in neonatalen Kardiomyozyten aus Ratten. In daraus erstelltem *engineered heart tissue* (EHT) war die Empfindlichkeit für Isoprenalin fünffach erhöht. Kardiomyozyten ausgewachsener Ratten zeigten verstärkte Kontraktilität nach β -adrenerger Stimulation, einhergehend mit verstärkter PLB-Phosphorylierung. Eine ca. 200fache Überexpression von I-1 in vivo gelangen El-Armouche et al (2008). Diese führte zur Entwicklung einer spontanen Hypertrophie über den Zeitraum von 10 Monaten. Hier zeigte sich außerdem eine (vermutlich kompensatorische) Erhöhung der Proteinmenge an PP-1c, einhergehend mit basal reduzierter PLB-Phosphorylierung um 50% gegenüber dem Wildtyp. Nach Isoprenalin-Stimulation war diese jedoch dreifach erhöht. Diese Ergebnisse sprechen für eine deutliche Neuordnung bzw. die Einstellung neuer Gleichgewichte im Rahmen des β -adrenergen Signalwegs infolge der ausgeprägten Überexpression, die nur sehr begrenzt den Verhältnissen unter physiologischen Bedingungen entsprechen.

Deutlich wird aus diesen Untersuchungen, dass I-1 grundsätzlich das Potential hat die Wirkung des β -adrenergen Signalwegs zu verstärken, insbesondere bei Stimulation mittels β -adrenerger Substanzen. Allerdings sind sowohl die Studien an I-1_{T35D}-transgenen Tieren als auch die Untersuchungen der Überexpression in ihrer Aussage über die physiologische Rolle des I-1 begrenzt. Die hohen Konzentrationen an I-1 / I-1_{T35D} vermindern die PP-1 Aktivität und erhöhen im Grundzustand die kontraktile Funktion bzw. erhalten die Kontraktilität im Rahmen einer erhöhten Druckbelastung. Die physiologische Funktion von I-1 wird dabei aller Wahrscheinlichkeit nach weit übertroffen (vgl. Kap. 1.6.2), evtl. wird seine Wirkung durch den Konkurrenten I-1_{T35D} in den transgenen Tieren komplett aufgehoben. Daher scheint in diesen Versuchen eher die resultierende starke Suppression der PP-1-Aktivität ausschlaggebend zu sein. Insbesondere die Frage, ob I-1 im Übergang zur Herzinsuffizienz eine pathophysiologische Bedeutung hat, bleibt hier unbeantwortet. Die Daten zur Mortalität deuten zwar darauf hin, dass die kardiale Expression von I-1_{T35D} grundsätzlich nicht schädlich ist. Allerdings sind die Daten unter der Bedingung erhöhter kardialer Druckbelastung auf funktionelle Parameter beschränkt und belegen keinen Überlebensvorteil – die Folgen des Gentransfers hinsichtlich der Mortalität bleiben also letztlich unklar.

1.6.2 Modelle mit Deletion von I-1

Neben der Verwendung von I-1_{T35D} und der I-1-Überexpression wurde auch die Deletion von I-1 in Mäusen zur Untersuchung der kardialen Funktionszusammenhänge genutzt. Die Ergebnisse sind hier jedoch widersprüchlicher. Carr et al (2002) zeigten, dass der Knockout zu einer Erhöhung der PP1-Aktivität um 23% führt. *In vivo* fanden sie basal eine um ca. 25% herabgesetzte kardiale Kontraktilität sowie eine um ca. 16% verminderte maximale Antwort auf intraperitoneale Stimulation mit Isoproterenol, jeweils gemessen im Rahmen der transthorakalen Echokardiographie (TTE) als *fractional shortening* (FS). In perfundierten Herzen zeigte sich eine lediglich geringfügig reduzierte basale Kontraktilität bei deutlich vermindertem Ansprechen auf β -adrenerge Aktivierung. Hinweise für ein Remodeling wurden nicht gefunden. Keine Auswirkungen hat der Knockout auf die Funktion des L-Typ Kalziumkanals sowie auf Troponin I.

El-Armouche et al (2008) hingegen fanden keinen offensichtlichen Phänotyp bei Mäusen mit I-1-Knockout. Sowohl die Messungen an isolierten Vorhöfen im Rahmen der Langendorff-Präparation als auch die transthorakale Echokardiographie an lebenden Tieren zeigten keinen Unterschied in der Kontraktilität zwischen Wildtyp und I-1-KO. Dieses Ergebnis wurde durch invasive Herzkatheter-Untersuchungen zusätzlich bestätigt. Darüber hinaus zeigte sich ein protektiver Effekt des I-1-Knockouts unter β -adrenerger Stimulation bei anästhesierten Mäusen: Sowohl im Rahmen der Implantation subkutaner Isoprenalin-Minipumpen als auch unter kontinuierlicher Dosissteigerung bei intraperitonealer Gabe zeigten die I-1-KO-Mäuse einen deutlichen Überlebensvorteil. Schließlich führte die chronische neurohumorale Aktivierung über sieben Tage zu weiteren interessanten Ergebnissen: Hierbei waren die Herzen der I-1-KO-Mäuse in geringerem Ausmaß von Hypertrophie und Dilatation betroffen. Außerdem zeigte sich, dass bei den Knockout-Mäusen im Gegensatz zu den Wildtypen eine nur unvollständige Desensitivierung erfolgte – eine gewisse Adaptationsfähigkeit blieb erhalten.

Peeck (2011) untersuchte die Auswirkungen eines I-1-Knockouts auf die frühe Phase der Entwicklung einer druckinduzierten Herzinsuffizienz. Zur Provokation der Herzinsuffizienz wurde hier eine TAC mit 27G-Nadel (Außendurchmesser 0,4mm) durchgeführt. Vor dem Eingriff wurde auch hier echokardiographisch kein Phänotyp infolge des I-1-Knockouts festgestellt, insbesondere wurde hier kein Unterschied unter der Bedingung β -adrenerger Aktivierung mittels Dobutamin gefunden. Die TAC führte zu einer ausgeprägten kardialen Insuffizienz. Diese ging einher mit einer Verringerung der Menge an mRNA für I-1 sowie mit einem deutlichen Anstieg von Hypertrophiemarkern wie ANP. Das Experiment war jedoch mit einer hohen Mortalität belastet und wurde aus ethischen Gründen nach

einer einmaligen echokardiographischen Untersuchung 8 Tage nach dem Eingriff beendet. Im Ergebnis zeigte sich bis zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte Mortalität der Knockout-Mäuse, der interessanterweise ausschließlich durch die männlichen Tiere bewirkt wurde. Allerdings war gerade bei den überlebenden männlichen Knockout-Tieren die Hypertrophie geringer ausgeprägt. Unklar blieb hier, ob dies ein Effekt der ungleichen Mortalität im Rahmen der TAC war, oder ob es sich um einen Hinweis auf eine generell geringere Ausprägung der Herzinsuffizienz in den Überlebenden Tieren des Knockouts handelte.

1.7 Fragestellung dieser Arbeit

Die mitunter widersprüchlichen Ergebnisse der bisher zu I-1 durchgeführten Studien zeigen, dass die Bewertung der Rolle des I-1 im Rahmen der Herzinsuffizienz nicht abschließend geklärt ist. Insbesondere die Frage, ob im Rahmen einer Herzinsuffizienz eine geringere oder eine höhere I-1-Aktivität protektive Wirkung entfaltet, ist noch nicht beantwortet. Die vorliegende Arbeit widmet sich dieser Frage durch die Weiterführung des von Peeck (2011) begonnenen Versuchsansatzes eines Vergleichs zwischen WT und I-1KO im Rahmen der druckinduzierten Herzinsuffizienz. Peeck fand Hinweise sowohl auf linien-, als auch auf geschlechtsabhängige Auswirkungen des Knockouts. Mittels des bereits dort verwendeten murinen Modells der druckinduzierten Herzinsuffizienz soll hier versucht werden die Frage nach der Auswirkung eines I-1-Knockouts insbesondere auf das Überleben der Tiere zu beantworten. Darüber hinaus erfolgt durch wiederholte echokardiographische Untersuchungen und Auswertungsmethoden auf funktioneller Ebene ein intensiver Vergleich der Linien. Hierbei soll mittels einer bei Peeck nicht erfolgten Bestimmung der Stenosegradienten zusätzlich ein Einblick in eventuelle Korrelationen zwischen Stenosegrad und Ausprägung der Herzinsuffizienz vorgenommen werden. Die wesentlichen Fragestellungen dieser Arbeit lauten wie folgt:

Besteht ein (evtl. geschlechtsabhängiger) Unterschied zwischen WT und I-1KO

- in der präoperativen kardialen Funktion?
- in der akuten Sterblichkeit nach TAC?
- im Verlauf der Herzinsuffizienz?
- im Langzeitüberleben?
- in der Expression von Hypertrophie markern?

Als eine zusätzliche methodische Untersuchung soll im Rahmen dieser Arbeit außerdem die Methode der Speckle Tracking Echokardiographie (STE) zum Einsatz kommen. Hierbei soll überprüft werden, ob das STE die mittels TTE gewonnen Ergebnisse widerspiegelt und ob sich für die diastolische Funktion zusätzliche Erkenntnisse ableiten lassen.

2. Material und Methoden

2.1 Auswahl, Herkunft und Betreuung der Mäuse

Für die Induktion einer Herzinsuffizienz durch TAC ist die Mauslinie C57Bl/6J (B6) in besonderem Maß geeignet. Im Gegensatz zu anderen Linien neigen die B6-Tiere in diesem Modell zur Entwicklung einer dekompensierten Herzinsuffizienz (Barrick et al 2009). Diese zeigt sich sowohl in einer Abnahme der Kontraktilität als auch in einer Zunahme der Herzgröße sowie in ausgeprägter Fibrosierung des Myokards und einer verstärkten Expression typischer Hypertrophiemarker (z.B. ANP, MHC).

Die I-1KO-Linie basiert ebenfalls auf dem B6-Hintergrund. Sie wurde in den 1990er Jahren von Dr. P. Greengard konstruiert um die Rolle des I-1 im Hinblick auf die *long term potentiation* im ZNS zu untersuchen (Allen et al 2000). Dankenswerter Weise dürfte diese Mauslinie folgend auch für die Untersuchungen zu I-1 im Herzen verwendet werden und war zum Zeitpunkt dieser Untersuchung im Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) bereits etabliert. Als weitere Linien fanden heterozygote Tiere mit einem unvollständigen I-1-Knockout Verwendung, die durch eine Kreuzung der I-1KO mit Wildtypen der Linie C57Bl/6J erzeugt wurden. Die Zucht und Pflege der Mauslinien erfolgte grundsätzlich im European Neuroscience Institute Göttingen. Ab Versuchsbeginn wurden die Tiere in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der UMG versorgt. Hier wurden die Tiere täglich im Hinblick auf ihre allgemeine Aktivität und ihre Reaktionsfreudigkeit überprüft. Eine Gewichtsmessung erfolgte standardisiert zweimal pro Woche, bei rapidem Gewichtsverlust auch häufiger. Um übermäßiges Leid der Tiere zu vermeiden wurden Kriterien für den Versuchsabbruch definiert. Objektive Parameter hierfür waren u.a. ein Gewichtsverlust >20% im Vergleich zum Gewicht vor der TAC und körperliche Verletzungen der Mäuse. Darüber hinaus wurden bei unklaren Verhaltensänderungen die erfahrenen Tierpfleger sowie die Tierärzte der betreuenden Einrichtung hinzugezogen. Bei dem nur selten aufgetretenen Verdacht auf Schmerzen wurden die betreffenden Tiere mit Metamizol-Wasser entsprechend der perioperativen Versorgung behandelt.

2.2 Die echokardiographische Untersuchung

2.2.1 Anästhesie

Die echokardiographische Untersuchung wurde unter Narkose durchgeführt. Zum einen wird so eine möglichst hohe Qualität der Bildgebung gewährleistet, da die Positionierung von Maus und Schallkopf sehr kontrolliert und standardisiert erfolgen kann. Zum anderen erfordert die Untersuchung an wachen Mäusen einen hohen Trainingsaufwand und führt zu größerer Variabilität der Ergebnisse (Ram et al 2011). Zudem wären insbesondere bereits erkrankte Tiere durch den

wiederkehrenden Stress der Untersuchung vital gefährdet, wohingegen die Anästhesie bei guter Routine des Untersuchers eine geringe Gefährdung aufweist.

Als Anästhetikum wurde Isofluran (Isofluran 100%, Abott) gewählt, da es einerseits stabile Resultate liefert und andererseits eine nur geringe kardiale Beeinträchtigung verursacht (Roth et al 2002). Das Anästhetikum wurde nach dem Verdampfen im Vaporizer (Visual Sonics) mit 100% Sauerstoff gemischt. Die Einleitung erfolgte mit 3% Isofluran in einer geschlossenen Kammer. Anschließend wurde die Maus gewogen und – ausschließlich im Rahmen der ersten Untersuchung – ein Transponder subkutan eingesetzt. Zur Aufrechterhaltung der Narkose genügte eine 1,5 – 2% Isofluran-Mischung. Diese wurde über einen Schlauch verabreicht, dessen Öffnung Nase und Mund der Maus umfasst. Zur Überwachung der Narkosetiefe wurden die Atem- und Herzfrequenz stetig kontrolliert.

2.2.2 Transthorakale Echokardiographie

Die Transthorakale Echokardiographie (TTE) ist eine vielgenutzte und gut dokumentierte Methode zur Evaluation der Herzfunktion in transgenen Mäusen (Collins et al 2003). Ihr besonderer Vorteil liegt in der Möglichkeit einer seriellen Erhebung von Daten der Herzfunktion im individuellen Tier. Der Ablauf der Untersuchung folgte dem Standardprotokoll der Serviceeinheit des SFB 1002 und wurde von erfahrenen und speziell hierfür ausgebildeten technischen Assistenten wie folgend beschrieben ausgeführt.

Die narkotisierte Maus wurde in Rückenlage auf einer frei einstellbaren Wärmeplatte (Visual Sonics) fixiert, die neben der Regulation der Temperatur auch die Überwachung der Atemfrequenz und EKG-Ableitungen der Extremitäten ermöglicht. Die Körpertemperatur des Tieres wurde mittels einer rektalen Temperatursonde erfasst und wurde, ggf. mithilfe einer zusätzlichen Wärmelampe, zwischen 37°C und 38°C gehalten. Als Zielwert für die Atemfrequenz galt ein Wert >100/min. Mittels der EKG-Ableitungen wurde auch die Herzfrequenz bestimmt. Es folgte die Enthaarung des linken Hemithorax (Veet Haarentfernungscreme), anschließend wurde vorgewärmtes Ultraschallgel (Asmuth) aufgebracht. Die transthorakale Echokardiographie wurde mit dem *Visual Sonics Vevo 2100 Imaging System* durchgeführt. Zur Erhebung der Bilder im B-Mode und M-Mode wurde der Schallkopf MS400 (18-38MHz, Visual Sonics) verwendet, für die Bestimmung der Gradienten mittels Doppler-Verfahren kam der MS250 (13-24MHz, Visual Sonics) zum Einsatz.

Die Erhebung der Bilder erfolgte nach einem standardisierten Verfahren: Zunächst wurde der Schallkopf so ausgerichtet, das ein Bild der langen Achse im B-Mode sowohl die Aortenklappe als

auch die Herzspitze in der Enddiastole beinhaltet. Durch ein 90° Drehung des Schallkopfes wurde dann die kurze Achse (ebenfalls B-Mode) aufgezeichnet. Schließlich folgte eine M-Mode Darstellung des linken Ventrikels. Bei der initialen Untersuchung sowie in der dritten Woche nach TAC wurde zusätzlich eine Echokardiographie nach Applikation von Dobutamin durchgeführt. Hierzu erfolgte die Gabe von 10 µg/g KG Dobutamin (Dobutamin-hameln, 5 mg/ml) intraperitoneal. Die echokardiographische Untersuchung begann jeweils 3 min nach Injektion. In Woche 18 erfolgte die β-adrenerge Stimulation stufenweise im Rahmen einer Anästhesie: Nach der basalen Echokardiographie wurden zunächst 1 µg/g KG Dobutamin injiziert und eine erneute Ultraschalluntersuchung durchgeführt. Im Anschluss an diesen Zwischenschritt erfolgte die Injektion von 10 µg/g KG Dobutamin entsprechend den vorherigen Untersuchungen. Die Bestimmung der Stenose-Gradienten erfolgte innerhalb der ersten drei Tage nach TAC mittels Dopplerverfahren. Im Anschluss an die echokardiographische Untersuchung wurden die Mäuse bis zum vollständigen Erwachen auf einer Wärmeplatte abgesetzt.

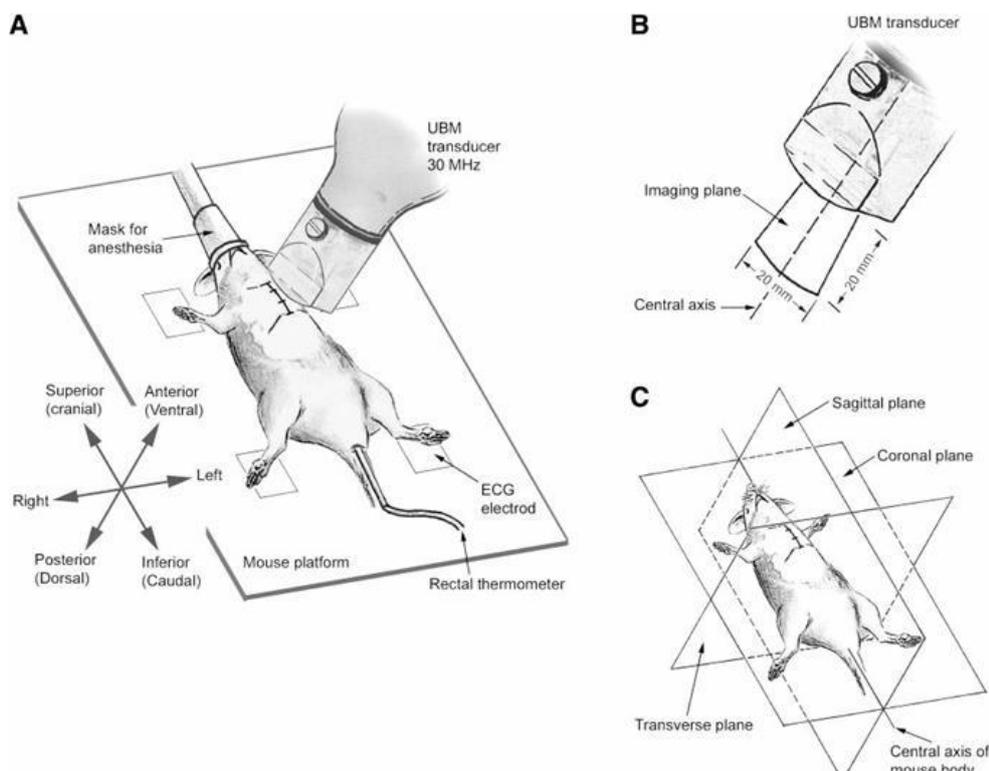


Abb. 2.1: Positionierung der Maus im Rahmen der TTE (Zhou et al, 2004).

Die Auswertung der Ultraschallbilder im B- und M-Mode erfolgte im ersten Schritt mit der Software des *Vevo 2100 Imaging System*, Version 1.4.0. Die Regelmäßigkeit der Kontraktionszyklen wurde für den gesamten Aufnahmezeitraum kontrolliert. Endsystole und Enddiastole wurden visuell bestimmt. Für beide Zeitpunkte im Kontraktionszyklus wurden die Messpunkte (Abb. 2.2) manuell ermittelt, d.h.

ohne automatische Funktionen der Software. Die aus diesen Messpunkten primär erhobenen Werte sind in Tab. 2.1 aufgeführt. Aus diesen Messwerten wurden sekundär weitere Parameter wie in Tab. 2.2 gezeigt berechnet.

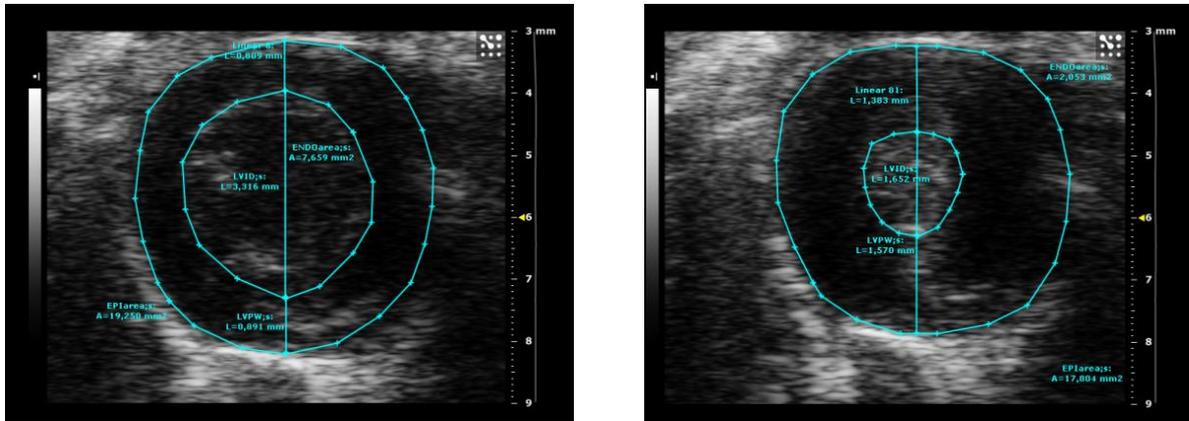


Abb. 2.2: B-Mode Aufnahmen der kurzen Achse in Diastole (links) und Systole

	Abkürzung	Beschreibung	Herzphase	TTE Ebene	Einheit
TEE	Ls	Längendurchmesser LV	Endsystole	Kurze Achse	mm
	Ld	Längendurchmesser LV	Enddiastole	Kurze Achse	mm
	AWThd	Dicke der LV Vorderwand	Enddiastole	Lange Achse	mm
	LVIDd	LV Innendurchmesser	Enddiastole	Lange Achse	mm
	PWThd	Dicke der LV Hinterwand	Enddiastole	Lange Achse	mm
	Area d	Innenfläche, incl. Endocard	Enddiastole	Lange Achse	mm ²
	AWThs	Dicke der LV Vorderwand	Endsystole	Lange Achse	mm
	LVIDs	LV Innendurchmesser	Endsystole	Lange Achse	mm
	PWThs	Dicke der LV Hinterwand	Endsystole	Lange Achse	mm
	Area s	Innenfläche, incl. Endocard	Endsystole	Lange Achse	mm ²
Epi s	Aussenfläche, incl. Epicard)	Endsystole	Lange Achse	mm ²	
Zusätzlich	HR	Herzfrequenz			1/min
	RR	Atemfrequenz			1/min
	BT	Körpertemperatur			°C
	BW	Körpergewicht			g

Tab. 2.1: Primär erhobene Messwerte im Rahmen der TTE.

Abkürzung	Bedeutung	Formel	Einheit
FAS	Fractional area shortening	$(\text{Area d} - \text{Area s}) / \text{Area d} * 100$	%
FS	Fractional shortening	$(\text{LVIDd} - \text{LVIDs}) / \text{LVIDd} * 100$	%
AWThF	Anterior wall thickening fraction	$(\text{AWThs} - \text{AWThd}) / \text{AWThs} * 100$	%
PWThF	Posterior wall thickening fraction	$(\text{PWThs} - \text{PWThd}) / \text{PWThs} * 100$	%
Vol s	Systolic volume	$5/6 * \text{Area s} * \text{Ls}$	$\text{mm}^3 = \mu\text{l}$
Vol d	Diastolic volume	$5/6 * \text{Area d} * \text{Ld}$	$\text{mm}^3 = \mu\text{l}$
EF	Ejection fraction	$(\text{Vol d} - \text{Vol s}) / \text{Vol d} * 100$	%
SV	Stroke volume	$\text{Vol d} - \text{Vol s}$	$\text{mm}^3 = \mu\text{l}$
CO	Cardiac output	$\text{SV} * \text{HR} / 1000$	$\text{mm}^3 = \mu\text{l}$
CI	Cardiac index	$\text{CO} / \text{BW} * 1000$	mm^3/g
LVW	Left ventricular weight	**	mm^3
LVW/BW	LV weight / Body weight ratio	LVW / BW	mm^3/g

Tab. 2.2: Abgeleitete Größen. **) $\text{LVW} = 1.05 * (5/6) * ((\text{Epi s} * (\text{Ls} + ((\text{AWThs} + \text{AWThd}) / 2))) - (\text{Area s} * \text{Ls}))$

2.2.3 Auswahl der echokardiographischen Parameter

In der klinischen Anwendung wird vor allem die *ejection fraction* (EF) zur Abbildung der linksventrikulären systolischen Funktion herangezogen. Mit zunehmender Veränderung der linksventrikulären Geometrie bei fortschreitender Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz kommt es jedoch zu regionalen Unregelmäßigkeiten der Wandbewegungen. Die vereinfachte kubische Berechnung des ventrikulären Volumens aus nur einer Schnittbildebene geht von einer normalen Form des Ventrikels aus und kann daher zu falschen Ergebnissen führen (Ram et al 2011). Eine adäquatere Messung wird grundsätzlich durch das *fractional shortening* (FS) ermöglicht. Da die exakte Position des Endokards im B-Mode jedoch oftmals nicht sicher zu bestimmen war, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Längsdurchmesser ausgehend vom Epikard der Herzspitze bestimmt (und das ventrikuläre Volumen somit in geringem Umfang überschätzt). Eine Berechnung des FS hätte daher den Anteil der Wandverdickung an der systolischen Volumenreduktion nicht berücksichtigt. Zur Abbildung der systolischen Funktion wurde in erster Linie das *fractional area shortening* (FAS) herangezogen, das auf der transversalen Schnittebene beruht, und in der die Endokardgrenzen deutlich abzugrenzen waren. Weiterhin wurden alle aus dem Längsdurchmesser und den daraus errechneten Volumina abgeleiteten Parameter (EF, SV, CO, CI) eher nachrangig eingestuft, wengleich die Ergebnisse sehr weitgehend mit den Resultaten des FAS übereinstimmten.

Das Monitoring der Volumenzunahme des Herzens wurde durch die Berechnung des *diastolic volume* (VoD) ermöglicht. Die oben genannte systematische Überschätzung des Längsdurchmessers kann für die Abbildung der Progression der Herzerkrankung vernachlässigt werden.

Eine Analyse des Verlaufs des Herzgewichts erfolgte mittels des *left ventricular weight* (LVW) bzw. der das auf das Körpergewicht bezogenen, normalisierten Ratio LVW/BW. Als Beleg für die Aussagekraft des durch TEE bestimmten LVW kann die Korrelation zwischen den unmittelbar prä mortal gemessenen LVWs und den in direktem Anschluss ermittelten tatsächlichen Ventrikelgewichten gelten. Gleiches gilt für die Korrelation der normalisierten Werte LVW/BW und HW/tibia.

Die Analyse der Wanddicke, insbesondere der *posterior wall thickness* (PWTh), ist ein in der Literatur häufig verwendeter Parameter und kann u.a. zur Differenzierung verschiedener Hypertrophieformen herangezogen werden. Allerdings wurde auch eine hohe Interobserver-Variabilität beschrieben (Yang et al 1999). Im Rahmen dieser Arbeit erschienen diese Parameter infolge ausgeprägter Variabilität von geringer Aussagekraft, wenngleich in der medizinischen Klinik insbesondere die *anterior* bzw. *posterior wall thickness* (AWTh, PWTh) und die daraus abgeleitete Wandverdickung (AWThF, PWThF) nutzbringende Parameter darstellen.

2.2.4 Speckle Tracking Echokardiographie

Die Speckle Tracking Echocardiography (STE) ist eine relativ neue Methode der Analyse zweidimensionaler B-Mode Aufnahmen, die bereits nutzbringend in der klinischen Kardiologie eingesetzt wird (Mondillo et al 2011). Im Gegensatz zu den globalen funktionellen Parametern der konventionellen TTE ermöglicht die STE einen Einblick in die Wanddeformation und die Deformationsgeschwindigkeit (Geyer et al 2010). Zudem können verschiedene Wandregionen unabhängig voneinander analysiert werden (Popovic et al 2007), was bei der Untersuchung segmentaler myokardialer Schädigungen von großem Nutzen sein kann. Da im Rahmen der hier vorliegenden druckinduzierten Herzinsuffizienz der Ventrikel in seiner Gesamtheit betroffen ist wurde eine Auswertung der Myokardfunktion ohne weitere Segmentierung vorgenommen.

Die Nutzung der STE im Rahmen dieser Arbeit zielte auf zwei Fragestellungen ab. Erstens sollte überprüft werden, ob die im Rahmen der zuverlässigen konventionellen echokardiographischen Auswertung erhaltenen Ergebnisse sich auch in der STE finden lassen. Im Falle adäquater Ergebnisse sollte zweitens ein besonderes Augenmerk auf die diastolische Funktion gerichtet werden, über die im Rahmen der konventionellen Analyse keine Aussage getroffen werden kann.

Die Analyse erfolgte mittels der Funktion *Vevo Strain* des *Vevo 2100 Imaging System* und nutzte die erhobenen B-Mode Aufnahmen der kurzen Achse. Das Endokard wurde durch 12 manuell gesetzte Punkte umschrieben, welche durch die Software automatisch ergänzt und in 6 Segmente unterteilt wurde. Eine visuelle Kontrolle des Trackings stellte sicher, dass die Verlagerung des Endokards über die Herzzyklen adäquat durch die gesetzten Messpunkte verfolgt wurde. Zur weiteren Analyse wurden nur Trackings verwendet, bei denen das Fläche/Zeit-Diagramm mindestens 4 aufeinander folgende rhythmische und regelmäßige Kontraktionszyklen aufwies. Die Bestimmung von Endsystole und Enddiastole erfolgte anhand des durch die Software erzeugten Fläche/Zeit-Diagramms: Der Zeitpunkt der größten Flächenausdehnung in der kurzen Achse wurde als Diastole, der Zeitpunkt der geringsten Ausdehnung als Systole definiert. Von den zahlreichen erhobenen Parametern wurden die in Tab. 2.3 genannten herangezogen.

Die verwendeten Parameter stellen die Mittelwerte aller für den jeweiligen Zeitpunkt bestimmten Segmentwerte da. Die Auswertung der langen Achse wurde wegen des hier oft schwer abgrenzbaren Endokards unterlassen, sodass lediglich der *radial strain* (S_R) und *circumferential strain* (S_C) ermittelt wurden, nicht jedoch der *longitudinal strain*.

	Abk.	Bedeutung	Beschreibung	Einheit
Endsystole & -diastole	S_R	Radial strain	Transversale Deformation in Richtung des Septums, endsystolisch	%
	S_C	Circumferential strain	Transversale Deformation entlang des Ventrikelumfanges, enddiastolisch	%
Systole & Diastole	SR_R	Radial strain rate	Maximale Geschwindigkeit des <i>radial strain</i> während Systole / Diastole	1/s
	SR_C	Circumferential strain rate	Max. Geschwindigkeit des <i>circumferential strain</i> während Systole / Diastole	1/s

Tab. 2.3: Mittels STE erhobene Parameter

2.3 Homogenität der Tier- und Untersuchungsgruppen

Insgesamt wurden 53 nach Alter und Geschlecht abgestimmte Tiere (28 WT und 25 I-1KO) der TAC zugeführt. In der WT-Gruppe stammten 19 Tiere aus der homozygoten I-1WT-Linie, 3 Tiere waren Nachfahren der heterozygoten I-1KO-Linie und 6 Tiere wurden aus externer Quelle (Charles River) hinzu gekauft. Insgesamt bestand die WT-Gruppe aus 13 männlichen und 15 weiblichen Tieren. In der I-1KO-Gruppe stammten 19 Tiere aus der homozygoten I-1KO-Linie und 6 Tiere waren Nachkommen der heterozygoten I-1KO-Linie. Insgesamt bestand die I-1KO-Gruppe aus 12 männlichen und 13 weiblichen Tieren. Diese Zusammenstellung der Interventionsgruppen aus verschiedenen Quellen machte einen umfassenden Vergleich dieser Subgruppen nötig (vgl. Anhang). Hierbei wurden zwischen den Subgruppen nur geringe Unterschiede im präoperativen TTE gefunden (Anhang A.1). Hinsichtlich der bestimmten Gradienten und dem Verlauf der Herzinsuffizienz nach TAC zeigten die Subgruppen keine wesentlichen Unterschiede (Anhang A.2).

Die Verteilung der nach TAC bestimmten Gradienten zeigte ein vergleichbares Ausmaß der induzierten Stenosen (Anhang A.3) mit 76 ± 5 mmHg (WT^{TAC}) und 73 ± 3 mmHg (KO^{TAC}). Auch der Vergleich der weiblichen und männlichen Tiere zeigte nur geringe Unterschiede. Hierbei wiesen jedoch KO(f) mit 69 ± 3 mmHg einen etwas geringeren Stenosegrad auf als die anderen Subgruppen mit WT(m) = 75 ± 7 mmHg, WT(f) = 78 ± 5 mmHg und KO(m) = 79 ± 7 mmHg (KO,m). Die Anpassung des Gradientenbereichs führte auch hier zu lediglich geringfügigen Veränderungen.

Im Rahmen der Applikation von Dobutamin fiel auf, dass es neben dem in der Regel resultierenden Frequenzanstieg mitunter auch zu Frequenzabnahmen kam. Der variable Bereich erstreckte sich hierbei insgesamt von -50/min bis +213/min. Die Kontrolle der echokardiographischen Bilder zeigte, dass Tiere ohne Frequenzanstieg bzw. mit einem sehr geringen Anstieg auch keine Kontraktilitätssteigerung aufwiesen, so dass hier von einer missglückten Dobutamin-Injektion auszugehen ist. Die betreffenden Tiere wurden durch die Einführung eines unteren Grenzwerts der Frequenzzunahme von +20/min nach Dobutamin-Injektion von der jeweiligen Analyse ausgeschlossen.

Für den Vergleich der echokardiographischen Parameter während der Progression der Herzinsuffizienz wurde eine Anpassung der Gruppen anhand der postoperativ ermittelten Stenosegradienten vorgenommen. Hierbei wurde die WT-Gruppe, die initial eine größere Streubreite aufwies, an die KO-Gruppe angepasst. Der resultierende Gradientenbereich erstreckte sich so auf 40-100 mmHg. Die Tierzahlen betragen zu Beginn der Verlaufsanalysen in Woche 1 nach TAC n=18 (WT) und n=16 (I-1KO).

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Verarbeitung der erhobenen Daten erfolgte mit den Programmen *Microsoft Excel 2007* und *GraphPad Prism*, Version 5.01. Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus von Differenzen zwischen den Untersuchungsgruppen (WT^{Sham}, WT^{TAC}, KO^{Sham}, KO^{TAC}) wurde der gepaarte t-test genutzt, wenn Werte derselben Individuen vorlagen. Der ungepaarte t-test wurde stets verwendet, wenn die Gruppen aus unterschiedlichen Individuen bestanden. Im Rahmen der Untersuchung der Überlebenszeiten wurde die Kaplan-Meyer-Analyse verwendet. Hierbei kam der *log-rank test* zum Einsatz. Für die Überprüfung der Korrelationen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet. Alle statistischen Werte sind angegeben als *mean ± SEM* (Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts der Durchschnittswerte). Die Angabe des α -Fehlers erfolgt dimensionslos als p-Wert, wobei ab $p < 0,05$ von Signifikanz ausgegangen wurde.

2.5 Das Modell der Transverse Aortic Constriction

2.5.1 TAC als Tiermodell der Herzinsuffizienz

In der klinischen Praxis bestehen zahlreiche mögliche, im Einzelfall mitunter unklare Ursachen der Herzinsuffizienz (McMurray 2000). Bei der Übertragung des Krankheitsbildes in ein Tiermodell wird diese Vielfalt stets durch eine einfache Ursache-Wirkung-Beziehung ersetzt. Zur Anwendung kommen hierbei z.B. die Induktion eines Myokardinfarkts oder die chronische Infusion β -adrenerger Substanzen. Zudem finden klinisch relevante Komorbiditäten und Medikationen im Modell keinerlei Berücksichtigung. Experimentell kommen grundsätzlich chirurgische, toxische und genetische Methoden zum Einsatz (Breckenridge 2010). Das Modell der TAC ahmt dabei am ehesten den Pathomechanismus einer Aortenstenose nach. Diese ist klinisch insbesondere beim älteren Menschen keine Seltenheit, allerdings führt sie nicht zwangsläufig zu einer klinisch manifesten Herzinsuffizienz. Die Insuffizienz ist hier primär druckinduziert, wobei der plötzliche Beginn und die Mortalität im Tiermodell nicht der meist langsamen Progredienz und der relativ guten Prognose der klinischen Aortenstenose entspricht (Daniel et al 2006). Dennoch treten der Druckbelastung folgend die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und der Kontraktilitätsverlust als sekundäre, die Insuffizienz fördernde Effekte hinzu. Auch die Expressionsmuster entsprechen den bekannten Veränderungen des insuffizienten Herzens im Menschen sowie in anderen Tiermodellen. Daher kann trotz der speziellen Kausalität im murinen Modell die Vielschichtigkeit des Syndroms ‚Herzinsuffizienz‘ verlässlich abgebildet werden.

2.5.2 Durchführung der TAC

Die Methode der Transverse Aortic Constriction (TAC) wurde als murines Hypertrophie-Modell von Rockman (Rockman et al 1991) erstmalig angewendet. Hierbei erfolgte der Zugang zur Aorta über eine Eröffnung des Thorax. Später wurde der Eingriff dahingehend modifiziert (Hu et al 2003), dass als Zugang die obere Thoraxapertur gewählt wurde. Diese Veränderung machte eine Intubation überflüssig, vereinfachte so die Methode und wurde daher auch im Rahmen dieses Projekts angewendet. Die TAC wurde für diese Arbeit von einer speziell hierfür geschulten technischen Assistentin der Serviceeinheit des SFB 1002 ausgeführt und erfolgte in Gruppen von 6-10 Mäusen im Alter von 9-12 Wochen an insgesamt 6 Tagen. Im Rahmen der perioperativen Analgesie erhielten alle Mäuse Metamizol-Wasser (2,5mg/ml) vom dritten Tag vor bis einschließlich dem siebten Tag nach dem Eingriff.

Die Anästhesie erfolgte inhalativ mittels Isofluran (1-1,5 Vol%), zusätzlich erhielten die Tiere jeweils 1,2µg/g KG Buprenorphin i.p. als Analgetikum unmittelbar vor der Operation. Das zu operierende Tier wurde anschließend in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert, wobei die Isofluran-Inhalation über einen Schlauch gewährleistet wurde. Thorax und Hals der Maus wurden vorbereitend enthaart und das Operationsgebiet mit Iod desinfiziert. Über einen ca. 1 cm langen Hautschnitt in kranialer Verlängerung des Sternums sowie die Verlagerung des Thymus nach kranial erfolgte die Freilegung der Muskulatur. Diese wurde mittels spitzer Pipette längs eröffnet. Der so gewonnene Zugang wurde um einen wenige Millimeter langen Einschnitt des oberen Brustbeins erweitert. Entlang der Karotiden wurde nun der zwischen den Abgängen liegende Abschnitt des Aortenbogens aufgesucht und das Bindegewebe direkt unterhalb mit einer stumpfen Nadel durchstoßen. Anschließend wurde ein Faden um den Aortenbogen geführt und ein zweifacher Knoten vorgelegt. Das Festziehen der Knoten erfolgte nach Platzierung einer 26G-Nadel (Außendurchmesser 4,5mm) innerhalb des Knotens. Nach Stabilisierung durch weitere gegenläufige Knoten wurde die Nadel entfernt. Der durchtrennte Abschnitt des Sternums sowie der Hautschnitt wurden mit Einzelnähten fixiert bzw. geschlossen. Abschließend folgte eine erneute Desinfektion. Für die Aufwachphase wurden die Tiere auf eine Wärmeplatte gesetzt.

2.6 Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte im Anschluss an die letzte echokardiographische Untersuchung nach Dobutaminapplikation in Woche 16 bzw. 18. Die Abläufe erfolgten standardisiert und – in Bezug auf die Herzentnahme – in möglichst kurzer Zeit. Die Tiere wurden zunächst in der CO₂-Kammer bis zur Reaktionslosigkeit auf Schmerzreiz narkotisiert. Die Tötung erfolgte durch Genickbruch der

narkotisierten Maus, anschließend wurde der Thorax eröffnet und das Herz am Ursprung der großen Gefäße abgesetzt, in eisgekühlter PBS-Lösung gewaschen, auf sauberem Papier getrocknet und auf einer Feinwaage gewogen. Im nächsten Schritt wurden die Vorhöfe von den Kammern getrennt und nochmals einzeln gewogen. Die Ventrikel wurden transversal in drei Schnitte zerteilt. Atria, Ventrikelbasis und –spitze wurden zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und dann bei -80°C gelagert. Der mittlere Schnitt des Ventrikels wurde für die histologische Analyse aufgearbeitet und über Nacht in 4% Paraformaldehyd inkubiert. Nach der Konservierung der Herzproben wurden jeweils Lunge und Leber entnommen, gewaschen und gewogen. Es folgte die Präparation der rechten Tibia, deren Länge mit einem Messschieber bestimmt wurde. Anschließend wurde die Schwanzspitze abgetrennt und ebenfalls tiefgefroren, um eine nachträglich Genanalyse zu ermöglichen.

2.7 Histologische Analysen

Wie beschrieben wurde der mittlere Anteil der entnommenen Ventrikel für die histologische Aufarbeitung benutzt. Im Anschluss an die Organentnahme erfolgte die vorbereitende Dehydratation entsprechend Tab.2.4, darauf folgte die Einbettung in Paraffinblöcke (*Surgipath® Paraplast*) unter Verwendung des Einbettsystems *Leica EG 1150*. Die histologischen Schnitte wurde mit dem Mikrotom *Leica RM 2255* in einer Dicke von 4 µm angefertigt und parallel zur Herzbasis durchgeführt.

Für die Größenbestimmung der Kardiomyozyten wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Um außerdem die Ausprägung der Fibrose im Rahmen der Herzinsuffizienz zu untersuchen erfolgte eine Siriusrot-Färbung. Die Färbungen erfolgten mit Färbelösungen der angegebenen Zusammensetzung (Tab. 2.5) nach dem unten stehenden Protokollen (Tab. 2.6). Die Rehydratation erfolgte in beiden Fällen auf dieselbe Weise, zum Eindecken wurde das *Roti®-HistoKitt II* entsprechend den Herstelleranweisungen genutzt.

Medium	Zeit
PBS pH 7,4	spülen
Ethanol 70%	3 Tage
Ethanol 80%	30 min
Ethanol 90%	30 min
Ethanol 96%	60 min
Ethanol 96%	30 min
Ethanol 100%	60 min
Ethanol 100%	30 min
Toluol / Ethanol 1:1	15 min
Toluol 100%	60 min
Toluol 100%	30 min
Paraffin	über Nacht

Tab. 2.4: Dehydratation

	Stoff	Konzentration
Eosin-Lösung	Eosin G	0,5%
Hämalaun-Lösung	Hämatoxylin	1%
n. Mayer	NaJO ₃	0,2%
	KAl(SO ₄) ₂	50%
	Chloralhydrat	50%
	Zitronensäure	1%
Siriusrot (pH 2)	Siriusrot 80	1%
	Pikrinsäure, gesättigt	
PBS (pH 7,4)	NaCl	13,6mM
	Na ₂ HPO ₄	652µM
	KH ₂ PO ₄	147µM
	KCl	268 µM

Tab. 2.5: Zusammensetzung der Färbelösungen

Rehydratation		H.E.-Färbung		Siriusrot-Färbung	
Medium	Zeit	Medium	Zeit	Medium	Zeit
Roti®-Histol	15 min	Hämalaun-Lösung	10 min	Siriusrot-Lösung	60 min
Roti®-Histol	15 min	Aqua dest.	Kurz spülen	Essigsäure 0,5%	Kurz spülen
Ethanol 100%	5 min	H ₂ O („Bläuen“)	15 min spülen	Essigsäure 0,5%	Kurz spülen
Ethanol 100%	5 min	Aqua dest.	2 min	Aqua dest.	5 min
Ethanol 96%	5 min	Eosin-Lösung	5 min	Ethanol 70%	20 sec
Ethanol 96%	5 min	Aqua dest.	Kurz spülen	Ethanol 96%	20 sec
Ethanol 80%	5 min	Ethanol 70%	20 sec	Ethanol 100%	20 sec
Ethanol 70%	5 min	Ethanol 96%	20 sec	Xylol	20 sec
Aqua dest.	5 min	Ethanol 100%	20 sec		
PBS pH 7,4	5 min	Xylol	20 sec		

Tab. 2.6: Rehydratation und Färbungen

Zur Auswertung der Schnitte wurde für die Siriusrot-Färbung das Stereomikroskop *Lumar.V12* (Carl Zeiss) mit der Software *AxioVision*, Version 4.8, genutzt. Die H.E.-gefärbten Schnitte wurden zur Ermittlung der Zellgröße herangezogen und mit dem Mikroskop *Axiomager.M2* (Carl Zeiss) in Kombination mit der Software *VisiView* (Visitron Systems) abgebildet. Die Auswertung der Zellquerschnitte erfolgte mittels der Software *ImageJ*, Version 1.46. Hierbei wurde pro Tier jeweils ein Schnitt ausgewertet. Um Verfälschungen durch den Einbezug längs bzw. diagonal angeschnittener Zellen zu vermeiden wurden in jedem Präparat drei linksventrikuläre Kardiomyozyten ausgemessen, die jeweils einen runden Querschnitt und einen rund angeschnittenen Kern aufwiesen.

2.8 Expressionsanalyse

2.8.1 Erstellung der cDNA

Für die Bestimmung der RNA-Niveaus wurden die Gewebeprobe der Herzspitze herangezogen. Zunächst wurden die Proben einzeln in einem Aluminiummörser zu einem feinen Pulver zerstoßen. Um ein Auftauen der Proben und daraus folgende biochemische Prozesse weitestgehend zu vermeiden wurden der Mörser und alle verwendeten Instrumente in einem Bad aus flüssigem Stickstoff permanent gekühlt. Zudem wurde auf eine möglichst hohe Geschwindigkeit im Arbeitsprozess geachtet. Die Extraktion der RNA erfolgte aus 5-20 mg der gefrorenen zerstoßenen Proben unter Verwendung von *TRIzol*[®] (Invitrogen) nach dem nebenstehenden Protokoll (Tab. 2.7). Im Resultat lag die extrahierte RNA in Wasser gelöst vor. Die Bestimmung der RNA-Konzentration mit dem *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Softwareversion 3.8.1) erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm. Als Beleg für eine qualitativ hochwertige RNA-Isolation wurde ein A_{260}/A_{280} -Quotient von 1,8-2,2 angenommen und in aller Regel erreicht. Zur Erstellung der cDNA wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) entsprechend dem folgenden Protokoll (Tab. 2.8) benutzt. Nach Abschluss des Prozesses wurde die cDNA bei 4°C gelagert. Die anschließende Vervielfältigung der cDNA wurde nach dem Protokoll in Tab. 2.9 vorgenommen. Hierbei wurden ebenfalls Reagenzien der Firma Applied Biosystems verwendet.

Maßnahme	Zeit
Zugabe 1000 µl TRIzol [®]	5 min
Zugabe 200 µl Chloroform	3 min
Zentrifuge 12000 rpm, 4°C	15 min
→ <u>Weiterarbeit mit Überstand</u>	
Zugabe 500 µl Isopropanol	10 min
Zentrifuge 12000 rpm, 4°C	10 min
→ <u>Weiterarbeit mit Pellet</u>	
Zugabe 1 ml Ethanol 75%	Schütteln
Zentrifuge 12000 rpm, 4°C	5 min
→ <u>Weiterarbeit mit Pellet</u>	
Trocknung	10 min
25 µl H ₂ O, DEPC-behandelt	Lösen
<u>Aufbewahrung bei -80°C</u>	

Tab. 2.7: RNA-Isolation

	DNase-Behandlung	cDNA-Synthese
Ansatz	8,8 µl H ₂ O (DEPC) + 1 µg RNA + 11 µl DNase Puffer + 0,2 µl DNase	Probe nach DNase-Behandlung + 2 µl 10x Reverse Transkriptase Puffer + 0,8 µl 25x dNTPs (100nM) + 2 µl 10x Reverse Transkriptase Random Primer + 1 µl RNase Inhibitor + 2.2 µl H ₂ O (DEPC) + 1 µl Reverse Transkriptase
Protokoll	Inkubation 37°C 20 min + 1 µl EDTA Lösung Inkubation 75°C 10min	25°C 10 min 37°C 120 min 85°C 5 min

Tab. 2.8: Erstellung der cDNA

PCR-Ansatz	PCR-Verlauf
5 µl 5x PrimeSTAR® Buffer Mg ²⁺	Inkubation (1x) 98°C 1 min
+ 2 µl dNTP Mix 2,5mM	30 Zyklen 95°C 15 sec
+ 0,25 µl Taq Polymerase	60°C 15 sec
+ 0,5 µl Primer	72°C 15 sec
+ 16,25 µl H ₂ O (bidest.)	
+ 1 µl cDNA	Programmende 4°C

Tab. 2.9: Vervielfältigung der cDNA

2.8.2 Quantitative Real-Time PCR

Zur Bestimmung der Expressionslevel der Hypertrophiemarker α -MHC, β -MHC, ANP und BNP sowie des Housekeeping-Proteins Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) erfolgte eine quantitative Real-Time PCR unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green I. Hierzu wurden die Ansätze ausgehend von 1:15-Verdünnungen der bereits amplifizierten cDNA unter Verwendung des *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus* (Solis Biodyne) erstellt (Tab. 2.10) und im Thermocycler nach dem beschriebenen Protokoll vervielfältigt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 2.11 aufgeführt. Die relative Expression der Proteine wurde durch die $\Delta\Delta$ CT-Methode ermittelt. Hierbei wurde die jeweilige Proteinmenge zunächst anhand des mitgeführten Housekeeping-Proteins PBGD normalisiert (Δ CT) und anschließend die relative Expression durch Bezug auf die Kontrollgruppe WT^{Sham} errechnet ($\Delta\Delta$ CT).

qPCR-Ansatz	qPCR-Verlauf		
4 μ l EvaGreen®	Inkubation (1x)	95°C	10 min
+1 μ l Primer (forward)	Amplifikation (40x)	95°C	15 sec
+ 1 μ l Primer (reverse)		60°C	20 sec
+ 13 μ l H ₂ O (bidest.)		72°C	40 sec
+ 1 μ l cDNA (1:15)	Endphase (1x)	95°C	15 sec
		60°C	15 sec
		95°C	15 sec

Tab. 2.10: qPCR: Ansatz und Verlauf

	Richtung	Sequenz 5' → 3'	Schmelzpunkt [°C]
α-MHC	forward	CCA ATG AGT ACC GCG TGA A	56,7
	reverse	ACA GTC ATG CCG GGA TGA T	56,7
β-MHC	forward	ATG TGC CGG ACC TTG GAA	56
	reverse	CCT CGG GTT AGC TGA GAG ATC A	62,1
ANP	forward	CAT CAC CCT GGG CTT CTT CCT	61,8
	reverse	TGG GCT CCA ATC CTG TCA ATC	59,8
BNP	forward	AAG TCC TAG CCA GTC TCC AGA GC	64,2
	reverse	CTT CAG TGC GTT ACA GCC CAA AC	62,4
PBGD	forward	CCT GAA ACT CTG CTT CGC TG	59,4
	reverse	CTG GAC CAT CTT CTT GCT GAA	57,9

Tab. 2.11: Sequenzen der benutzten Primer

3. Ergebnisse

3.1 Kardiale Funktion und Morphologie in der präoperativen Phase

3.1.1 Vergleich der kardialen Funktion von WT und I-1KO

28 WT und 25 KO Mäuse – hinsichtlich Alter und Geschlecht abgestimmt – wurden vor der TAC echokardiographisch untersucht um einen Vergleich der Gruppen unter unbehandelten Bedingungen zu ermöglichen. Hierbei zeigte die Herzgröße, normalisiert als LVW/BW, keinen Unterschied zwischen WT mit $3,70 \pm 0,13 \text{ mm}^3/\text{g}$ und KO mit $3,65 \pm 0,13 \text{ mm}^3/\text{g}$ (Abb. 3.1-C). Die Herzfrequenz zeigte sich basal vergleichbar mit $385 \pm 6/\text{min}$ (WT) und $386 \pm 7/\text{min}$ (KO) (Abb. 3.1-A). Die Frequenzsteigerung nach i.p.-Applikation von Dobutamin zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (WT $533 \pm 9/\text{min}$ vs. KO $551 \pm 5/\text{min}$).

Die FAS als Parameter der Kontraktilität hatte in beiden Gruppen basal eine vergleichbare Höhe mit $35,6 \pm 1,2 \%$ (WT) und $35,6 \pm 1,4 \%$ (KO). Beide Gruppen zeigten einen deutlichen Anstieg der FAS infolge der Dobutamin-Injektion auf $82,1 \pm 1,3 \%$ (WT) bzw. $76,6 \pm 1,7 \%$ (KO). Hierbei war der Unterschied zwischen den Gruppen jedoch signifikant mit $p = 0,014$ (Abb. 3.1-B). Um auszuschließen, dass es sich bei diesem Befund nicht um das Resultat einer Verzerrung infolge des verwendeten Ausschlusskriteriums ($\Delta\text{HR} \geq 20/\text{min}$) handelt, wurden die Gruppen zusätzlich unter Verwendung verschiedener Ausschlusskriterien verglichen ($\Delta\text{HR} \geq 00$ bis $\Delta\text{HR} \geq 180/\text{min}$). In allen Analysen blieb der Unterschied erhalten (Abb. 3.1-D). Zusätzlich erreichte die Differenz im Bereich von $\Delta\text{HR} \geq 00/\text{min}$ bis $\Delta\text{HR} \geq 100/\text{min}$ vergleichbare Signifikanz. Die Knockout-Mäuse entwickelten somit eine verminderte kontraktile Reaktion auf eine vergleichbare β -adrenerge Stimulation. Der relative Verlust der Kontraktilitätssteigerung für Knockout-Tiere beträgt hier 10,6 %.

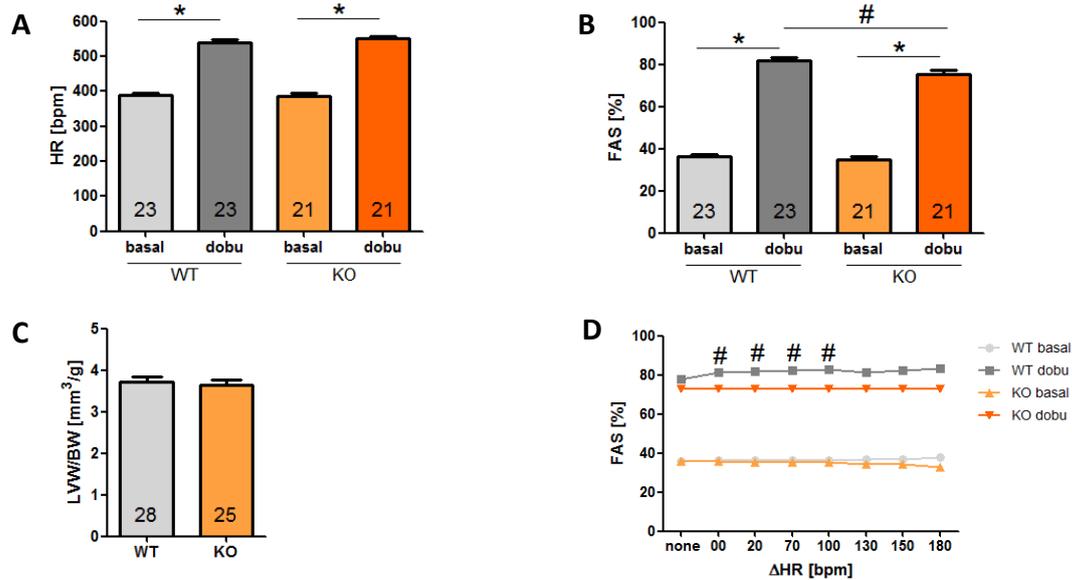


Abb. 3.1: Präoperative Charakterisierung vor TAC: Vergleichbare Steigerung der HR (A) nach Dobutamin und vergleichbare Herzgrößen (C), reduzierte kontraktile Reaktion im I-1KO (B) und Unabhängigkeit dieser Differenz vom gewählten Ausschlusskriterium (D). * $p < 0,05$ im gepaarten t-Test ; # $p < 0,05$ im ungepaarten t-Test.

3.1.2 Geschlechtsbezogener Vergleich der kardialen Funktion von WT und I-1KO

In einem weiteren Schritt wurde ein Vergleich weiblicher (f) und männlicher (m) Tiere vorgenommen, um die Auswirkungen des I-1-Knockouts auf mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede zu untersuchen. Hierbei zeigten WT(f) nach Dobutamin nicht nur die geringsten Frequenzen, sondern setzten sich auch signifikant gegen die Gruppe der KO(f) ab mit $\Delta\text{HR} = 21,3 \pm 8,9/\text{min}$ und $p = 0,03$. Dabei hatten die weiblichen Tiere beider Linien eine signifikant geringere Steigerung der Herzfrequenz unter Dobutamin-Applikation gegenüber den jeweiligen männlichen Tieren mit $\Delta\text{HR} = 50,2 \pm 8,6/\text{min}$ und $p < 0,0001$ (WT) bzw. $\Delta\text{HR} = 28,3 \pm 7,9/\text{min}$ und $p = 0,002$ (KO) (Abb. 3.2-A). Die Analyse der FAS unter Dobutamin-Stimulation ergab keinen nennenswerten Unterschied zwischen den männlichen Tieren beider Gruppen (Abb. 3.2-B). Die KO(f) zeigten jedoch eine verringerte Kontraktilität. Am deutlichsten war diese Differenz gegenüber den WT(f) mit $\Delta\text{FAS} = 7,3 \pm 2,8 \%$ und $p = 0,014$. Doch auch gegenüber den WT(m) bestand eine signifikante Minderung ($p < 0,03$). Die für SV erhobenen Werte (Abb. 3.2-C) waren bei den weiblichen Tieren jedoch deutlich geringer.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die weiblichen Tiere sowohl im WT als auch im KO mit einer deutlich verminderten HR-Steigerung und einem geringeren Schlagvolumen auf die β -adrenerge Stimulation reagierten. Die für die Gesamtgruppe festgestellte signifikant verminderte FAS des Knockouts nach Dobutamin wird insbesondere durch die weiblichen Tiere der Knockout-Gruppe hervorgerufen.

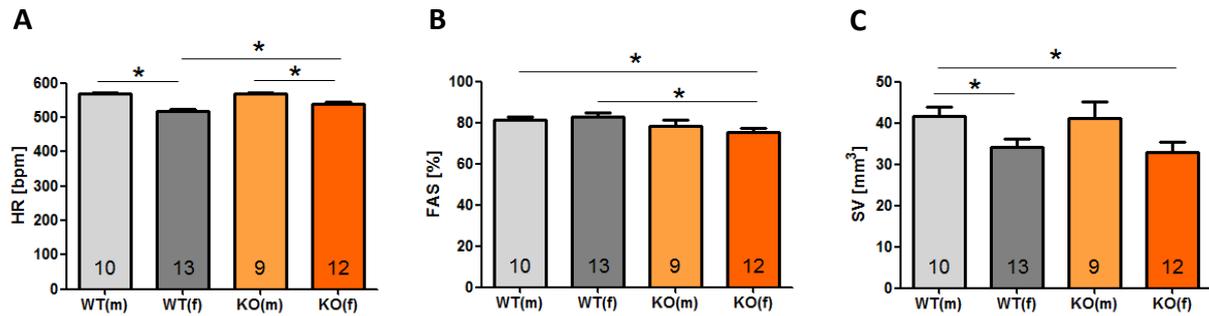


Abb. 3.2: Geschlechtsspezifische Unterschiede in der präoperativen Charakterisierung nach Dobutamin-Applikation: Verminderte HR-Anstieg der weiblichen Tiere (A), reduzierte kontraktile Antwort v.a. der weiblichen KO-Tiere (B) sowie reduziertes SV bei weiblichen Tieren (C). * $p < 0,05$ im ungepaarten t-Test.

3.2 Mortalität in der akuten Phase nach TAC

3.2.1 Ausmaß der intra- und perioperativen Mortalität

Die Sterblichkeit während der Operation (intraoperativ) war mit insgesamt 5,7 % sehr niedrig. Lediglich 3 von 53 Tieren starben intraoperativ, d.h. direkt bei der Operation. Bei je einem WT- (f) und KO-Tier (m) riss die Aorta infolge der Konstriktion. Diese Tiere wurden ausschließlich in die Analyse der intraoperativen Mortalität einbezogen. Bei einer weiteren KO-Maus (m) waren die anatomischen Verhältnisse abweichend: Der zusätzliche Abgang einer eigenen A. subclavia aus dem Aortenbogen führte zur Stenosierung der Aorta vor den beiden Karotiden. Dies führte (vermutlich durch zerebrale Minderperfusion) zum Tod während des Eingriffs. Unter Einbezug jener Tiere, die direkt im Anschluss an die Operation in der Aufwachphase verstarben (perioperativ), liegt die Gesamtmortalität bei 20,8 %. Dies entspricht den bisher gemachten Erfahrungen mit dem verwendeten Tiermodell (Rockman et al 1991; Nakamura et al 2001; Zhou et al 2004) und kann als Beleg für Qualität und Standardisierung des Verfahrens gelten.

3.2.2 Vergleich der akuten Mortalität zwischen WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}

Perioperativ, d.h. direkt im Anschluss an den chirurgischen Eingriff noch auf der Wärmeplatte direkt neben dem Operationsplatz in der Aufwachphase, starben 3 WT- (f) und 5 KO-Mäuse (3m, 2f).

Postoperativ, d.h. nach Rückführung der Mäuse in den Tierstall, starben weiterhin 1 WT- (f) und 2 KO-Mäuse (m,f) noch vor der Bestimmung des Stenosegrads am zweiten oder dritten Tag nach der TAC. Schließlich konnten 23 WT- und 16 KO-Tiere hinsichtlich des Stenosegrads untersucht werden.

Eine letzte WT-Maus (f) starb in zeitlicher Nähe zur TAC (d.h. postoperativ) an Tag 4, sodass nur 22 WT-Tiere die erste TTE eine Woche nach dem chirurgischen Eingriff erlebten. Der nächste Todesfall trat erst mit einem deutlichen zeitlichen Abstand an Tag 25 ein. Diese Lücke in der Mortalität legte es nahe, zwischen akuter und chronischer Phase der kardialen Dekompensation zu unterscheiden. Tag 1-5 wurde daher als akute Phase, der weitere Verlauf als chronische Phase definiert.

Im Rahmen der Analyse des Überlebens nach Kaplan-Meyer wurden die drei intraoperativ verstorbenen Tiere exkludiert, da ihr Tod Folge einer chirurgischen Komplikation war und so keinen Rückschluss auf die kardiale Adaptionsfähigkeit der betreffenden Tiere erlaubt. Die Daten zeigen, dass der Knockout in der akuten Phase zu einer erhöhten Mortalität führte (Tab. 3.1, Abb. 3.4). So lag die Überlebensrate an Tag 5 bei 81,5 % (WT) gegenüber 69,6 % (KO). Diese Differenz war nicht auf Unterschiede in der intraoperativen Sterblichkeit zurück zu führen, sondern betraf ausschließlich den peri- und postoperativen Abschnitt der akuten Phase. Eine Korrelation der frühen Sterblichkeit mit dem Ausmaß der Stenose konnte nicht untersucht werden: Die Bestimmung des Gradienten konnte lediglich für ein einziges in der akuten Phase verstorbenes Tier ermittelt werden, weil alle anderen Tiere bereits vor der Gradientenmessung starben. Bei diesem wurde der niedrigste Gradient aller Tiere festgestellt (31 mmHg).

	Anzahl der verstorbenen Tiere	
	WT	KO
Intra-operativ	1	1
Peri-operativ	3	5
Post-operativ	1	2

Tab. 3.1: Intra-, peri- und postoperative Mortalität.

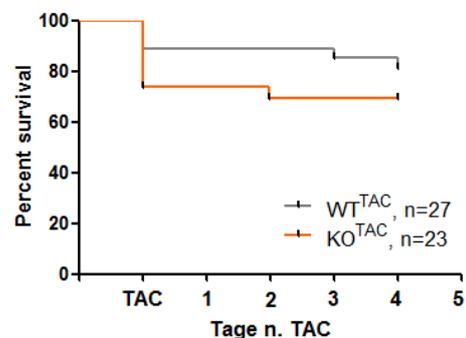


Abb. 3.4: Überleben in akuten Phase nach TAC.

3.2.3 Geschlechtsbezogener Vergleich der akuten Mortalität in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}

Folgend stellt sich die Frage, ob das Überleben in der akuten Phase in geschlechtsabhängiger Weise variierte. Eine Trennung der Überlebensdaten nach dem Geschlecht der Tiere zeigte, dass die weiblichen Tiere zwischen den Gruppen nur einen marginalen Unterschied aufwiesen. Hier zeigte sich entgegen dem Gesamtbild sogar ein besseres Überleben mit KO^{TAC}(f) = 76,9 % gegenüber WT^{TAC}(f) = 64,3 % an Tag 5 (Abb. 3.5-A). Demgegenüber war in WT^{TAC}(m) nicht ein einziges Tier verstorben, was in einem signifikanten Unterschied in der Überlebensrate der WT^{TAC}(m) = 100 % (WT) gegenüber KO^{TAC}(m) = 60 % resultierte mit $p < 0,014$ im *log-rank* Test (Abb. 3.5-B).

Die in der Gesamtgruppe festgestellte erhöhte Mortalität im I-1KO während der akuten Phase kardialer Belastung betrifft somit ausschließlich $KO^{TAC}(m)$.

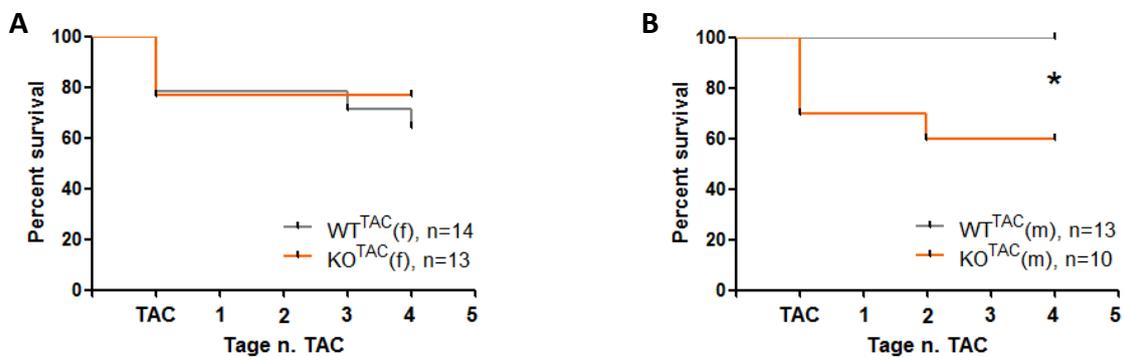


Abb. 3.5: Überleben in der akuten Phase nach TAC für weibliche (A) und männliche Tiere (B). * $p < 0,05$ im *log-rank* Test.

3.3 Kardiale Funktion und Morphologie im Verlauf der Herzinsuffizienz

3.3.1 Induktion einer kardialen Hypertrophie durch TAC in WT^{TAC} und $I-1KO^{TAC}$

Die erste vollständige echokardiographische Untersuchung erfolgte eine Woche nach TAC mit der Fragestellung, ob eine kardiale Reaktion durch die TAC ausgelöst wurde. Der mittlere Frequenzanstieg war jeweils signifikant mit $\Delta HR = 100/\text{min}$ (WT^{TAC}) bzw. $72/\text{min}$ (KO^{TAC}) und $p < 0,0001$ (Abb. 3.6-A). Das LVW/BW stieg in beiden Gruppen vergleichbar, wobei die Zunahme hier $2,1 \text{ mm}^3/\text{g}$ (WT^{TAC}) bzw. $2,6 \text{ mm}^3/\text{g}$ (KO^{TAC}) betrug jeweils mit $p < 0,0001$ (Abb. 3.6-C). Die FAS hingegen stieg bei den WT^{TAC} um 4%, während KO^{TAC} eine Reduktion um 2 % zeigten (Abb. 3.6-B). Auch das VolD zeigte nur geringfügige Veränderungen und nahm in beiden Gruppen ab mit $\Delta \text{VolD} = -7,9 \text{ mm}^3$ (WT^{TAC}) und $\Delta \text{VolD} = -3,4 \text{ mm}^3$ (KO^{TAC}) (Abb. 3.6-D). Signifikante Unterschiede zwischen WT^{TAC} und KO^{TAC} wurden dabei nicht festgestellt. Zusammenfassend konnten eine kardiale Hypertrophie-Reaktion sowie eine deutliche Herzfrequenzzunahme infolge der linksventrikulären Druckbelastung detektiert werden.

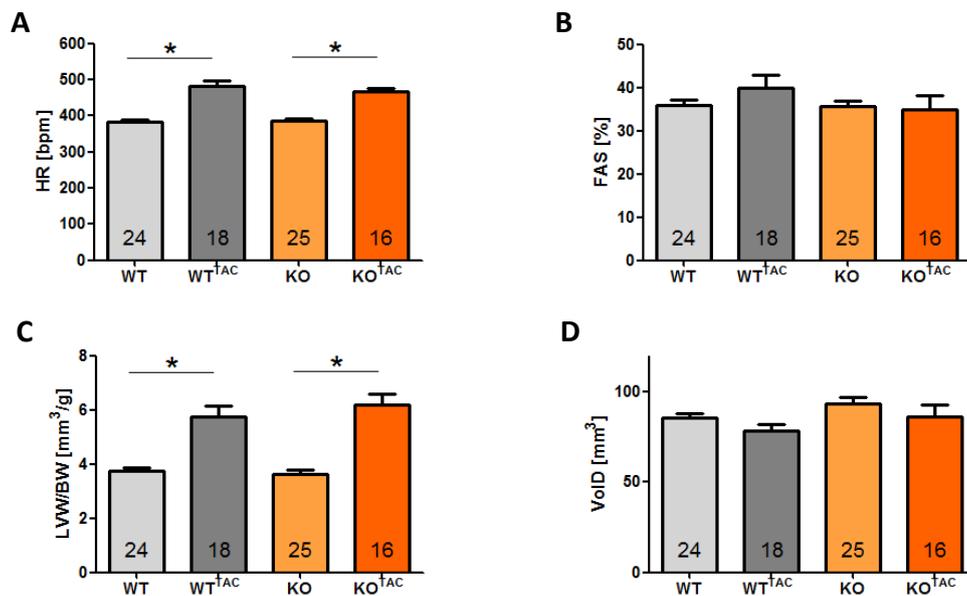


Abb. 3.6: Kardiale Reaktion in Woche 1 n. TAC mit signifikanter Zunahme von HR (A) und LVW/BW (C). VoID nimmt in beiden Gruppen initial ab (D), während sich die initiale kontraktile Reaktion zwischen WT^{TAC} und KO^{TAC} unterscheidet (B). * $p < 0,05$ im gepaarten t-Test.

3.3.2 Vergleich der Entwicklung kardialer Funktion und Morphologie in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}

Um die Mauslinien während des weiteren Fortschritts der druckinduzierten Herzinsuffizienz zu vergleichen erhielten die Tiere zunächst wöchentlich eine TTE. Ab Woche 13 erfolgte die Untersuchung alle zwei Wochen. Hierbei blieb die Herzfrequenz nach der massiven Erhöhung im Verlauf der ersten Woche nach TAC (s.o.) bei beiden Linien auf dem einmal erreichten Niveau (Abb. 3.7-A), wenngleich sie eine verhältnismäßig große Schwankungsbreite zwischen den Messzeitpunkten aufwies. Die lineare Regression der Mittelwerte ab Woche 1 ergab jedoch, dass in beiden Gruppen keine Tendenz zu einer weiteren Steigerung der Frequenz vorlag (Anhang A.4).

Für die HR wurde zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen WT^{TAC} und KO^{TAC} festgestellt (Abb. 3.7-A). Die Kontraktilität nahm in beiden Gruppen bis Woche 6 deutlich ab, um dann auf konstant niedrigem Niveau zu bleiben (Abb. 3.7-B). Im Verlauf der Kontraktilitätsabnahme konnten jedoch gruppenspezifische Besonderheiten gefunden werden. Zunächst reagierten WT^{TAC} initial mit einer geringen Steigerung der Kontraktilität, wohingegen die KO^{TAC} eine direkte Abnahme der FAS zeigten. Innerhalb der ersten 6 Wochen waren die ermittelten Werte für WT^{TAC} immer höher gegenüber KO^{TAC}. Zu zwei Messzeitpunkten war dieser Gruppenunterschied signifikant mit $\Delta FAS = 8,7 \pm 3,7\%$ (Woche 2, $p = 0,025$) und $\Delta FAS = 7,1 \pm 3,1\%$ (Woche 4, $p = 0,03$). Ab Woche 6 zeigten beide Gruppen keine Unterschiede mehr. Die Kontraktilitätsabnahme in den Gruppen betrug insgesamt

absolut 13,9 % (WT^{TAC}, $p=0,0005$) bzw. 16,6 % (KO^{TAC}, $p<0,0001$) und relativ zum Ausgangswert 38,8 % (WT^{TAC}) bzw. 45,2 % (KO^{TAC}).

Das LVW/BW zeigte nach dem initialen Sprung einen kontinuierlichen leichten Anstieg (Abb. 3.7-C), der etwa ab Woche 9 stagnierte. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Zunahme bezogen auf die Ausgangswerte (vor TAC) 4,25 mm³/g bzw. 128 % (WT^{TAC}) und 3,86 mm³/g bzw. 104,9 % (KO^{TAC}) mit jeweils $p < 0,0001$. Für das LVW/BW wurde zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen WT^{TAC} und KO^{TAC} festgestellt. Das Void, welches in Woche 1 eine geringfügige Reduktion gezeigt hatte, stieg im weiteren Verlauf kontinuierlich an (Abb. 3.7-D). In Woche 11 erreichten die Werte ein Plateau, das bis zum Versucheende bestand hatte. Die Differenz zwischen den Ausgangswerten (vor TAC) und Woche 11 waren im gepaarten t-test jeweils signifikant ($p < 0,0001$) mit mittleren Zunahmen von 65,4 mm³ bzw. 79,2 % (WT^{TAC}) und 73,2 mm³ bzw. 77,5 % (KO^{TAC}).

Zusammenfassend zeigten sich weitestgehend vergleichbare Verläufe in WT^{TAC} und KO^{TAC} hinsichtlich HR, LVW/BW und Void. Demgegenüber war die Abnahme der FAS bei KO^{TAC} beschleunigt und zeigte keine initiale Zunahme. Dies führte zu deutlichen Unterschieden in der Kontraktilität während der ersten Wochen nach TAC.

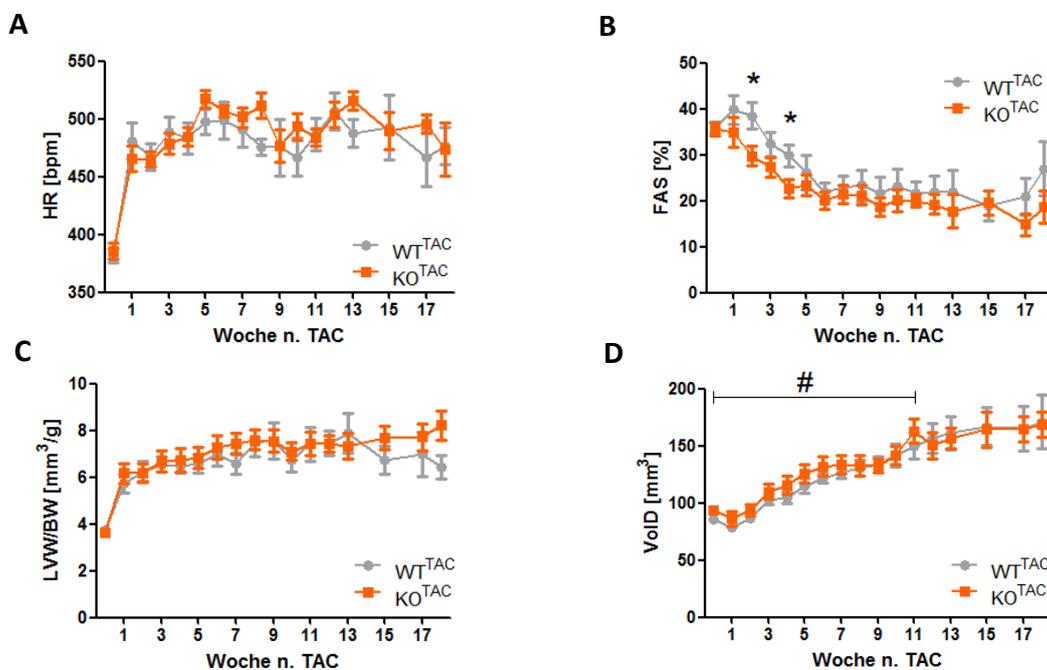


Abb. 3.7: Progression der Herzinsuffizienz über den Versuchszeitraum. * $p < 0,05$ im ungepaarten t-Test, # $p < 0,05$ im gepaarten t-Test.

3.3.3 Geschlechtsbezogener Vergleich der Entwicklung kardialer Funktion und Morphologie

in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}

Die Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede im Verlauf der druckinduzierten Herzinsuffizienz erfolgte durch den Vergleich der männlichen und weiblichen Tiere jeweils einer Mauslinie sowie durch den Vergleich von WT^{TAC} mit KO^{TAC} jeweils eines Geschlechts.

Hinsichtlich der Herzfrequenz zeigte sich kein Unterschied zwischen den nach Geschlecht getrennten Mauslinien. Sowohl der initiale Frequenzanstieg nach TAC als auch die konstant erhöhten Frequenzniveaus in den folgenden Wochen waren vergleichbar (Anhang A.5).

Bei WT^{TAC} wurden zwei Unterschiede festgestellt. Zum einen waren die Mittelwerte der FAS von Woche 6 bis Woche 18 mit 24,9 % (m) gegenüber 15,7 % (f) deutlich erhöht (Abb. 3.8-A). Demgegenüber zeigten WT^{TAC}(m) an 8 von 15 Messzeitpunkten ein signifikant geringeres LVW/BW gegenüber WT^{TAC}(f) mit jeweils $p < 0,05$ (Abb. 3.8-B). Das diastolische Volumen differierte bei WT^{TAC} nicht zwischen den Geschlechtern (Abb. 3.8-C).

Bei KO^{TAC} waren die Unterschiede geringer ausgeprägt. Sowohl in der FAS als auch beim LVW/BW zeigte sich eine geringe aber konstante Tendenz hin zu höheren Werten für KO^{TAC}(f) (Abb. 3.8-D, E). KO^{TAC}(m) zeigten außerdem vergrößerte VoID mit $p < 0,05$ an 4 Messzeitpunkten nach TAC (Abb. 3.8-F). Allerdings war hier bereits vor der TAC ein entsprechender Unterschied gemessen worden.

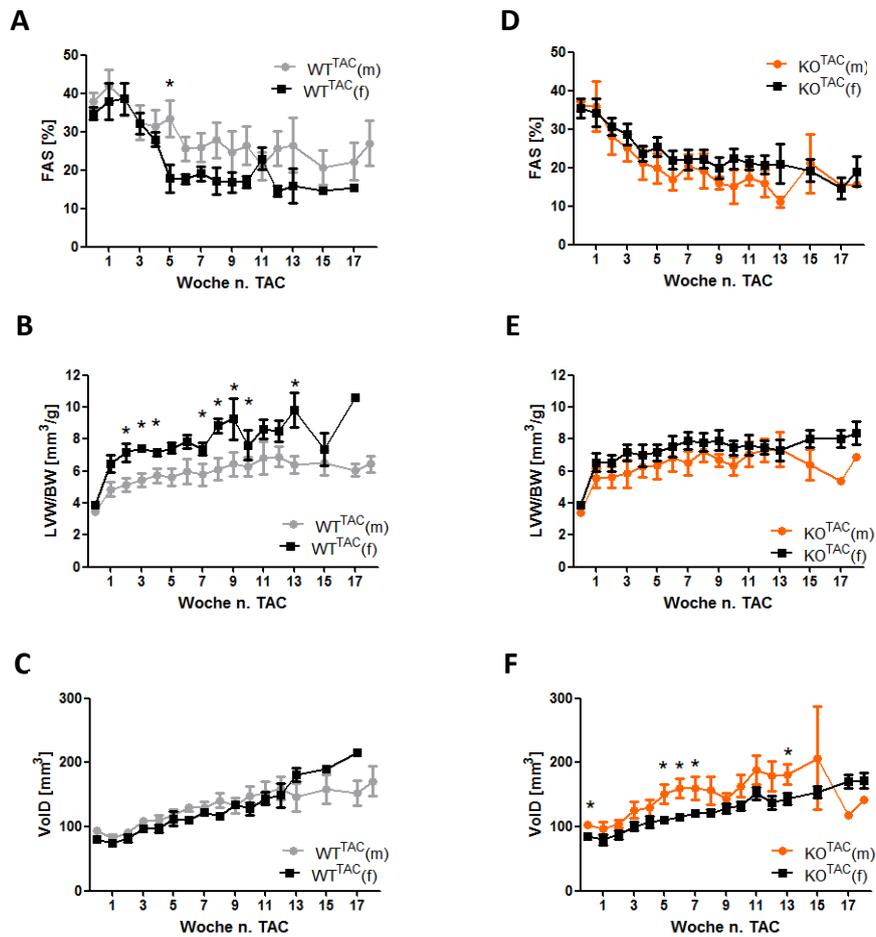


Abb. 3.8: Geschlechtsspezifische Unterschiede in WT^{TAC} (A-C) und I-1KO^{TAC} (D-F). *p < 0,05 im ungepaarten t-Test.

Im Vergleich der jeweils männlichen bzw. weiblichen Tiere in WT^{TAC} und KO^{TAC} waren die Unterschiede hinsichtlich HR, LVW/BW und VoID äußerst gering (Anhang A.6). Die initiale erhöhte FAS bei WT^{TAC} zeigte sich sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Tieren. Der Vergleich der männlichen Tiere zeigte zu allen Messzeitpunkten höhere Mittelwerte der FAS für Woche 6-18 in WT^{TAC}(m) (24,9 %) gegenüber KO^{TAC}(m) (16,7 %) (Abb. 3.9-A). Dabei entspricht der Mittelwert der FAS bei KO^{TAC}(m) recht genau dem Niveau der WT^{TAC}(f) (15,7 %). Die KO^{TAC}(f) ihrerseits liegen zwar etwas höher (20,4 %), aber immer noch deutlich unter dem Niveau der WT^{TAC}(m). Die WT^{TAC}(m) haben somit eine gegenüber allen anderen Gruppen erhöhte FAS.

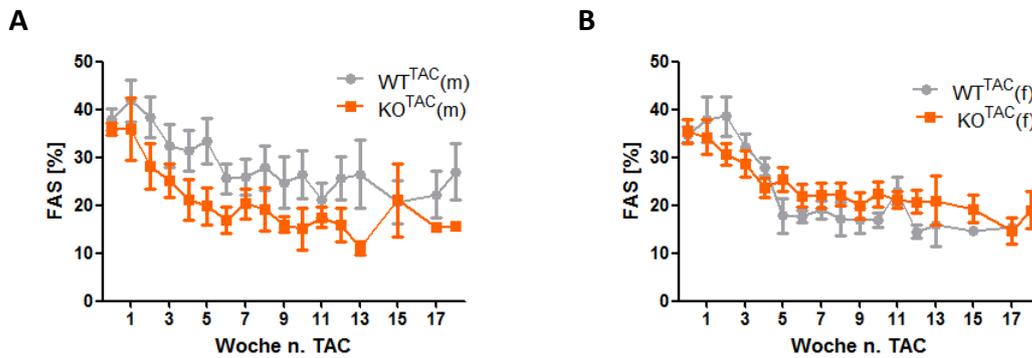


Abb. 3.9: Gruppenspezifischer Unterschied der FAS in männl. (A) und weibl. Tieren (B). WT^{TAC}(m) zeigen eine erhöhte FAS im Verlauf der Herzinsuffizienz.

Zusammenfassend zeigten die WT^{TAC}(m) deutlich erhöhte FAS-Werte und erniedrigte LVW/BW-Werte gegenüber allen anderen Gruppen. Diese bei WT^{TAC} deutlichen geschlechtsabhängigen Differenzen sind bei KO^{TAC} nicht zu finden.

3.3.4 Vergleich der kardialen Reaktion auf β -adrenerge Stimulation in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}

Bereits in der präoperativen Charakterisierung wurden bei den Knockout-Tieren Besonderheiten in der kontraktile Reaktion auf β -adrenerge Stimulation festgestellt (vgl. Kap. 3.1). Um einen fraglichen Einfluss des Knockouts auf die Adaptionsfähigkeit vor dem Hintergrund erhöhter kardialer Druckbelastung zu bestimmen, wurde den Tieren in Woche 3 und 18 nach der TAC im Rahmen der TTE erneut Dobutamin injiziert.

In Woche 3 (Abb. 3.10) betrug der Anstieg der mittleren HR 61,6/min (WT^{TAC}, $p=0,003$) bzw. 70,6/min (KO^{TAC}, $p = 0,0002$). Die Zunahme der FAS war bei KO^{TAC} größer und betrug 26,3 % (KO^{TAC}, $p = 0,0004$) gegenüber 15,3 % (WT^{TAC}, $p = 0,004$). Die für diesen Zeitpunkt festgestellte geringere basale FAS (vgl. Kap. 3.3.2) wurde hier durch Anwendung des Ausschlusskriteriums ($\Delta\text{HR} > 20/\text{min}$) aufgehoben: Beide Linien zeigten im basalen Zustand eine vergleichbare Kontraktilität. Die relativen Anstiege der FAS nach Dobutamin-Applikation gegenüber dem basalen Niveau unterschieden sich mit 49 % (WT^{TAC}) gegenüber 82,2 % (KO^{TAC}) deutlich, jedoch nicht signifikant mit $p = 0,08$ (KO^{TAC} vs. WT^{TAC}, jeweils nach Dobutamin). Dieser Unterschied in der Dobutamin-Reaktion ist eine Folge des hier notwendigen Ausschlusses der zweiten Interventionsgruppe KO^{TAC} und kann nicht zweifelsfrei dem I-1-Knockout zugerechnet werden (Anhang A.7).

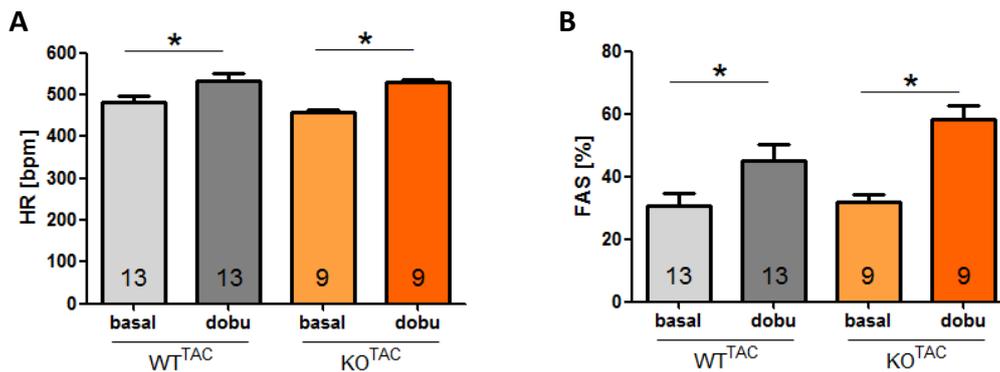


Abb. 3.10: Erhaltene Reaktion auf β -adrenerge Stimulation in Woche 3. * $p < 0,05$ im gepaarten t-Test.

In Woche 18 war die Adaptionsfähigkeit ebenfalls erhalten. Die HR (Abb. 3.11-A) erhöhte sich infolge dieser Applikation im Mittel um 96/min (WT^{TAC}, $p=0,0003$) und 94/min (KO^{TAC}, $p=0,002$). Bei der FAS zeigten sich ebenfalls deutliche Reaktionen auf Dobutamin bei WT^{TAC} und KO^{TAC}: Ein signifikanter Anstieg nach β -adrenerger Stimulation wurde bei WT^{TAC} mit $\Delta FAS = 14\%$ ($p=0,02$) festgestellt (Abb. 3.11-B), bei KO^{TAC} war der Anstieg nicht signifikant mit $p = 0,09$. KO^{TAC} zeigten mit $\Delta FAS = 16\%$ einen höheren absoluten Anstieg bzw. einen relativen Anstieg von 81 % (KO^{TAC}) gegenüber 56 % (WT^{TAC}).

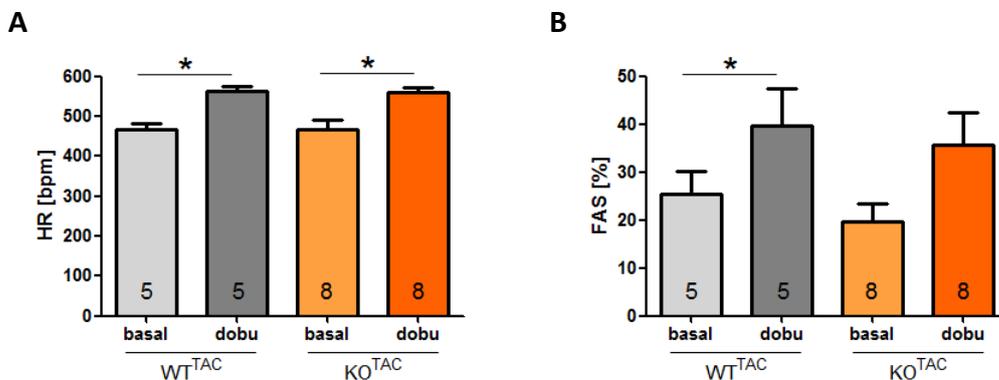


Abb. 3.11: Erhaltene Reaktion auf β -adrenerge Stimulation in Woche 18. * $p < 0,05$ im gepaarten t-Test.

Zusammenfassend zeigte sich in Woche 3 nach TAC eine vergleichbare Steigerung von HR und FAS durch β -adrenerge Stimulation bei WT^{TAC} und KO^{TAC}. Auch für Woche 18 blieb eine kardiale Sensitivität auf β -adrenerge Stimulation erhalten. Die Dobutamin-vermittelten Anstiege der HR sowie der FAS sind auch zu diesem Zeitpunkt in WT^{TAC} und KO^{TAC} vergleichbar. Gegenüber der präoperativen Charakterisierung zeigte sich die maximale FAS zum Versuchsende (Woche 18) in beiden Gruppen um ca. 50 % vermindert, während die maximalen Herzraten unverändert bestehen blieben.

3.3.5 Geschlechtsbezogener Vergleich der kardialen Reaktion auf β -adrenerge Stimulation

in WT^{TAC} und $I-1KO^{TAC}$

Eine Untersuchung der geschlechtsbezogenen Unterschiede in Woche 3 zeigte für die HR eine Steigerung nach β -adrenerger Stimulation in allen Gruppen (Abb. 3.12-A). Für $WT^{TAC}(f)$ und $KO^{TAC}(f)$ war die Steigerung signifikant mit $p < 0,05$. In der FAS zeigte sich ebenfalls eine Steigerung nach Dobutamin-Applikation in allen Gruppen (Abb. 3.12-B). Signifikante Steigerungen erfolgten bei $WT^{TAC}(m)$ und $KO^{TAC}(f)$. Die Analyse der FAS zeigte generell eine Tendenz zu höheren Werten nach Dobutamin-Applikation in den KO^{TAC} gegenüber WT^{TAC} . Für Woche 18 war eine geschlechtsbezogene Analyse obsolet: Die WT^{TAC} -Gruppe bestand hier ohnehin ausschließlich aus männlichen Tieren, während in der KO^{TAC} -Gruppe sieben weibliche und nur ein männliches Exemplar waren.

Zusammenfassend wurden in WT und KO keine geschlechtsbezogenen Unterschiede festgestellt.

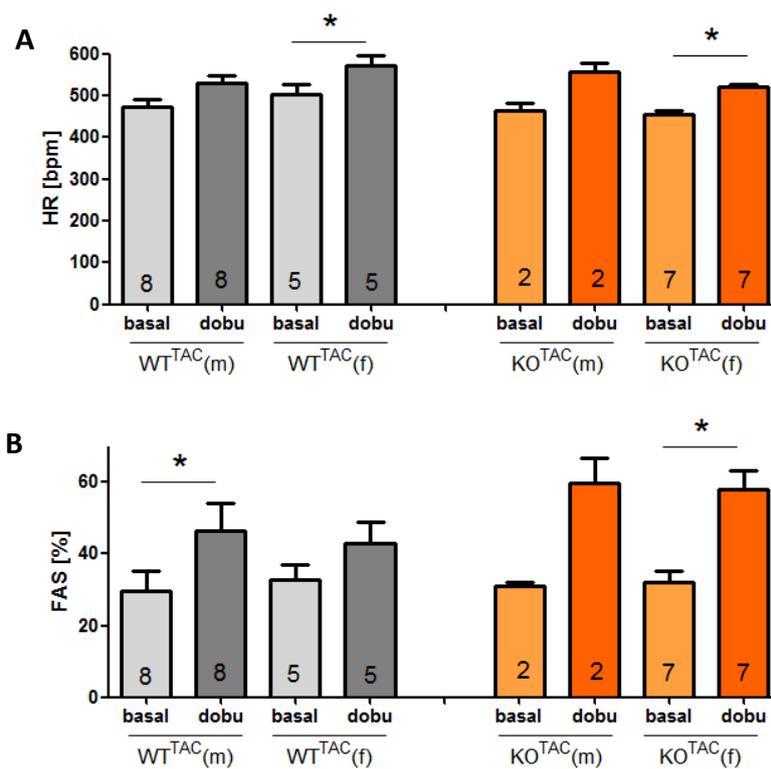


Abb. 3.12: Die Reaktion auf β -adrenerge Stimulation in Woche 3. Es sind keine wesentlichen geschlechtsbezogenen Unterschiede in HR (A) und FAS (B) ersichtlich. * $p < 0,05$ im gepaarten t-Test.

3.4 Mortalität im Verlauf der Herzinsuffizienz

3.4.1 Vergleich der Mortalität in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}

Die Analyse des Langzeit-Überlebens im Gruppenvergleich zeigte, dass der initiale Trend zu einer erhöhten Mortalität in KO^{TAC} im weiteren Verlauf umgekehrt wurde (Abb. 3.13). Das mediane Überleben bei KO^{TAC} war mit 98 Tagen deutlich verlängert gegenüber WT^{TAC} mit 61 Tagen. Zum Versuchsende betrug die Überlebensrate 20% (WT^{TAC}) gegenüber 39% (KO^{TAC}).

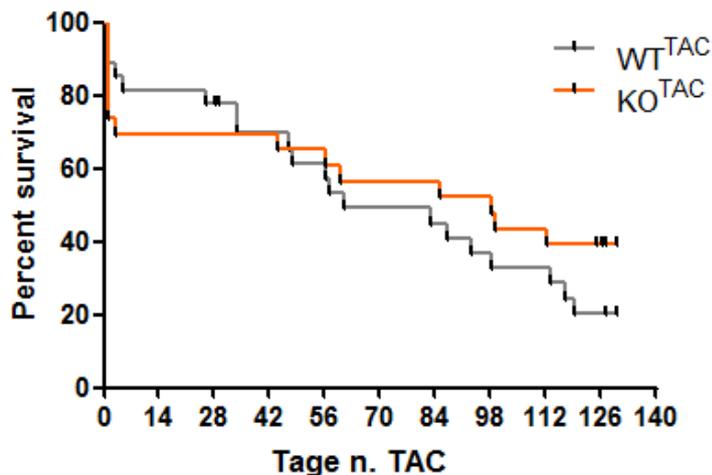


Abb. 3.13: Überleben. Der langfristige Überlebensvorteil der KO^{TAC} – Tiere kompensiert die initial erhöhte Sterblichkeit in dieser Gruppe.

Um Kurz- und Langzeitwirkung des Knockouts getrennt zu betrachten, wurde in einem weiteren Schritt das Überleben jener Tiere analysiert, welche die akute Phase nach TAC überstanden hatten (Abb. 3.14). Dies vergrößerte den Überlebensvorteil für KO^{TAC} gegenüber WT^{TAC} mit $p = 0,06$ im *log-rank test*. Die mediane Überlebenszeit betrug in dieser Analyse für WT^{TAC} 93 Tage, während es für den Knockout wegen mangelnder Sterblichkeit im Versuchszeitraum bis Tag 126 noch nicht bestimmt werden konnte.

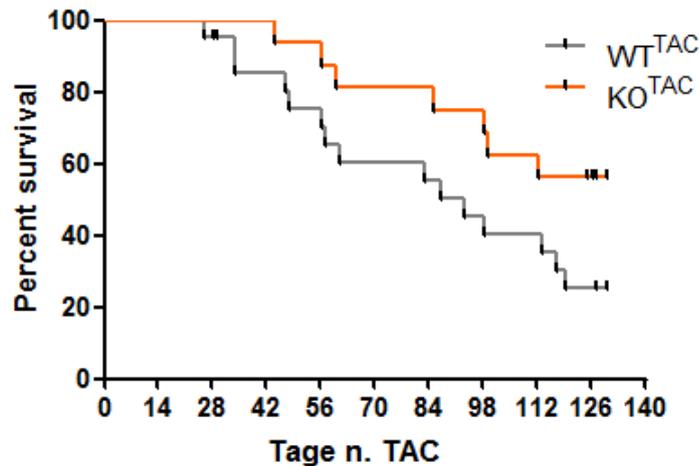


Abb. 3.14: Überleben bei Ausschluss der postoperativ verstorbenen Tiere.
 KO^{TAC} zeigen eine deutlich geringere Mortalität gegenüber WT^{TAC} mit $p=0,06$ im log-rank Test.

3.4.2 Geschlechtsbezogener Vergleich der Mortalität in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}

Die vergleichende Untersuchung des Überlebens nach Geschlecht unter Einbezug aller Tiere (Abb. 3.15-A, B) zeigte ein deutlich besseres Überleben der KO^{TAC}(f) gegenüber WT^{TAC}(f) mit $p=0,005$. Hierbei betrug die mediane Überlebenszeit 48 Tage bei WT^{TAC}(f) und konnte für KO^{TAC}(f) zum Versuchsende noch nicht bestimmt werden. Der Kurvenverlauf ist hier divergierend. Dem gegenüber zeigten die WT^{TAC}(m) eine höhere Überlebensrate gegenüber KO^{TAC}(m) mit $p=0,04$ und einer medianen Überlebenszeit von 98 Tagen bei WT^{TAC}(m) gegenüber nur 23,5 Tagen bei KO^{TAC}(m). Der Kurvenverlauf ist hier parallel.

Bei der Betrachtung lediglich jener Tiere, die die initiale Phase überlebt hatten (Abb. 3.15-C, D), ist der Überlebensvorteil bei KO^{TAC}(f) herausragend mit $p=0,001$ und medianen Überlebenszeiten von 61 Tagen bei WT^{TAC}(f) und zum Versuchsende nicht bestimmbarer medianer Überlebenszeit in KO^{TAC}(f). Dem gegenüber zeigt die Mortalität in WT^{TAC}(m) und KO^{TAC}(m) keinen wesentlichen Unterschied und die mediane Überlebenszeit ist hier mit jeweils 98 Tagen identisch.

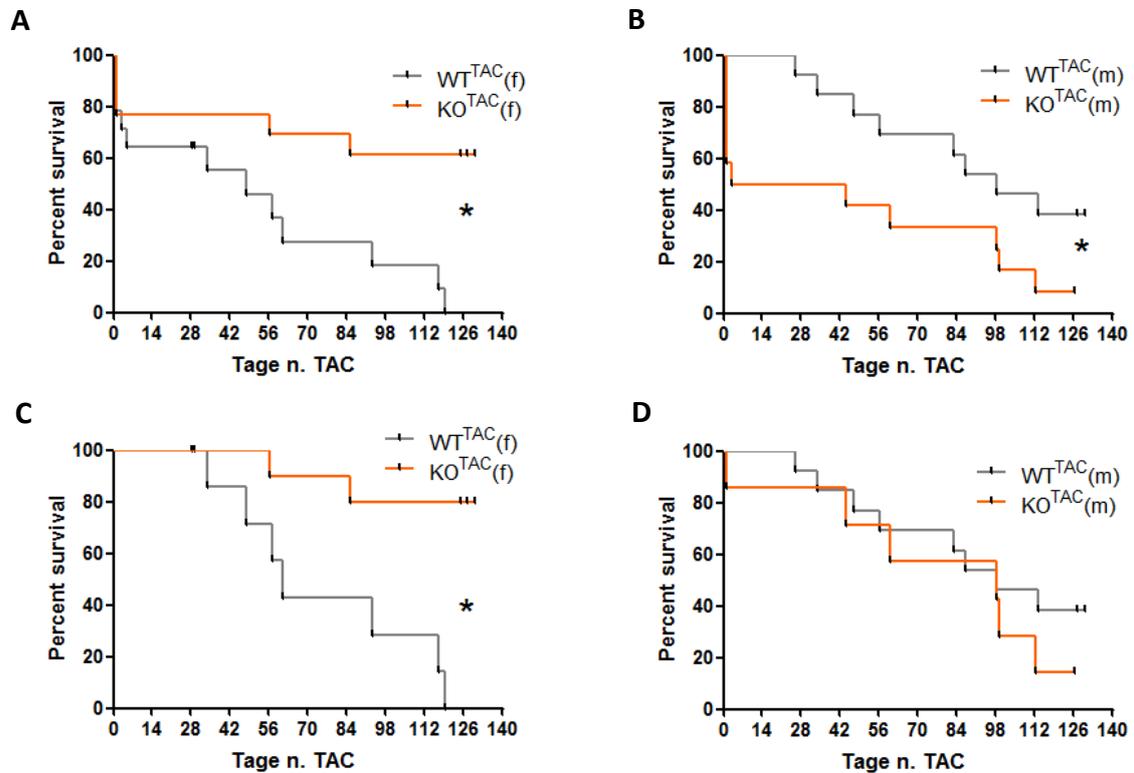


Abb. 3.15: Überleben, getrennt nach Geschlecht. Für $\text{KO}^{\text{TAC}}(\text{f})$ zeigt sich sowohl insgesamt (A) als auch unter Ausschluss der akuten Phase (C) ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber $\text{WT}^{\text{TAC}}(\text{f})$. Die Gesamtmortalität ist insgesamt für $\text{KO}^{\text{TAC}}(\text{m})$ infolge der hohen akuten Sterblichkeit gegenüber $\text{WT}^{\text{TAC}}(\text{m})$ signifikant erhöht (B), während der Ausschluss der akuten Phase (D) hier in einem vergleichbaren Überleben resultiert. * $p < 0,05$ im log-rank Test.

Zusammenfassend zeigen $\text{KO}^{\text{TAC}}(\text{f})$ eine deutliche Verbesserung des Langzeitüberlebens gegenüber $\text{WT}^{\text{TAC}}(\text{f})$. Zwischen $\text{WT}^{\text{TAC}}(\text{m})$ und $\text{KO}^{\text{TAC}}(\text{m})$ konnte kein Unterschied in der Überlebensrate nach der akuten Phase festgestellt werden.

3.5 Prognostischer Wert der Gradientenbestimmung

Die an Tag 1-3 nach TAC ermittelten Gradienten wurden auf ihren prognostischen Wert hinsichtlich der Herzfunktion in den ersten vier Wochen der Herzinsuffizienz sowie hinsichtlich der Überlebenszeit überprüft. Hierbei ergaben sich für WT^{TAC} und KO^{TAC} keine Korrelationen zwischen den Gradienten und den jeweiligen funktionellen Parametern HR, LVW/BW, FAS und Void. In der geschlechtsbezogenen Analyse wurden sporadisch Korrelationen festgestellt. Exemplarisch ist dies

für FAS und LVW/BW in Woche 2 nach TAC gezeigt (Anhang A.8). Insgesamt ergab sich jedoch für keine Gruppe eine konsistente Korrelation zwischen einem der echokardiographischen Parameter und dem ermittelten Gradienten im Zeitraum der ersten vier Wochen nach TAC. Eine Korrelation zwischen Höhe des Gradienten und Überlebenszeit wurde – unabhängig von der Trennung nach Geschlecht – weder für WT^{TAC} noch für KO^{TAC} gefunden (Abb. 3.16).

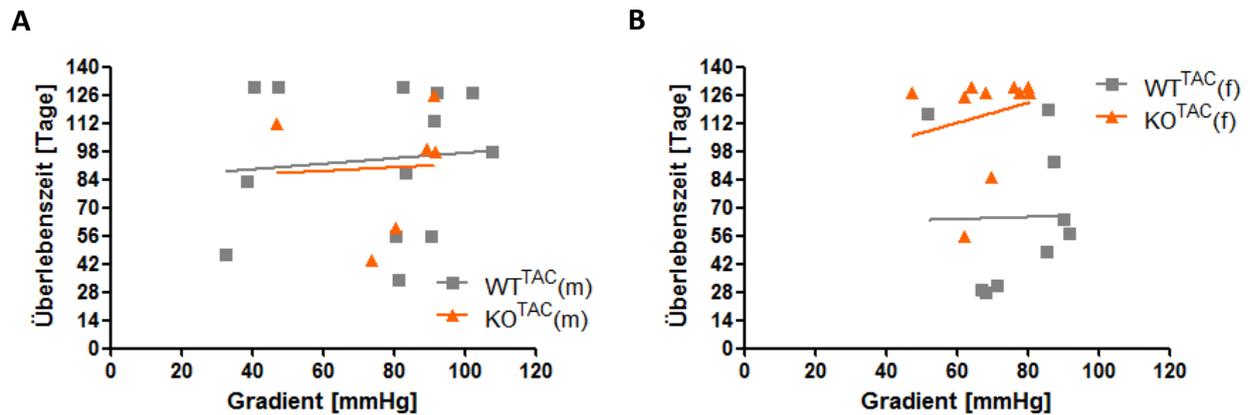


Abb. 3.16: Korrelation zwischen Gradient und Überlebenszeit. Die ermittelte Höhe des Gradienten nach TAC erlaubt für keine Gruppe eine Aussage über den Todeszeitpunkt.

3.6 Transthorakale Echokardiographie und Speckle Tracking Echokardiographie im Vergleich

3.6.1 Korrelation des STE mit FAS

Um die Aussagekraft der mittels STE erhobenen Daten einzuschätzen wurde zunächst eine Analyse der Korrelation zwischen der im TTE ermittelten FAS und den verschiedenen Parametern des STE vorgenommen. Hierbei wurden die zu den 3 Messzeitpunkten (präoperativ, Woche 3 und Woche 18) ermittelten FAS-Werte in basalem Zustand und nach β -adrenerger Stimulation auf die Korrelationen mit S_R^{sys} , S_C^{sys} , SR_R^{sys} , und SR_C^{sys} überprüft. Die Häufigkeit der in diesen insgesamt 24 Analysen festgestellten Signifikanz ist in Tab. 3.2 zusammengefasst.

	p < 0,05 n. Pearson		p < 0,05 n. Pearson
Strain (n=24)	18	Strain Rate (n=24)	13
Radial Strain (n=12)	8	Radial Strain Rate (n=12)	6
Circular Strain (n=12)	10 (~83%)	Circular Strain Rate (n= 12)	7

Tab. 3.2: Häufigkeit der signifikanten Korrelation n. Pearson (p < 0,5) zwischen FAS und Strain bzw. Strain Rate.

Die größte Häufigkeit signifikanter Korrelationen ergab sich für S_c mit einer prozentualen Übereinstimmung von 83 %. Insgesamt war die Übereinstimmung der FAS mit dem Strain größer als mit der Strain Rate. Für jeden Messzeitpunkt lag sowohl basal als auch unter β -adrenerger Stimulation immer eine signifikante Korrelation der FAS entweder mit S_R oder S_c oder mit beiden Parametern vor. Für die Strain Rate hingegen konnte in einigen Analysen keine signifikante Korrelation gefunden werden.

Zusammenfassend wurde mit S_c ein Parameter der STE gefunden, der weitgehend mit der FAS korreliert. Der S_c wurde daher für die folgenden Analysen verwendet.

3.6.2 Vergleich von STE und TTE anhand der präoperativen Daten

Anhand der präoperativen Daten wurde überprüft, ob die Dobutamin-induzierte Veränderung der systolischen Funktion im STE abgebildet wurde. Sowohl WT^{TAC} als auch KO^{TAC} zeigten einen signifikanten Anstieg des S_c^{SYS} nach β -adrenerger Stimulation (Abb. 3.17-A). Diesbezüglich stimmten die Ergebnisse von TTE und STE überein. Allerdings ergab die Analyse des S_c^{SYS} einen signifikant höheren Wert für KO^{TAC} gegenüber WT^{TAC} nach Dobutamingabe mit $p = 0,04$, während die FAS im TTE hier einen niedrigeren Wert für KO^{TAC} ergeben hatte (vgl. Abb. 3.1-B).

Der geschlechtsbezogene Vergleich des S_c^{SYS} nach β -adrenerger Stimulation ergab gegenüber allen anderen Gruppen ein niedrigeres Niveau bei $WT^{TAC}(m)$ (Abb. 3.17-B). Die Differenz ist signifikant gegenüber $KO^{TAC}(f)$ mit $p = 0,01$. Auch hier zeigte das TTE ein anderes Ergebnis mit niedrigstem FAS in $KO^{TAC}(f)$ und signifikanter Differenz gegenüber $WT^{TAC}(m)$ und $WT^{TAC}(f)$ (vgl. Abb. 3.2-B).

Die Analyse des S_c^{DIA} zeigte eine deutliche Zunahme nach β -adrenerger Stimulation in WT^{TAC} und KO^{TAC} (Abb. 3.17-C). Signifikant war diese Zunahme in WT^{TAC} mit $p = 0,03$, nicht jedoch in KO^{TAC} . Insgesamt zeigte sich eine deutlich größere Varianz der Daten gegenüber den für FAS und S_c^{SYS} erhobenen Werten.

Zusammenfassend spiegelte das STE unter Verwendung der präoperativen Daten die auch im TTE deutliche Kontraktilitätssteigerung nach β -adrenerger Stimulation in vergleichbarem Umfang wider. Feinere Unterschiede, die im TTE auftraten, stellten sich in der Analyse des S_c^{SYS} abweichend dar. Der S_c^{DIA} zeigt äquivalente Tendenzen, ist jedoch durch eine größere Varianz charakterisiert.

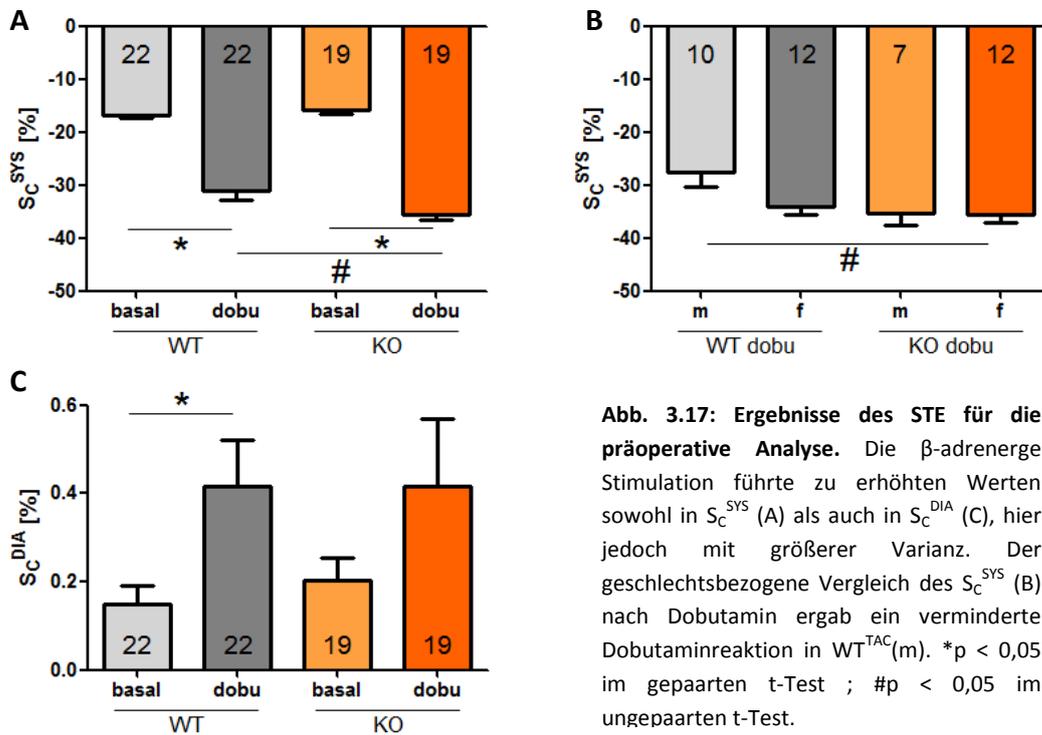


Abb. 3.17: Ergebnisse des STE für die präoperative Analyse. Die β -adrenerge Stimulation führte zu erhöhten Werten sowohl in S_C^{SYS} (A) als auch in S_C^{DIA} (C), hier jedoch mit größerer Varianz. Der geschlechtsbezogene Vergleich des S_C^{SYS} (B) nach Dobutamin ergab ein verminderte Dobutaminreaktion in $WT^{TAC}(m)$. * $p < 0,05$ im gepaarten t-Test ; # $p < 0,05$ im ungepaarten t-Test.

3.6.3 Vergleich von STE und TTE im Verlauf der Herzinsuffizienz

Die Analyse des S_C^{SYS} in Woche 3 nach TAC ergab eine Steigerung nach β -adrenerger Stimulation sowohl in WT^{TAC} als auch in KO^{TAC} (Abb. 3.18-A). Lediglich die Steigerung in KO^{TAC} war hier signifikant mit $p=0,02$, während in der Analyse der FAS Signifikanz für WT^{TAC} und KO^{TAC} festgestellt wurde (vgl. Abb. 3.10-B).

Der geschlechtsbezogene Vergleich der Reaktion auf Dobutamingabe (Abb. 3.18-C, D) anhand der S_C^{SYS} zeigte lediglich für $KO^{TAC}(f)$ einen signifikanten Anstieg mit $p=0,03$. Der Anstieg in $WT^{TAC}(m)$ war deutlich aber nicht signifikant, während bei $WT^{TAC}(f)$ und $KO^{TAC}(m)$ nur geringe Zunahmen detektiert wurden. Das Ergebnis der FAS im TTE war hier ähnlich, wenngleich dort auch $WT^{TAC}(m)$ eine signifikante Steigerung nach Dobutamin zeigten (vgl. Abb. 3.12-B).

Die Analyse des S_C^{DIA} zeigte eine deutliche Zunahme nach β -adrenerger Stimulation in WT^{TAC} und KO^{TAC} (Abb. 3.18-B). Hierbei konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Die bereits in der präoperativen Analyse festgestellte größere Varianz gegenüber den für FAS und S_C^{SYS} erhobenen Werten erschien hier noch ausgeprägter.

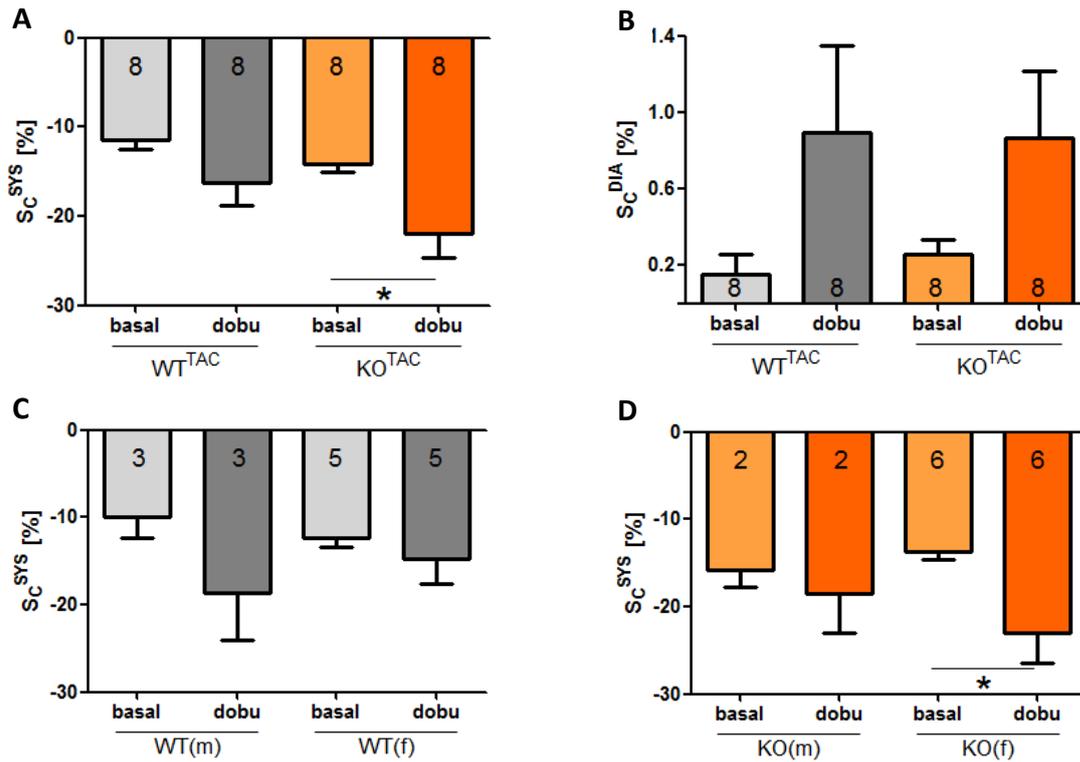


Abb. 3.18: Ergebnisse der STE für Woche 3 n. TAC. Die β -adrenerge Stimulation führte zu erhöhten Werten in S_c^{SYS} (A) mit Signifikanz in KO^{TAC} . Auch S_c^{DIA} (B) zeigt eine entsprechende Steigerung, allerdings mit ausgeprägter Varianz. Der geschlechtsbezogene Vergleich (C,D) zeigt deutlichere Steigerungen für WT^{TAC} (m) und KO^{TAC} (f). * $p < 0,05$ im gepaarten t-Test.

Die Analyse des S_c^{SYS} in Woche 18 nach TAC ergab eine signifikante Steigerung nach β -adrenerger Stimulation sowohl in WT^{TAC} ($p = 0,45$) als auch in KO^{TAC} ($p > 0,001$) (Abb. 3.19-A). Für KO^{TAC} wurde im Rahmen der Analyse der FAS für Woche 18 trotz einer deutlichen Zunahme nach Dobutamin keine Signifikanz erreicht. Die Überprüfung des S_c^{DIA} (Abb. 3.19-B) zeigte – wie auch zu den anderen Messzeitpunkten – ein Zunahme der Werte unter β -adrenerger Stimulation. Signifikanz wurde an dieser Stelle für keine Gruppe erreicht.

Zusammenfassend konnte auch im Verlauf der Herzinsuffizienz die kontraktile Reaktion auf Dobutamin mittels S_c^{SYS} abgebildet werden. Auch hier entsprechen die Veränderungen im S_c^{DIA} tendenziell den systolischen Gegebenheiten. S_c^{DIA} zeigt jedoch – wie bereits in den präoperativen Daten – eine große Varianz.

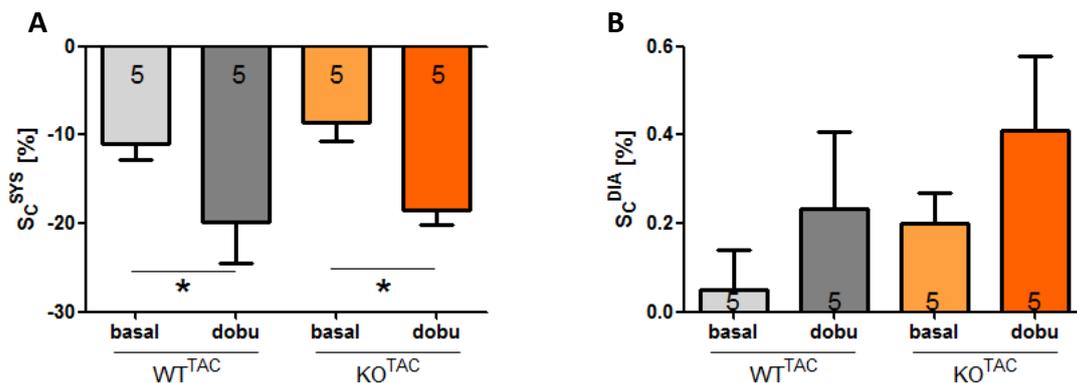


Abb. 3.19: Ergebnisse der STE für Woche 18 n. TAC. Die β -adrenerge Stimulation führte zu erhöhten Werten in S_C^{SYS} (A) mit Signifikanz in WT^{TAC} und KO^{TAC} . S_C^{DIA} (B) zeigt eine entsprechende Steigerung mit ausgeprägter Varianz. * $p < 0,05$ im gepaarten t-Test.

3.7 Postmortale Analysen

3.7.1 Makroskopische Organveränderungen in WT^{TAC} und $I-1KO^{TAC}$

Die im Rahmen der Organentnahme gewonnenen Daten wurden zunächst genutzt, um die Qualität der echokardiographisch bestimmten Werte für die Herzgröße zu überprüfen. Die Korrelationen der echokardiographischen Parameter LVW/BW mit dem postmortal gemessenen normalisierten Herzgewicht (HW/tibia) war deutlich mit $p < 0,07$ für WT^{TAC} und $p < 0,01$ für KO^{TAC} im (Abb. 3.20-A). Dies bestätigt die TTE als qualitativ hochwertiges Verfahren.

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die TAC in einer für die Herzinsuffizienz typischen Weise auf die entnommenen Organe ausgewirkt hat. Die Herzgröße war auch postmortal (HW/tibia bzw. VW/tibia) in WT^{TAC} und KO^{TAC} vergleichbar und gegenüber der jeweiligen Sham-Gruppe deutlich erhöht (Abb. 3.20-B). Das anhand der Tibialänge normalisierte Lungengewicht war bei den TAC-Tieren generell gegenüber Sham erhöht, wobei die höheren Lungengewichte hier von den KO^{TAC} erreicht wurden mit $0,1 \text{ mg/cm}$ (KO^{Sham}) gegenüber $0,17 \text{ mg/cm}$ (KO^{TAC}) (Abb. 3.20-C). Beim normalisierten Gewicht der Leber zeigten nur WT^{TAC} eine Erhöhung, bei KO^{TAC} war das Lebergewicht erniedrigt (Abb. 3.20-D). Hierbei war der Unterschied zwischen WT^{TAC} mit $0,8 \text{ mg/cm}$ und KO^{TAC} mit $0,65 \text{ mg/cm}$ nicht signifikant.

Zusammenfassend wurden in der Untersuchung des Herz- und Lungengewichts vergleichbare Zunahmen der Organgrößen in WT^{TAC} und KO^{TAC} gefunden. Eine Größenzunahme der Leber konnte lediglich bei den WT^{TAC} , nicht jedoch bei den KO^{TAC} festgestellt werden.

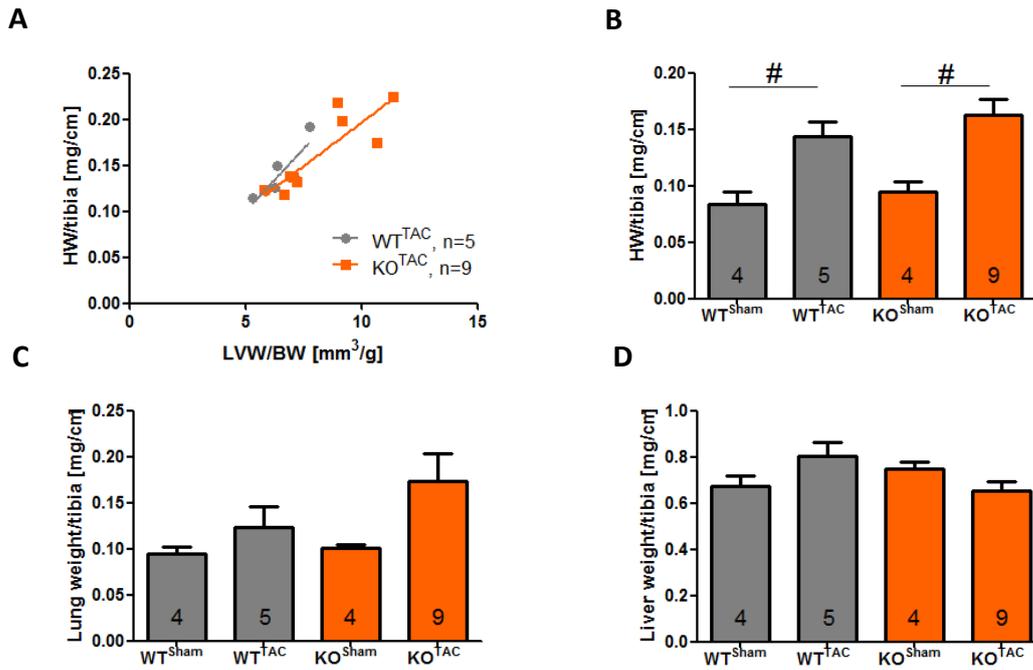


Abb. 3.20: Analyse nach Organentnahme. Die ermittelten Herzgewichte korrelieren deutlich mit den Ergebnissen der TTE (A). Die Zunahme des Herzgewichts infolge der TAC war in WT^{TAC} und KO^{TAC} signifikant (B). Ein durch TAC hervorgerufene pulmonale Kongestion konnte in WT^{TAC} und KO^{TAC} festgestellt werden (C). Das Lebergewicht (D) zeigte ausschließlich für WT^{TAC} eine Zunahme. #p < 0,05 im ungepaarten t-Test.

3.7.2 Histologische Organveränderungen in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}

Die im Rahmen der H.E.-Färbung analysierten Zellschnitte zeigten eine massive Verdickung des linken Ventrikels in WT^{TAC} und KO^{TAC} gegenüber den jeweiligen Sham-Tieren. Dies war im Rahmen der Siriusrot-Färbung ebenfalls ersichtlich (Abb. 3.21). Zudem zeigte sich hier für WT^{TAC} und KO^{TAC} eine myokardiale und perivaskulär verstärkte Fibrose, während die Schnitte von WT^{Sham} und KO^{Sham} keine Anreicherung von Kollagen erkennen ließen. Der Größenunterschied der Kardiomyozyten in WT^{TAC} und KO^{TAC} gegenüber der jeweiligen Sham-Gruppe war signifikant mit p = 0,0002 (WT) bzw. p = 0,002 (KO) (Abb. 3.22). Hierbei waren die Zellgrößen zwischen WT^{TAC} und KO^{TAC} sowie zwischen WT^{Sham} und KO^{Sham} jeweils vergleichbar

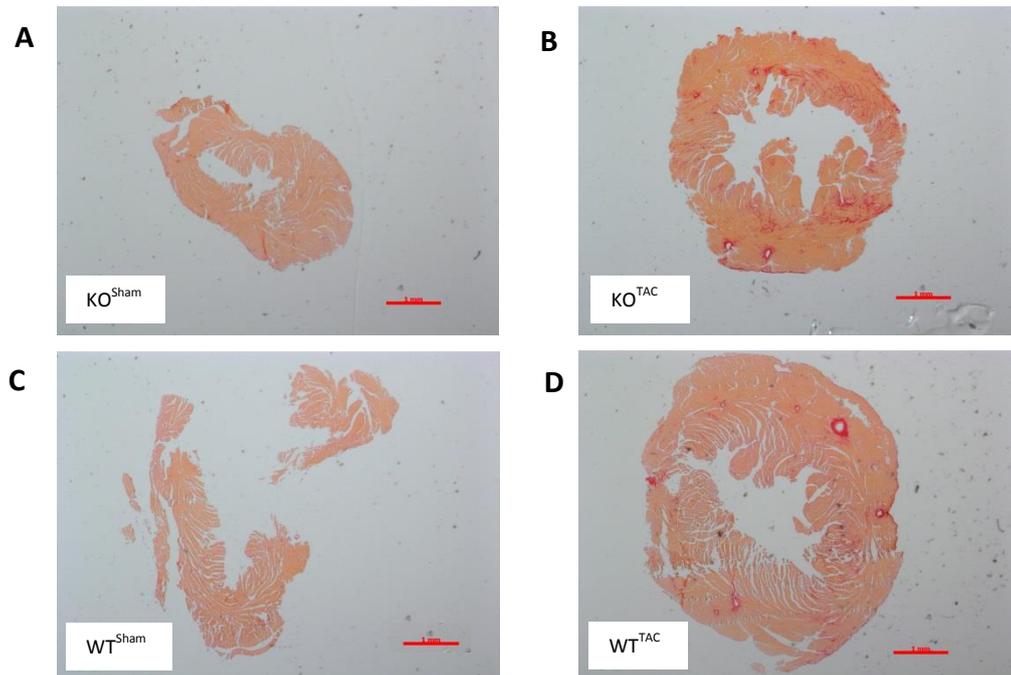


Abb. 3.21: Vergleich der Myokarddicke sowie der kardialen Fibrose durch Siriusrot-Färbung. KO^{Sham} (A) und WT^{Sham} (C) weisen keine verstärkte Fibrosierung auf. Die Zunahme der Fibrose in den hypertrophierten linken Ventrikeln in KO^{TAC} (B) und WT^{TAC} (D) ist v.a. perivaskulär lokalisiert.

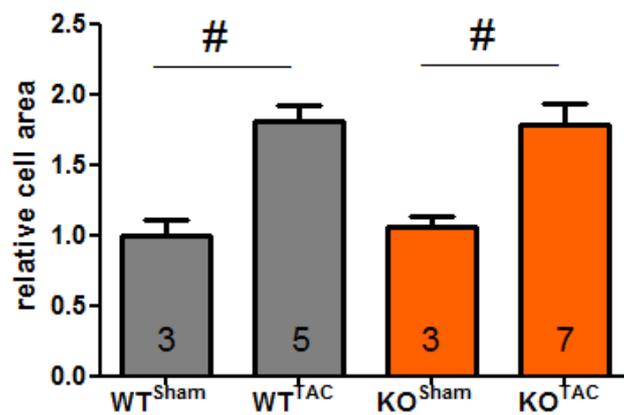


Abb. 3.22: Vergleich der Zellgrößen in der H.E.-Färbung. #p < 0,05 im ungepaarten t-Test.

3.7.3 Vergleich kardialer Hypertrophiemarker in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}

Neben der erhöhten Überlebensrate in KO^{TAC}(f) wurden in den echokardiographischen Analysen keine signifikanten Unterschiede für diese Gruppe festgestellt. Die Ursache für die verminderte Sterblichkeit in KO^{TAC}(f) war daher unklar. Aus diesem Grund wurden die Herzspitzen der zum Versuchsende getöteten Mäuse für die quantitative real-time PCR aufbereitet. Mittels der Bestimmung des Niveaus verschiedener Hypertrophiemarker sollte so zusätzlich auf molekularer Ebene ein Einblick in eventuelle Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gewonnen werden.

Sowohl in WT^{TAC} als auch in KO^{TAC} wurden deutliche Erhöhungen von ANP, BNP und β -MHC gegenüber den jeweiligen Sham-Tieren festgestellt (Abb. 3.23-A, B, C). Der Marker α -MHC zeigte hingegen eine Abnahme in WT^{TAC}, während KO^{TAC} auch hier eine signifikante Zunahme zeigte (Abb. 3.23-D). Darüber hinaus zeigten sich bei allen untersuchten Hypertrophiemarkern signifikant geringere $\Delta\Delta$ CT-Werte für KO^{Sham} gegenüber WT^{Sham}.

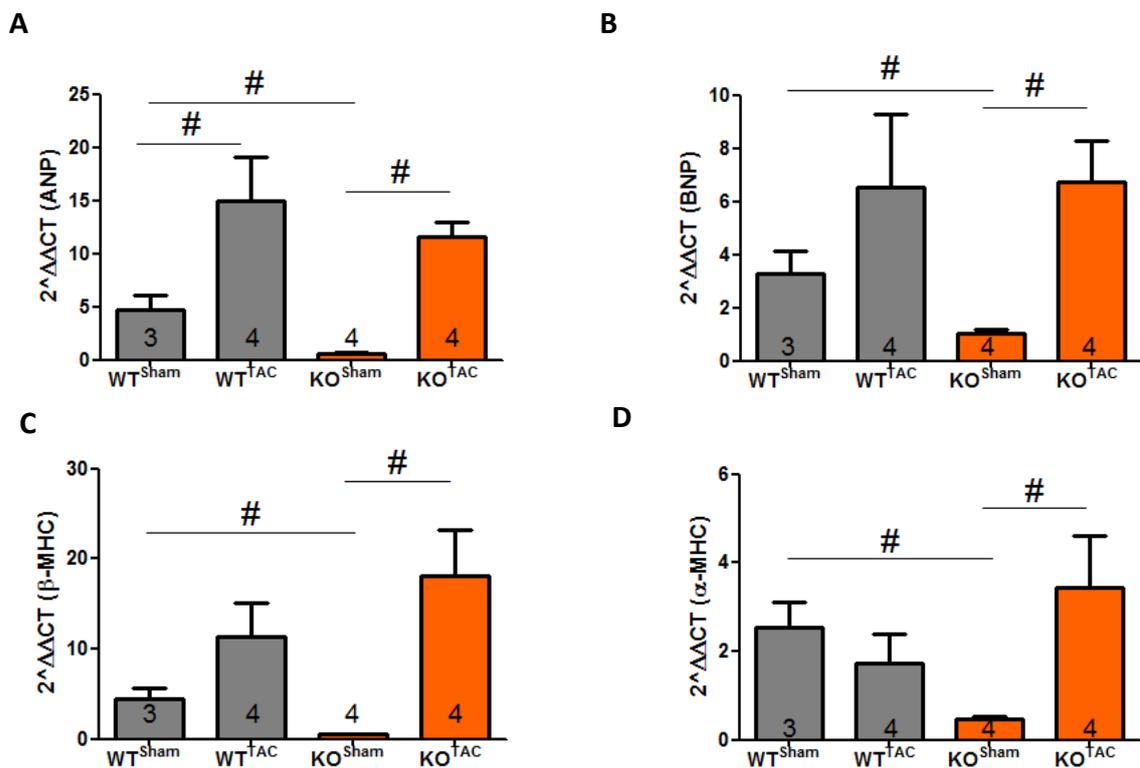


Abb. 3.23: Vergleich der Hypertrophiemarker. Die qPCR zeigte eine deutliche Zunahme von ANP (A), BNP (B) und β -MHC (C) in WT^{TAC} und KO^{TAC} gegenüber der jeweiligen Sham-Gruppe. α -MHC war in WT^{TAC} erniedrigt, in KO^{TAC} jedoch erhöht. Für alle Marker zeigte sich eine signifikant geringere Menge in KO^{Sham} gegenüber WT^{Sham}. #p < 0,05 im ungepaarten t-Test.

3.7.4 Geschlechtsbezogener Vergleich kardialer Hypertrophiemarker in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}

Die Ergebnisse des geschlechtsbezogenen Vergleichs werden folgend unter dem Vorbehalt sehr geringer Tierzahlen (n = 0-4) dargestellt.

Für den geschlechtsbezogenen Vergleich der männlichen Tiere wurde im Wildtyp lediglich ein WT^{Sham}(f) ausgeschlossen. Dem entsprechend zeigten sich ebenfalls Erhöhungen von ANP, BNP und β -MHC sowie ein Verringerung des α -MHC, wobei das Ausmaß der Veränderungen den Beobachtungen in der Gesamtgruppe entsprach. KO^{TAC}(m) zeigten im Vergleich dazu deutlich geringere Veränderungen, wenngleich auch hier die Steigerungen in ANP, BNP und β -MHC signifikant ($p < 0,05$) waren. Für α -MHC zeigte sich bei KO^{TAC}(m) ein signifikanter Anstieg, der ebenfalls deutlich vermindert gegenüber dem Anstieg in der Gesamtgruppe war. Ein geringeres Niveau in KO^{Sham}(m) gegenüber WT^{Sham}(m) wurde für alle Marker festgestellt, hierbei war lediglich der Unterschied für ANP nicht signifikant.

Der Vergleich der weiblichen Tiere konnte nur unvollständig erfolgen, denn zum Versuchsende hatte kein WT^{TAC}(f) überlebt. Die Differenz im Niveau der Hypertrophiemarker zwischen WT^{Sham}(f) und KO^{Sham}(f) wurde auch hier gefunden, wobei lediglich für BNP keine Signifikanz vorlag. Für KO^{TAC}(f) zeigten sich gegenüber KO^{TAC}(m) deutlich größere signifikante Zunahmen in ANP, BNP und β -MHC. Auch die Zunahme des α -MHC war deutlich ausgeprägter, mit $p = 0,07$ jedoch nicht signifikant.

Zusammenfassend ergab auch die geschlechtsbezogene Analyse für männliche und weibliche Tiere ein deutlich vermindertes Niveau aller Hypertrophiemarker in KO^{Sham} gegenüber WT^{Sham}. Zudem zeigte sich für KO^{TAC}, dass die TAC-induzierten Erhöhung von ANP, BNP, β -MHC und α -MHC in KO^{TAC}(f) deutlich ausgeprägter waren als in KO^{TAC}(m).

4. Diskussion

4.1 Präoperative Vergleichbarkeit der basalen kardialen Funktion in WT und I-1KO

Die präoperative kardiale Funktion der I-1KO-Tiere im basalen Zustand unterschied sich in dieser Untersuchung nicht vom Wildtyp. Hiervon abweichend stellten Carr et al (2002) eine herabgesetzte kardiale Kontraktilität in I-1KO-Tieren fest. Dieses Ergebnis ist jedoch fraglich: Carr et al anästhesierten die Tiere mittels intraperitonealer Injektion eines Gemisches aus Ketamin (65 %), Acepromazin (22 %) und Xylazin (13 %) (Hoit et al 1995). Insbesondere die Kombination aus Ketamin und Xylazin wurde von Roth et al (2002) als problematisch hinsichtlich der kardialen Funktion gegenüber dem in dieser Untersuchung verwendeten inhalativen Anästhetikum Isofluran beschrieben. Zum einen ist die Narkosetiefe durch eine einmalige intraperitoneale Injektion nicht steuerbar, zum anderen ergibt sich eine initiale Minderung der Kontraktilität, welche im Verlauf von mindestens 20 Minuten nachlässt. Insofern kann die von Carr et al beobachtete Kontraktilitätsminderung durchaus akzidenteller Natur sein. Dem entgegen entspricht der Befund einer präoperativen Vergleichbarkeit der basalen kardialen Funktion auch den Ergebnissen von El-Armouche et al (2008) und Peeck (2011), deren Messungen unter der vorteilhaften Isofluran-Anästhesie stattfanden.

4.2 I-1KO zeigen eine verminderte kontraktile Antwort auf Dobutamin

Nach β -adrenerger Stimulation zeigte sich in dieser Untersuchung eine signifikant verminderte kontraktile Antwort der I-1KO-Tiere. Dieses Ergebnis wurde auch in der früheren Untersuchung von Carr et al (2002) gefunden. Sie beschreiben eine deutliche Differenz der FS nach Injektion von Isoproterenol mit 56,9 % (I-1KO) gegenüber 68 % (WT). Die verminderte kontraktile Reaktion könnte einerseits Folge einer Desensitivierung bei grundsätzlich erhaltenem Kontraktionsmaximum sein, wofür insbesondere die Ergebnisse von El-Armouche (2008) sprechen. Hier war die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) für Isoprenalin in isolierten linken Vorhöfen der Knockout-Tiere mit 41 nM deutlich erhöht gegenüber 24 nM im WT, was auf eine Desensitivierung der (atrialen) Kardiomyozyten gegenüber β -adrenergen Substanzen hinweist. Doch auch das Vorliegen eines absoluten Kontraktilitätsverlusts ist möglich: Carr (2002) zeigte, dass durch die Überexpression der PP-1 die Kontraktilität in vivo unter β -adrenerger Stimulation herabgesetzt wird. Insofern kann vermutet werden, dass eine permanent erhöhte Aktivität der PP-1 infolge des I-1-Knockouts funktionell ebenfalls das myokardiale Kontraktionsmaximum erniedrigt. Einen derartigen Unterschied der maximalen Kontraktionsfähigkeit allerdings konnten El-Armouche et al (2008) in isometrischen Kontraktionsstudien der linken Vorhöfe nicht feststellen. Zudem wurde hier

ultrasonographisch kein Unterschied in der Kontraktilität nach Dobutaminapplikation festgestellt. Auch Peeck (2011) konnte präoperativ keinen Unterschied in der Reaktion auf Dobutamin feststellen, weder ultrasonographisch noch im Rahmen einer Linksherzkatheter-Untersuchung.

Als Ursache für die widersprüchliche Datenlage zur Kontraktilität unter β -adrenerger Stimulation kommen verschiedene Einflussfaktoren in Frage. So können grundsätzlich etwa Unterschiede der Narkosetiefe bzw. Unterschiede im Ausmaß der β -adrenergen Stimulation ausschlaggebend sein. Vermutlich erklären sich die abweichenden Ergebnisse bei El-Armouche (2008) jedoch durch die Tatsache, dass dort ausschließlich männliche Tiere verwendet wurden, während der hier festgestellte Effekt auf die weiblichen Tiere zurückzuführen ist (vgl. Kap. 4.3). Bei Peeck (2008) wurde keine geschlechtsbezogenen Analyse der präoperativen Daten vorgenommen, sodass dort eine eventuell verminderte Kontraktilität der weiblichen KO-Tiere nicht detektiert werden konnte. Bei Carr et al (2002) ist unklar, welchen Geschlechts die verwendeten Tiere waren.

4.3 Die herabgesetzte Kontraktilität nach β -adrenerger Stimulation betrifft I-1KO(f)

Die in dieser Untersuchung erstmals vorgenommene geschlechtsbezogene Analyse der präoperativen Daten zeigte für die weiblichen Tiere in der Dobutaminreaktion deutlich geringere Steigerungen der HR sowie ein vermindertes SV. Überraschenderweise war der signifikant verminderte Kontraktilitätsgewinn der KO-Gruppe jedoch ausschließlich auf die weiblichen KO-Tiere zurück zu führen. Diese zeigten zudem eine gegenüber WT(f) erhöhte HR, die als kompensatorische Reaktion zur Aufrechterhaltung des benötigten Herzzeitvolumens interpretiert werden kann. Der Befund der verminderten Kontraktilität nach Dobutamin bei KO(f) ist auch aufgrund seiner Alleinstellung bemerkenswert, denn die geschlechtsbezogenen Unterschiede in HR und SV zeigen sich sowohl im Knockout als auch im Wildtyp. Die Kontraktilität bei WT(f) unterscheidet sich jedoch nicht von WT(m). Dieser Befund spricht für eine isolierte Wirkung des I-1-Knockouts auf die kardiale Kontraktionsfähigkeit nach β -adrenerger Stimulation bei weiblichen Tieren.

4.4 Erhöhte Mortalität in der akuten Phase nach TAC in KO^{TAC}

Die Analyse der akuten Mortalität am fünften Tag nach der Transverse Aortic Constriction zeigte in dieser Untersuchung eine verringerte Überlebensrate der KO^{TAC} mit 69,6 % gegenüber 81,5 % bei WT^{TAC}. Auch Peeck (2011) berichtet von einer verminderten Überlebensrate in KO^{TAC} in der ersten postoperativen Woche mit 45,8 % (KO^{TAC}) gegenüber 63,3 % (WT^{TAC}). Die insgesamt niedrigeren Überlebensraten bei Peeck sind durch die Verwendung einer dünneren Nadel (27 G; 0,4 mm

Außendurchmesser) bei der TAC mit daraus resultierenden stärkeren Stenosen zu erklären. Dem entgegen stellten El-Armouche et al (2008) in einem Modell chronischer Isoprenalin-Infusion über sieben Tage einen protektiven Effekt des I-1-Knockouts auf das Überleben fest. Dieses abweichende Ergebnis kann jedoch Resultat der Unterschiedlichkeit der verwendeten Stressmodelle sein und ist insbesondere mit der Vorstellung einer ‚intrazellulären β -Blockade‘ durch den I-1-Knockout gut zu erklären: Im Falle einer alleinigen exzessiven β -adrenergen Stimulation könnte der Knockout zu einer kardialen Desensitivierung beitragen, die eine akute kardiale Dekompensation verhindert. Dieser Mechanismus entspricht grundsätzlich auch der therapeutischen β -Blockade in der klinischen Behandlung der Herzinsuffizienz. Im Rahmen einer akuten kardialen Druckbelastung könnte die β -Blockade bzw. der I-1-Knockout aufgrund dieser Desensitivierung jedoch die nötige Anpassung der Herzleistung unmöglich machen und so die Sterblichkeit erhöhen.

4.5 Die erhöhte Mortalität in der akuten Phase betrifft I-1KO^{TAC}(m)

Die Sterblichkeit in der akuten Phase nach TAC zeigte sich in dieser Untersuchung als deutlich geschlechtsabhängig: Während WT^{TAC}(f) und KO^{TAC}(f) vergleichbare Überlebensraten aufwiesen, zeigten KO^{TAC}(m) eine signifikante Reduktion auf 60 % gegenüber 100 % bei den WT^{TAC}(m). Der Befund eines signifikant verringerten Überlebens der KO^{TAC}(m) gegenüber den WT^{TAC}(m) in der initialen Phase nach TAC wurde bereits von Peeck (2011) erhoben. Allerdings waren bei Peeck die Überlebensraten der WT^{TAC}(m) mit denen der weiblichen Tiere beider Linien vergleichbar, während in dieser Untersuchung die WT^{TAC}(m) gegenüber allen anderen Gruppen eine höhere Überlebensrate zeigten. Ein weiteres Ergebnis von Peeck (2008) ist eine verstärkte Sterblichkeit in WT^{TAC}(f) und KO^{TAC}(f) gegenüber den männlichen Tieren. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Dennoch deuten beide Ergebnisse darauf hin, dass grundsätzlich ein Einfluss des Geschlechts auf das Überleben der akuten Phase nach Induktion einer druckinduzierten Herzinsuffizienz besteht. Insbesondere eine nachteilige Wirkung des I-1-Knockouts für männliche Tiere ist wahrscheinlich.

4.6 WT^{TAC} und I-1KO^{TAC} zeigen eine vergleichbare initiale Hypertrophiereaktion nach TAC

Die operative Erhöhung des linksventrikulären Drucks durch TAC führte in WT^{TAC} und KO^{TAC} initial zu einer deutlichen Zunahme der Herzfrequenz und der Herzgröße. Diese Hypertrophiereaktion wurde in zahlreichen anderen Studien beschrieben (z.B. Mohammed et al 2012; Barrick et al 2007; Nakamura et al 2001). WT^{TAC} und KO^{TAC} unterschieden sich hier nicht im Ausmaß der

Herzvergrößerung. Auch Peeck (2011) konnte keinen Unterschied in der initialen hypertrophen Reaktion WT^{TAC} und KO^{TAC} feststellen. Dies passt zu der Erkenntnis, dass die β -adrenerge Kaskade lediglich einer unter vielen an der Hypertrophiereaktion beteiligten Signalwege ist (vgl. Heineke u. Molkentin, 2006) und dabei vermutlich nicht im Vordergrund steht.

4.7 Typischer Verlauf der Herzinsuffizienz in WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}

Im Verlauf nach TAC zeigte sich echokardiographisch über Wochen eine Progression des LVW/BW, die schließlich zu einer relativen Steigerung um 128 % (WT^{TAC}) bzw. 105 % (KO^{TAC}) führten. Die postmortale Ermittlung des Quotienten HW/tibia ergab etwas geringere Zunahmen der Herzgröße. Beide Befunde entsprechen den Resultaten vergleichbarer Studien mit Tieren der Linie C57Bl/6J. Die kontinuierliche Zunahme des LVW/BW wurde auch von Mohammed et al (2012) über neun Wochen nach TAC beschrieben. Hier sind die Ausgangswerte vergleichbar, die relativen Zunahmen jedoch geringer ausgeprägt. Liao et al (2002) beschreiben eine kontinuierliche Zunahme des LVW/BW bis Woche 11, die etwa der Verdopplung des echokardiographisch bestimmten Herzgewichts entspricht. Polhemus et al (2013) zeigten eine Herzvergrößerung in etwas größerem Umfang durch postmortale Analysen nach 12 Wochen.

Das VoID der Tiere nach TAC war in dieser Untersuchung nach einer initialen Abnahme ebenfalls durch eine kontinuierliche Zunahme charakterisiert, die bis zum Versuchsende anhielt. Diese stetige Zunahme wurde für den WT bereits in anderen Untersuchungen beschrieben (Liao et al 2002; Mohammed et al 2012). Auch die leichte initiale Abnahme des VoID nach TAC wurde durch engmaschige Kontrollen in vergleichbaren Studien (Liao et al 2002; Polhemus et al 2013) festgestellt.

Die Kontraktilität hingegen fiel deutlich ab und stagnierte schließlich auf deutlich erniedrigtem Niveau, wobei der Kontraktilitätsverlust relativ zum Ausgangswert ca. 40 % betrug. Die Abnahme der Kontraktilität nach TAC wird in vergleichbaren Studien meist anhand der FS (Liao et al 2002) oder nur indirekt anhand der EF (Polhemus et al 2013) beschrieben. In beiden Studien allerdings stagnierte die Kontraktilität nicht vor Versuchsende. Deutlich geringere Abnahmen der linksventrikulären FS wurden in anderen Studien beschrieben. Hierbei lagen jedoch vergleichbar geringere mittlere Gradienten vor (z.B. Garcia-Menendez et al 2013) oder der Verlauf nach TAC war insgesamt mild führte nicht zur erhöhter Mortalität (z.B. Lairez et al 2013), sodass hierbei eher von einer kardialen Hypertrophie in Abgrenzung zu einer manifesten Herzinsuffizienz auszugehen ist.

Im gesamten Versuchszeitraum starb kein einziges der scheinoperierten Tiere. Jene Tiere, die eine TAC erhielten, zeigten hingegen eine deutliche Mortalität mit Überlebensraten von lediglich 20 % (WT^{TAC}) bzw. 40 % (KO^{TAC}) zum Zeitpunkt des Versuchsendes.

Zusammenfassend wurde durch die TAC erfolgreich eine Herzinsuffizienz – d.h. eine kardiale Hypertrophie und eine hiermit assoziierte Mortalität – induziert. Hierbei entspricht der Verlauf der zunehmenden kardialen Insuffizienz in dieser Untersuchung im Wesentlichen den Ergebnissen ähnlicher Studien. Die bestehenden Differenzen der sonografischen Befunde zwischen den Studien können unter Umständen auf Unterschiede in der Ausprägung des Stenosegrads zurückgeführt werden. Die Vergleichbarkeit ist aufgrund von Unterschieden der Versuchsprotokolle, der verwendeten Parameter und der Resultate der TAC (kompensierte Hypertrophie vs. Herzinsuffizienz) eingeschränkt. Generell ist festzustellen, dass die Variabilität der Verläufe nach TAC sehr groß ist (vgl. hierzu Mohammed et al 2012).

4.8 Die kontraktile Reaktion unterscheidet sich zwischen WT^{TAC} und I-1KO^{TAC}

Die Auswirkung des I-1-Knockouts auf die Progression der Herzinsuffizienz wurde im Rahmen dieser Studie erstmalig untersucht und ergänzt die bisher zum I-1KO vorliegenden Erkenntnisse. Der Verlauf der FAS zeigte in den ersten Wochen nach TAC deutliche Unterschiede zwischen WT^{TAC} und KO^{TAC}. WT^{TAC} zeigten in den ersten zwei Wochen eine Steigerung der FAS, wohingegen KO^{TAC} keine Steigerung in Woche 1 zeigten und bereits ab Woche 2 eine deutlich geringere Kontraktilität aufwiesen. Diese Differenz der kontraktilen Reaktion auf die TAC zwischen WT und I-1KO wurde hier erstmalig festgestellt. Peeck (2011) hingegen fand in Woche 1 nach TAC keinen Unterschied in der Kontraktilität zwischen WT^{TAC} und KO^{TAC}.

Für die weiblichen Tiere ergänzt dieser Befund das Ergebnis der bereits präoperativ verminderten Kontraktilität der KO^{TAC}(f) nach β -adrenerger Stimulation, wenngleich die verminderte FAS nach TAC beide Geschlechter betrifft. Beides deutet darauf hin, dass die funktionelle Bedeutung von I-1 insbesondere in der Anpassung an akute kardiale Belastungen liegt. Dies widerspricht den Ergebnissen von Carr et al (2002), die *in vivo* bereits basal eine verringerte Kontraktilität beschreiben. Dem gegenüber zeigten El-Armouche et al (2008) einen protektiven Effekt des I-1-Knockouts unter exzessiver β -adrenerger Stimulation sowie eine verminderte kardiale Hypertrophie nach chronischer Isoprenalin-Infusion. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass I-1 vor allem im Kontext β -adrenerger Aktivierung eine funktionelle Bedeutung trägt.

Ab Woche 6 stagnierte die FAS für WT^{TAC} und KO^{TAC} auf vergleichbarem Niveau, sodass der Unterschied lediglich auf die ersten Wochen nach TAC beschränkt ist. Diese Beobachtung ergänzt die Ergebnisse von El-Armouche et al (2007), die eine deutliche Abnahme von kardialen I-1 sowie von I-1-mRNA nach chronischer Isoprenalin-Infusion bei Ratten feststellten. Zudem konnten El-Armouche et al (2003) auch für menschliche Herzen eine Reduktion der Proteinlevel für I-1 infolge von Herzinsuffizienz feststellen. Es ist daher auch für diese Untersuchung davon auszugehen, dass infolge der chronischen β -adrenergen Aktivierung nach TAC eine Desensitivierung erfolgt, die mit einer Abnahme der Menge an I-1 einhergeht. Dies resultiert schließlich auf funktioneller Ebene in einem ausgeprägten Verlust von I-1 auch in WT^{TAC}, was im Ergebnis zu einem vergleichbaren Niveau der Kontraktilität in WT^{TAC} und KO^{TAC} führt.

Die Auswirkungen des Knockouts sind auf die FAS beschränkt, während HR, LVW/BW und VoID in WT^{TAC} und KO^{TAC} vergleichbar sind. Dies entspricht den bisherigen Ergebnissen zur Funktion von I-1. Auf molekularer Ebene wurden etwa von Nicloaou et al (2009) der isolierte Einfluss von I-1 auf den Phosphorylierungsstatus von PLN im Rahmen eines induzierbaren transgenen Modells beschrieben, während andere Substrate der PKA wie RyR und TnI unbeeinflusst blieben. Pathak et al (2005) konnten zeigen, dass ein konstitutiv aktiver I-1 eine Hyperkontraktilität erzeugt. Alle genannten Resultate deuten darauf hin, dass I-1 in erster Linie die Kontraktilität in Kardiomyozyten beeinflusst.

4.9. Aufhebung geschlechtsspezifischer Unterschiede durch den I-1-Knockout

Im Verlauf dieses Versuchs zeigten sich zwei geschlechtsspezifische Besonderheiten im WT: Zum einen zeigten WT^{TAC}(m) eine deutlich höhere FAS als WT^{TAC}(f). Zum anderen war die Zunahme des LVW/BW bei WT^{TAC}(m) gegenüber den weiblichen Tieren deutlich geringer ausgeprägt. Dieser Befund widerspricht dem Ergebnis Peecks (2011), der eine stärkere Hypertrophie in WT^{TAC}(m) gegenüber WT^{TAC}(f) für Woche 1 nach TAC beschreibt. Die Ursache dieses Unterschieds ist unklar. In der vorliegenden Studie zeigen die WT^{TAC}(m) das Bild einer verzögerten bzw. reduzierten Progression der Herzinsuffizienz. Beide Unterschiede waren bei KO^{TAC} trotz vergleichbarer Gradienten nicht vorhanden, d.h. der I-1-Knockout hob deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede in der kardialen Reaktion auf die TAC auf. Erneut sind hier – wie bereits bei der Mortalität in der akuten Phase nach TAC – insbesondere die männlichen Tiere betroffen, deren Herzgröße und Kontraktilität sich infolge des I-1-Knockouts dem Niveau der weiblichen Tiere anpasst. Fraglich bleibt, ob die erhöhte akute Sterblichkeit der männlichen KO-Gruppe eine Selektion jener Tiere bewirkt haben könnte, die in der Lage waren eine bessere Kompensation der TAC zu entwickeln.

Die geschlechtsbezogene Analyse der echokardiographischen Daten nach TAC über einen langen Zeitraum wurde bisher in anderen Studien selten vorgenommen. Peeck (2011) untersuchte die geschlechtsabhängige kardiale Entwicklung bis Tag 8 nach TAC. Die von ihm beschriebene geringe Herzgröße der $KO^{TAC}(m)$ an Tag 8 konnte in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden: Die hier für die erste Woche nach TAC bestimmten Werte für LVW/BW waren bei $KO^{TAC}(m)$ tendenziell höher als im WT. Skavdahl et al (2005) und Fliegner et al (2010) beschreiben eine signifikant erhöhte HW/BW-Ratio für $WT^{TAC}(m)$ gegenüber $WT^{TAC}(f)$ postmortal zwei Wochen bzw. neun Wochen nach TAC. Auch Peeck (2011) verweist auf eine signifikant erhöhte HW/TL-Ratio in $WT^{TAC}(m)$ gegenüber $WT^{TAC}(f)$. Dieser Trend konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigten $WT^{TAC}(m)$ hier ein oft signifikant niedrigeres LVW/BW gegenüber $WT^{TAC}(f)$ über den gesamten Versuchszeitraum. Ein geschlechtsbezogener Vergleich der postmortalen Herzgewichte war aufgrund des Versterbens aller $WT^{TAC}(f)$ vor Versuchsende nicht möglich. In Anbetracht der guten Korrelation zwischen Daten aus der TTE mit den postmortalen Ergebnissen ist jedoch nicht von einem abweichenden Befund auszugehen. Interessanterweise zeigt sich jedoch auch bei Peeck (2011), dass die im WT vorhandenen geschlechtsbezogenen Unterschiede der Hypertrophiereaktion nach TAC durch den I-1-Knockout verringert bzw. aufgehoben werden.

Die kontraktile Reserve war in dieser Untersuchung in Woche 3 und 18 in WT^{TAC} und KO^{TAC} unabhängig vom Geschlecht in gleichem Umfang vermindert, aber vorhanden. Dieses Ergebnis widerspricht der von Peeck (2008) beschriebenen verminderten Steigerung der FAS bei $WT^{TAC}(f)$ und $KO^{TAC}(f)$ Tieren nach Dobutaminingabe an Tag 8. Interessant ist hier jedoch, dass auch Peeck einen auf die weiblichen Tiere beschränkten Effekt beschreibt, wenngleich ein entsprechendes Ergebnis in der vorliegenden Untersuchung nur präoperativ gefunden wurde.

4.10 Erhöhtes Langzeit-Überleben in $KO^{TAC}(f)$

Im Langzeitüberleben zeigte sich ein deutlicher Überlebensvorteil der KO^{TAC} . Die geschlechtsspezifische Analyse ergab, dass dieser signifikante Unterschied allein $KO^{TAC}(f)$ betrifft. Das Überleben in $WT^{TAC}(m)$ und $KO^{TAC}(m)$ war hingegen identisch. Die Auswirkungen des I-1-Knockouts sind somit phasen- und geschlechtsspezifisch: Der erhöhten Mortalität in $KO^{TAC}(m)$ in der akuten Phase steht eine verringerte Mortalität der $KO^{TAC}(f)$ im weiteren Verlauf der Herzinsuffizienz gegenüber. Dieser Befund steht mangels vergleichbarer Studien mit dem I-1-Knockout für sich. Der Befund einer erhöhten akuten Mortalität der $KO^{TAC}(m)$ deutet auf eine wichtige Funktion des I-1 unter der Bedingung akuter kardialer Belastung für männliche Tiere hin. Das verbesserte Langzeitüberleben der $KO^{TAC}(f)$ hingegen spricht für eine protektive Funktion des Knockouts unter der

Bedingung chronischer kardialer Belastung für weibliche Tiere. Vermutlich ahmt der I-1-Knockout hier in begrenztem Umfang eine β -Blockade nach. Warum dieser Effekt ausschließlich in weiblichen Tieren Wirkung zeigt bleibt unklar.

4.11. Der Stenosegrad korreliert nicht mit kardialer Morphologie, Funktion oder Überleben

Unter der Vorstellung, dass der Stenosegrad direkt das Ausmaß der linksventrikulären Druckbelastung bestimmt, war eine Korrelation zwischen Stenosegrad und Hypertrophie bzw. Überlebenszeit eine implizite Erwartung an das Modell der TAC. Ein derartiger Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Studie nicht belegt werden. Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Einerseits argumentieren Mohammed et al (2010), dass der Stenosegrad durchaus maßgeblich für die weitere kardiale Entwicklung sei. Das Problem läge aber in der eingeschränkten Genauigkeit und schlechten Reproduzierbarkeit der Gradientenbestimmung. Andererseits ist auch denkbar, dass der Stenosegrad keine statische Größe ist, sondern dass er sich im lebenden Tier verändern kann. Durch die nur einmalige Bestimmung an Tag 1-3 nach TAC würde die vermutete intraindividuelle Dynamik der Stenose nicht abgebildet. Die Tatsache, dass verschiedenen Mauslinien in unterschiedlichem Umfang auf die standardisierte TAC zeigen (vgl. Barrick et al 2007), macht eine gewisse Kompensationsfähigkeit auch in den hier verwendeten Tieren wahrscheinlich. Insofern müsste für das Modell davon ausgegangen werden, dass durch eine Anpassung des Gradientenbereichs lediglich eine Homogenität der Startbedingungen hergestellt wird. Ob diese Homogenität jedoch über den Verlauf der Erkrankung erhalten bleibt ist zu diesem Zeitpunkt unklar. Eine weitere alternative Interpretation der fehlenden Korrelation liegt in der Möglichkeit einer überwiegend gleichförmigen kardialen Reaktion, die unabhängig vom Ausmaß der Stenose ab einem bestimmten Schwellenwert abläuft. Festzuhalten bleibt, dass die Gradientenbestimmung in dieser Untersuchung keine Aussagekraft über den weiteren Verlauf der Herzinsuffizienz erlaubt, weder im Hinblick auf die kardialen Funktionen noch im Hinblick auf das Überleben der Tiere.

4.12 STE bestätigt TTE trotz größerer Varianz

Die zusätzliche Untersuchung der systolischen Funktion mittels der Methode des Speckle Tracking führte zu ähnlichen Ergebnissen wie die TTE, wobei der S_c die größte Übereinstimmung mit der FAS zeigte. Für die globale Analyse der Herzfunktion wurde dies bereits von Peng et al (2009) beschrieben, die unter Verwendung hoher Tierzahlen ($n < 50$) eine signifikante Korrelation zwischen FS bzw. LV

mass und S_c^{sys} fanden. Bhan et al (2014) beschreiben entsprechende Korrelationen des STE mit MRI-Untersuchungen in einem Mykardinfarkt-Modell.

Für den in dieser Untersuchung durchgeführten Vergleich von Interventionsgruppen ist festzustellen, dass trotz guter intraindividuelle Korrelation der Resultate der STE größere Varianzen aufwiesen als die TTE. Dieser Umstand macht eine Detektion kleiner Gruppenunterschiede unmöglich, so etwa der präoperativen Reduktion der FAS nach β -adrenerger Stimulation in KO^{TAC} . Die beschriebenen Differenzen in den Ergebnissen der TTE gegenüber der STE könnten auf die in der STE erhöhte Varianz und auf dem notwendigen Ausschluss zusätzlicher Tiere im Rahmen der STE beruhen.

Die in der TTE für die systolische Funktion gemessenen Ergebnisse konnten durch die STE in gleicher Tendenz auch für die diastolische Funktion bestätigt werden. Die diesbezüglichen Unterschiede bleiben quantitativ jedoch weit hinter den Veränderungen der systolischen Reaktion zurück. Unterschiede zwischen WT und KO konnten für die diastolische Funktion nicht festgestellt werden.

Insgesamt konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass die STE die Ergebnisse der TTE überwiegend reproduzieren kann, wenngleich mit Einschränkungen der Genauigkeit. Im Rahmen der hier vorgenommenen Analyse der globalen Herzfunktion ist der Erkenntnisgewinn durch die zusätzliche STE daher begrenzt. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die größte Stärke des STE – die Analyse einzelner Myokardregion und ihr Vergleich – im Rahmen dieser Studie nicht genutzt wurde. Insbesondere im Rahmen von Tiermodellen, die einen Mykardinfarkt induzieren, kann das STE von großem Nutzen sein (vgl. z.B. Popovic et al 2007).

4.13 Organische Veränderungen post mortem bestätigen Herzinsuffizienz in WT^{TAC} und $I-1KO^{TAC}$

Die in der postmortalen Analyse festgestellte Zunahme der Herzgröße sowie die pulmonale Stauung in WT^{TAC} und KO^{TAC} gegenüber der jeweiligen Sham-Gruppe ergänzen die Ergebnisse zur kardialen Funktion und Mortalität und belegen die erfolgreiche Induktion einer Herzinsuffizienz. Die gute Korrelation zwischen postmortal ermitteltem Ventrikelgewicht und im TTE bestimmtem LVW kennzeichnet die hohe Zuverlässigkeit der echokardiographischen Analyse. Die in der histologischen Untersuchung festgestellte Zunahme des Zellquerschnitts auf ca. die doppelte Größe nach TAC gegenüber den Sham-Tieren entspricht den von Barrick et al (2007) und Gao et al (2005) dargestellten Ergebnissen für die verwendete Mauslinie. Peeck (2011) beschreibt ebenfalls deutliche Zunahmen, wenngleich in etwas geringerem Umfang. Auch der Befund der perivaskulären und myokardialen Fibrose nach TAC entspricht den Erkenntnissen vergleichbarer Studien (vgl. Liao et al 2004; Polhemus et al 2013).

4.14 α -MHC ist vermindert in WT^{TAC}, aber erhöht in KO^{TAC}

Die in der molekularen Analyse festgestellten Veränderungen der untersuchten Hypertrophiemarker in WT^{TAC} gegenüber WT^{Sham} entsprechen den Erfahrungen aus anderen Studien mit dem Modell der TAC. So beschreiben Barrick et al (2007) massive Erhöhungen von ANP, BNP und β -MHC nach Induktion der kardialen Drucküberlastung, während α -MHC infolge der TAC erniedrigt ist. Auch Gao et al (2005) fanden ein erhöhtes Niveau von ANP bei gleichzeitiger Reduktion des α -MHC infolge TAC. Peeck (2011) zeigt eine mehr als achtfache Zunahme von ANP nach TAC. Das hier festgestellte Ausmaß der Erhöhungen ist von geringerer Ausprägung, nichts desto trotz signifikant in WT^{TAC} gegenüber den Sham-Gruppen für ANP. In ihrem Umfang entsprechen die Erhöhungen für ANP in WT^{TAC} recht genau den Zunahmen, die auch El-Armouche (2008) nach chronischer Isoprenalin-Infusion im WT festgestellt hat.

Die für WT^{TAC} geltenden Ergebnisse entsprechen identisch den Resultaten für WT^{TAC}(m), da zu Versuchsende kein weibliches Tier in der Gruppe WT^{TAC} war. Die Niveaus aller Marker sind für WT^{Sham}(m) und WT^{Sham}(f) vergleichbar, d.h. ein geschlechtsbezogener Unterschied wurde innerhalb der WT-Gruppe nicht gefunden.

Für KO^{TAC} zeigten sich ebenfalls Erhöhungen in ANP, BNP und β -MHC. Diese unterschieden sich nicht signifikant von den Erhöhungen in WT^{TAC}. Für ANP zeigte auch Peeck (2011) eine vergleichbare Zunahme in KO^{TAC} und WT^{TAC} acht Tage nach TAC. Demgegenüber zeigten El-Armouche et al (2008) im Modell chronischer Isoprenalin-Infusion für ANP eine deutlich geringere Zunahme des I-1KO gegenüber WT. Dies ist möglicherweise ein Resultat der unterschiedlichen Stressmodelle.

Im Gegensatz zu WT^{TAC} war bei KO^{TAC} das α -MHC massiv gegenüber KO^{Sham} erhöht. Die typische Abnahme des Markers infolge kardialer Druckbelastung scheint sich hier umzukehren. Im Rahmen der geschlechtsbezogenen Analyse zeigte sich dieses Muster sowohl in KO^{TAC}(m) als auch in KO^{TAC}(f), doch waren die Erhöhungen aller Marker in KO^{TAC}(f) deutlich ausgeprägter. Dieses Indiz für eine geschlechtsspezifische veränderte Reaktion auf chronische Druckbelastung in KO^{TAC}(f) ergänzt den Befund einer erhöhten Überlebensrate für diese Tiere. Ob es einen Zusammenhang beider Befunde gibt ist zu diesem Zeitpunkt unklar, insbesondere weil die qualitative Veränderung einer Zunahme des α -MHC in KO^{TAC}(m) nicht von einem Überlebensvorteil begleitet ist.

4.15 KO^{Sham} zeigen vermindertes Niveau von ANP, BNP, α - und β -MHC gegenüber WT^{Sham}

Unabhängig vom Geschlecht zeigte sich eine deutlich verminderte Expression aller Marker in KO^{Sham} gegenüber WT^{Sham}. Dieser Unterschied ist nach TAC nicht feststellbar. Für ANP widerspricht dieser Befund den Ergebnissen von El-Armouche et al (2008), die ein vergleichbares Niveau des ANP in männlichen WT^{Sham}- und KO^{Sham}-Tieren feststellten. Auch Peeck (2011) beschreibt unter Verwendung beider Geschlechter ein identisches Niveau von ANP in WT^{Sham} und KO^{Sham}. Einerseits ist hier das Alter der Tiere zu berücksichtigen: Die verwendeten Tiere waren mit ≥ 28 Wochen deutlich älter als die Tiere bei El-Armouche (12-18 Wochen) und Peeck (ca. 13 Wochen). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den festgestellten Unterschieden um einen altersabhängigen Effekt in KO^{Sham} handelt. Andererseits wurden in der Arbeitsgruppe El-Armouche Hinweise dafür gefunden, dass PP-1 über eine Dephosphorylierung des Histons H3^{S28} die Transkription von Genen beeinflusst. Möglicherweise hat der I-1-Knockout insofern über eine erhöhte Aktivität der PP-1 Einfluss auf die Transkription der untersuchten Hypertrophiemarker. Diese Frage ist Gegenstand aktueller Untersuchungen in der Arbeitsgruppe und kann hier nicht beantwortet werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

28 WT- und 25 I-1KO-Mäuse (C57Bl/6J) wurden mittels transthorakaler Echokardiographie (TTE) untersucht und erhielten anschließend eine Transverse Aortic Constriction (TAC) zur Induktion einer druckinduzierten Herzinsuffizienz. Die darauf folgend ermittelten Stenosegradienten waren vergleichbar mit 77% (WT^{TAC}) bzw. 73% (KO^{TAC}). Anhand serieller echokardiographischer Untersuchungen wurde der Verlauf der kardialen Hypertrophie über den Zeitraum von 18 Wochen verfolgt. Hierbei erfolgte in Woche 3 und Woche 18 zusätzlich eine Applikation von Dobutamin zur Überprüfung der kardialen Reaktion auf β -adrenerge Stimulation. Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz in WT^{TAC} und KO^{TAC} wurde bestätigt durch eine ausgeprägte Hypertrophiereaktion (sowohl in der TTE als auch in postmortalen Analysen der Zell- und Ventrikelgröße), eine postmortal ermittelte pulmonale Kongestion sowie die TAC-induzierte erhöhte Sterblichkeit gegenüber der jeweiligen Sham-Gruppe.

Präoperativ hatten die weiblichen Tiere nach Stimulation mit Dobutamin in WT und I-1KO eine verminderte Herzfrequenz (HR) sowie ein vermindertes Schlagvolumen (SV) gegenüber den männlichen Tieren. Nach Dobutamingabe zeigten die weiblichen KO-Tiere KO(f) eine signifikant verminderte *fractional area shortening* (FAS) gegenüber den weiblichen WT-Tieren WT(f). Für WT^{TAC} und KO^{TAC} wurde eine gleichförmige initiale Hypertrophiereaktion festgestellt. Im weiteren Verlauf ergaben sich zwischen WT^{TAC} und KO^{TAC} keine Unterschiede in der HR, in dem auf das Körpergewicht normalisierten linksventrikulären Gewicht (LVW/BW) und im enddiastolischen Volumen (V₀D). KO^{TAC} zeigten jedoch eine deutlich schnellere Reduktion der FAS in den ersten sechs Wochen. Während WT^{TAC}(m) im Verlauf konstant ein signifikant geringeres LVW/BW sowie eine deutlich erhöhte FAS gegenüber WT^{TAC}(f) zeigten, konnte zwischen KO^{TAC}(m) und KO^{TAC}(f) kein derartiger Unterschied festgestellt werden. Der I-1-Knockout führte diesbezüglich zu einer Aufhebung von geschlechtsbezogenen Unterschieden im WT. In der Reaktion auf Dobutamin ergaben sich in Woche 3 und in Woche 18 keine Unterschiede.

Das Überleben der akuten Phase nach TAC war für KO^{TAC}(m) deutlich vermindert und entspricht dem Ergebnis bei Peeck (2011). Dem gegenüber war das Langzeit-Überleben für KO^{TAC}(f) signifikant gegenüber WT^{TAC}(f) erhöht, während unter Ausschluss der in der akuten Phase verstorbenen Tiere kein Unterschied des Langzeit-Überlebens zwischen WT^{TAC}(m) und KO^{TAC}(m) bestand. Der Knockout des I-1 war in diesem Experiment somit schädlich für männliche Tiere in der akuten Phase der kardialen Druckbelastung, während er für weibliche Tiere unter chronischer Druckbelastung einen Vorteil bot. Sowohl die erhöhte Sterblichkeit als auch das verbesserte Langzeit-Überleben passen gut zum Modell einer ‚intrazellulären β -Blockade‘. Die streng geschlechtsspezifische Auswirkung ist jedoch überraschend und erfordert weitergehende Untersuchungen.

Die Analyse der Hypertrophiemarker ergab eine verminderte Expression von *atrial natriuretic factor* (ANP), *brain natriuretic factor* (BNP), *α -myosin heavy chain* (α -MHC) und *β -myosin heavy chain* (β -MHC) in KO^{Sham} gegenüber WT^{Sham}. Dieser Befund widerspricht den Ergebnissen vorhergehender Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe (El-Armouche et al 2008, Peeck 2011), allerdings können hier altersbedingte Effekte nicht ausgeschlossen werden. Es bleibt zu vermuten, dass der I-1-Knockout auch eine veränderte Genexpression unter nicht-pathologischen Bedingungen bewirkt. Dieser Zusammenhang ist Gegenstand aktueller Untersuchungen in der Arbeitsgruppe. Für WT^{TAC} und KO^{TAC} zeigten sich vergleichbare Erhöhungen von ANP, BNP und β -MHC. Während jedoch bei WT^{TAC} für α -MHC eine Abnahme detektiert wurde, zeigte sich bei KO^{TAC} eine deutliche Zunahme des α -MHC. Das für die Herzinsuffizienz typische Muster der veränderten Expression von Hypertrophiemarkern ist durch den I-1-Knockout im Rahmen der chronischen Druckbelastung somit qualitativ verändert. Ob diese Veränderung in einem funktionellen Zusammenhang mit der veränderten Reaktion auf die druckinduzierte Herzinsuffizienz in I-1KO-Tieren steht bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Ein Einfluss des I-1 auf die Entstehung bzw. den Verlauf von Herzerkrankungen wurde bisher in sehr verschiedenen Studien untersucht. Die teilweise widersprechenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Untersuchungsbedingungen eine nicht zu unterschätzende Rolle spielen. *In vivo* zeigte sich eine geringere Hypertrophiereaktion 6 Wochen nach TAC durch Gentransfer des konstitutiv aktiven I-1_{T35D} (Pathak et al 2005). Allerdings wurden hier ausschließlich männliche Tiere einer anderen Linie (FVBN) verwendet. Im Rahmen exzessiver β -adrenerger Stimulation führte der Knockout zu einer verminderten Mortalität männlicher C57BL/6J-Tiere (El-Armouche et al 2008). Die vorliegende Arbeit ergänzt beide Ergebnisse: Für männliche Tiere einerseits spiegelt die erhöhte akute Mortalität des I-1KO den milderen Verlauf I-1_{T35D}-positiver Tiere in der druckinduzierten Hypertrophie. Für männliche Tiere unter akuter kardialer Druckbelastung scheint I-1 somit protektiven Charakter zu haben. Andererseits scheint die Bedeutung des I-1-Knockouts stark von der Art der kardialen Belastung abhängig zu sein, so dass es im Modell chronischer Isoprenalin-Infusion bereits initial zu einer Mortalitätssenkung kommt. Unter der Bedingung chronischer kardialer Druckbelastung ist der I-1-Knockout protektiv für weibliche Tiere. Die Funktion des I-1 in der Entstehung bzw. im Verlauf einer kardialen Hypertrophie / Herzinsuffizienz scheint folglich von Geschlecht, Erkrankungsphase und Art der Erkrankung abhängig zu sein.

Hinsichtlich I-1 als potentiell therapeutisches Zielmolekül deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine positive Wirkung einer Inhibition des I-1 im Rahmen der druckinduzierten Herzinsuffizienz auf weibliche Individuen beschränkt sein könnte. Vielversprechend ist zum einen, dass der Knockout in seiner Auswirkung dem Wirkprofil eines konventionellen β -Blockers – der bisher wichtigsten Substanzklasse in der Therapie der Herzinsuffizienz – ähnelt. Zum anderen lassen die geringen

phänotypischen Abweichungen selbst bei dem hier verwendeten kompletten Knockout darauf hoffen, dass I-1 grundsätzlich inhibiert werden kann ohne vitale Funktionen zu beeinträchtigen. Auch die sehr selektive Auswirkung des Knockouts auf die Kontraktionskraft könnte bei bestimmten Krankheitsbildern von Vorteil sein, etwa wenn eine Beeinflussung der Herzfrequenz unerwünscht ist. Ein möglicher nächster Schritt wäre die Erstellung eines Tiermodells, in dem I-1 zu einem gewünschten Zeitpunkt inhibiert oder seine Transkription eingestellt werden kann. So könnte z.B. im Rahmen einer TAC direkt der therapeutische Effekt dieser Maßnahme untersucht werden.

6. Kurzfassung

Ziel

Der Proteinphosphatase-Inhibitor I-1 wirkt als ein Verstärker der β -adrenergen Kaskade in Kardiomyozyten. Nach PKA-abhängiger Phosphorylierung hemmt er spezifisch die Dephosphorylierung von PLB und RYR-2 durch die Proteinphosphatase-1. Im Rahmen einer Herzinsuffizienz sind sowohl Aktivität als auch Expression von I-1 deutlich reduziert. Hierbei ist unklar, ob dies eine protektive oder eine schädliche Adaption der β -adrenergen Kaskade darstellt. Diese Arbeit untersucht den Einfluss einer Depletion des I-1 (I-1KO) im Rahmen der druckinduzierten Herzinsuffizienz auf die akute bzw. auf die langfristige Mortalität, auf die kardiale Morphologie und Funktion sowie auf die Expression typischer Hypertrophiemarker. Hieraus sollen Erkenntnisse über den Nutzen der Verwendung putativ I-1 inhibierender Substanzen in der Behandlung der Herzinsuffizienz gewonnen werden.

Methoden und Resultate

25 I-1KO- sowie 28 WT-Mäuse (C57Bl/6J, age and sex matched) erhielten eine Transverse Aortic Constriction (TAC). Die kardiale Funktion wurde einmalig vor der Intervention sowie danach wöchentlich mittels TTE untersucht. Zusätzlich wurden die Tiere einmalig vor TAC und zweimalig danach unter echokardiographischer Kontrolle mittels Dobutamin β -adrenerg stimuliert. Für die männlichen Tiere zeigte sich in den ersten Tagen nach TAC eine signifikant erhöhte Überlebensrate des WT gegenüber I-1KO. Die Mortalität der überlebenden männlichen Tiere unterschied sich hingegen nicht über den Versuchszeitraum. Für die weiblichen Tiere bestand kein Unterschied in der akuten Sterblichkeit nach TAC, während sich im Verlauf eine signifikant bessere Überlebensrate der weiblichen I-1KO gegenüber WT zeigte. Vor TAC wurde eine signifikant herabgesetzte Kontraktilität (FAS) des I-1KO unter Dobutamin festgestellt, der im Wesentlichen durch die weiblichen Tiere bewirkt wird. Insgesamt zeigten die weiblichen Tiere beider Linien unter β -adrenerger Stimulation eine geringere Zunahme von Herzfrequenz (HR) und Schlagvolumen (SV). Hingegen waren nach TAC keine linien- oder geschlechtsabhängigen Unterschiede unter Dobutamingabe feststellbar. Ein Vergleich der Hypertrophiemarker in der Kontrollgruppe zeigte für I-1KO ein deutlich vermindertes Niveau der Marker gegenüber WT.

Ergebnis

Der I-1-Knockout verändert die kardiale Kontraktilität und wirkt sowohl in phasen- als auch in geschlechtsabhängiger Weise auf die Mortalität infolge druckinduzierter Herzinsuffizienz. Er ist nachteilig für männliche Tiere in der akuten Phase kardialer Belastung, während er für weibliche Tiere im weiteren Verlauf protektive Wirkung entfaltet. Eine erhöhte Mortalität in der akuten Phase kann durch den Ausfall der Verstärkerfunktion des I-1 erklärt werden, da hiermit eine Einschränkung der akut notwendigen kontraktilen Adaptionfähigkeit einhergeht. Ein Überlebensvorteil bei chronischer kardialer Belastung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die pathologisch erhöhte sympathische Aktivierung der β -adrenergen Kaskade infolge der I-1-Depletion eine geringere Auswirkung auf die Zielstrukturen des aktivierten I-1 am Sarkoplasmatischen Retikulum hat. Darüber hinaus lassen die Analysen der Hypertrophiemarker eine veränderte Genexpression zwischen I-1KO und WT auch unter nicht-pathologischen Bedingungen vermuten.

6. Abstract

Aims

Protein Phosphatase Inhibitor 1 (I-1) functions as an amplifier of the β -adrenergic cascade in cardiomyocytes. Once activated via PKA, I-1 specifically blocks PP-1-mediated dephosphorylation of phospholamban and the ryanodine receptor-1. In heart failure I-1 activity as well as its expression is significantly reduced. It is still unclear whether this adaptation is protective or detrimental. This work aims at examining the impact of I-1 depletion on the course of pressure-induced heart failure, more precisely on acute and long-term mortality, on cardiac morphology and function and on expression levels of hypertrophy markers. Results may help evaluating the benefit of putative I-1 inhibiting substances in the therapy of heart failure.

Methods and Results

25 I-1KO and 28 WT mice (C57Bl/6J, age- and sex-matched) underwent *transverse aortic constriction* (TAC). Cardiac function was assessed via transthoracic echocardiography prior to the intervention and weekly afterwards. Additionally, mice were exposed to β -adrenergic stimulation by injection of dobutamine once prior to TAC and two times afterwards, each controlled by echocardiography.

For male mice acute survival was significantly increased in WT compared to I-1KO, whereas the mortality of surviving animals did not differ during the investigation period. For female mice no difference was seen in acute mortality after TAC, but during heart failure progression I-1KO revealed a significantly better survival. Prior to TAC contractility in I-1KO after application of dobutamine was significantly lower than in WT. This effect was mainly induced by female mice. Overall female mice of both WT and I-1KO showed smaller increases in heart rate (HR) and stroke volume (SV) when stimulated. In contrast, following TAC neither line- nor sex-dependent differences were found according to β -adrenergic stimulation.

The comparison of hypertrophy markers in control groups revealed clearly decreased levels for I-1KO compared to WT.

Conclusion

In pressure-induced heart failure, I-1 knockout alters cardiac contractility and modulates mortality in a phase- and sex-dependent way. The depletion is detrimental for male mice in the acute phase of cardiac stress, whereas it is protective for female mice during heart failure progression.

The increased mortality in the acute phase might result from the loss of I-1 as an amplifier of β -adrenergic signaling as this leads to a restriction of contractile adaptation. The increased survival in heart failure progression might be caused by a reduced transmission of pathologically increased sympathetic activity on the SR due to the depletion of I-1. Additionally, hypertrophy marker analyses point to differences in expression levels even under non-pathological conditions.

7. Abkürzungen

AC	Adenylatcyclase
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AKAP	A-Kinase-Ankerprotein
β -AR	Beta-Adrenorezeptor
β -ARK	Beta-Adrenorezeptorkinase
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CI	Herzindex
cMyBPc	kardiales Myosin-Bindungsprotein C
CO	Herzminutenvolumen
cTNI	kardiales Troponin I
EF	Ejektionsfraktion
FAS	<i>Fractional area shortening</i>
FS	<i>Fractional shortening</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HR	Herzfrequenz
i.p.	intraperitoneal
I-1	Inhibitor-1
I-1KO	Inhibitor-1-Knockout
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
LVW	Linksventrikuläres Gewicht
LVW/BW	Linksventrikuläres Gewicht/Körpergewicht
MHC	Schwere Kette des Myosin
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PP1, PP2	Protein-Phosphatase 1, Protein-Phosphatase 2
RyR	Ryanodin-Rezeptor
S _R , S _C	<i>Radial Strain, Circumferential Strain</i>
SERCA	Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SR _R , SR _C	<i>Radial Strain Rate, Circumferential Strain Rate</i>
STE	<i>Speckle Tracking</i> Echokardiographie
SV	Schlagvolumen
TAC	<i>transverse aortic constriction</i>
TTE	Transthorakale Echokardiographie
VoID	enddiastolisches Volumen
WT	Wildtyp

8. Literaturverzeichnis

Aitken A, Bilham T, Cohen P. Complete primary structure of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 1982 Aug;126(2):235-46.

Allen PB, Hvalby O, Jensen V, Errington ML, Ramsay M, Chaudhry FA, Bliss TVP, Storm-Mathisen J, Morris RGM, Andersen P, Greengard P. Protein phosphatase-1 regulation in the induction of long-term potentiation: Heterogeneous molecular mechanisms. *J Neurosci.* 2000 May 15;20(10):3537-43.

Barrick CJ, Dong A, Waikel R, Corn D, Yang F, Threadgill DW, Smyth SS. Parent-of-origin effects on cardiac response to pressure overload in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Sep;297(3):H1003-9.

Barrick CJ, Rojas M, Schoonhoven R, Smyth SS, Threadgill DW. Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/J6 mice: temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 May;292(5):H2119-30.

Bhan A, Sirker A, Zhang J, Protti A, Catibog N, Driver W, Botnar R, Monaghan MJ, Shah AM. High-frequency speckle tracking echocardiography in the assessment of left ventricular function and remodeling after murine myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014 May;306(9):H1371-83.

Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias E, Molkentin JD. PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med.* 2004 March;10(3):248-54.

Breckenridge R. Heart failure and mouse models. *Dis Model Mech.* 2010 Mar-Apr;3(3-4):138-43.

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.* 1982 Jul 22;307(4):205-11.

Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing SL, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoli-Roach AA, Kranias EG. Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol.* 2002 Jun;22(12):4124-35.

Cohen P, Rylatt DB, Nimmo GA. The hormonal control of glycogen metabolism: the amino acid sequence at the phosphorylation site of protein phosphatase inhibitor-1. *FEBS Lett.* 1977 Apr 15;76(2):182-6.

Cohen P, Cohen PT. Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem.* 1989 Dec 25;264(36):21435-8

Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem.* 1989;58:453-508.

Collins KA, Korcarz CE, Lang RM. Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiol Genomics.* 2013 May 13;13(3):227-39.

Daniel WG, Baumgartner H, Gohlke-Bärwolf C, Hanrath P, Horstkotte D, Koch KC, Mügge A, Schäfers HJ, Flachskampf FA. Klappenvitien im Erwachsenenalter. *Clin Res Cardiol*. 2006 Nov;95:620-41.

Dodge-Kafka KL, Langeberg L, Scott JD. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circ Res*. 2006 Apr 28;98(8):993-1001. Review.

El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jäckel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J, Eschenhagen T. Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J*. 2003 Mar;17(3):437-9.

El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didié M, Dobrev D, Eschenhagen T. Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Aug 4;346(3):700-6.

El-Armouche A, Gocht F, Jaekel E, Wittköpper K, Peeck M, Eschenhagen T. Long-term beta-adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart. *Eur J Heart Fail*. 2007 Nov;9(11):1077-80.

El-Armouche A, Wittköpper K, Degenhardt F, Weinberger F, Didié M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsöld B, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T. Phosphatase inhibitor-1 deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2008 Dec 1;80(3):396-406.

El-Armouche A, Eschenhagen T. Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2009 Dec;14(4):225-41. Review.

Endo S, Zhou X, Connor J, Wang B, Shenolikar S. Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry*. 1996 Apr 23;35(16):5220-8.

Fabiato A, Fabiato F. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res*. 1977 Feb;40(2):119-29. Review.

Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, Witt H, Kararigas G, Dworatzek E, Staub E, Martus P, Ruiz Noppinger P, Kintscher U, Gustafsson JA, Regitz-Zagrosek V. Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 Jun;298(6):R1597-606.

Francis GS, Cohn JN, Johnson G, Rector TS, Goldman S, Simon A. Plasma norepinephrine, plasma rennin activity, and congestive heart failure. Relations to survival and the effects of therapy in V-HeFT II. *Circulation*. 1993 Jun;87(6 Suppl):VI40-8.

Freedman NJ, Liggett SB, Drachman DE, Pei G, Caron MG, Lefkowitz RJ. Phosphorylation and desensitization of the human β_1 -adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1995 Jul;270(30):17953-61.

Gao XM, Kiriazis H, Moore XL, Feng XH, Sheppard K, Dart A, Du XJ. Regression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Jun;288(6):H2702-7.

Garcia-Menendez L, Karamanlidis G, Kolwicz S, Tian R. Substrain specific response to cardiac pressure overload in C57BL/6 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Aug 1;305(3):H397-402.

Geyer H, Caracciolo G, Abe H, Wilansky S, Carerj S, Gentile F, Nessler HJ, Khandheria B, Narula J, Segupta PP. Assessment of myocardial mechanics using speckle tracking echocardiography: fundamentals and clinical applications. *J Am Soc Echocardiogr*. 2010 Apr;23(4):531-69.

Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Cardiol*. 1998 Nov;32(5):1454-9.

Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Aug;7(8):589-600. Review.

Heusch G, Libby P, Gersh B, Yellon D, Böhm M, Lopaschuk G, Opie L. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet*. 2014 May 31;383(9932):1933-43. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60107-0. Review.

Higuchi N, Nishi A, Higashi H, Ito Y, Kato H. Phosphorylation of protein phosphatase-1 inhibitors, inhibitor-1 and DARPP-32, in renal medulla. *Eur J Pharmacol*. 2000 Nov 17;408(2):107-16.

Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol*. 1993 Oct;22(4 Suppl A):6A-13A.

Hoit BD, Khoury SF, Kranias EG, Ball N, Walsh RA. In Vivo Echocardiographic Detection of Enhanced Left Ventricular Function in Gene-Targeted Mice With Phospholamban Deficiency. *Circ Res*. 1995; Sep;77(3):632-7.

Hu P, Zhang D, Swenson L, Chakrabarti G, Abel ED, Litwin SE. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Sep;285(3):H1261-9.

Huang FL, Glinsmann WH. Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*. 1976 Nov 15;70(2):419-26.

Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):225-36. Review.

Lairez O, Cognet T, Schaak S, Calise D, Guilbeau-Frugier C, Parini A, Mialet-Perez J. Role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in the development of cardiac hypertrophy in response to aortic constriction in mice. *J Neural Transm*. 2013 Jun;120(6):927-35.

Levitzki A. From epinephrine to cyclic AMP. *Science*. 1988 Aug 12;241(4867):800-6. Review

Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA*. 1996 May 22-29;275(20):1557-62.

Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*. 2002 Oct 31;347(18):1397-402.

Liao Y, Ishikura F, Beppu S, Asakura M, Takashima S, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogita H, Kuzuya T, Node K, Kitakaze M, Hori M. Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 May;282(5):H1703-8.

Liao Y, Asakura M, Takashima S, Ogai A, Asano Y, Shintani Y, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Kitamura S, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Celiprolol, a vasodilatory beta-blocker, inhibits pressure overload-induced cardiac hypertrophy and prevents the transition to heart failure via nitric oxide-dependent mechanisms in mice. *Circulation*. 2004 Aug 10;110(6):692-9.

Lip GY, Gibbs CR, Beevers DG. ABC of heart failure: aetiology. *BMJ*. 2000 Jan 8;320(7227):104-7.

Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res*. 2003 Nov 14;93(10):896-906. Review.

MacDougall LK, Jones LR, Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem*. 1991 Mar 28;196(3):725-34.

Mann DL, Kent RL, Parsons B, Cooper G, 4th. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation*. 1992 Feb;85(2):790-804.

McMurray JJ, Stewart S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart*. 2000 May;83(5):596-602. Review.

McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popoescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *Eur J Heart Fail*. 2012 Aug;14(8):803-69.

Meredith IT, Broughton A, Jennings GL, Esler MD. Evidence of a selective increase in cardiac sympathetic activity in patients with sustained ventricular arrhythmias. *N Engl J Med*. 1991 Aug 29;325(9):618-24.

Middlekauff HR, Mark AL. The treatment of heart failure: the role of neurohumoral activation. *Intern Med*. 1998 Feb;37(2):112-22. Review.

Mohammed SF, Srotlie JR, Oheler EA, Bowen LA, Korinek J, Lam CSP, Simari RD, Burnett JC, Redfield MM. Variable phenotype in murine transverse aortic constriction. *Cardiovasc Pathol*. 2012 May-June;21(3):188-98.

Mondillo S, Galderisi M, Mele D, Cameli M, Lomoriello VS, Zacà V, Ballo P, D'Andrea A, Muraru D, Losi M, Agricola E, E'Errico A, Buralli S, Sciomer S, Nistri S, Badano L. Speckle-tracking echocardiography. A new technique for assessing myocardial function. *J Ultrasound Med*. 2011 Jan;30(1):71-83. Review.

Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 2007 Sep;93(9):1137-46.

Movsesian MA, Karimi M, Green K, Jones LR. Ca²⁺-transporting ATPase, phospholamban, and calsequestrin levels in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation*. 1994 Aug;90(2):653-7.

Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*. 1994 Jun 9;369(6480):486-8.

Nagayama T, Takimoto E, Sadayappan S, Mudd JO, Seidman JG, Robbins J, Kass DA. Control of in vivo left ventricular contraction/relaxation kinetics by myosin binding protein C: protein kinase A phosphorylation dependent and independent regulation. *Circulation*. 2007 Nov 20;116(21):2399-408.

Nakamura A, Rokosh DG, Paccanaro M, Yee RR, Simpson PC, Grossman W, Foster E. LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Sep;32(5):1418-25.

Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC, Watanabe AM. Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res*. 1991 Dec;69(6):1450-7.

Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Jan;29(1):265-72.

Neumann J. Altered phosphatase activity in heart failure, influence on Ca²⁺ movement. *Basic Res Cardiol*. 2002;97 Suppl 1:191-5. Review.

Nicolaou P, Rodriguez P, Ren X, Zhou X, Qian J, Sadayappan S, Mitton B, Pathak A, Robbins J, Hajjar RJ, Jones K, Kranias EG. Inducible expression of active protein phosphatase-1 inhibitor-1 enhances basal cardiac function and protects against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*. 2009 Apr 24;104(8):1012-20.

Nicolaou P, Hajjar RJ, Kranias EG. Role of protein phosphatase-1 inhibitor_1 in cardiac physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol*. 2009 Sep;47(3):365-71. Review.

Oliver CJ, Shenolikar S. Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci*. 1998 Sep 1;3:D961-72. Review.

Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz JE, Lorenz JN, Bodi I, Weiser D, Hahn H, Carr AN, Syed F, Mavila N, Jha L, Qian J, Marreez Y, Chen G, McGraw DW, Heist EK, Guerrero JL, DePaoli-Roach AA, Hajjar RJ, Kranias EG. Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ Res*. 2005 Apr 15;96(7):756-66.

Peck M. The role of protein phosphatase inhibitor 1 in the initial phase after transverse aortic constriction in a murine model. *Hamburg 2011*. <http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2011/5390>.

Peng Y, Popovic ZB, Sopko N, Drinko J, Zhang Z, Thomas JD, Penn MS. Speckle tracking echocardiography in the assessment of mouse models of cardiac dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Aug;297(2):H811-20.

Polhemus DJ, Kondo K, Bhushan S, Bir SC, Kevil CG, Murohara T, Lefler DJ, Calvert JW. Hydrogen sulfide attenuates cardiac dysfunction after heart failure via induction of angiogenesis. *Circ Heart Fail.* 2013 Sep 1;6(5):1077-86.

Popovic ZB, Benejam C, Bian J, Man N, Drinko J, Lee K, Forudi F, Reeg R, Greenberg NL, Thomas JD, Penn MS. Speckle-tracking echocardiography correctly identifies segmental left ventricular dysfunction induced by scarring in a rat model of myocardial infarction. *Am J Physiol heart Circ Physiol.* 2007 Jun;292(6):H2809-16.

Ram R, Mickelsen DM, Theodoropoulos C, Blaxall BC. New approaches in small animal echocardiography: imaging the sounds of silence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Nov;301(5):H1765-80.

Rapundalo ST. Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res.* 1998 Jun;38(3):559-88. Review.

Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilper ME, Field LJ, Ross J Jr, Chien KR. 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.* 1991 Sep 15;88(18):8277-81.

Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature.* 2002 Jan 10;415(6868):206-12. Review.

Roth DM, Swaney JS, Dalton ND, Gilpin EA, Ross John Jr. Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Jun;282(6):H2134-40.

Sahin B, Shu H, Fernandez J, El-Armouche A, Molckentin JD, Nairn AC, Bibb JA. Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by protein kinase C. *J Biol Chem.* 2006 Aug 25;281(34):24322-35.

Saucerman JJ, McCulloch AD. Cardiac beta-adrenergic signaling: from subcellular microdomains to heart failure. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct;1080:348-61. Review.

Schmidt U, Hajjar RJ, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, Gwathmey JK. Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca(2+)-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. *Am J Physiol.* 1999 Aug;277(2 Pt 2):H474-80.

Schwinger RH, Münch G, Bölcck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced Ca (2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Mar;31(3):479-91.

Senni M, Paulus WJ, Gavazzi A, Fraser AG, Díez J, Solomon SD, Smiseth OA, Guazzi M, Lam CS, Maggioni AP, Tschöpe C, Metra M, Hummel SL, Edelmann F, Ambrosio G, Stewart Coats AJ, Filippatos GS, Gheorghiade M, Anker SD, Levy D, Pfeffer MA, Stough WG, Pieske BM. New Strategies for heart failure with preserved ejection fraction: the importance of targeted therapies for heart failure phenotypes. *Eur Heart J.* 2014 Oct 21;35(40):2797-2815.

Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, Myers P, Demianenko T, Mao L, Rockman HA, Korach KS, Murphy E. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Feb;288(2):H469-76.

Stewart S, Jenkins A, Buchan S, McGuire A, Capewell S, McMurray JJ. The current cost of heart failure to the National Health Service in the UK. *Eur J Heart Fail.* 2002 Jun;4(3):361-71.

Szucs TD. Gesundheitsökonomische Aspekte der chronischen Herzinsuffizienz. *Schweizerische Ärztezeitung.* 2003;84(46):2431-41.

Tada M, Kirchberger MA, Repke DI, Katz AM. The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1974 Oct 10;249(19):6174-80.

Toyofuku T, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH. Identification of regions in the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum that effect functional association with phospholamban. *J Biol Chem.* 1993 Feb 5;268(4):2809-15.

Trautwein W, Hescheler J. Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G proteins. *Annu Rev Physiol.* 1990;52:257-74. Review.

Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation.* 1993 Feb;87(2):454-63.

Yang XP, Liu YH, Rhaleb NE, Karihara N, Kim HE, Carretero OA. Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *Am J Physiol.* 1999 Nov;277(5 Pt 2):H1967-74.

Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD. Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res.* 1995 Jun;76(6):1028-35.

Zhou YQ, Foster FS, Nieman BJ, Davidson L, Chen XJ, Henkelman RM. Comprehensive transthoracic cardiac imaging in mice using ultrasound biomicroscopy with anatomical confirmation by magnetic resonance imaging. *Physiol Genomics.* 2004 Jul 8;18(2):323-44.

Online-Ressourcen

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden: www.destatis.de

Nationale Versorgungsleitlinie Herzinsuffizienz (Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften): www.versorgungsleitlinien.de

National Heart, Lung, and Blood Institute (U.S. Department of Health): www.nhlbi.nih.gov

9. Anhang

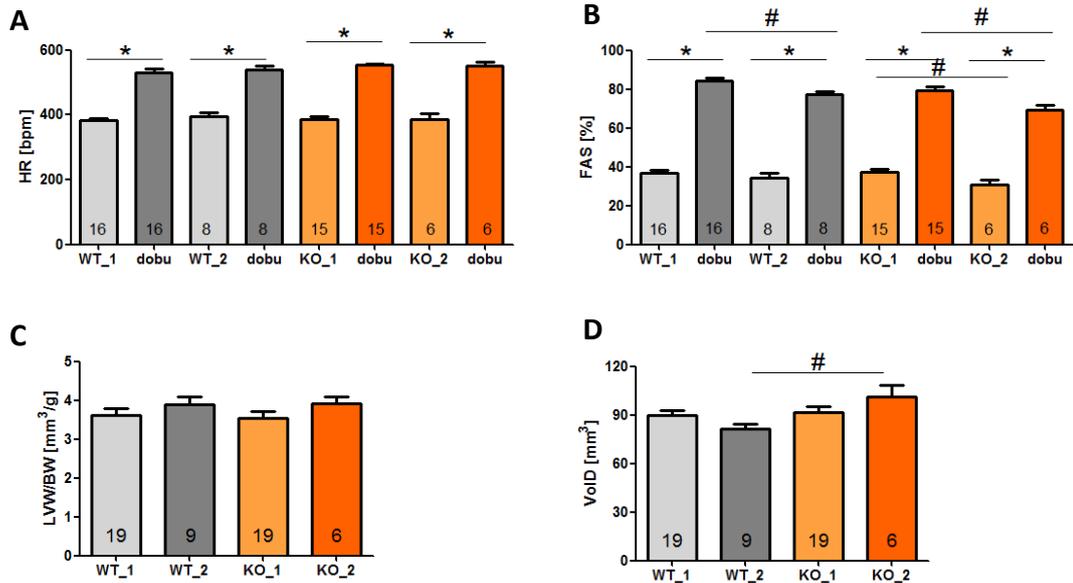


Abb. A.1: Präoperativer Vergleich der verschiedenen Interventionsgruppen. Die Gruppen zeigen eine einheitliche HR-Steigerung nach Dobutamin-Applikation (A). Die Interventionsgruppen WT₂ (aus Het₁₁KO und Charles River) und KO₂ (aus Het-11-KO) zeigen signifikant geringere Δ FAS nach Dobutamin (B). Dabei ist KO₂ basal gegenüber KO₁ erniedrigt (B), zeigt jedoch gegenüber allen Gruppen ein erhöhtes VoID (D). Das LVW/BW ist zwischen den Gruppen vergleichbar (C). * $p < 0,05$ im gepaarten t-Test ; # $p < 0,05$ im ungepaarten t-Test.

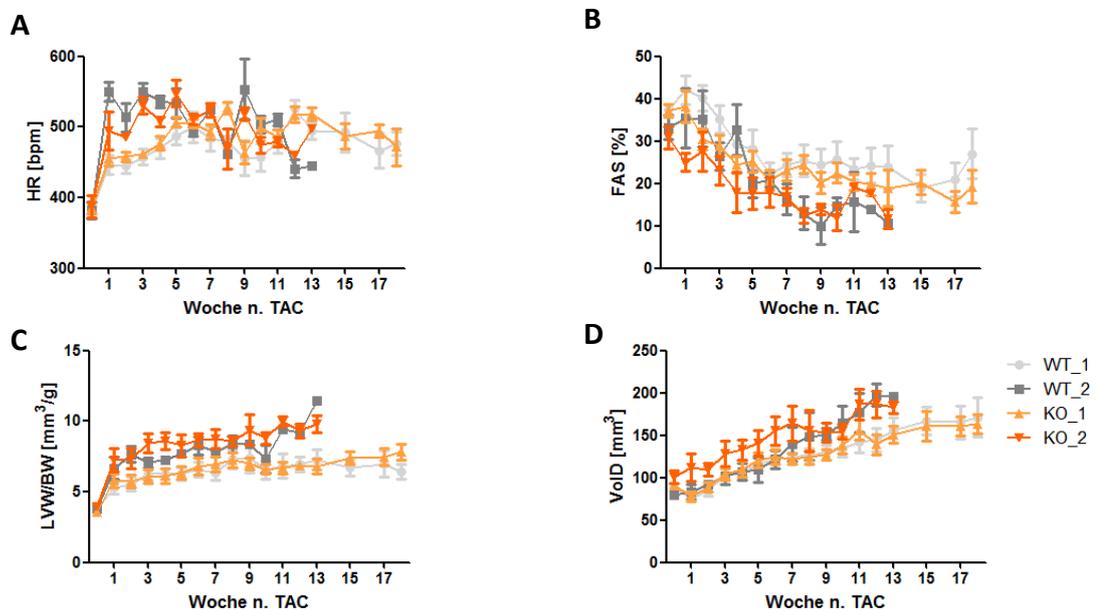


Abb. A.2: Vergleich der verschiedenen Interventionsgruppen im Verlauf der Herzinsuffizienz. Die Gruppen WT₂ und KO₂ zeigen tendenziell höhere HR in den ersten Wochen (A), eine niedrigere FAS (B), eine größere Zunahme des LVW/BW (C) und eine stärkere Zunahme des VoID (D). Da diese Abweichungen sowohl in WT^{TAC} als auch in KO^{TAC} auftreten, ist nicht von einer Verzerrung der Ergebnisse auszugehen.

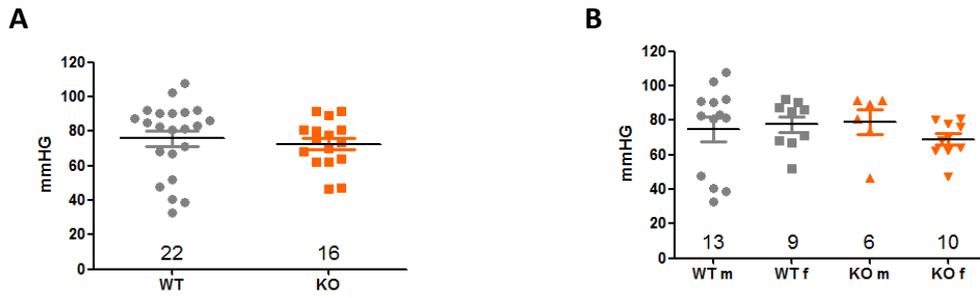


Abb. A.3: Verteilung der Gradienten für die Gesamtgruppen (A) und getrennt nach Geschlecht (B).

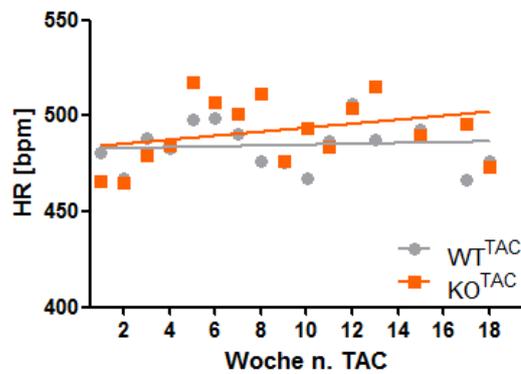


Abb. A.4: Lineare Regression der mittleren HR ab Woche 1 nach TAC.

Die HR bleibt über den Versuchszeitraum konstant.

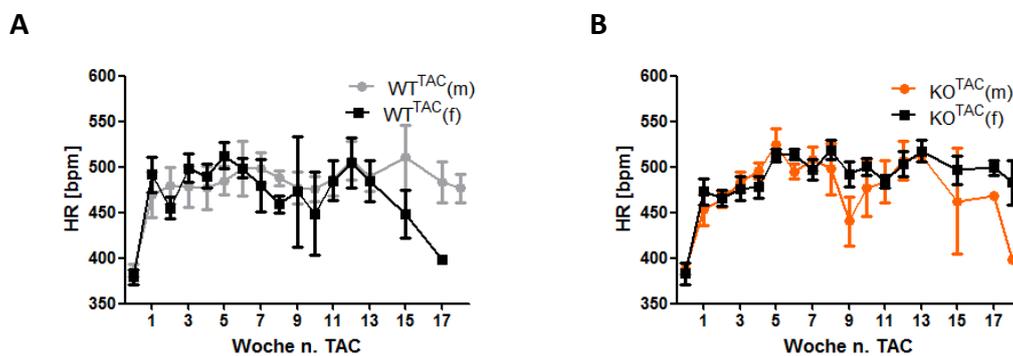


Abb. A.5: Identisches Niveau der HR in WT^{TAC} (A) und KO^{TAC} (B) unabhängig vom Geschlecht.

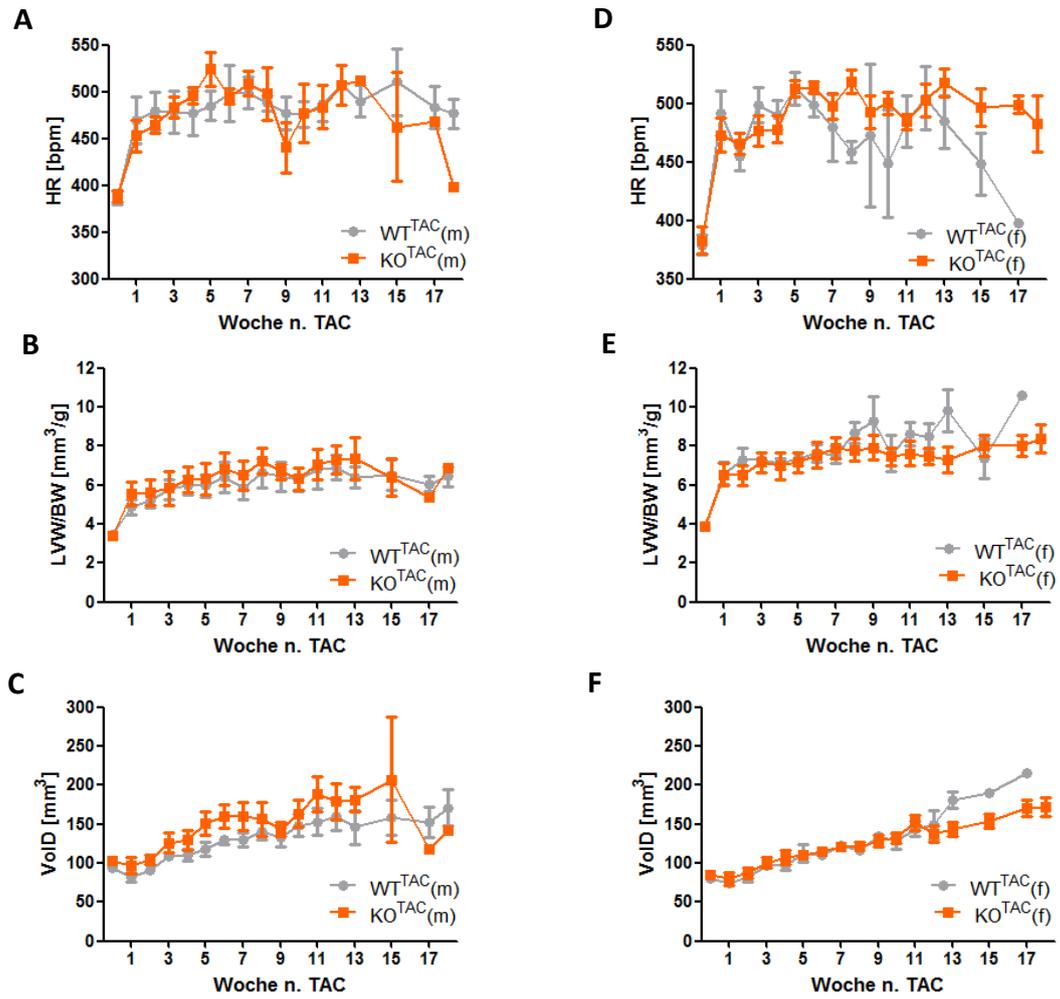


Abb. A.6: Geschlechtsbezogener Vergleich der Gruppen WT^{TAC} und KO^{TAC}. Der Verlauf der Herzinsuffizienz zeigt hinsichtlich HR, LVW/BW und VoID zwischen männlichen (A-C) und weiblichen Tieren (D-F) keine wesentlichen Unterschiede.

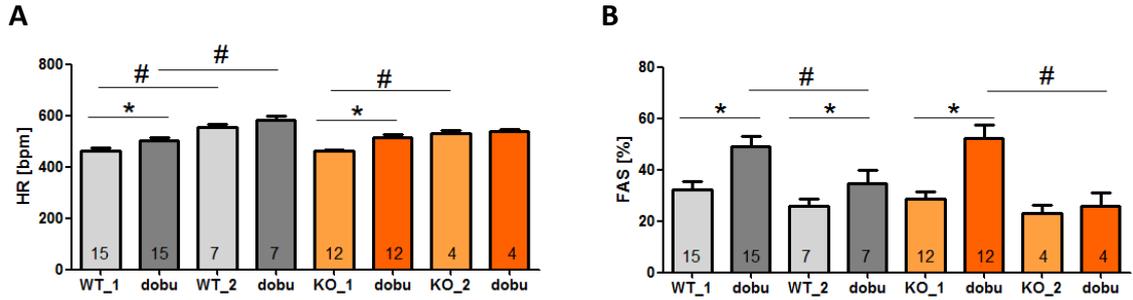


Abb. A.7: Vergleich der Interventionsgruppen in Woche 3 n. TAC. Die zweite Interventionsgruppe zeigt in WT^{TAC} und KO^{TAC} bereits basal erhöhte Herzfrequenzen, die auf Dobutamin-Applikation nicht mehr steigerungsfähig sind (A). Die FAS hingegen ist in der zweiten Interventionsgruppe in WT^{TAC} und KO^{TAC} gleichermaßen geringer ausgeprägt (B). Der Ausschluss der zweiten Interventionsgruppe der KO^{TAC} im Rahmen der Analyse der Kontraktilität nach β -adrenerger Stimulation infolge HR-Steigerung < 20 /min führte zu einer Verzerrung mit resultierenden höheren FAS-Werten nach Dobutamin-Applikation in KO^{TAC} (vgl. Kap. 3.3.4). * $p < 0,05$ im gepaarten t-Test ; # $p < 0,05$ im ungepaarten t-Test.

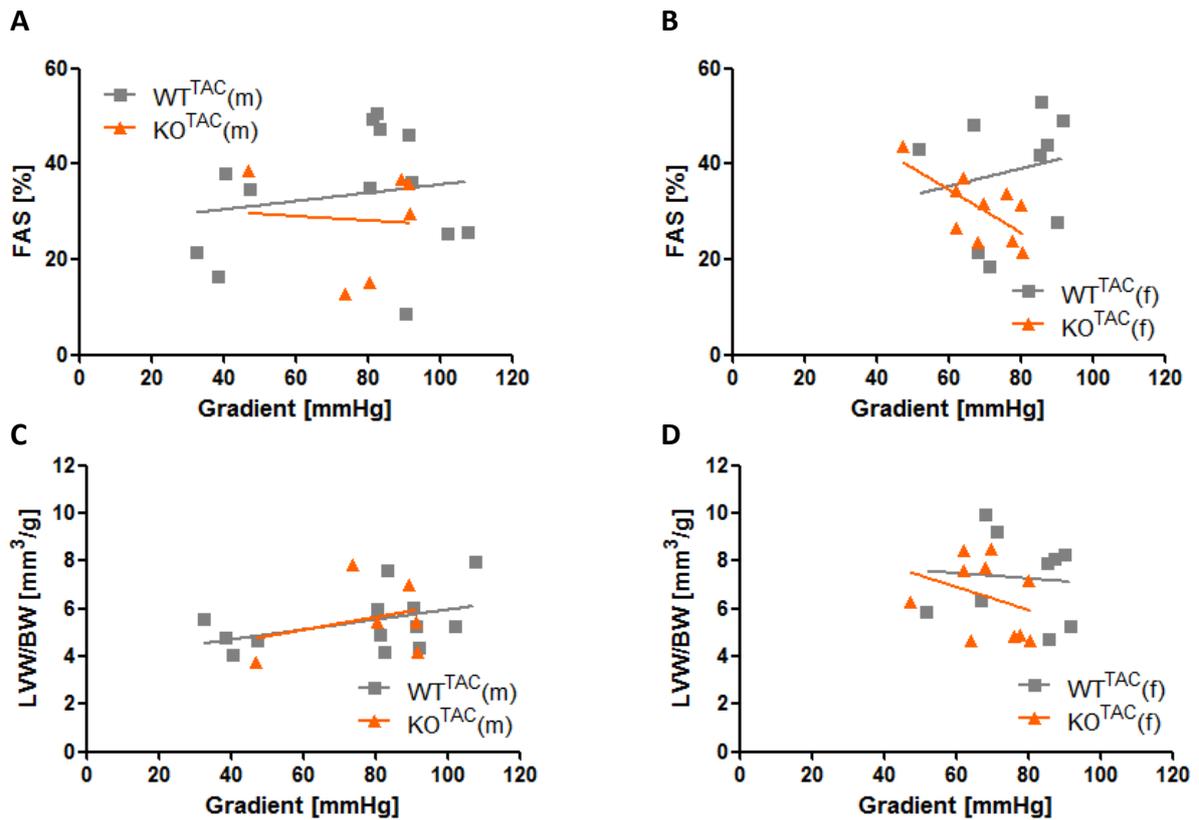


Abb. A.8: Korrelation zwischen Gradient und FAS bzw. LVW/BW in Woche 2 n. TAC. Die Überprüfung der linearen Korrelationen für die ersten vier Wochen ergab nur sporadisch einen signifikanten Zusammenhang. Für Woche 2 bestand eine negative Korrelation zwischen Gradient und FAS bei KO^{TAC}(f) (B) mit $p = 0,03$ und Pearsons $r = -0,67$.

**Technische Universität Dresden
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus
Promotionsordnung vom 24. Juli 2011**

Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

- Prof. Dr. Ali El-Armouche
- Dr. rer. nat. Christiane Vettel
- Dr. rer. nat. Silvio Weber
-
-
-

3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht:

- nicht zutreffend
-

6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.

7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.

8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Ort, Datum Göttingen, 18.01.2016

Unterschrift des Doktoranden

(Diese Erklärungen sind an das Ende der Arbeit einzubinden) Formblatt 1.2.1, Seite 1-1, erstellt 18.10.2013

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation

- das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen
Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommissionentfällt.....
- die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes
Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung
33.14-42502-04-10/0065 (Nieders. Landesamt f. Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit)
- die Einhaltung des Gentechnikgesetzes
ProjektnummerAZ 501.40611/0113/503 (Staatliches Gewerbeaufsichtsamt Göttingen)....
- die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Ort, Datum

Göttingen, 18.02.2016

Unterschrift des Doktoranden