

**Diplomarbeit**

**Dehnungsabhängige Genexpression am isolierten  
humanen Myokard**

eingereicht von

**Martin Calineata**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Institut / Klinik für Kardiologie**

unter der Anleitung von

**Priv. Doz. Dr. Egbert Bisping**

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 13.03.2015*

*Martin Calineata eh*

# Vorwort

Meine Entscheidung mich mit dieser Diplomarbeit auf der Kardiologie zu beschäftigen ist der erste Schritt meiner gewählten Karriere, ein Kardiologe zu werden. Die Physiologie und Therapie von kardialen Erkrankungen und der dazugehörige Pathomechanismus ist schon seitdem Modul „Herz Kreislaufsystem“ für mich immer eines der interessantesten Themengebiete gewesen.

Mit diesem Thema habe ich dank Priv. Doz. Dr. Bisping die Möglichkeit erhalten, mein Wissen im Bereich der Hypertrophie zu vertiefen. Ich danke Priv. Doz. Dr. Bisping vielmals für seine Hilfe und Unterstützung während der Entstehung der Arbeit durch welche ich zu unglaublich wichtigen Einblicken in das wissenschaftliche Arbeiten kam. beispielweise wie man eine Thematik angeht, um zu einem Ergebnis zu kommen, oder wie man ein Experiment plant. Natürlich auch Geduld und die Erkenntnis, dass die Wissenschaft Murphys Gesetz folgt und alles was schief gehen kann schief geht.

Zu guter letzt auch zu der Erkenntnis, dass unabhängig von Fleiß und Aufwand nicht immer ein positiver Abschluss einer mühsamen Arbeit bleibt.

Die Techniken und das Wissen was ich mir auf Ebene der RNA-Isolation und der PCR erarbeiten konnte sind wertvolle Fähigkeiten für meine weitere Arbeit.

# Danksagungen

Ich möchte als erstes meiner Familie danken. Vor allem meiner Mutter und meinem Vater. Sie unterstützen mich bei jeder meiner Entscheidungen, auch wenn sie häufig nicht der gleichen Meinung waren wie ich.

Meiner Mutter möchte ich für ihren Rat danken und dafür, dass sie in ihrer Art immer optimistisch ist und stets davon ausgeht, dass es zum Besten für mich ausgeht.

Ich danke natürlich auch meinem Vater für die Unterstützung und die zahllosen Gespräche, mit welchen er mir über schwere Zeiten und Motivationsmangel hinweggeholfen hat.

Meinen alten Freunden in der Heimat möchte ich dafür danken, dass sie meine Abwesenheit nicht nur akzeptierten, sondern mir bei meinen Besuchen zuhause immer das Gefühl vermittelten, dass ich niemals weg war. Es hilft unglaublich zu wissen, dass man zuhause diesen Rückhalt an Familie und Freunden hat und einen Ort, an den man immer zurückkehren kann, um den Stress der Uni hinter sich zu lassen.

Meinen neuen Freunden in Graz möchte ich dafür danken, dass sie aus meiner *Flucht in die Ferne* ein *Erwachen in der Heimat* gemacht haben. Ohne diese neue Bekanntschaften hätte ich mich niemals so wohl in Graz gefühlt. Und nur ihnen allen ist es zu verdanken, dass Graz ein Ort ist, an welchen ich immer wieder gerne zurückkehren werde.

Natürlich möchte ich auch meinen Betreuern danken. Vor allem dafür, dass sie meine anfängliche Unwissenheit akzeptiert haben und mich gefördert haben, so dass ich viel durch diese Arbeit gelernt habe, das mich sicher in meiner weiteren Karriere weiterbringen wird.

Als Letztes möchte ich mich bei meiner Freundin Nina bedanken. Sie ist seit 6 Jahren mein Rückhalt und sie hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Durch Tipps und Lesen der Arbeit hat sie mir den Blick auf die Arbeit gegeben, den wohl eine hochinteressierte und zugleich zum Blick über den Tellerrand fähige Außenstehende hat. Aber am meisten möchte ich ihr für ihre Akzeptanz und den Rückhalt danken, wenn ich manchmal bis spät in die Nacht im Labor gegessen bin und ich auch spontan Wochenenden absagen musste, und sie dies akzeptierte und mich immer unterstützt hat.

# Zusammenfassung

## Hintergrund:

Dehnung ist ein sehr wichtiger Auslöser von kardialem Remodeling. Mehrere durch Dehnung verursachte strukturelle Veränderungen, wie zum Beispiel Hypertrophie, Fibrose und Entzündung wurden in der Literatur beschrieben. Doch je genauer man sich auf die frühen und sehr frühen Veränderungen fokussiert desto offensichtlicher wird eine Wissenslücke. Die Hypothese dieser Diplomarbeit war, dass das sehr frühe Remodeling durch Dehnung im isolierten menschlichen Myokard induzierbar ist und das dies durch Veränderungen der Genexpression bereits nach wenigen Stunden nachweisbar ist.

## Methode:

Muskelstreifen(Trabekel) wurden aus zwei verschiedenen Quellen bezogen; A) Atriales Myokard des rechten Vorhofohr (Auriculum) von Patienten, welche sich einer offenen Herzoperation unterzogen. B) Ventrikuläres Myokard von Organspendern, welche aufgrund von technischen oder medizinischen Gründen nicht für eine Organtransplantation geeignet waren. Als Reaktion auf elektrische Stimulation kontrahierten die Trabekel in einem Organbad unter physiologischen Bedingungen. Die Interventions-Gruppe wurde gedehnt und kontrahierte isometrisch (entspricht maximaler Vorlast und Nachlast). Die Kontrolle verblieb dehnungsfrei (keine Vorlast und fast isotonische Kontraktionen). Nach entweder 6 oder 8 Stunden wurden die Trabekel in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur RNA Isolation und dazugehöriger quantitativen Realtime - Polymerase Ketten Reaktion (qRT- PCR) gelagert. In der qRT – PCR wurden 5 Hypertrophie-Markergene, 2 Fibrose-Markergene, 1 Entzündungs-Markergene und ein Signalweg-Markergen getestet.

## Ergebnis:

Dehnung induzierte eine Hochregulation von allen getesteten Genen im atrialen Myokard. Die maximalen Anstiege für die Hypertrophie-marker waren: BNP 10,94 fache nach 8 Stunden, ANP 4,31 fache nach 8 Stunden, ACTA1 15,03 fache nach 8 Stunden, MYH7 3,2 fache nach 6 Stunden, FHL1 3,94 fache nach 8 Stunden.

Für die Fibrose Marker war das Ergebnis ähnlich: TGFbeta 3,17 fache nach 6 Stunden, TIMP3 10,07 fache nach 6 Stunden. Der Entzündungs-marker IL6R wurde hochreguliert um das 12,17 fache nach 6 Stunden und das Markergen des Signalweges RCAN 1 zeigte eine 5,94 fache Hochregulation nach 6 Stunden an.

Im Gegensatz dazu zeigte im ventrikulären Myokard nur ANP eine 2,29 fache Hochregulation nach 8 Stunden.

#### Diskussion:

Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass es bereits nach 6 oder 8 Stunden durch akute Dehnung zu einer Induktion und Expressionssteigerung von Hypertrophie-, Fibrose- und Entzündungsmarkern im humanen Myokard kommt. Dies konnte im Ventrikelmyokard für ANP gezeigt werden aber nicht für andere Marker, das lässt sich durch die verringerte Zahl an Proben des seltener verfügbaren Ventrikel Myokards erklären.

# Abstract

## Background:

Stretch is a very important trigger of cardiac remodeling. Several details about structural changes such as hypertrophy, fibrosis and inflammation induced by stretch have been described in the literature already. However, the more the focus is on early and very early changes as the initiating processes of cardiac remodeling, a broader lack of knowledge becomes evident. The hypothesis in this diploma thesis was, that very early remodeling is inducible in isolated human myocardium by stretch and that this is detectable by gene expression changes within very few hours.

## Method:

Muscle strip preparations (trabeculae) were obtained from two different sources: a) Atrial myocardial of the right atrial auriculae of patients undergoing open chest cardiac surgery. b) Ventricular myocardium deriving from organ donor patients, where due to medical or technical reasons the hearts were not suitable for organ transplantation. In response to electrical stimulation the trabeculae were contracting in an organ bath at physiological conditions. The intervention group was stretched and contracting isometrically (consistent with maximal pre- and afterload). The control group was kept unloaded (no preload and almost isotonical contractions). After either 6 or 8 hours the trabeculae got shock frozen in liquid nitrogen and stored until used for RNA isolation and subsequent gene expression analysis by quantitative realtime polymerase chain reaction (qRT-PCR): 5 hypertrophy marker genes, 2 fibrosis and 1 inflammation marker gene and 1 signaling pathway marker gene were tested.

## Results:

Stretch induced an upregulation of the expression of all tested genes in atrial myocardium. The maximum increases for the hypertrophy marker genes were: BNP 10,94fold after 8 hours, ANP 4,31fold after 8 hours, ACTA1 15,03fold after 8 hours, MYH7 3,2fold after 6 hours, FHL1 3,94fold after 8 hours.

For the fibrosis marker genes this was similar: TGFbeta 3,17fold after 6 hours, TIMP3 10,07fold after 6 hours: Furthermore the inflammation marker IL6R got upregulated 12,17fold after 6 hours, and the signalling marker RCAN1 5,94fold after 6 hours.

In contrast, in ventricular myocardium only ANP showed a 2,29 fold increase after 8 hours, whereas the other genes were not upregulated.

Conclusion:

This leads to the assumption that already after 6 or 8 hours there is an induction of hypertrophy markers, fibrosis markers and inflammation markers in human atrial myocardium after application of an acute stretch. This was resembled in ventricular myocardium for the hypertrophy marker ANP but not for other markers, which might be explained by the reduced sample size due to the limited availability of ventricular samples.

# Glossar und Abkürzungen

ACTA1 – alpha skeletal Actin 1  
ACTC1 - actin, alpha, cardiac muscle 1  
AGTR-1 – Angiotensinogen Receptor 1  
ANP – Atriales natriuretische Peptid  
BNP – B –natriuretische Peptid  
CABG - Coronar artery bypass grafting  
CAMK-II- Calmodulin-Kinase II  
cAMP – zyklisches Adenosin Monophosphat  
CaN – Calcineurin  
CHF - Congestive Heart Failure  
DAG - Dyacylglycerol  
DCMP – Dilatative Kardiomyopathie  
EC-Coupling – Exzitation-Kontraktions-Kopplung  
EF - Ejection fraction  
ET-Coupling – Exzitation-Transkriptions-Kopplung  
FHL-1 – four-and-a-half-lim 1  
GDF-15 – Growth differentiation Factor 15  
GPCR - G-Protein coupled Receptor  
HDAC - Histone deacetylase 4/5  
HFpEF - heart failure with preserved Ejection fraction  
ICMP –Ischämische Kardiomyopathie  
IL6R – Interleukin-6-Rezeptor  
IP-3 – Inositoltriphosphat  
IP3 - Inositol triphosphat  
LTCC - L-Type-Calcium-Channels  
MAP-Kinase - Mitogen-activated protein Kinase  
PIP2 - Inositol Biphosphat  
PKA – Phosphokinase A  
RAAS - Renin-Angiotensin-Aldosteron System  
RCAN-1 – Regulator of Calcineurin  
TEF1 - TEA domain transcription factor-1  
TIMP 3 – Tissue inhibitor of metalloproteinases-3

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Houser R. Steven, Molkentin D. Jeffrey (1).....	8
Abbildung 2 Alves A. J. et al. (44).....	10
Abbildung 3 Kuwahara, Nishikimi, & Nakao, 2012 (27) .....	12
Abbildung 4 modifiziert nach Kuwahara, Nishikimi, & Nakao, 2012 (27) .....	12
Abbildung 5 Organbad .....	18
Abbildung 6 unten der Stimulator, oben das Thermostat.....	19
Abbildung 7 Trabekel in einem Organbad .....	20
Abbildung 8 In Labchart aufgezeichnetes Protokoll mit Dehnungsschritten.....	22
Abbildung 11 Bioanalyser Ergebnis.....	25

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 .....	17
Tabelle 2 .....	27
Tabelle 3 .....	28
Tabelle 4 .....	29
Tabelle 5 .....	63
Tabelle 6 .....	63
Tabelle 7 .....	64
Tabelle 8 .....	64

# Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	ii
Danksagungen.....	iii
<b>Zusammenfassung</b> .....	iv
<b>Abstract</b> .....	vi
Glossar und Abkürzungen .....	viii
Abbildungsverzeichnis.....	ix
Tabellenverzeichnis .....	x
Inhaltsverzeichnis .....	xi
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Bedeutung von Dehnung und Genexpression im menschlichen Herzen .....	1
1.2 Remodelingvorgänge im menschlichen Herzen.....	2
1.3 Genexpressionsmuster mit Beziehung zum kardialen Remodeling: .....	4
1.3.1 Markergene für Hypertrophie.....	4
1.3.2 Markergene für Fibrose .....	6
1.3.3 Markergene für Inflammation .....	7
1.3.4 Markergene für Signalgebung .....	7
1.4 Mechanismen der Genregulation.....	8
1.5 Signalkaskaden des kardialen Remodeling .....	11
1.6 Hypothese und Fragestellung .....	13
<b>2 Methode</b> .....	14
2.1 Gewebe .....	14
2.1.1 Ventrikelmyokard.....	14
2.1.2 Vorhofmyokard .....	15
2.2 Präparation und Transport .....	15
2.3 Verwendete Substanzen.....	16
2.3.1 Tyrode-Lösung .....	16
2.3.2 2,3-Butan-Dion-Monoxim Lösung (BDM).....	17
2.4 Geräte.....	18
2.5 Versuchsablauf .....	20
2.5.1 . Einhängen .....	20
2.5.2 Entnahme und Einfrieren.....	22
2.6 Genexpression .....	23

2.6.1	Homogenisierung und Lyse.....	23
2.6.2	RNA Isolation.....	24
2.6.3	cDNA Synthese .....	26
2.6.4	Quantitative Real-Time Polymerase Ketten Reaktion(qRT-PCR).....	28
2.7	Statistische Auswertung .....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1	BNP .....	34
3.2	ANP .....	36
3.3	FHL1.....	37
3.4	MYH7.....	39
3.5	TGFB1.....	41
3.6	RCAN1 .....	43
3.7	ACTA1 .....	44
3.8	IL6R.....	46
3.9	TIMP3.....	47
3.10	Subgruppenanalyse.....	49
3.11	Genexpression im Ventrikel .....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>55</b>
4.1	BNP .....	55
4.2	ANP .....	56
4.3	FHL1.....	57
4.4	MYH7.....	57
4.5	TGFB.....	58
4.6	RCAN1 .....	59
4.7	ACTA1 .....	60
4.8	IL6R.....	61
4.9	TIMP3.....	61
4.10	Limitationen .....	62
	Anhang –Tabellen.....	63
	Literaturverzeichnis .....	65
	Anhang –Projektplan .....	70

# 1 Einleitung

## ***1.1 Bedeutung von Dehnung und Genexpression im menschlichen Herzen***

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von akuter Dehnung auf die Genexpression des menschlichen Herzens. Als Reaktionen auf einen pathologischen Reiz können Strukturveränderungen (Remodeling) beginnend in der Zelle und im Verlauf im gesamten Herzen stattfinden. All diesen Veränderungen gehen Änderungen der Proteinexpression und diesen wiederum Änderungen der Genexpression voraus. Änderungen der Genexpression sind somit sehr frühe Veränderungen, die teilweise in einem bereits sehr kurzem Zeitraum nach Beginn des Reizes erfasst werden können und haben für die Anpassung des Herzens an Lastzustände die Bedeutung einer Grundsteinlegung haben.

Ein häufiger und sehr starker pathologischer Reiz für das Herz ist eine Druckbelastung mit erhöhter Nachlast oder eine Volumenbelastung mit erhöhter Vorlast. Eine anhaltende Dehnung auf Zellebene kann beides erreichen, eine erhöhte Vor- und erhöhte Nachlast. Folgende klinische Beispiele zeigen dieses Phänomen:

Bei Patienten/innen mit Hypertonie oder Aortenstenose wird die Nachlast gesteigert und das Herz muss mehr Arbeit leisten um das Herz-Zeit-Volumen aufrecht zu halten. Es kommt hierdurch zu einer Erhöhung des Wandstress im Herzen und bei fortschreitendem Verlauf auch zu einer Zunahme des enddiastolischen Volumens. Durch den erhöhten Druck und zusätzlich die Dilatation der betroffenen Herzkammer entsteht ein erhöhter Wandspannungsstress (vgl. Gesetz von Laplace) woraufhin ein dauerhafter Umbau des Herzens vermittelt wird. Sehr akut kann dies auch bei einem Herzinfarkt einsetzen, wichtig ist dabei, zu verstehen, dass nicht nur das Infarktareal, sondern durch die akute Mehrbelastung und Dehnung von Herzmuskelzellen auch die Nicht-Infarktzone in Umbauprozesse wie Hypertrophie und Fibrose einbezogen werden. Auf Vorhofebene ist eine Trikuspidalinsuffizienz oder ein pulmonal arterieller Hypertonus für den rechten Vorhof und Mitralvitien und die diastolische Dysfunktion mit erhöhtem linksventrikulären enddiastolischen Volumen für den linken Vorhof typische Beispiele für einen chronischen Reiz. Bei beiden Pathologien kann es zu einer atrialen Dehnung kommen.

In dieser Diplomarbeit wurde versucht, den Einfluss eines zeitlich kurzen Reizes auf die Genexpression direkt am isolierten menschlichen Herzmuskel (Vorhof- und Ventrikelmyokard) nachzuweisen. Die Durchführung erfolgte an isolierten Muskelstreifen (Trabekeln), die über mehrere Stunden in einem Organbad entweder gedehnt oder dehnungsfrei (Kontrollgruppe) Kontraktionen ausführen. Es wurden gezielt Markergene verschiedener, spezifischer Remodeling-Vorgänge untersucht. Es besteht eine hohe Relevanz und Aussagekraft dieser Untersuchungen, da der Reiz sehr spezifisch für eine Druckbelastung ist und durch die Verwendung von humanem Myokard eine hohe Aussagekraft über die Veränderungen und Signalwege beim Menschen getroffen werden kann.

## **1.2 Remodelingvorgänge im menschlichen Herzen**

Das Remodeling des menschlichen Herzens beschreibt die Änderungen von Form, Größe und Funktion von zellulären und subzellulären Strukturen und im Verlauf sichtbaren Veränderungen des Gewebes (histologisch) und des gesamten Organs (makroskopisch) mit einhergehendem Funktionsverlust (2-4). Hierbei liegen teilweise nützliche (adaptive) und teilweise pathophysiologische Adaptionsmechanismen vor, welche den Progress negativer Veränderungen weiter fördern. Eine Vielzahl verschiedener Belastungssituationen des Herzens kann einen Remodeling-Prozess initiieren und im Verlauf fortwährend unterhalten.(5, 6).

Klinisch sehr relevant ist das Remodeling im Rahmen einer Postinfarkt Nekrose. Im Zentrum des Infarktes besteht dabei ein Zelltod, im Randgebiet für die Myokardzellen hingegen eine teilweise reversible Schädigung durch eine Unterversorgung mit Sauerstoff, die sich auf zellulärer Ebene mit einer Adaption des Zellstoffwechsel äußert (7, 8). Doch auch das eigentlich unbeteiligte Gewebe („remote myocardium“) beginnt sich aufgrund der zu leistenden kompensatorischen Mehrarbeit zu verändern: Durch dort anliegenden Wandspannungsstress beginnt das Herz mit maladaptiven Remodeling Prozessen. Der beim Infarkt entstandene Funktionsverlust äußert sich makroskopisch in Hypokinesie oder Akinesie der Kammerwand. Hierdurch erhöht sich der enddiastolische Druck in der Kammer, da nicht mehr das komplette Schlagvolumen ausgeworfen werden kann (9). Durch den erhöhten Druck steigt die Nachlast gegen die der Ventrikel arbeiten muss. Über eine Erhöhung der Wandspannung werden die Myokard Zellen also einer kontinuierlichen

Dehnung ausgesetzt, durch welche die Kalziumhomöostase gestört wird und im Herzen maladaptive Remodeling Prozesse weiter unterhalten werden.(10)

Eine sehr akute Dehnung erfahren die Herzmuskelzellen aber auch z.B. bei einer hypertensiven Krise, welche eintritt, wenn ein Patient/In mit Blutdrücken von über 230/130mmHg behandelt werden muss (11). In der hypertensiven Krise ist die Nachlast des Herzens massiv gesteigert. Der diastolische Druck muss bei jedem Herzschlag überwunden werden um das Schlagvolumen zu gewährleisten. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass hierbei bereits kurze Zeiträume ausreichen um Remodeling-Prozesse im Herzen zu aktivieren (12).

Durch die Dehnung auf Zellebene und die erhöhte Wandspannung auf Organebene und im Verlauf einsetzende Adaptionsmechanismen des Körpers wie zum Beispiel durch ein aktiviertes Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) bei Hypertonie (13), kommt es zur Induktion von Remodelingprozessen. Diese umfassen unter anderem (14-17):

- Frühe Veränderungen im Metabolismus und in der Ionenhomöostase der Zellen (incl. anhaltendem elektrischen Remodeling) und Aktivierung von Signalkaskaden
- Zelluläre -und im Verlauf auf Organebene nachweisbare- Hypertrophie
- Eine Veränderung der Extrazellulärmatrix und einsetzende Fibrose
- Inflammation und gesteigerter Zelltod durch Apoptose
- Dysfunktion auf Zellebene und im Verlauf auf Organebene
- Dilatation und weiterer Funktionsverlust des gesamten Herzens

Für mehrere dieser genannten Prozesse gibt es Marker-Gene, welche im Rahmen der Adaptation und Maladaptation teilweise rasch reguliert werden. Klinisch haben sich hiervon BNP und NT-pro BNP als Marker für den Verlauf von Therapie und als prognostisch relevanter Marker bewährt. Sie korrelieren mit dem Ausprägungsgrad der Dehnung und der Wandspannung des Herzens (18, 19). Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit näher untersuchten Markergene der einzelnen Remodeling-Vorgänge näher vorgestellt.

## **1.3 Genexpressionsmuster mit Beziehung zum kardialen Remodeling:**

### **1.3.1 Markergene für Hypertrophie**

Kardiale Hypertrophie geht einher mit Veränderungen in der Genexpression und der Aktivierung eines fetalen Genexpressionsmuster. Im Fetus sind einige Gene aktiv die unter physiologischen Bedingungen im erwachsenen Herz nicht aktiv sind. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind die natriuretischen Peptide, Atrial- und brain natriuretic peptid (ANP, BNP) und die fetalen Isoformen von kontraktilen Proteinen ACTA1 und  $\beta$ -myosin heavy-chain, eine Gruppe der fetalen T-Type Kalzium -Kanäle sowie eine Gattung von glatten Muskelzellen. In der vorliegenden Arbeit wurden davon folgende Gene untersucht:

#### **B-natriuretisches Protein (BNP)**

BNP ist ein humorales, Vorlast senkendes Protein. Dieser Effekt wird über Diurese und Vasodilatation verursacht. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass BNP eine hypertrophie-inhibierende Wirkung hat. (18, 20). Mit seiner Vorstufe des NT-proBNP ist es heutzutage der wichtigste therapeutische Marker für den Erfolg einer Herzinsuffizienz-Therapie. Erhöhte Werte von NT-proBNP sind gleich zu setzen mit einer Verschlechterung der Prognose. Mit einem erhöhten NT-proBNP korreliert auch ein erhöhter BNP-Wert. BNP hat dadurch prognostische Bedeutung.

#### **Atrial natriuretic Peptid (ANP)**

ANP wurde erstmals 1983 von Flynn A. et al das beschrieben.(21) Anschließend war eine japanische Gruppe um Kangawa sehr aktiv in der näheren Aufklärung der Funktion dieses neuentdeckten Peptids (22-24). ANP wurde im weiteren Verlauf mit Herzinsuffizienz in Zusammenhang gestellt. Der wichtigste Faktor der zur einer Steigerung von ANP führt ist die mechanische Dehnung der Vorhöfe. Der Effekt von Vasokonstriktoren auf die Steigerung von ANP kann auf den Einfluss auf die Vorlast oder Nachlast der Vorhöfe zurückgeführt werden. So wird zum Beispiel der massive ANP Anstieg bei Ischämie durch Endothelin verursacht.(25) ANP wird anders als BNP nicht als Marker für die Prognose

oder Therapie genutzt. Im Tiermodell ist ANP stark mit der Last korreliert (26). Seine funktionellen Effekte ähneln sehr denen des BNP.

### **$\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC)**

Die zwei relevanten Isoformen  $\alpha$ - und  $\beta$ - Myosin heavy chain (MHC) sind Strukturproteine des kontraktiven Apparats des Myokards. In fetalem Myokard kommt vorwiegend  $\beta$ -MHC vor, in adultem Myokard vorwiegend  $\alpha$ -MHC. Der Wechsel der MHC Isoform scheint ein wichtiger Mechanismus zu sein, über welchen sich das Herz effektiver der mechanischen Situation des postnatalen Kreislaufs anpasst. Sowohl bei kardialer Hypertrophie, als auch bei Herzinsuffizienz kann nach Reaktivierung der fetalen Genexpression wieder ein verhältnismäßig größerer Anteil an  $\beta$ -MHC gefunden werden (27).

### **Skeletal $\alpha$ -Aktin(ACTA1)**

Skeletales  $\alpha$ -Aktin ist eine prominente Aktin Isoform im fetalen Myokard. Die Expression verringert sich postnatal und im adulten Herzen ist sie nur noch gering nachzuweisen. In hypertrophen Herzen und Failing Hearts ist eine Re-Induktion von skeletalen  $\alpha$ -Aktin (SkA) nachgewiesen.

Mutationen in dem für ACTA1 codierenden Gen führen zu Myopathien. Am Herzen führen sie vor allem zu der Nemalin-Myopathie. Rezessive Träger dieser Mutation leiden an einem Verlust von skeletalem  $\alpha$ -actin (28). Die Hochregulation von ACTA1 stellt somit einen adaptiven Mechanismus dar.

### **Four-and-a-half-LIM-domain (FHL1)**

FHL1 ist ein Protein mit vier Cystein Bindestellen mit jeweils 4 Zink-Bindestellen. Mutationen in FHL1 stehen in Zusammenhang mit Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie und X-linked Hypertrophy Cardio Myopathy(HCM). Hartmannova et al. konnten eine X-Chromosom vererbte FHL1 Insuffizienz nachweisen, welche sich isoliert auf das Myokard bezieht und sich in Form einer reinen X-linked HCM zeigt (29). Wie von Hutchinson et al. (30) gezeigt kommt es bei Mäusen nach aorto-ventrikulären Fisteln zu einer biventrikulären Hypertrophie und einer Hochregulation von FHL-1. Die Autoren setzen die Hypertrophie und Zunahme der Steifigkeit in Zusammenhang mit einer FHL-1-

Hochregulation und der Protein-zu-Protein Wirkung von FHL-1 auf Titin. Zusätzlich wirkt FHL1 als Transkriptionsfaktor und ist verantwortlich für die Regulation der Proliferation, der Differenzierung und der Migration von Proteinen (31)

### **1.3.2 Markergene für Fibrose**

Die kardiale Extrazellulärmatrix besteht zu großen Teilen aus Kollagen und Fibrogen, eine exzessive Akkumulation von beiden entspricht einer Fibrose. Physiologisch hat die kardiale Extrazellulärmatrix Einfluss auf die Kontraktilität und die strukturelle Anordnung von Kardiomyozyten und deren Verbindungen untereinander. Die Adhäsion zwischen Kardiomyozyten hat einen Einfluss auf Zellwachstum, Hypertrophie und das Überleben der Zelle. Eine klinische Fibrose korreliert mit einer diastolischen Dysfunktion, wie sie in PatientenInnen mit heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) vorkommt.(32). Die Fibrose kann dabei großen Einfluss auf die Reizweiterleitung haben und Mitverursacher von Arrhythmien bei herzinsuffizienten PatientenInnen sein.

#### **Tissue growth factor $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

Tissue Growth Factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) ist in vielen Systemen des Körpers als Ursache von Fibrose bekannt. Im Herzen hat es bei Überexpression denselben Effekt. Verschiedene *in vivo* und *in vitro* Experimente konnten zeigen, dass die Expression von TGF-  $\beta$  im Herzen durch Angiotensin II getriggert wird. Eine erhöhte Stimulation mit Angiotensin-II korreliert in Mäusen mit einer Fibrose, wohingegen bei TGF-  $\beta$  knockout Mäusen mit Angiotensin-II keine Fibrose induziert werden konnte. (33)

#### **Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3)**

Metalloproteinasen sind entscheidende Regulatoren des Stoffwechsels der Extrazellulärmatrix. Es wurde in einer *in-vivo* Studie mit TIMP 3 -knockout Mäusen eine erhöhte Nachlast simuliert. Dort hat sich gezeigt, dass Mäuse ohne TIMP-3 oder TIMP-2 gravierende Hypertrophie und Fibrose des Myokards erlitten.(34) TIMP-3 hat somit eine protektive Funktion und eine Hochregulation zeigt die gesteigerte Aktivität welche in Zusammenhang mit einer Fibrose steht.

### **1.3.3 Markergene für Inflammation**

#### **Interleukin 6 receptor (IL6R)**

Interleukin 6 Rezeptor ist ein proinflammatorischer Marker. Es ist bekannt, dass erhöhte Level von IL6R im Blut von PatientenInnen mit Herzinsuffizienz nachgewiesen werden können (35). Interleukin-6 verstärkt hierbei die Zytokin-Kaskade und induziert die Apoptose (36). Es ist somit ein maladaptiver Faktor.

### **1.3.4 Markergene für Signalgebung**

#### **Regulator of Calcineurin (RCAN-1)**

RCAN-1 ist ein Calcineurin-regulierendes Protein. Es konnte unter anderem von Vega et al., gezeigt werden, dass es in RCAN-1 Knock-out Mäusen mit Simulation einer erhöhten Nachlast, als auch durch Katecholamin-Gabe, zu einer verstärkten Hypertrophie kommt (37). RCAN-1 wirkt also anti-hypertroph. Diese Wirkung wird über eine Hemmung von Calcineurin vermittelt. Es ist jedoch Calcineurin selbst, welches über NFAT vermittelt eine Expressionssteigerung von RCAN-1 bewirkt (38). Dies ist von daher im Sinne einer negativen Feedback Loop biologisch verständlich. Ist also mehr aktives Calcineurin vorhanden, wird RCAN aktiv und reguliert gegen eine Calcineurin Überaktivität. RCAN-1 wird aktiviert durch die Extracellular signal-regulated kinase (ERK) und Inositoltriphosphat (IP3), also unter anderem über den gleichen Signalweg wie Calcineurin (39). Eine gemessene Hochregulation von RCAN-1 kann mit einem erhöhten Calcineurin Spiegel korrelieren. Ähnliches wurde von Hill et al. an Knockout Mäusen mit Aortic-Banding gezeigt (40).

## 1.4 Mechanismen der Genregulation

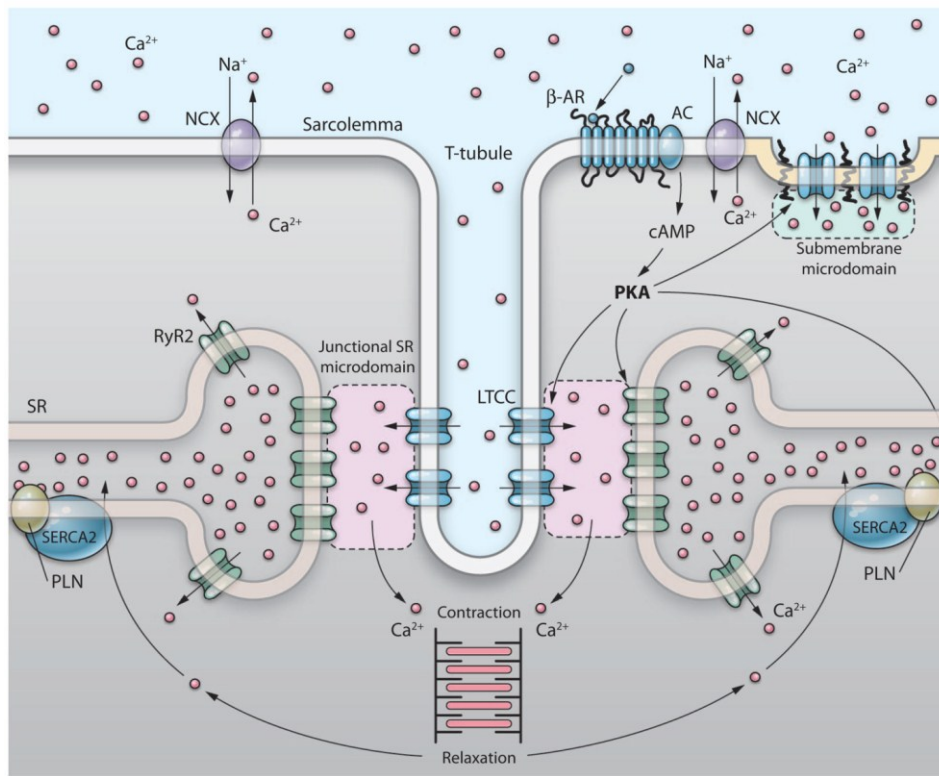


Abbildung 1 Houser R. Steven, Molкетин D. Jeffrey (1)

Kalzium ist unentbehrlich für jegliche Muskelkontraktion im Körper und dabei sowohl an der Erregung der Muskelzellen über Aktionspotentiale als auch direkt an der Kontraktion beteiligt. Zusätzlich ist es aber auch ein universaler intrazellulärer Signalvermittler mit Endeffekten auf die Transkription und das Genexpressionsmuster.

Wie von Maack, C. et O'Rourke, B gezeigt (41), kommt es bei einer diastolischen Dysfunktion zu einem diastolisch permanent erhöhten Kalzium-Spiegel, welcher zu einem erhöhten Grundtonus der Kontraktion und erhöhten Grundtonus an Transmitter Aktivität führt.

Die beiden elementaren Vorgänge mit Kalzium in der Hauptrolle werden daher mit dem Begriff **Excitations-Kontraktions-Kopplung (EC)** auf der einen und **Excitations-Transkriptions-Kopplung (ET)** auf der anderen Seite beschrieben. Es gibt zwei unterschiedliche Wege, die zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums führen, doch nur die Koppelung beider führt zu einem ausreichenden Ausmaß für eine Kontraktion:

*Der erste Weg* ist eine Verlagerung von extrazellulärem Kalzium nach Intrazellulär. Unter physiologischen Bedingungen ist die Konzentration von Kalzium höher im Extrazellulärraum (auch im Blut). Im Falle einer Erregung kommt es zum Einen zu einem Influx in die Zelle entlang des Diffusionsgradienten und zum Anderen wird der Einstrom zusätzlich durch das Öffnen von Kalziumkanälen beschleunigt.

*Der zweite Weg* besteht aus der Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Dies erfolgt als Reaktion auf den Kalziueinstrom aus dem Extrazellulärraum. Wie in Abb. 1 gezeigt, liegt das SR in der Nähe der membranständigen Kalziumkanäle. Durch den Einstrom von Kalzium kommt es zu einer regional erhöhten Konzentration von Kalzium in der Nähe dieser Kanäle. Dadurch wird über die Ryanodinrezeptoren die Freisetzung von Kalzium aus dem SR veranlasst.

Diese Region wird auch junctional SR- Mikrodomäne genannt. Durch beide Mechanismen gemeinsam kommt es zu einem schnellen und starken Anstieg des intrazellulären Kalziums. Hierdurch vermittelt bewirkt Kalzium eine Bindung von Aktin und Troponin und folglich eine Kontraktion (***EC-Kopplung***).

Durch Erregungen von außen kann es aber auch zu einem Anstieg des gesamten intrazellulären Kalziums kommen, welcher nicht auf die junctionale Mikrodomäne beschränkt ist. Hierfür scheinen die Kanäle in der Nähe der sogenannten submembrane microdomain der Zellmembran beteiligt und für die ***ET-Kopplung*** von besonderer Bedeutung zu sein.(42) Hier befinden sich zum Beispiel Kalzium-Kanäle wie TRPC (ROC/SAC), ORAI und LTCC. Zudem liegen hier die G-Protein coupled Receptors (GPCR), welche durch Angiotensin, Endothelin und  $\alpha$ -adrenerge Stimulation aktiviert werden. Angiotensin ist wie oben beschrieben über AGTR1 Rezeptoren an Remodeling Prozessen direkt beteiligt. Seine Aktivierung führt zur Expression des Transkriptionsfaktors TEF-1, welcher im Kapitel „Signalkaskaden“ näher beschrieben wird. Bekannt ist außerdem, dass Angiotensin zu einer erhöhten TGF Aktivität führt und somit die Entstehung einer Fibrose begünstigt.(33). Aktivierung eines GPCR erhöht die Konzentration von Inositoltriphosphat (IP3) über eine Phosphorylierung mittels Phospholipase C von Inositol Biphosphat (PIP2) aus der Zellwand. Phospholipase C erhöht auch die Diacylglycerol (DAG) Konzentration.(43) DAG aktiviert seinerseits den ROC-channel und führt zu einem weiteren Anstieg von intrazellulärem Kalzium, während IP3 zu

einer intranukleären Aktivierung von Calmodulin (CaM) über den IP3-Rezeptor und zu einer Freisetzung von Kalzium aus dem SR führt.(43)

Eine andere Aktivierungsmöglichkeit von außen mit einhergehender Erhöhung der Kalziumkonzentration wird über  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren gewährleistet. (Abb. 3) Durch deren Aktivierung wird der zyklische Adenosin-Monophosphat(cAMP) Spiegel erhöht. Ein erhöhter cAMP Spiegel aktiviert Phosphokinase A (PKA), welche zu einer Freisetzung von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum führt. Zusätzlich öffnet cAMP weitere Kalziumkanäle. Dies hat dadurch dann großen Einfluss auf sowohl die *EC*- als auch die *ET-Kopplung*.

Im folgenden Bild (Abbildung 2) lassen sich die Zusammenhänge einerseits zwischen Katecholamin-Stimulation und andererseits Angiotensin-II-Stimulation inklusive der dazugehörigen Rezeptoren erkennen.

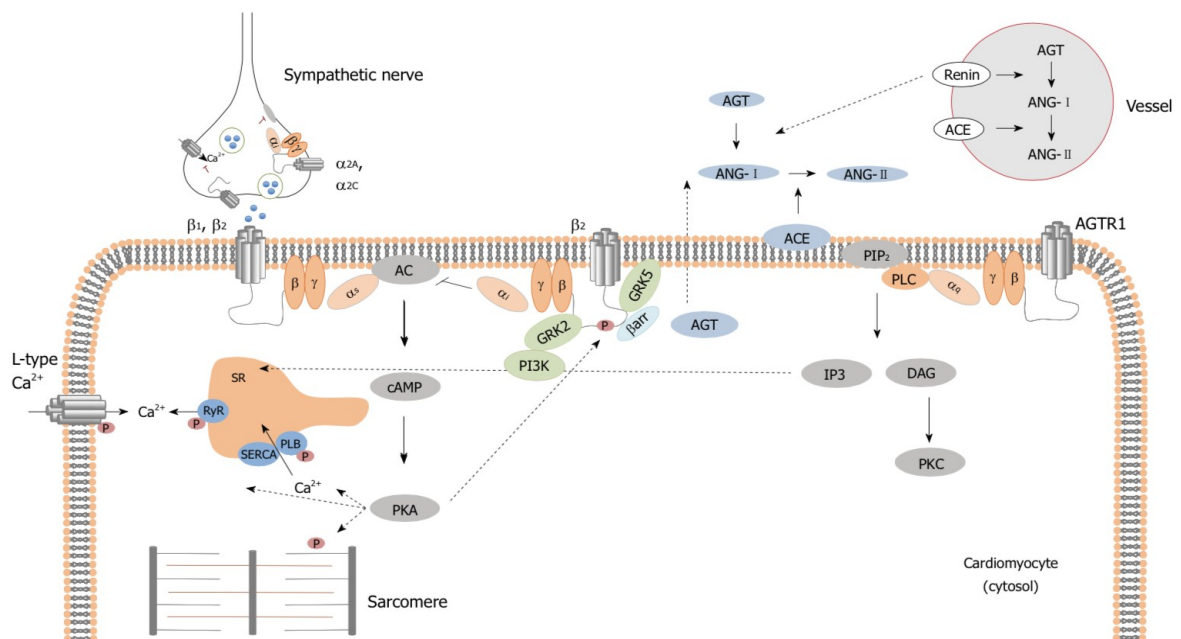


Abbildung 2 Alves A. J. et al. (44)

## 1.5 Signalkaskaden des kardialen Remodeling

Intrazelluläre erhöhte Kalziumkonzentrationen, aus welcher Quelle es auch kommt, aktivieren als Ziel-Mediatoren **Calmodulin (CaM)** und **Calcineurin (CaN)**, welche als wichtigste Transmitter des kardialen Remodeling wirken und jeweils ihrerseits ein gesamt Signalkaskade anstoßen.

**Erforderliche Parameter fehlen oder sind falsch.** Die erste Kalzium-abhängige Signalkaskade ist die Calmodulin/CalmodulinKinase-II Kaskade. Hierbei kommt es durch Bindung von intrazellulärem Kalzium an im Intrazellulärraum liegendes, freies Calmodulin zu dessen Aktivierung. Das daraufhin aktivierte Calmodulin wird durch die Kernmembran transportiert und bindet intranukleär an die **CalmodulinKinase-II (CaMKII)**. Durch diese Bindung wird CaMKII aktiviert. Die CaMKII phosphoryliert die Histone Deacetylase 4/5 (HDAC), welche an die Promoterregion des MEF-2 Gen gebunden ist. Durch die Phosphorylierung löst sich HDAC von MEF-2 und gibt dieses zur Transkription frei. Anschließend wird die phosphorylierte HDAC aus dem Zellkern transportiert (45, 46). Zusammengefasst erfolgt durch intrazellulären Kalziumanstieg eine Aktivierung von CaM und CaMK-II und hierüber eine Expressionssteigerung von MEF-2.

Ein Anstieg von intrazellulärem Kalzium aktiviert **Calcineurin (CaN)** als Transmitterstoff der zweiten kalziumabhängigen Signalkaskade. Aktiviertes Calcineurin bindet an den im Intrazellulärraum freien und nicht-aktiven Transkriptionsfaktor NFAT (= nuclear factor of activated T-cells). NF-AT wird dabei nun dephosphoryliert und ist als aktiver Transkriptionsfaktor dazu in der Lage, nach intranukleär verlagert zu werden. Intranukleär aktiviert es die Transkription von GATA-4, c-Maf und Ap-1, wobei letztere beide eine untergeordnete Rolle im Remodeling besitzen. Teils alleine und teils in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren (wie z.B. GATA4) ist NFAT als Transkriptionsfaktor aktiv (10, 47, 48). Nach seiner Verwendung wird CaN entfernt und NFAT wieder phosphoryliert und in seiner inaktiven Form zurück in den Intrazellulärraum verlagert.(49) Dieser Export aus dem Nukleus ist abhängig von dem Enzym Glykogen Synthase Kinase -3 b(GSK3b) und Enzymen der Mitogen-activated protein Kinase(MAP-Kinase)-Gruppe.(48)

Die folgende Abbildung zeigt die Promotorregionen verschiedener in dieser Arbeit untersuchter Gene. Wie man anhand von ANP und BNP sieht, sind MEF-2 und GATA-4

zwei der möglichen Transkriptionsfaktoren, die an diesen wichtigen klinischen Markern für Hypertrophie angreifen und ihre Expression steuern.(27) MEF-2 und GATA 4 sind auch noch für andere Hypertrophie-Marker von Bedeutung, zum Beispiel für  $\beta$ -MHC. Doch nicht nur diese Endprodukte der oben beschriebenen Calcineurin- Signalkaskade sind für die Transkription verantwortlich, sondern auch das aktivierte NFAT ist ein relevanter Transkriptionsfaktor für  $\beta$ -MHC und BNP.(27)

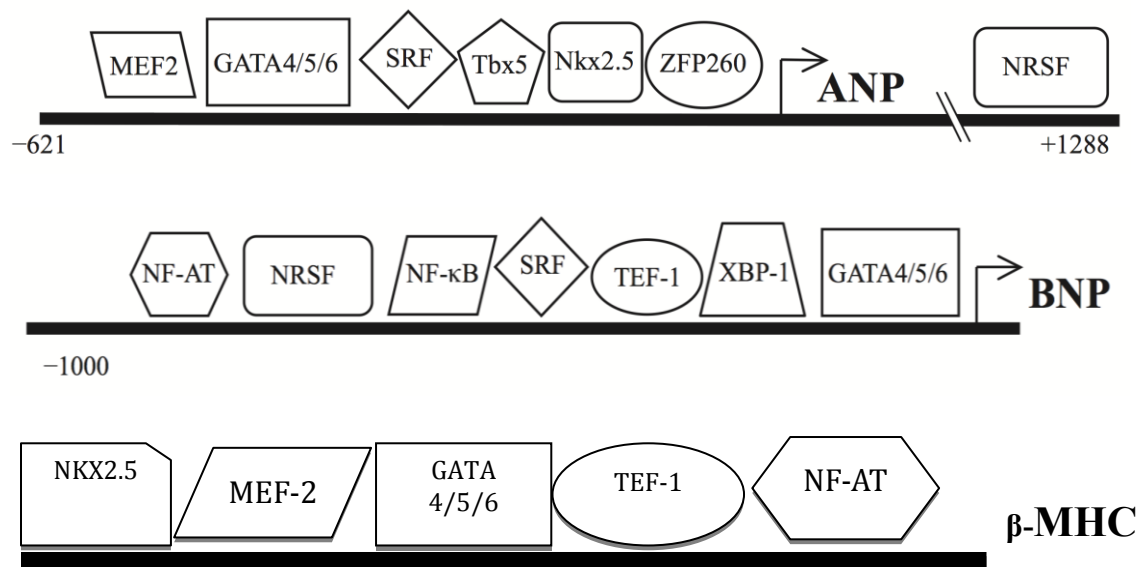


Abbildung 3 Kuwahara, Nishikimi, & Nakao, 2012 (27)

Eine Stimulation ( $\alpha$ -adrenerg, Endothelin etc.) und Aktivierung des GPCR Rezeptors führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors TEA domain transcription factor-1 (TEAD-1 oder TEF1). Wie von Tsika et. al (50) gezeigt wurde, kam es im Rattenmodell bei Simulation einer erhöhten Nachlast (aortic banding), zu einer gesteigerten Aktivität von TEF-1 und den damit korrelierenden Hypertrophie-Markern beta-MHC, BNP und ACTA1.

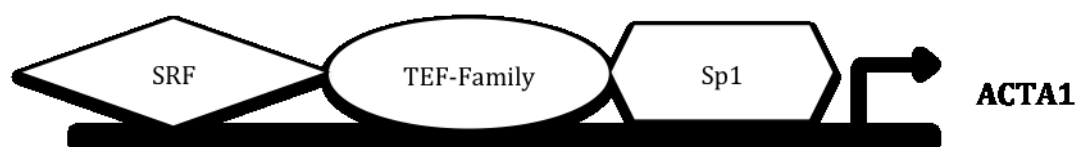


Abbildung 4 modifiziert nach Kuwahara, Nishikimi, & Nakao, 2012 (27)

## **1.6 Hypothese und Fragestellung**

1. Kommt es nach einer akuten Lastsituation auf Vorhof und/oder Ventrikel Ebene bereits zu Einfluss auf Hypertrophiemarker?
2. Kommt es nach einer akuten Lastsituation auf Vorhof und/oder Ventrikel Ebene bereits zu Einfluss auf Fibrosemarker?
3. Kommt es nach einer akuten Lastsituation auf Vorhof und/oder Ventrikel Ebene bereits zu Einfluss auf Entzündungsmarker?
4. Kommt es durch Laststimulation in Ventrikeln und Vorhof zu unterschiedlichen gewebespezifischen Veränderungen?

## **2 Methode**

### **2.1 Gewebe**

Es wurden für diese Arbeit Präparate aus menschlichen Herzen verwendet, die entweder aus dem Vorhof (rechts-aurikuläres Vorhofmyokard) oder aus der Herzkammer (Ventrikelmyokard) stammten. Aus beiden Gewebearten wurden Trabekel präpariert, die in Form von dünnen Muskelstreifen nachfolgend in ein Organbad transferiert und in eine Haltevorrichtung eingespannt wurden.

#### **2.1.1 Ventrikelmyokard**

Das ventrikuläre Myokard wurde von Multiorganspender-Patienten erhalten, deren Herzen aufgrund von technischen oder medizinischen Gründen im Gegensatz zu den anderen Organen nicht transplantiert werden konnten. Diese Gründe umfassten z.B. das Vorliegen einer KHK, einer Infektion oder die Absenz eines geeigneten Empfängers. Durch diese Ursachen waren die Herzen zwar nicht transplantationsgeeignet, wiesen jedoch eine normale Funktion des Myokard auf. Die Klassifikation als „nicht-insuffiziente“ (englisch Non-Failing) Herzen umschreibt diesen Umstand genau. Bei einer Herzinsuffizienz mit Erhöhung der Nachlast als auch der Vorlast kommt es zur Dehnung der Kardiomyozyten und möglicherweise Hypertrophie und möglicherweise schlechterem Ansprechen auf akute Reize. Aus diesem Grund sind Non-Failing Herzen ohne stattgefundene Dehnung besser geeignet, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu untersuchen, da sie noch keinem pathologischen Remodelingprozess unterworfen sind.

Die Herzen wurden vom Transplantationsteam des Universitätsklinikum für Transplantationschirurgie Graz (Ethikvotum 19-109 ex 07/08) entnommen. Aus dem Myokard wurden möglichst lange Trabekel extrahiert. Hierbei wurde ein Maximaldurchmesser von allerhöchstens 0,9mm und eine maximale Länge von 2cm verwendet. Der limitierende Faktor für den Durchmesser ist die fehlende Versorgung des Trabekel Zentrums, da die gesamte Versorgung durch passive Diffusion geschieht.

Klinische Patientendaten:

Die Tabelle 5 im Anhang gibt für die Experimente relevante Daten wieder:

Experiment, Geschlecht (männlich(m)/ weiblich(w)), Alter (In Jahren(a)), LV-Vergrößerung, PAP(systolisch), PAP-wedge, LVESD, LVEDD, LV-Vergrößert(ja(J), nein(N)), LVEF (%), Operationsart.

### **2.1.2 Vorhofmyokard**

Vorhofmyokard wurde aus Operationspräparaten gewonnen, wozu eine Kooperation mit der Abteilung für Herzchirurgie des LKH-Graz (Ethikvotum 19-109 ex 07/08) bestand. Bei Bypassoperationen (CABG) oder Klappenersatz Operationen wurde das rechte Herzohr (Bereich der Spitze) entfernt, um eine venöse Kanülierung für den Anschluss der Herzlungenmaschine (HLM) zu ermöglichen. Nach Entfernung der Herzohren werden diese direkt am Operationstisch durch den Operateur in vorbereitete, präoxygenierte und gekühlte BDM-Lösung gegeben.

Die Tabellen 6-8 im Anhang geben die relevanten Daten wieder:

Experiment, Experimentdatum Geschlecht(männlich(m)/ weiblich(m/w) ), Alter (In Jahren), LV-Vergrößert (ja(J), nein(N)), RA-vergrößert (ja(J), nein(N)), LVEF (%), Operationsart.

## **2.2 Präparation und Transport**

Unter Sicht eines Stereomikroskops (Olympus; VMT) mit 10-fach Vergrößerung wurde intensiv nach freiliegenden *Trabeculae Carneae*(Trabekel) gesucht. Die Anforderungen waren für alle Experimente identisch. Eine Maximalquerschnittsfläche von 0,64 mm<sup>2</sup>(Durchmesser von 0,9mm) durfte verwendet werden. Dickere Trabekel würden wie oben beschrieben aufgrund mangelhafter Diffusion von Sauerstoff eine zentrale Hypoxie erleiden.

Die Trabekel wurden aus dem linken und rechten Ventrikel entnommen, ebenso wurden Trabekel aus dem rechten Vorhof entnommen da dieses für die HLM entfernt werden musste. Hierbei wurde darauf geachtet, dass auf die Trabekel keine Spannung und/oder Zug ausgeübt wurde um mögliche Adaptionsvorgänge nicht zu initiieren.

Falls Trabekel die Sicht versperrten und aufgrund ihrer Größe (>0,64 mm<sup>2</sup>) für uns

ungeeignet waren, wurden diese entfernt um ungehindert an freiliegende Trabekel zu gelangen. Ein besonders großer Trabekel wurde jeweils entnommen und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren um als Probe für Hintergrund Streuung zu dienen.

Der Durchmesser wurde in allen Experimenten mittels Stereomikroskop bestimmt anschließend wurde die Querschnittsfläche unter Zuhilfenahme der folgenden Formel berechnet:  $Querschnitt = (Radius)^2 \times \pi$

Direkt nach Explantation sowohl des Herzens als auch des Herzohres wird das Gewebe in gekühlter präoxygenierter Kalziumarmer 2,3-Butan-Dion-Monoxim Lösung (BDM) transportiert.

Explantierte failing/non-failing Herzen wurden kanüliert und es wurden Proben von anderen Gruppen der Arbeitsgruppe entnommen. Das aus dem LKH Graz stammende Gewebe wurde unverzüglich nach Entnahme in die Labore gebracht. Die extern explantierten Herzen absolvierten teilweise zwei Stunden Transport. Es wurde darauf geachtet, dass der Transport immer in gekühlter (4°C) BDM Lösung stattgefunden hat. Es wurden geschlossene Glasbehälter in Styropor Transportbehältern verwendet. Diese Aufgabe wurde von Hilfswissenschaftlern des Ludwig-Boltzmann Instituts übernommen.

## **2.3 Verwendete Substanzen**

### **2.3.1 Tyrode-Lösung**

Um im Organbad zu gewährleisten, dass die Trabekel unter möglichst physiologischer Bedingung kontrahieren wurden die Bäder mit oxygenierter Tyrode-Lösung gefüllt. Über die Oxygenierung kann der pH-Wert auf einem stabilen Wert gehalten werden und eine Azidose oder Alkalose im Bad verhindert werden. Die verwendete Tyrode-Lösung ist in diesem Setting zu Beginn sehr Kalziumarm und muss in kleinen Schritten auf die nötige Kalziumkonzentration aufgebaut werden (siehe Versuchsablauf).

Die Tyrode-Lösung, die für alle Experimente benutzt wurde, hatte folgende Zusammensetzung:

**Tabelle 1**

<b>Elektrolyt</b>	<b>Konzentration</b>
Na <sup>+</sup>	152 mM
Cl <sup>-</sup>	135 mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
Mg <sup>2+</sup>	0,6 mM
SO <sub>4</sub>	0,6 mM
Ca <sup>2+</sup>	2,5 mM
Glukose	11,2 mM
Altinsulin	10 IE/l

### **2.3.2 2,3-Butan-Dion-Monoxim Lösung (BDM)**

Für Transport, Präparation und das Einhängen des Muskelstreifens in das Organbad wurde die Tyrode-Lösung mit zusätzlichen 30mM BDM angereichert.

BDM dient als kardioplegischer Schutz und ist in seiner Wirkung komplett reversibel. Es wird eingesetzt um eine mögliche Kontraktur der Trabekel durch plötzlichen Kalzium Anstieg zu verhindern. In der Präparation kommt es durch die Zerstörung des umliegenden Gewebes zur Freisetzung von intrazellulärem Kalzium. BDM ist eine Phosphatase, die die Querbrückeninteraktion reversibel hemmt (51-53). Die Kalziumsensitivität von Troponin C (54) und die Aufnahme von Kalzium in das Sarkoplasmatische Retikulum (55) bleiben dabei unbeeinflusst (53). Auch auf den Verlauf von Membran- und Aktionspotentialen hat BDM keinen Einfluss (56).

In der angewendeten Konzentration und dank der Reversibilität ist BDM eine sehr geeignete Substanz für eine effektive und reversible Kardioplegie. (53)

## 2.4 Geräte

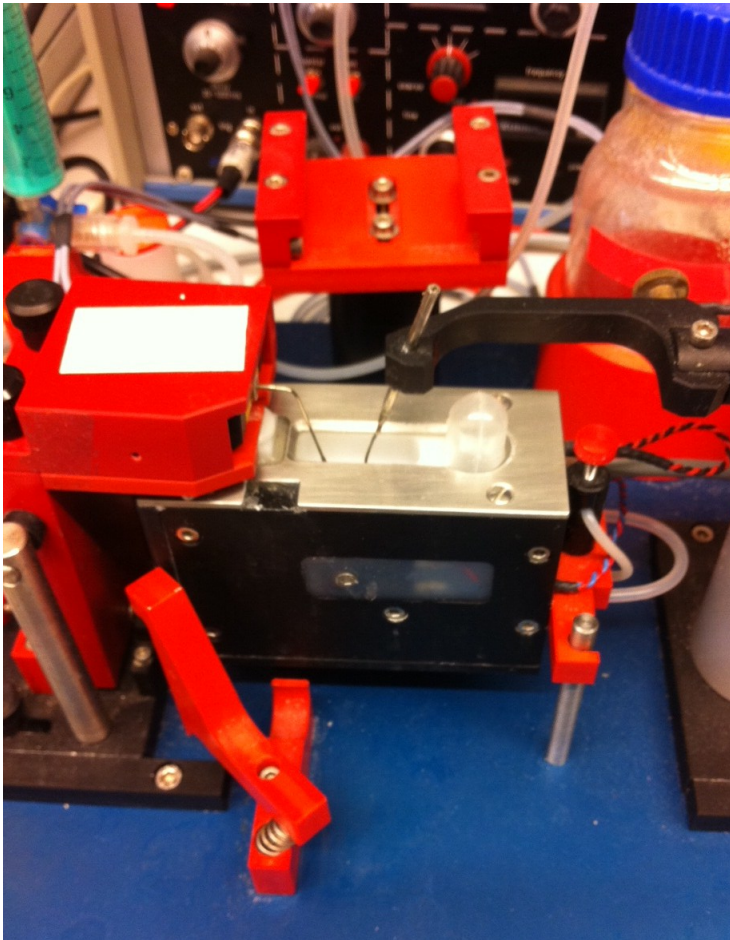


Abbildung 5 Organbad

### Organbad

Bei dem Organbad handelt es sich um eine Anlage des Herstellers SI-Heidelberg. Die Anlage besteht aus einem 7ml fassenden Organbad inklusive eines Oxygenationsbeckens. Über eine externe reine Sauerstoff-Zufuhr kann die ständige Versorgung der Trabekel mit Sauerstoff gewährleistet werden. Das Becken verfügt über eine integrierte Heizanlage, worüber die Temperatur kontrolliert bei 37°C gehalten wird.

In das Organbad ragen zwei Aufhängevorrichtungen (Haken). Beide sind so positioniert, dass die Spitzen komplett unter der Flüssigkeitsoberfläche zu liegen kommen. Über die im rechten Bildrand gelegene Aufhängevorrichtung ist die Anlage mit dem extern gelegenen Stimulator verbunden.

Die im linken Bildrand liegende Aufhängevorrichtung dient als Kraftaufnehmer (Force-Transducer), durch diesen werden die Kontraktionen aufgezeichnet.

Hinter dem Organbad erkennt man oben in Rot die Halterung für das zum Einspannen verwendete Mikroskop.



Abbildung 6 unten der Stimulator, oben das Thermostat

### **Stimulator und Thermostat**

Zur elektrischen Stimulation der Trabekel wurde ein wie oben abgebildeter Stimulator verwendet. An diesem kann man die Dauer des Impulses (5ms), die Amplitude des Impulses und die Frequenz einstellen. Auf dem Stimulator befindet sich auf dem Bild ein Thermostat. Dieses Thermostat misst die Temperatur im Becken und reguliert sie auf die Voreingestellte Temperatur ( 37°C). Die Temperatur wird direkt über die unter dem Organbad gelegene Heizvorrichtung reguliert.

### **Zentrifuge**

Für die Isolation der RNA wie später beschrieben wurde eine Zentrifuge der Firma Thermo scientific mit dem Namen Fresco 21 verwendet. Sie ist für für micro tubes ausgelegt. Diese Zentrifuge ist in der Lage, während des Zentrifugierens das Material bei einer voreingestellten Temperatur zu halten und kann bis zu 28.000 RPM zentrifugieren.

### **Biorad- MyCycler**

Aus dem Trabekel wurde im Verlauf RNA isoliert (s. unten) und in cDNA transkribiert.

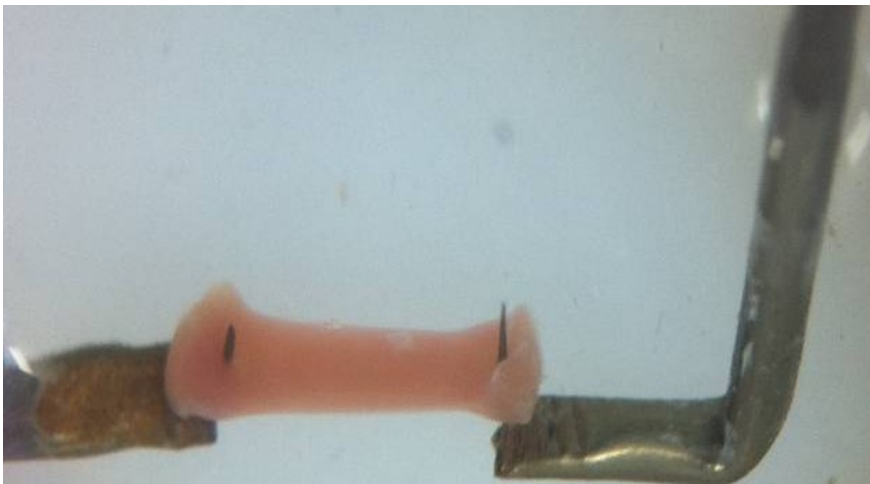
Für die Inkubation der Proben während der Transkription von RNA in cDNA wurde ein Biorad MyCycler verwendet. Dieser ist in der Lage, vorher eingespeicherte Protokolle zur Erhitzung von Proben durchzuführen. Er kann mit einer Erhitzungsrate von bis zu 2.5°C/Sekunde und einer Kühlrate von 1.5°C/Sekunde die Proben erhitzen/abkühlen. Durch die eingespeicherten Protokolle wird gewährleistet, dass zwischen Inkubationszeit und Erhitzung keine Zeit verloren geht.

## **2.5 Versuchsaufbau**

### **2.5.1 . Einhängen**

Das Zirkulationssystem der Kammer des Organbades wurde zuerst mit 7ml Kalzium-arter-Tyrode Lösung gefüllt. Diese wurde unter aktivierter Oxygenierung in der Kammer präoxygeniert. Und mit Hilfe des Thermostates auf 37°C Beckentemperatur gebracht.

In das Einhängenbecken wurde präoxygenierte BDM Lösung gegeben. In das Einhängenbecken wurde anschließend das Präparat mit Hilfe einer Pipette gebracht. Der Muskelstreifen wurde mit Hilfe mikrochirurgischer Pinzetten unter mikroskopischer Kontrolle auf die Muskelhaken aufgespießt, wobei darauf geachtet wurde, das Präparat nicht zu dehnen.



**Abbildung 7 Trabekel in einem Organbad**

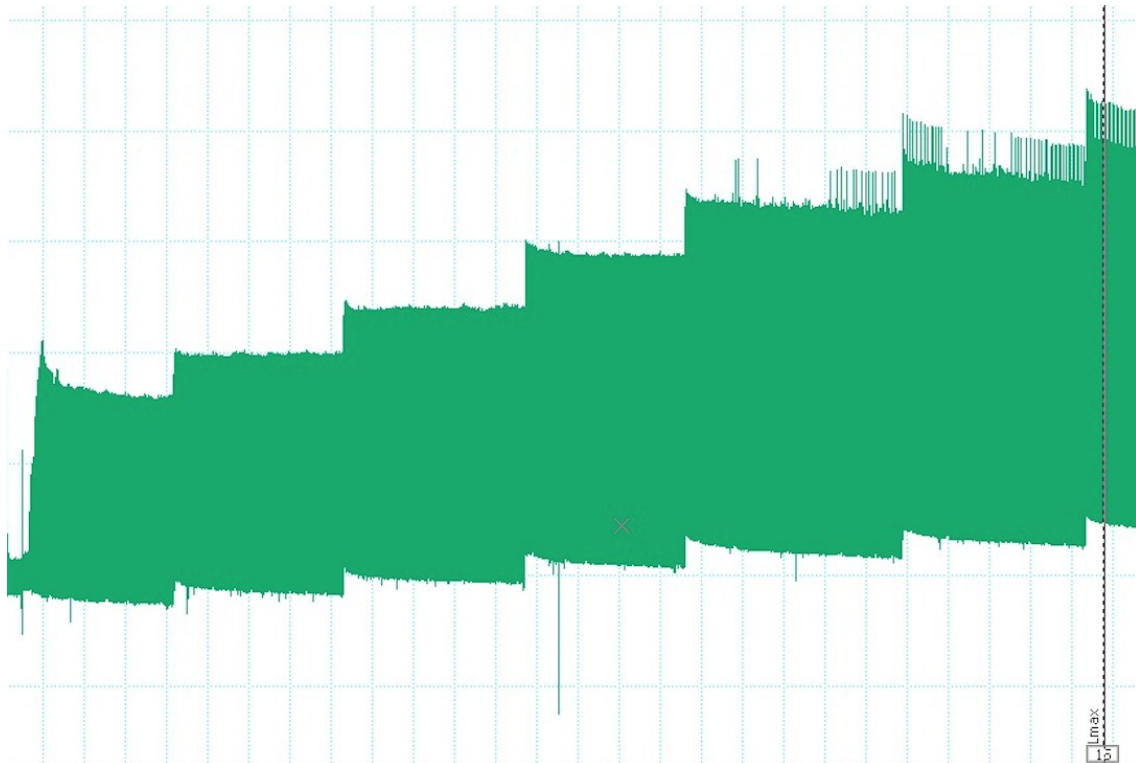
Nach fünf Minuten Ruhephase wurde der Trabekel in das Organbad zu der bereits präoxygenierten Tyrode Lösung gegeben. Es wurde weitere fünf Minuten gewartet und die Lösung im Organbad wurde komplett durch frische präoxygenierte Tyrode-Lösung ausgetauscht. Dies geschah um mögliche Reste von BDM aus dem Organbad zu entfernen.

In den nächsten Schritten wurde die Dokumentation vorbereitet. Hierfür wurde Powerlab in Betrieb genommen, eine Schnittstelle zwischen den Force-Transducern und dem Programm LabChart (Version 7.1.7.), welches auch gestartet wurde. Es wurde mit der Dokumentation begonnen, sobald die Trabekel im Organbad angelangt sind und die Querschnittsfläche jedes Trabekels eingefügt. Hiermit wurde die Kraft in Abhängigkeit von der Querschnittsfläche angegeben ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ ) und es wurde ein Null-Abgleich am nicht-gedehnten Trabekel durchgeführt.

Weitere fünf Minuten nach dem Auswaschen der BDM Lösung wurde mit dem Auftitrieren der Kalzium-Konzentration begonnen. Hierbei wurde in drei Schritten (1. Schritt +3,1  $\mu\text{l}$  2. Schritt + 4,0  $\mu\text{l}$ , 3. Schritt +9  $\mu\text{l}$ ) 2,5 mM Kalziumkonzentration im Becken erreicht. Nach dem zweiten Schritt und 1mM Kalzium im Becken wurde mit der Stimulation begonnen. Die Stimulation erfolgte über die Muskelklemmen (Rechteckstimulation, End-zu-End, Impulsdauer 5 ms). Die Spannung wurde bis zur ersten sichtbaren und messbaren Kontraktion (hiermit wurde der Schwellenwert für die elektrische Erregung erreicht) erhöht. Für die Erhaltung wurde ein Spannungswert von 40% über dem Schwellenwert gewählt. Anschließend wurde der letzte Kalzium Schritt verabreicht.

Es wurde gewartet bis die Kontraktionen auf gleichem Niveau stattgefunden haben. Wenn die Kontraktionen gleichmäßig und stabil waren, konnte davon ausgegangen werden, dass der nötige Schwellenwert sicher überschritten war.

Nach Stabilisierung der Kontraktionskraft wurde in 50 $\mu\text{m}$  Schritten über die Mikrometerschraube der Zug auf die Trabekel erhöht. Diese wurden solange gedehnt, bis kein Kraftzuwachs mehr oder einer Abschwächung im Vergleich zur vorherigen Periode sichtbar waren. Diese Länge wurde als  $L_{\text{max}}$  (Linie in der Abbildung) definiert.



**Abbildung 8 In Labchart aufgezeichnetes Protokoll mit Dehnungsschritten**

Nach Stabilisation der Kontraktionskraft konnte anschließend mit den Experimenten begonnen werden.

Für die Messungen der Genexpression in diesem Modell wurden zwei Bäder auf Maximale Dehnung ( $L_{\max}$ ) vorgedehnt und mit 1 Hz stimuliert. Durch die Maximale Dehnung wurde mittels Frank-Starling-Mechanismus die maximale Kraft im Myokard erzeugt. Diese Vordehnung wurde 8 Stunden und 6 Stunden beibehalten. In den verbleibenden zwei Organbädern wurden die Trabekel ohne Vordehnung/Dehnfrei eingehängt und für den gleichen Zeitraum unter Stimulation im Organbad belassen. Diese wurden als Kontrollgruppe verwendet. Somit hat man 2 Bäder auf Dehnung(Interventionen) und 2 Bäder Dehnungsfrei(Kontrolle).

## **2.5.2 Entnahme und Einfrieren**

Nach erfolgtem Protokoll wurden die Muskeltrabekel kontrahierend bei bestehenden Steady-State nach Ablauf des jeweiligen Zeitpunktes (6h oder 8h) entnommen. Die entnommenen Trabekel wurden aus dem Organbad direkt in ein bereitstehendes Eppendorf Cryotube gegeben, welches in flüssigem Stickstoff gelagert und somit vorgekühlt war. Durch das Vorkühlen gefroren die Trabekel direkt an der Röhren-Wand. Das verschlossene Cryotube wurde sofort zurück in den bereitstehenden flüssigen Stickstoff

gegeben. Die Cryotubes wurden unter ständiger Kühlung in flüssigen Stickstoff in einen -80°C Kühlschrank überführt, in welchem sie zur Langzeitlagerung aufbewahrt wurden.

## **2.6 Genexpression**

### **2.6.1 Homogenisierung und Lyse**

Um die in den Trabekeln enthaltene RNA in eine Lösung zu binden und zu extrahieren, ist eine Lyse und Homogenisierung notwendig. Die Lyse findet unter Schwing- und Rüttelbewegungen in dem Magna-Lyser statt. Bei einem Magna-Lyser handelt es sich um einen Rotor-Stator-Homogenisierer. In diesem werden die im Röhrchen enthaltenen Keramikbälle in Bewegung gebracht, durch diese Schwingungen und Bewegungen wird das zwischen den Bällen gefangene Gewebe zerkleinert. Zur Untersuchung der RNA-Zusammensetzung wurden die Myokardproben mithilfe des RNEasy-Mini-Kit der Firma Qiagen (Bestellnummer: 74104) bearbeitet. Dieses Kit ermöglicht die Isolation von RNA aus kleinen (bis zu 1mg Bindekapazität auf der Säulen-membrane) Probenmengen wie zum Beispiel aus Trabekeln. Aus diesem Set wurde der RLT Puffer entnommen, die genauen Bestandteile sind geheim. Es enthält aber eine hohe Konzentration von Guanidin Isothiocyanat und ist verantwortlich für die Bindung von RNA an der Säulenmembran.

Im ersten Schritt wurde die nötige Puffer Lösung aus RLT-Puffer und Mercaptoethanol hergestellt. In einem Verhältnis von 1:100 wurden dem RLT-Puffer kleine Mengen Mercaptoethanol hinzu gegeben, um die Stabilität des Lysates zu erhöhen. Nachdem die Puffer-Lösung vorbereitet war, wurden 430µl Puffer für jede Probe in einem Magna-tube bereit gestellt. Anschließend wurden die auf flüssigem Stickstoff gelagerten Proben in die vorbereiteten Tubes gegeben.

Standardmäßig wurden alle Proben 4mal bei 6500rpm für 20 Sekunden bearbeitet. Falls nach dem letzten Zyklus noch makroskopisch sichtbares Gewebe vorhanden war, wurde noch ein Schritt mit 6500rpm für 10 Sekunden durchgeführt. Da sich die Proben hierbei erhitzen Zwischen den einzelnen Zyklen wurden die Magna-Tubes auf bereitgestellten Kühlkissen (auf -20°C vorgekühlt) auf Raumtemperatur herabgekühlt.

Nach vollständiger Lyse wurde das Lysat in ein bereit stehendes 2ml Eppendorf Tube gegeben. Es wurde bei jeder Lyse mit einem Restvolumen von 80µl in den Magnatubes gerechnet. Diese konnten aufgrund der hohen Adhäsionskräfte an den Keramikugeln nicht extrahiert werden.

## **2.6.2 RNA Isolation**

### **2.6.2.1 Präzipitation und Bindung an die Säule**

Die gewonnenen 350µl Lysat wurden mit 70% Ethanol in den neuen Eppendorf Tubes vermischt. Durch Auf- und Abpipetieren wurde schonend eine Präzipitation der im Lysat enthaltenen RNA in dem Ethanol erreicht.

Das Gesamtvolumen des Lysats wurde danach auf die zentrale Membran der Säule in einem 2ml Röhrchen gegeben, welches dem RNeasy-Kit beilag. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 10000rpm wurde die im Röhrchen aufgefangene Flüssigkeit verworfen.

### **2.6.2.2 Waschschritte**

Die RNA wurde durch diesen Schritt auf der Säulenmembran fixiert.

Nun wurde die auf der Säulenmembran fixierte RNA durch Zugabe von 350µl RW1-Puffer gewaschen und 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt.

Der RW1-Puffer wurde auch dem RNeasy-Kit entnommen, die genaue Zusammensetzung ist geheim. Sie enthält aber Guanidin, Salze und Ethanol. Er wird verwendet um effektiv Biomoleküle wie Kohlenhydrate, Proteine, Fettsäuren etc. zu entfernen. Zur gleichen Zeit bindet er RNA mit mehr als 200 Basenpaaren an die Säulenmembran.

Anschließend wurde die Säule auf ein neues 2ml Röhrchen gegeben und die Waschschritte folgten. Hierfür wurden 700µl RPE1 Puffer auf die spin-Membran gegeben. Nach zwei Minuten Inkubationszeit folgte 15 Sekunden Zentrifugation mit 10 000 rpm. Dieser Schritt ist zweimal durchgeführt worden.

Der RPE-Puffer wurde auch dem RNeasy-Kit entnommen, die genaue Zusammensetzung ist geheim. Es handelt sich bei dem RPE-Puffer um eine milde Waschlösung. Seine Hauptfunktion ist die Entfernung von Salzen aus der Lösung. Ethanol ist ein wichtiger Bestandteil des RPE-Puffers, dieser wird im Verhältnis 1:4 (RPE-Konzentrat : Ethanol) vor der ersten Verwendung des Puffers beigelegt.

### 2.6.2.3 Trocknen

Nach dem auswaschen mit RPE1 wurde der Auswurf samt Röhrchen wieder verworfen und die Säulenmembran in ein neues 2ml Röhrchen gesteckt. Es folgte eine 2-minütliche Zentrifugation mit Maximalgeschwindigkeit zum Trocknen der Membran.

### 2.6.2.4 Elution (Protokollname)

Der letzte Schritt der RNA-Isolation ist die Eluierung. Hierbei folgte eine Spülung der Membran mit 30 l RNase freiem Wasser, dadurch wurde die RNA aus der Membran gelöst und befand sich nun gelöst im RNase freiem Wasser. Da die Proben anschließend sehr sensibel waren, mussten sie nach der Eluierung auf Eis (4 C) gelegt werden um eine RNA-Degradierung zu verhindern. Die gelöste RNA wurde spektrometrisch (in einem Nano-Drop 2000c) vermessen, wodurch die Konzentration an RNA in der Lösung ermittelt wurde.

Stichprobenartig wurden auch Kontrollen der Qualität mittels Bioanalyser durchgeführt. In der Abbildung 12 kann das Ergebnis einer solchen gesehen werden. Die L-Bande ist hierbei die Vorgabe man erkennt bei Probe 7 und 8 zwei scharf abzugrenzende schwarze Linien, diese entsprechen der durch Gelelektrophorese zurückgelegten Strecke der RNA Ketten. Bei Probe 9 und 10 erfolgte eine Degradierung der RNA, welches sich im Bioanalyser als eine „Schmierspur“ zeigt.

Die Proben wurden nach der Vermessung erneut bei -80 C eingefroren.

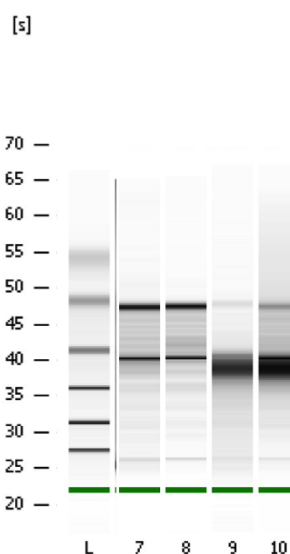


Abbildung 9 Bioanalyser Ergebnis

### 2.6.3 cDNA Synthese

Die gefrorene Probe wurde langsam aufgetaut und anschließend durch schütteln auf einem Vortexer und Zentrifugieren wieder in eine homogene Lösung gebracht. Das vorher gefrorene Qiagen Quantiscript Kit (Bestellnummer: 205311 ) enthält gDNA wipeout buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT-Buffer, RT Primer mix und RNase-freies Wasser. Der Kit wurde bei -20°C gelagert und nach der Entnahme auf Eis gelagert, wo er langsam aufgetaut wurde. Die einzelnen Bestandteile wurden wie die Proben durch schütteln auf einem Vortexer und nachfolgende leichte Anzentrifugation auf einem Tisch-spiner in eine homogene Lösung gebracht. Durch das Zentrifugieren konnten auch Restmengen der vorhandenen Lösungen gesammelt werden.

Zuerst wurde ein genomic DNA wipeout Mastermix erstellt. Hierfür wurden pro Probe 2 µl gDNA wipeout Buffer und 11ul RNase-freies Wasser vermischt.

Anschliessend wurden 13ul des Mastermix mit 1ul der RNA vermischt.

Es kommt auf ein Gesamt Reaktions Volumen von 14 µl.

Die Mischung aus Mastermix und RNA wurde für 2min bei 42°C inkubiert und nach abgelaufener Inkubation direkt auf Eis gekühlt. Durch diesen Schritt wurde Genomische Rest-DNA, welche die Probe verunreinigt hätte, ausgespült.

Für den nächsten Schritt wurde bei Experimentbeginn ein Reverse-Transkriptase Mastermix erstellt. Dieser Mastermix enthält alle nötigen Komponenten um einen cDNA Synthese zu ermöglichen. In der folgenden Aufstellung sind alle Komponenten des MasterMix aufgelistet.

Tabelle 2

Komponente	Volumen/Reaktion
<b>Reverse Transkription Mastermix</b>	
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 $\mu$ l
Quantiscript RT Buffer	4 $\mu$ l
RT Primer Mix	1 $\mu$ l
<b>Zu transkripiierende RNA</b>	14 $\mu$ l
nach kompletter gDNA Bereinigung	
<b>Gesamtvolumen</b>	20 $\mu$ l

Wenn der Mastermix und die gDNA bereinigte RNA zusammengegeben werden, wird der Mix für 15min bei 42°C inkubiert. Der Biorad Zykler erhitzt nach 15min automatisch auf 95°C, wodurch die Reverse Transkriptase deaktiviert wird. Durch die Reverse Transkriptase wird aus RNA und Nukleotiden wieder komplementäre DNA(cDNA).

Nach Abschluss der Erhitzung wird die gewonnene cDNA bei -80°C bis zur Durchführung der PCR gelagert.

## 2.6.4 Quantitative Real-Time Polymerase Ketten Reaktion (qRT-PCR)

Es wurde eine quantitative Polymerase chain reaction (PCR) durchgeführt. Bei dieser kommt es zur Vervielfältigung der cDNA. Der Startpunkt der PCR wird genspezifisch mit bestimmten Primern vor der Analyse festgelegt.

In der folgenden Tabelle 3 sieht man die verwendeten Primer inklusive der dazugehörigen Sequenz, alle bestellt bei der Firma Microsynt aus Wolfurt. Sämtliche Primer wurden mit Qualitätszertifikat geliefert.

Tabelle 3

Oligo Name	Sequenz
<b>h-AGTR-for</b>	GGCTATTGTTACCCAATGAAGT
<b>h-AGTR-rev</b>	TGGGACTCATAATGGAAAGCAC
<b>h-MYH7-for</b>	CTTTGCTGTTATTGCAGCCATT
<b>h-MYH7-rev</b>	AGATGCCAACTTCCTGTTGC
<b>h-ACTA1-for</b>	GGCATTACGAGACCACCTAC
<b>h-ACTA1-rev</b>	CGACATGACGTTGTTGGCATAAC
<b>h-FHL1-for</b>	TGCTGCCTGAAATGCTTTGAC
<b>h-FHL1-rev</b>	GCCAGAAGCGGTTCTTATAGTG
<b>h-TGFb1-for</b>	GGCCAGATCCTGTCCAAGC
<b>h-TGFb1-rev</b>	GTGGGTTTCCACCATTAGCAC
<b>h-TIMP3-for</b>	TGGGTTGTAAGTCAAGATCAAG
<b>h-TIMP3-rev</b>	GGTCCAGAGACACTCGTTCT
<b>h-IL6R-for</b>	CCCCTCAGCAATGTTGTTTGT
<b>h-IL6R-rev</b>	CTCCGGGACTGCTAACTGG
<b>h-NppA-for</b>	CAACGCAGACCTGATGGATTT
<b>h-NppA-rev</b>	AGCCCCCGCTTCTTCATTC
<b>h-NppB-for</b>	TGGAAACGTCCGGGTTACAG
<b>h-NppB-rev</b>	CTGATCCGGTCCATCTTCCT
<b>h-GAPDH-for</b>	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
<b>h-GAPDH-rev</b>	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
<b>h-B2M-for</b>	GAGGCTATCCAGCGTACTCCA
<b>h-B2M-rev</b>	CGGCAGGCATACTCATCTTTT
<b>RCAN1-rev.(human)</b>	TGAGGTGGATCGGCGTGTA
<b>RCAN1-</b>	GCGTGGTGGTCCATGTATGT

### 2.6.4.1 Primertest:

Um die Zuverlässigkeit und Spezifität der Primer zu testen wurde in einem ersten Schritt ein Testlauf durchgeführt. Hierzu wurde aus den gelieferten Primern eine 100  $\mu\text{M}$  Stocklösung erstellt, das hierfür benötigte Wasservolumen wurde im Qualitätszertifikat angegeben. Anschließend wurde die Stocklösung um den Faktor 10 mit Nuclease-free Water der Firma Ambion auf eine 10  $\mu\text{M}$  Lösung verdünnt.

Um die Primer zu testen, wurde ein Pool-Homogenat aus den 6 am höchsten konzentrierten Proben erstellt. Diese wurden verdünnt und es wurde getestet welche die minimal mögliche Konzentration für die Primer darstellt.

Zu dem Pool-Homogenat wurde ein Mastermix aus aus nuclease freiem Wasser und SYBR Green als Fluoreszenz hergestellt. Dieser wurde mit den jeweiligen Primern nach dem unteren Schema vermischt. Für die Testung der Primer wurde die Reaktion mit 4  $\mu\text{l}$  des Pool-Homogenat getestet.

Tabelle 4

Mastermix	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
H <sub>2</sub> O	0,48
SYBR Green Master Mix	5,00
Primer 1 (10 $\mu\text{M}$ ) --> 260 nM	0,26
Primer 2 (10 $\mu\text{M}$ ) --> 260 nM	0,26
cDNA	4,0
<b>Gesamt</b>	<b>10,00</b>

Es wurde der SSO Advanced SYBR Green Super Mix der Firma Biorad verwendet.

Jede Probe wurde als Triplikat getestet.

Es wurden 96-Well Platten(LightCycler® Multiwell Plate 96, Artikelnummer 04729692001, Firma Roche) verwendet. Im ersten Schritt wurden 6  $\mu\text{l}$  Mastermix vorgelegt, anschließend wurden jeweils 4  $\mu\text{l}$  der Proben in die Wells pipettiert.

Die Platte wurde anschließend mit einer Folie abgedeckt und eine Minute bei 9000RPM zentrifugiert, daraufhin wurde die qPCR gestartet.

Hier als Beispiel das Ergebnis des Primertestlaufs von hu-RCAN1. Wie man in Abbildung 11 erkennt, kommt es zu einem Anstieg des Fluoreszenz Marker nach ca. 18-22 Zyklen. Es kommt wie gewollt zu einem schnellen Anstieg der gemessenen Fluoreszenz (dunkelrote Kurven). Der Kurvenverlauf ist typisch und man kann aus dem Umschlagspunkt der Steigung anhand der benötigten Zyklen eine Standardkurve mit Y-Achse Umschlagspunkt (crossing point) und X-Achse der Logarithmischen Konzentration erstellen. Aus der Steigung (Slope) dieser Standardkurve kann die Effizienz (Efficiency) berechnet werden. Unter perfekten Bedingungen sollte die Effizienz 2 (dies entspricht 100%) sein, das heißt bei jedem Zyklus wird die Anzahl der DNA verdoppelt. Da 100% (entspricht einem Slope von -3.32) in der Wissenschaft nie erreicht wird, wird eine Slope/Effizienz zwischen 90% und 110% akzeptiert. Dies entspricht einem Slope zwischen -3.58 und -3.10. Für hu-RCAN1 ergab sich eine Efficiency von 1,969 und ein Slope von -3.397. Diese Ergebnisse entsprechen einem optimalen Ergebnis und besten Voraussetzungen für die Primer.

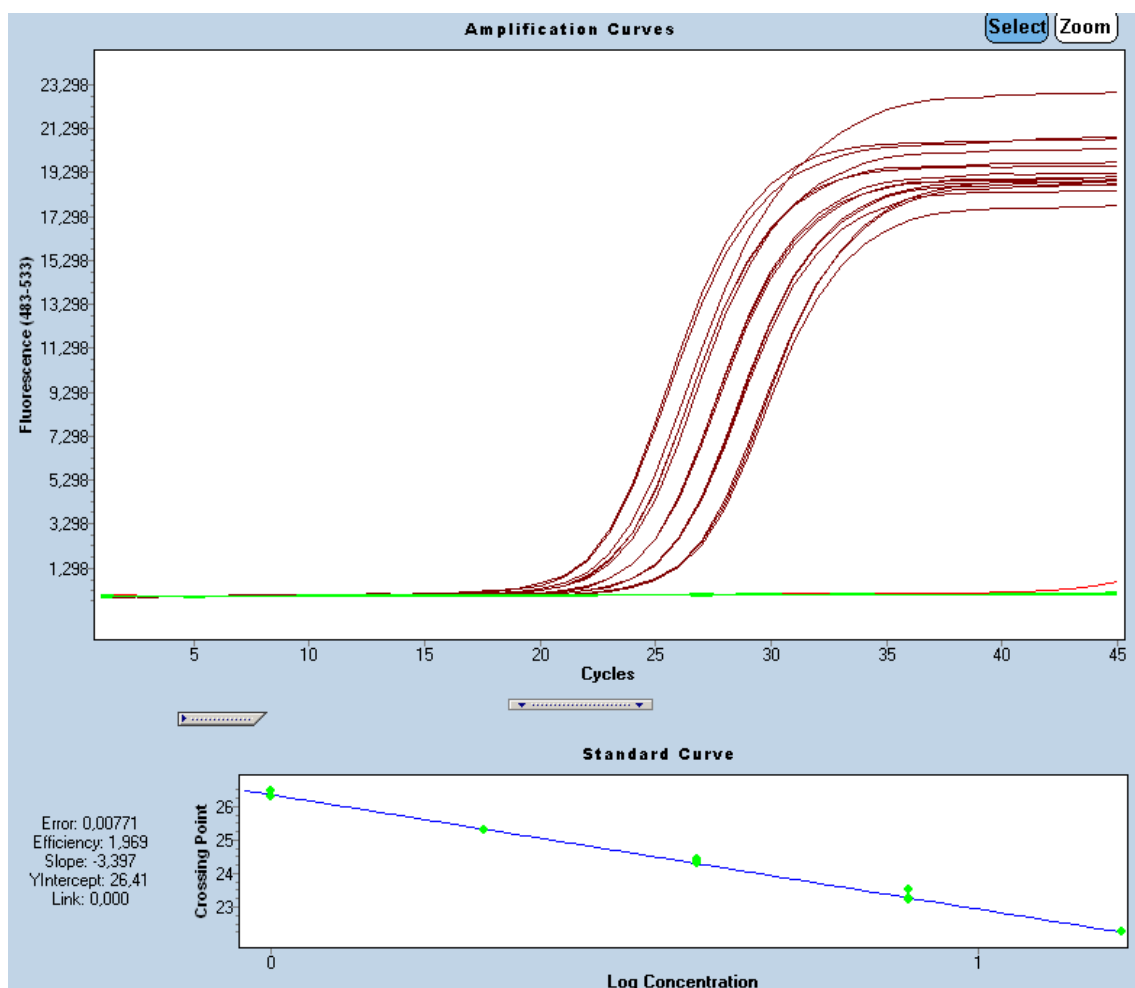


Abbildung 11

In der Abbildung 12 erkennt man den Kurvenverlauf einer Erhitzungsphase der Primertesting von hu-RCAN1. Da die Fluoreszenz nur an doppelsträngige DNA bindet, kann man anhand der Melting Curve erkennen, bei welcher Temperatur sich der Doppelstrang löst und zwei einsträngige DNA-Stränge entstehen. Bei der Analyse der Melting Curve zu hu-RCAN1 fällt auf, dass der „Melting-Point“ zwischen 82 °C und 84 °C liegt. Da es zu einem stetigen Abfall der doppelsträngigen DNA kommt und es keinen zweiten peak oder Stufe gibt kann davon ausgegangen werden, dass bei circa 84,5 °C die Doppelstränge alle in Einzelstränge zerlegt wurde.

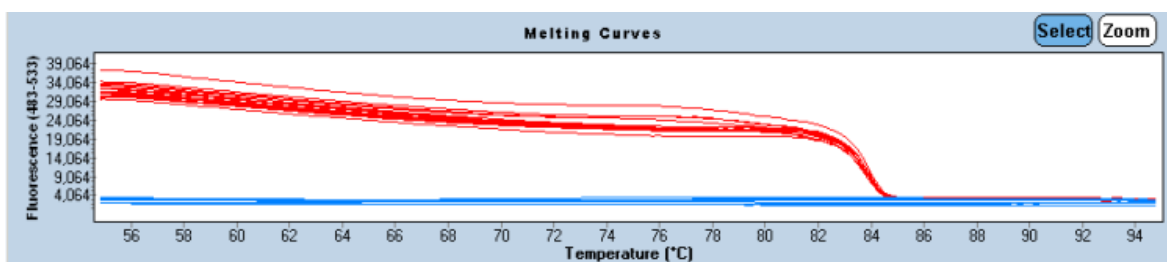


Abbildung 12

In der Abbildung 13, welche sich aus Abb. 12 ableitet, sieht man einen einfachen Ausschlag (single peak) zwischen 80-86 °C. Dieser zeigt uns, dass es für diesen Primer nur ein Amplicon gab. Dies spricht dafür, dass es keine Verunreinigung gab, an welche die Fluoreszenz hätte binden können.

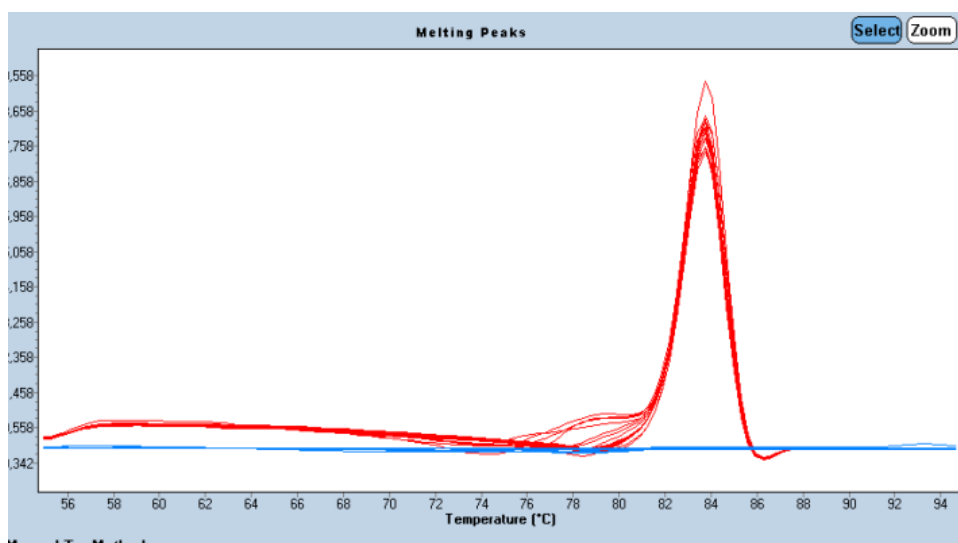


Abbildung 13

Dank der Auswertung der beiden Graphen und den hervorragenden Parametern Efficiency und Slope kann davon ausgegangen werden, dass hu-RCAN1 für die Laborbedingungen und den Experimentablauf die bestmögliche Primer-Wahl ist.

#### **2.6.4.2 qRT-PCR Versuchsprotokoll**

Für die Experimente wurden die in Tabelle 1 genannten Primer gewählt.

Alle cDNA Proben wurden auf 1ng/  $\mu$ l verdünnt. Der Mastermix wurde identisch zu dem im Kapitel Primertest beschriebenen Mastermix hergestellt.

Es wurden erst 6  $\mu$ l Mastermix und anschließend 4 $\mu$ l der Probe (entspricht 4 ng) auf die 384-Well Platte gebracht.

Die Proben wurden von einem automatischen Pipettierroboter der Firma Hamilton (STARlet) auf eine 384-Well Platte pipettiert. Das Ergebnis der PCR wird später beschrieben.

#### **2.6.4.3 Theoretischer Hintergrund zur PCR**

In der PCR wird die DNA auf 94-98 °C erhitzt, während dieser Phase teilt sich die doppelsträngige DNA in zwei einzelsträngige DNA Strecken auf.

Die Reaktion wird auf 45-65°C heruntergekühlt. In dieser Phase werden einzelne DNA-Primer, welche aus einzelsträngiger DNA bestehen hinzugegeben und die Taq-Polymerase bindet an die Primer des weiteren werden Nukleotide für die Polymerase hinzugegeben (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Diese Reaktion läuft sehr langsam ab, da die DNA-Polymerase bei so niedrigen Temperaturen nicht sehr aktiv ist, aber sich die Primer an ihre Startcodons setzen können.

Das Bad wird nun langsam auf 65-75°C erhitzt, die Taq-Polymerase hat ihr Wirkungsmaximum bei 72°C. In dieser Phase läuft die Taq-Polymerase die einzelsträngige

DNA in 3'-5'Richtung ab und ergänzt von dem Primer ausgehend die fehlenden Basenpaare mit den komplementären Basenpaaren in der Lösung, so dass zwei neue doppelsträngige DNA Stränge entstehen.

SYBR Green bindet alle neu entstandenen Basen Paare und bringt diese zum Fluoreszieren. Die Fluoreszenz akkumuliert sich und wird am Ende der PCR gemessen. Die Intensität der Fluoreszenz wird gegen die Hintergrund Fluoreszenz ( $C_T$ -Wert) gemessen und ist aussagekräftig über die Zahl der neu aufgetretenen Basen-Paare.

Dieser Zyklus wird 40mal wiederholt und am Ende wird die Steigerung an Fluoreszenz gegen den  $C_T$ -Wert gemessen.

## **2.7 Statistische Auswertung**

Alle in dieser Arbeit angegebenen Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Die Testung auf Signifikanz erfolgte mittels T-test(ungepaart).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 BNP

Für NppB(BNP) kann man eine generelle Expressionssteigerung feststellen. In den folgenden Abbildungen wurde in der ersten die gesamte Expression der Kontrollgruppe ins Verhältnis mit der gesamten Expressionssteigerung der Dehnungsgruppe gesetzt. Wie man in Abbildung 14 sieht, ist die Expression in der Dehnungsgruppe ca. 5-mal höher als in der Kontrollgruppe.

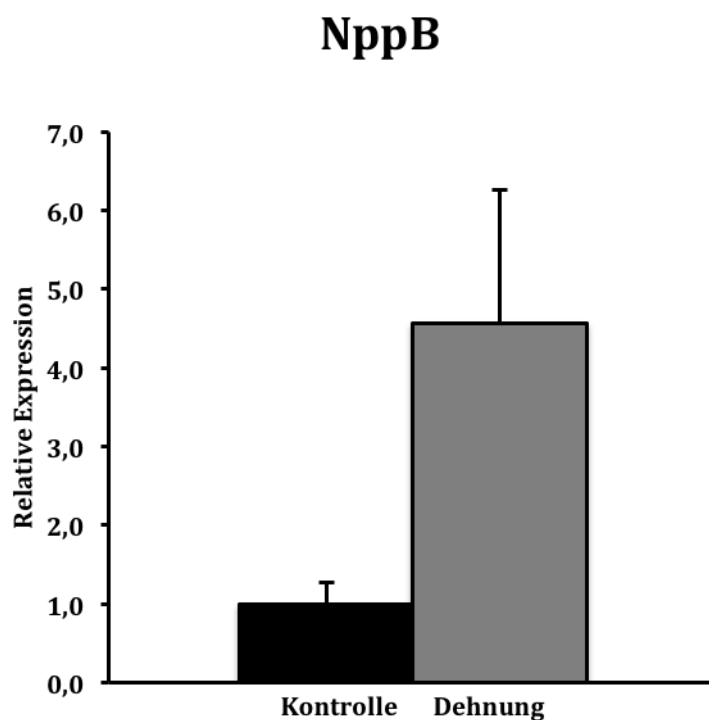


Abbildung 14 NppB Gesamtexpression

Man sieht in Abbildung 15 die Expression der Kontrolle und Dehnung für das 6 und 8 Stunden Protokoll. Man sieht hier nur eine minimale Expressions-Steigerung nach 6h. Ganz im Gegensatz zu der Expressionssteigerung nach 8Stunden Dehnung, hier kommt es zu einer starken aber nicht signifikanten Expressionssteigerung von NppB.

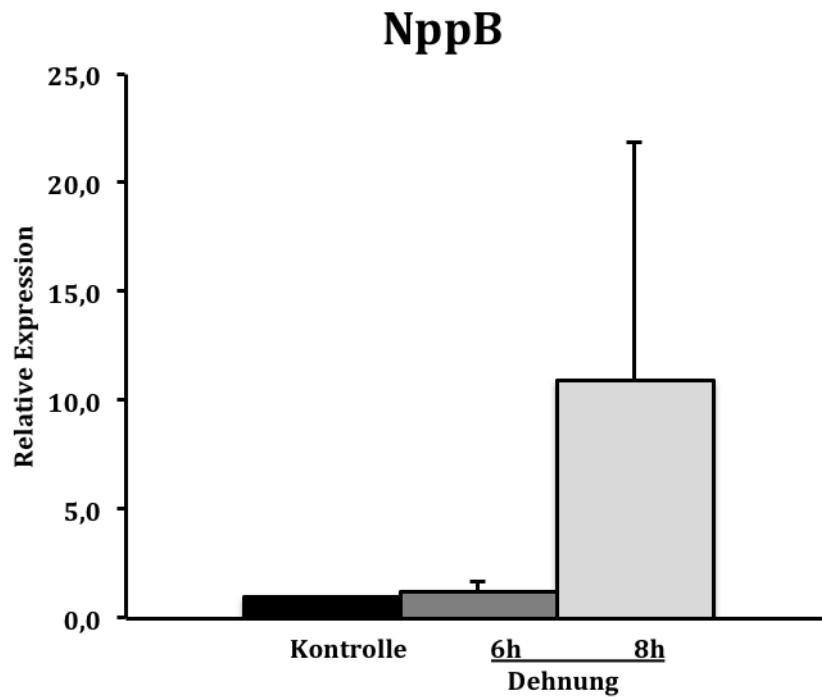


Abbildung 15 NppB Detailansicht

## 3.2 ANP

Für NppA(ANP) kann eine Expressionssteigerung in allen Untergruppen festgestellt werden. In Abbildung 16 sieht man die Kontrollgruppe im Zusammenhang mit der Gesamtheit der Dehnungsgruppe. Man erkennt eine Expressionssteigerung in der Dehnungsgruppe.

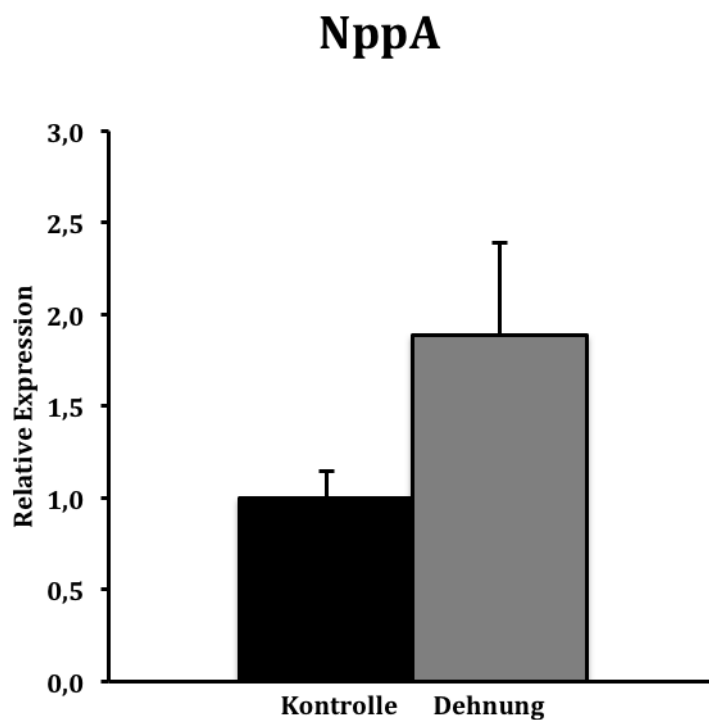


Abbildung 16 NppA Gesamtexpression

In der detaillierteren Abbildung 17 mit Aufspaltung in 6 Stunden und 8 Stunden Dehnung sieht man, dass es nach 6h noch zu keiner nachweisbaren Steigerung der NppA Expression kommt, wohingegen nach 8 Stunden eine signifikante Expressionssteigerung um den Faktor 5 nachweisbar ist.

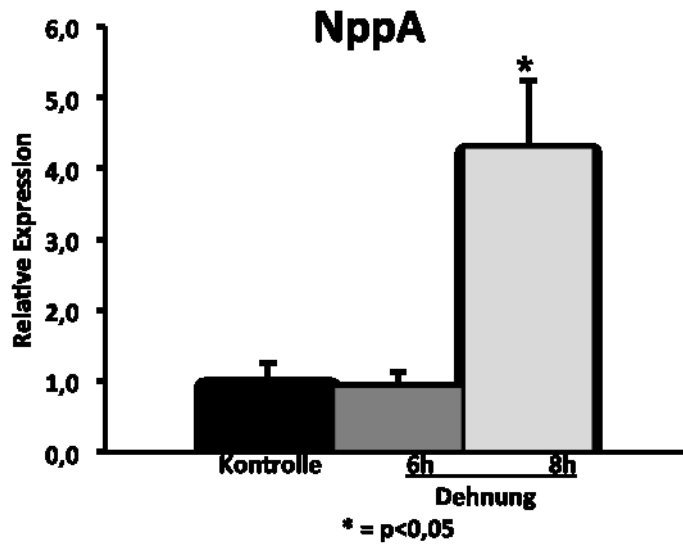


Abbildung 17 NppA Detailansicht

### 3.3 FHL1

Für FHL1 kann für die Gesamtexpression, wie in Abbildung 18 zu sehen, eine Expressionssteigerung nachgewiesen werden. Die Expressionssteigerung der Kontrolle im Vergleich zur Summe aller gedehnten Trabekel ist hierbei signifikant.

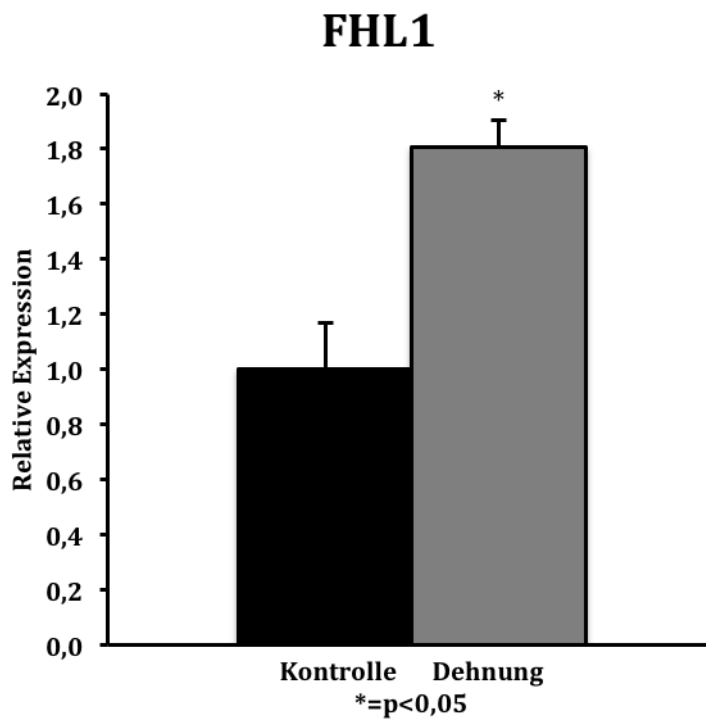


Abbildung 18 FHL1 Gesamtexpression

In der Detailansicht Abbildung 19 sieht man wie für NppA nach 6h Dehnung eine nicht aussagekräftige Veränderung der Expression und nach 8h eine starke und signifikante Expressionssteigerung der FHL1 Expression.

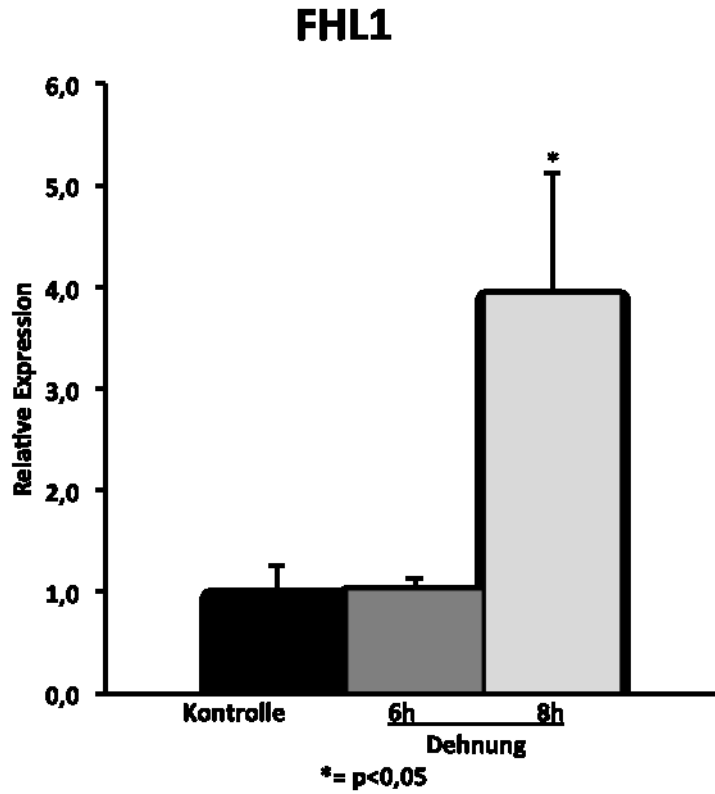


Abbildung 19 FHL1 Genexpression Detailansicht

### 3.4 MYH7

Für MYH7 konnte eine Expressionssteigerung der Dehnungsgruppe im Gesamtvergleich zur Kontrolle gemessen werden. Wie in Abbildung 20 zu sehen, kommt es zu einer Expressionssteigerung um den Faktor 3.

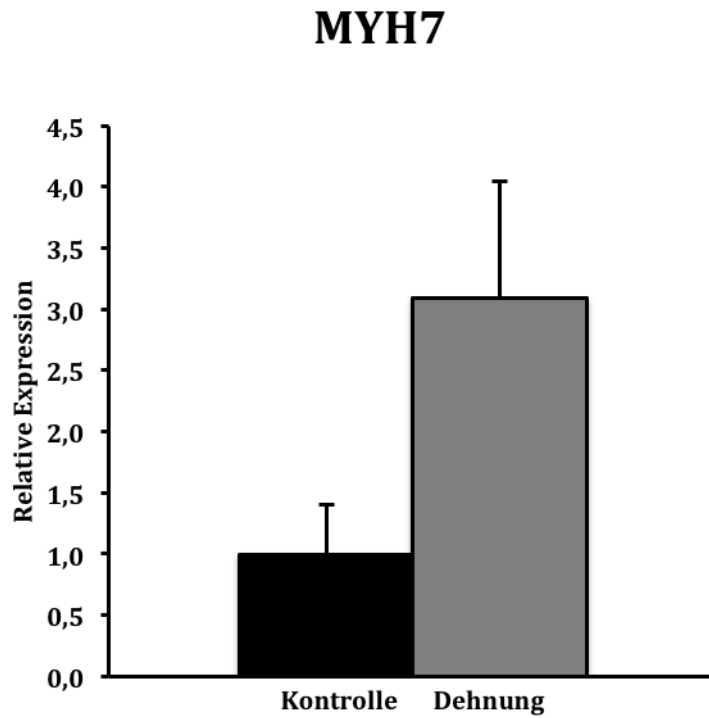


Abbildung 20 MYH7 Gesamtexpression

In der Detail Ansicht in Abbildung 21 sieht man, dass es nach 6 Stunden zu einer signifikanten Expressionssteigerung gekommen ist. Für 8 Stunden ist bei geringer Fallzahl leider keine aussagekräftige Aussage zu treffen aber der Trend geht auch hier zu einer Expressionssteigerung.

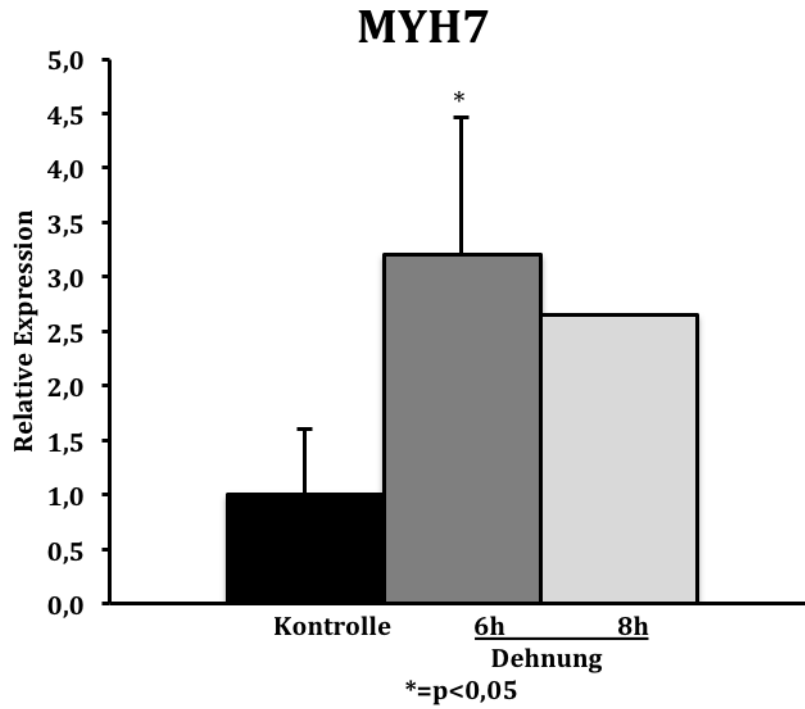


Abbildung 21 Detailansicht

### 3.5 TGFB1

Für das Gen TGFB1 kann, wie in Abbildung 22 zu sehen ist, eine Expressionssteigerung durch Dehnung nachgewiesen werden.

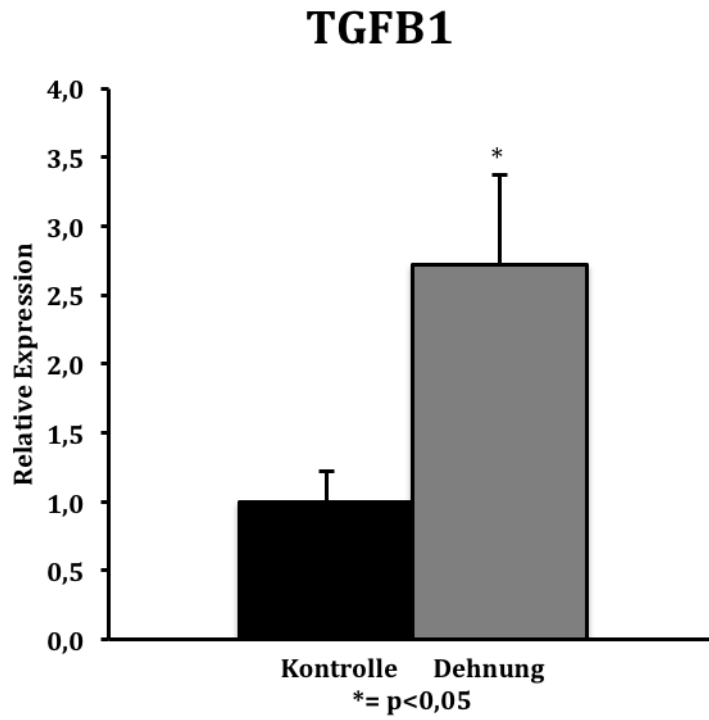


Abbildung 22 TGFB Gesamtexpression

In der Detailansicht zeigt sich, dass es nach 6 Stunden zu einer signifikanten Steigerung kommt und diese konstant ist und noch nach 8 Stunden nachweisbar ist.

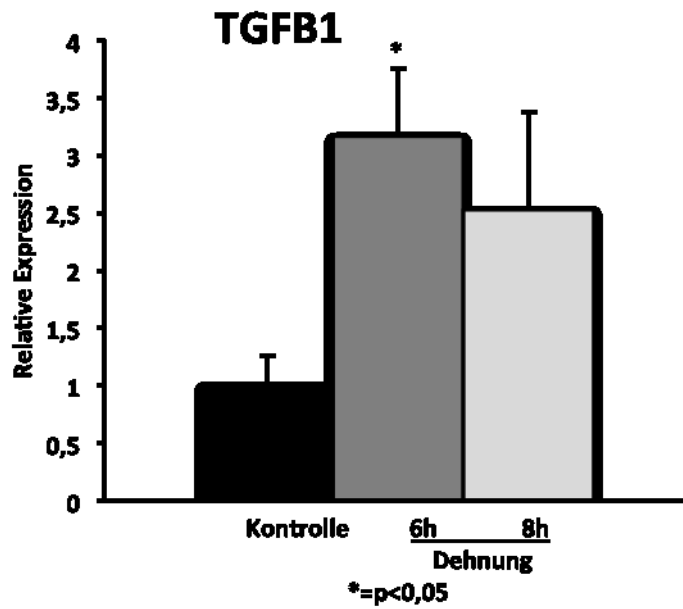


Abbildung 23 TGFB Detailansicht

### 3.6 RCAN1

Für das Gen RCAN 1 wird durch Dehnung eine Expressionssteigerung verursacht. Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, kommt es durch Dehnung zu einem Anstieg der Expression um den Faktor 4.

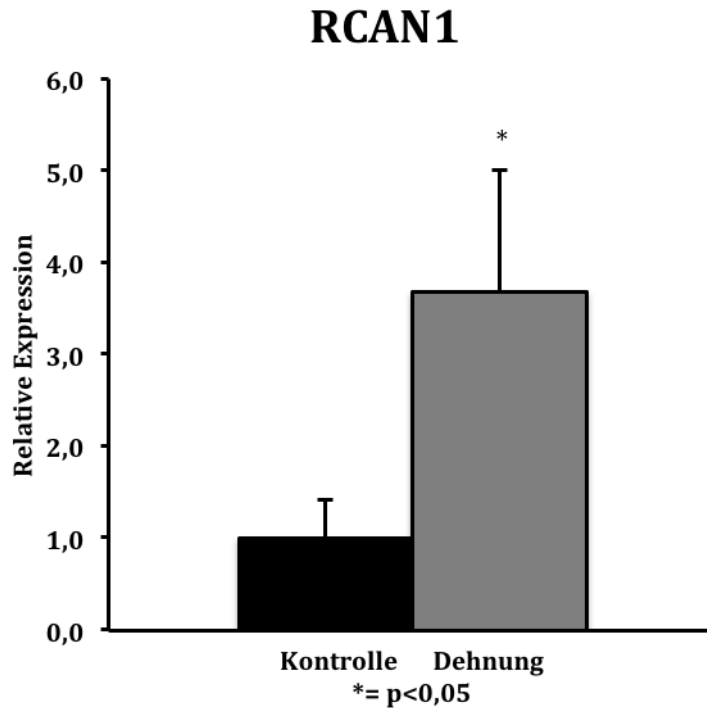


Abbildung 24 RCAN1 Gesamtexpression

In der Detailansicht sieht man eine konstante Steigerung der Expression nach 6 und 8 Stunden. Für 6 Stunden ist das Ergebnis allerdings mit Vorsicht zu betrachten, da es aufgrund geringer Fallzahl keine klare Aussagekraft gibt.

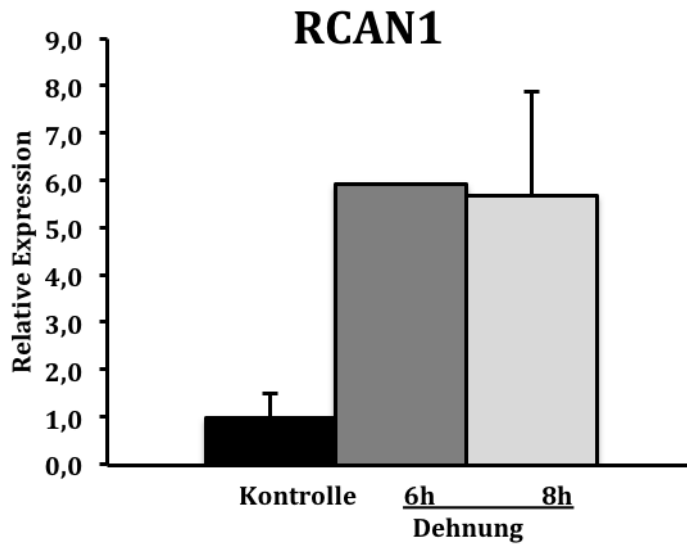


Abbildung 25 RCAN1 Detailansicht

### 3.7 ACTA1

Für das Gen ACTA1 kann durch Dehnung eine signifikante Expressionssteigerung nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, kommt es zu einer aussagekräftigen Expressionssteigerung.

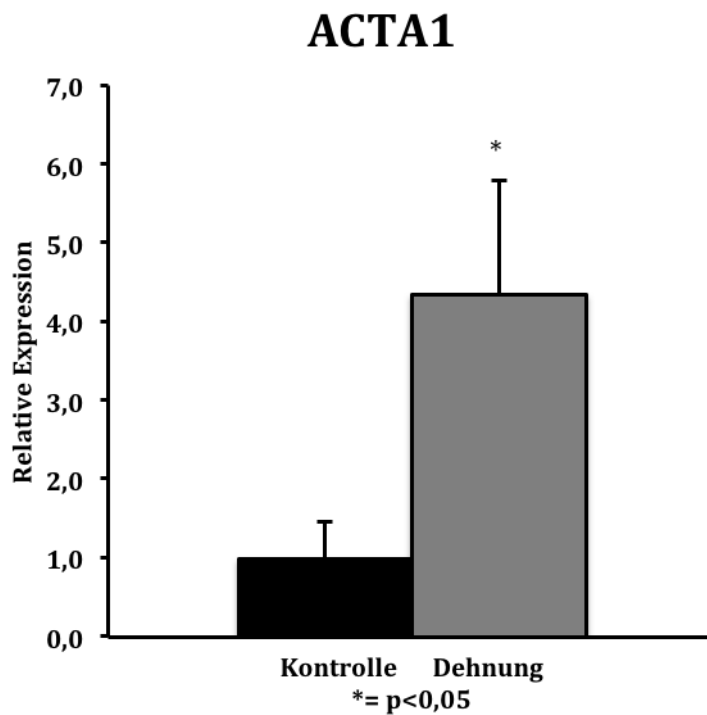


Abbildung 26 ACTA1 Genexpression Gesamtansicht

Wie in der Detailansicht Abbildung 27 zu erkennen, kommt es zu einer starken und signifikanten Expressionssteigerung nach 8h, bereits nach 6 Stunden ist eine Expressionssteigerung von 1,6 im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar.

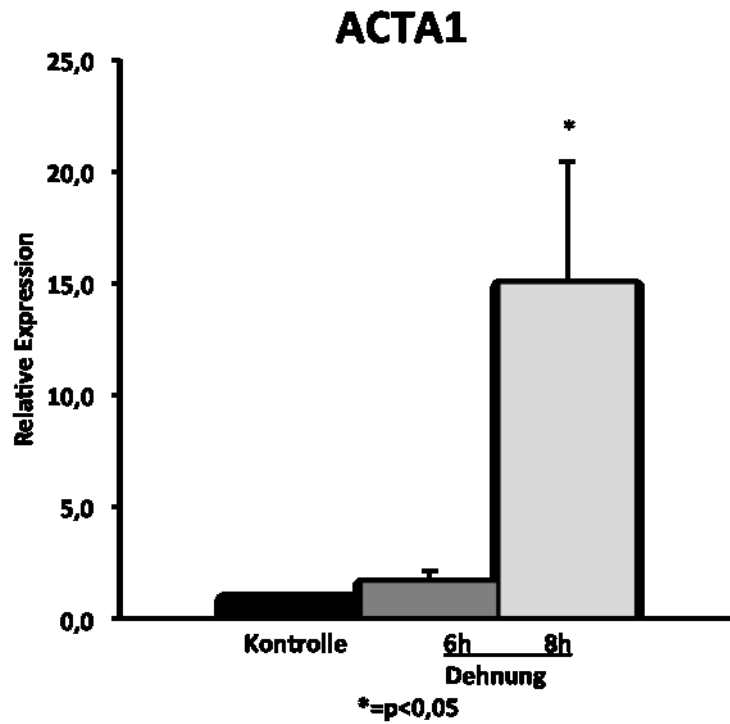


Abbildung 27 ACTA1 Detailansicht

### 3.8 IL6R

Für das Gen IL6R kann durch Dehnung eine Expressionssteigerung nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, kommt es zu einer 6-fach stärkeren Expression des IL6R Gens durch Dehnung.

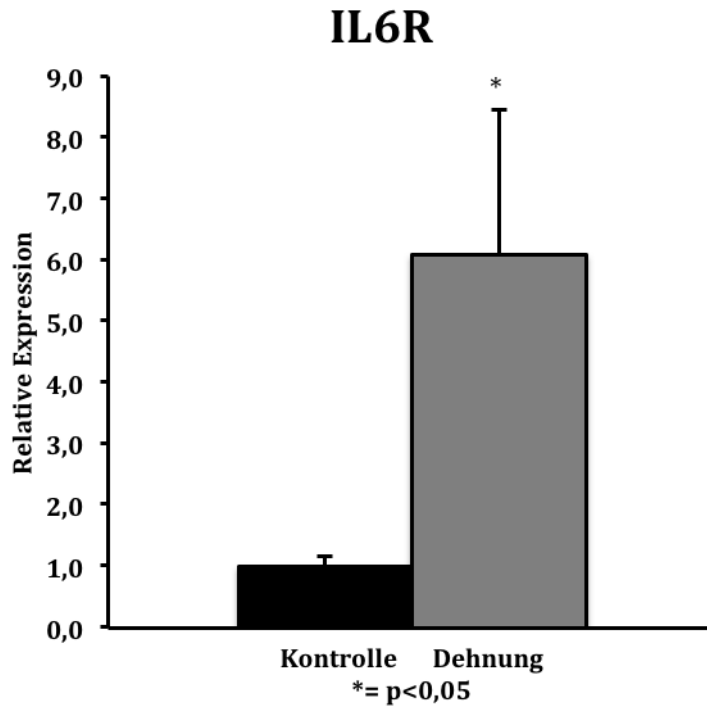


Abbildung 28 IL6R Gesamtexpression

Wie in Abbildung 29 zu sehens kommt es nach 6h zu einer stärkeren Expressionssteigerung als nach 8 Stunden. Aber auch nach 8 Stunden ist eine Steigerung um das 1,81 –fache im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar. Beide Messergebnisse sind signifikant.

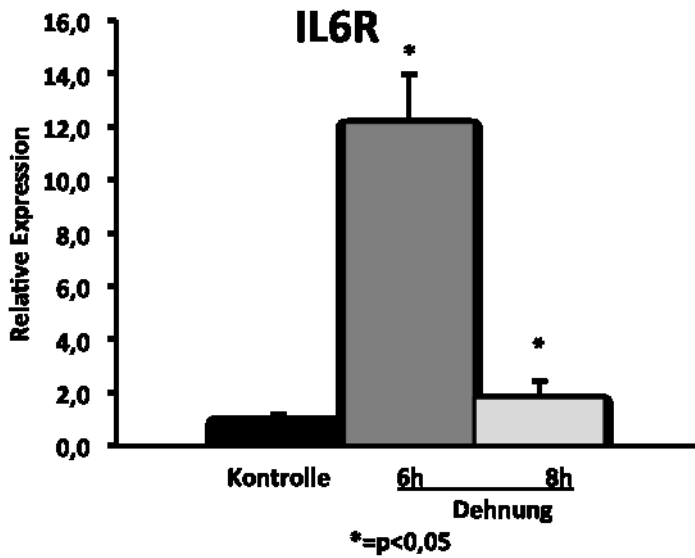


Abbildung 29 IL6R Genexpression Detailansicht

### 3.9 TIMP3

Für das Gen TIMP3 kann eine Expressionssteigerung durch Dehnung nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 30 zu sehen, kommt es zu einer Steigerung um den Faktor 5 durch Dehnung.

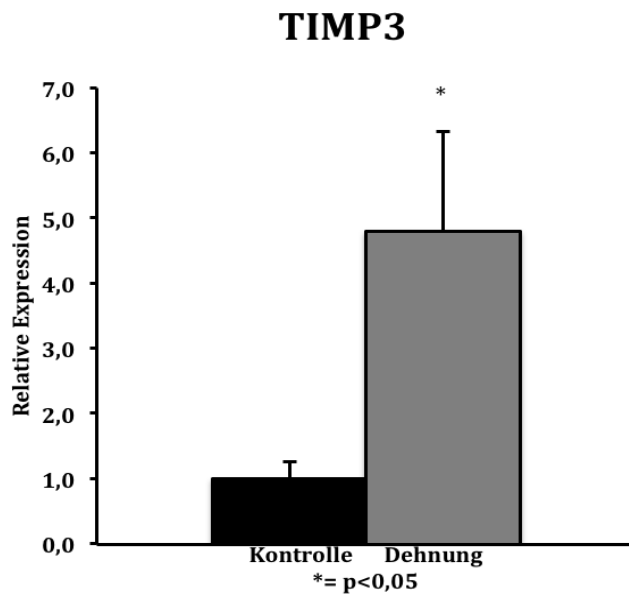


Abbildung 30 TIMP3 Gesamtexpression

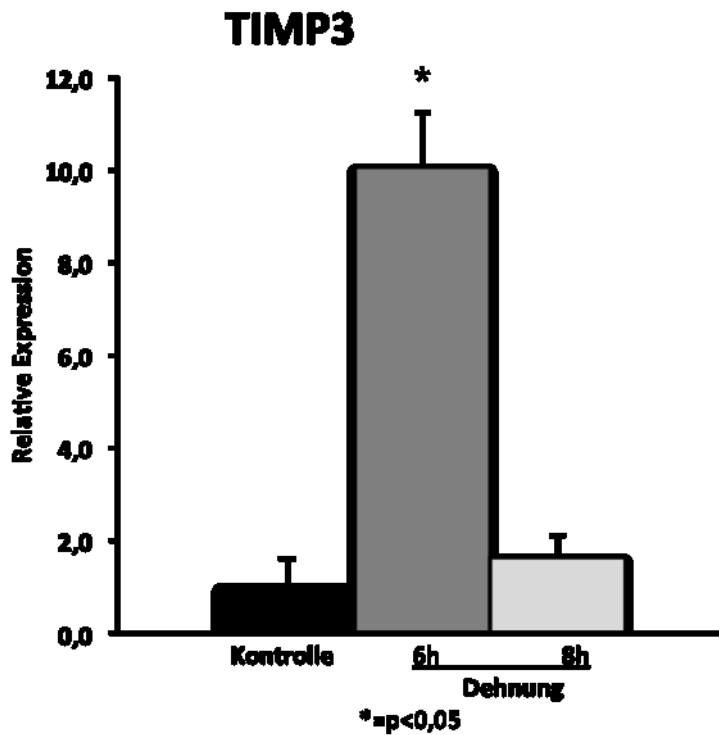


Abbildung 31 TIMP3 Genexpression Detailansicht

In der Detailansicht lässt sich erkennen, dass es nach 6 Stunden zu einer stärkeren und signifikanten Expressionssteigerung kam, nach 8 Stunden ist diese geringer ausgeprägt. Allerdings ist auch nach 8 Stunden eine Expressionssteigerung um den Faktor 1,62 feststellbar.

### 3.10 Subgruppenanalyse

In der Subgruppe mit erhöhtem pulmonal-arteriellen Druck war die Grundexpression in der Kontrollgruppe von Gen NppB und NppA höher als in der Gruppe ohne erhöhten PAP. Hingegen fiel der Dehnungseffekt bei PAP für dieses Gen tendenziell schwächer aus. Des Weiteren kann eine höhere Grundexpression und Expressionssteigerung für die Gene IL6R und TIMP3 festgestellt werden( Abbildung 32 und 33).

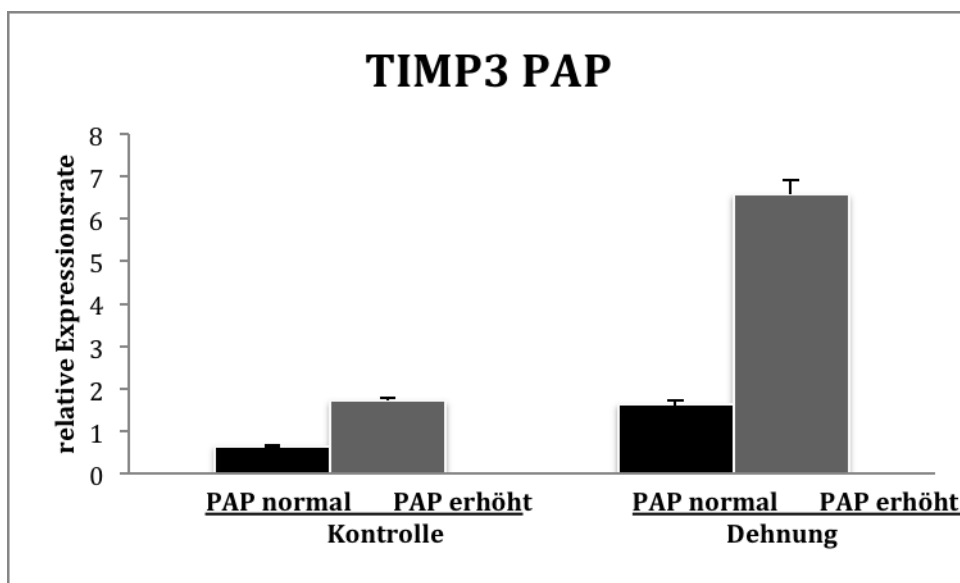


Abbildung 32 Korrelation TIMP3 Genexpression bei vorbekannten erhöhtem PAP

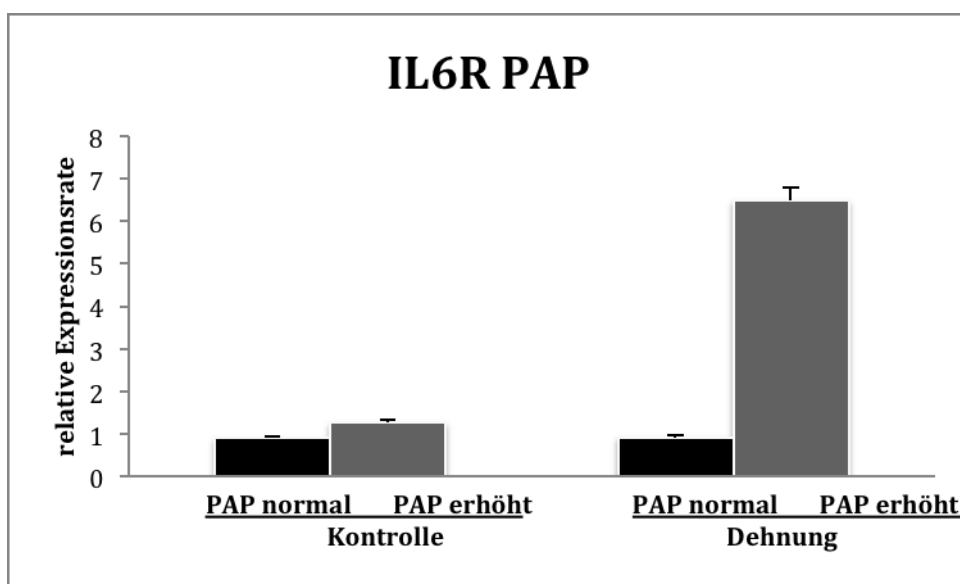


Abbildung 33 Korrelation IL6R Genexpression bei vorbekannten erhöhtem PAP

Für die Subgruppe mit erhöhtem PAP konnte auch eine verringerte Expression von NppA und NppB bei Patienten mit erhöhtem PAP festgestellt werden. Sowohl die Grundexpression als auch die Expressionssteigerung ist hierbei verringert (Abbildung 34 und 35).

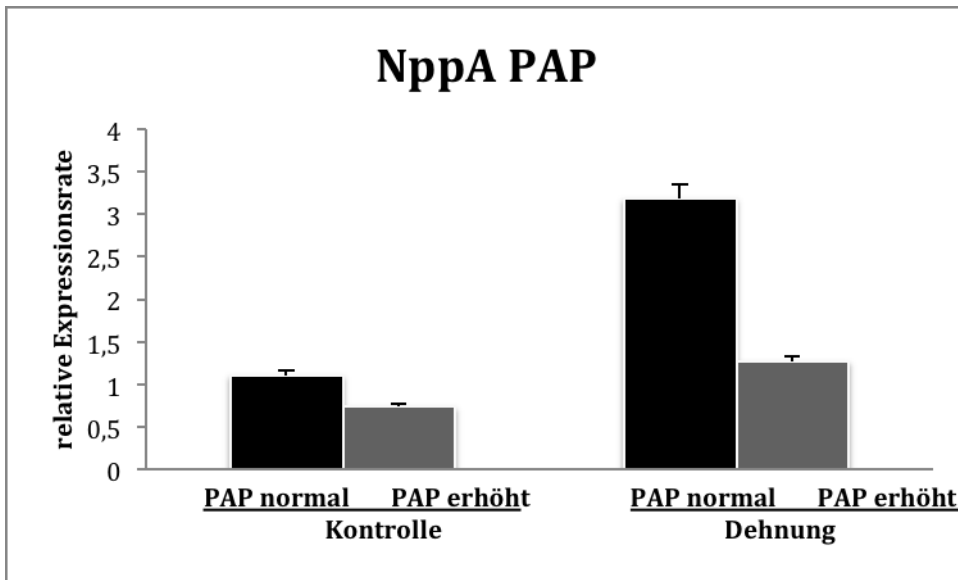


Abbildung 34 Korrelation NppA Genexpression bei vorbekanntem erhöhtem PAP

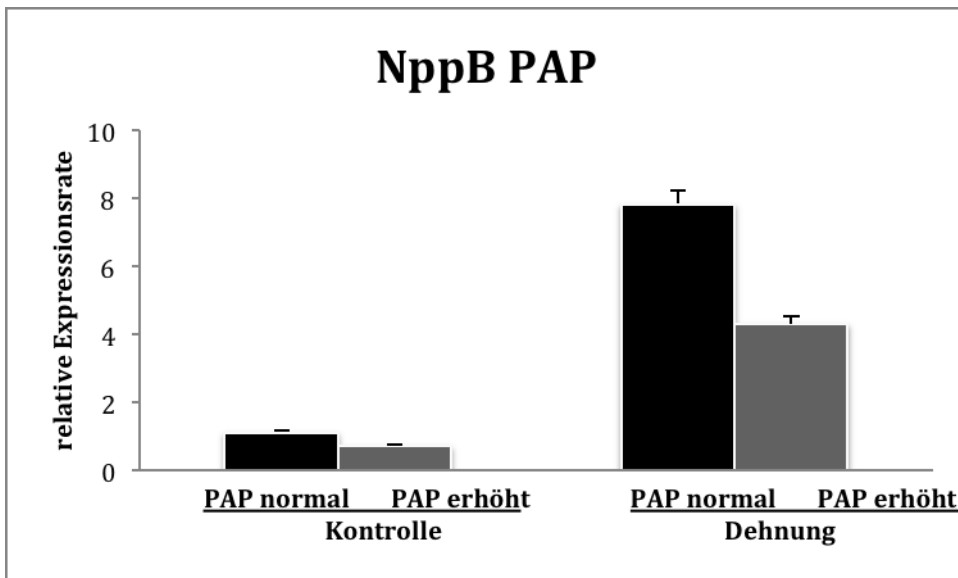


Abbildung 35 Korrelation NppB Genexpression bei vorbekanntem erhöhtem PAP

In der Subgruppe mit RA-Vergrößerung war die Grundexpression in der Kontrollgruppe von Gen IL6R und MYH7 niedriger als in der Gruppe ohne RA-Vergrößerung. Aussagen über den Dehneffekt sind bei fehlender Fallzahl leider nicht möglich.

## IL6R

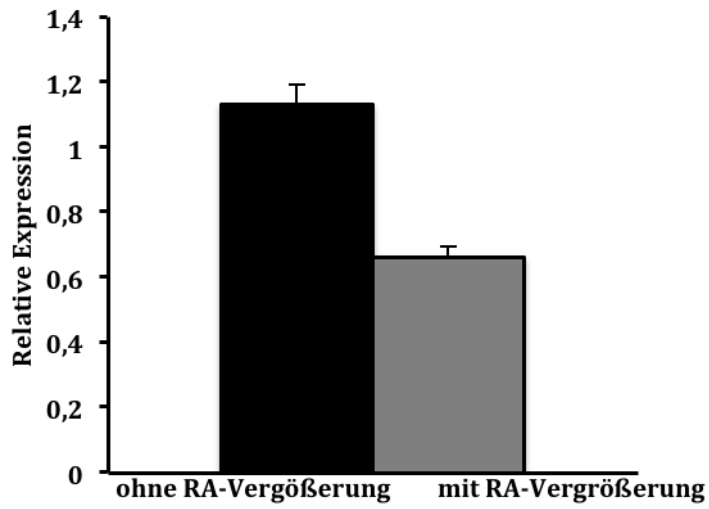


Abbildung 36 IL6R Expression in der Kontrollgruppe, korreliert mit RA-Vergrößerung

## MYH7

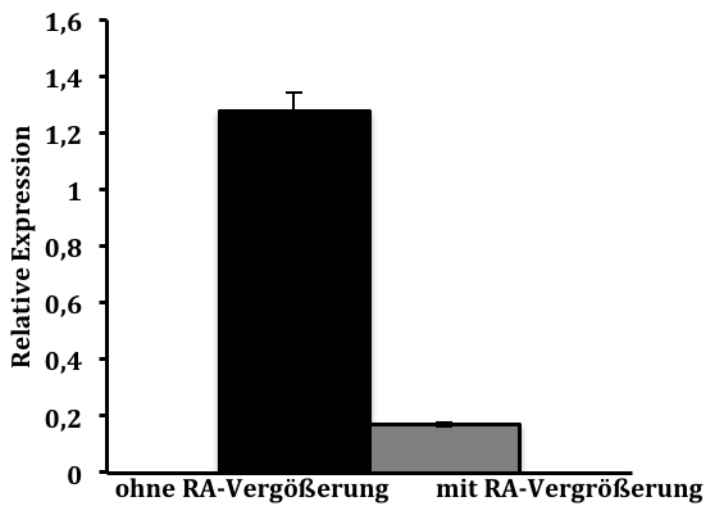


Abbildung 37 MYH7 Expression in der Kontrollgruppe, korreliert mit RA-Vergrößerung

Für das Gen TIMP3 lässt sich bei RA-Vergrößerung eine erhöhte Grundexpression nachweisen. Auch hier ist eine Aussage für einen Dehneffekt aufgrund fehlender Fallzahl leider nicht möglich.

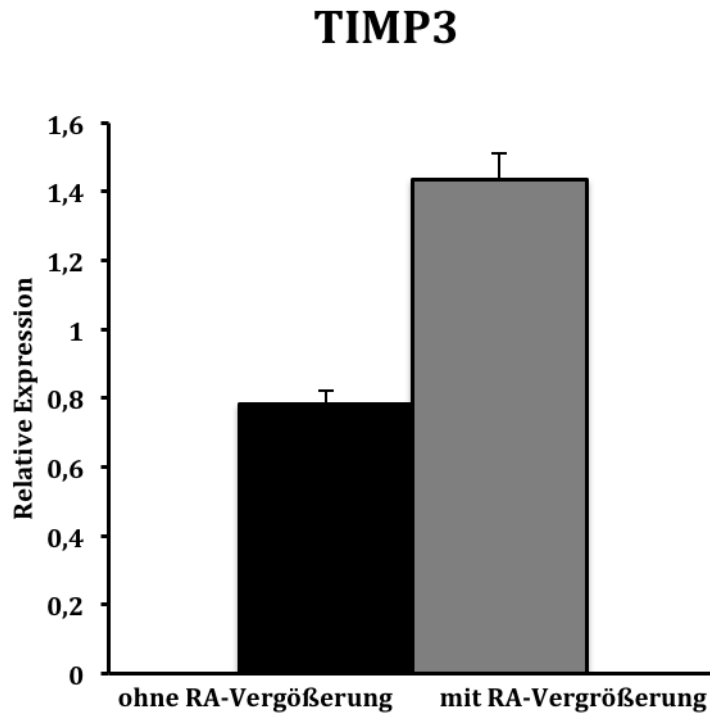


Abbildung 38 TIMP3 Expression der Kontrollgruppe, korreliert mit RA-Vergrößerung

### 3.11 Genexpression im Ventrikel

Wie in Abbildung 39 zu sehen ist, konnte für den Ventrikel eine signifikante Expressionssteigerung um den Faktor 2,29 nach 8 Stunden Dehnung festgestellt werden.

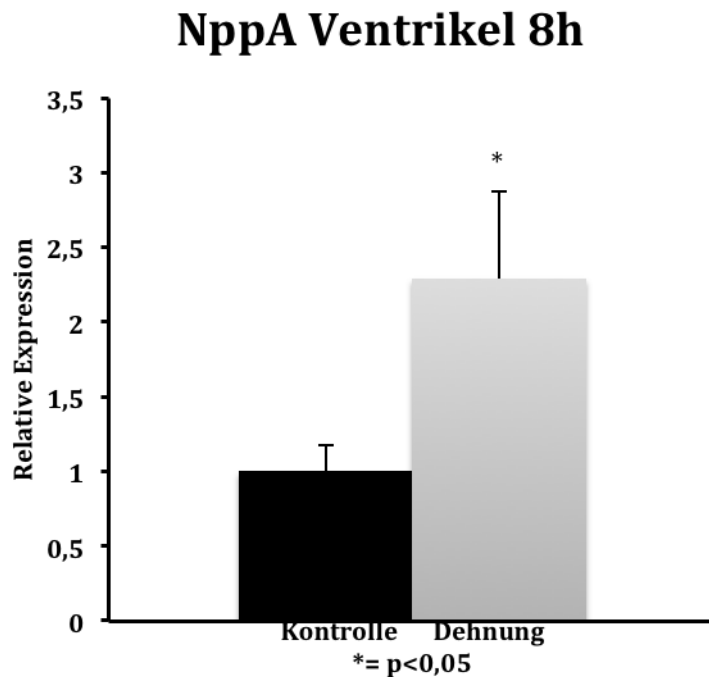


Abbildung 39 NppA Ventrikel Dehnung nach 8 Stunden

Wie bei dem jeweiligen Gen bereits besprochen, konnte außer für den Hypertrophie Marker NppA für kein weiteres Gen eine Expressionssteigerung nachgewiesen werden. In Abbildung 40 sieht man, dass die Streuung sehr groß ist und aufgrund der niedrigen Fallzahl von qualitativ hochwertigen Proben sind die Ergebnisse nicht aussagekräftig.

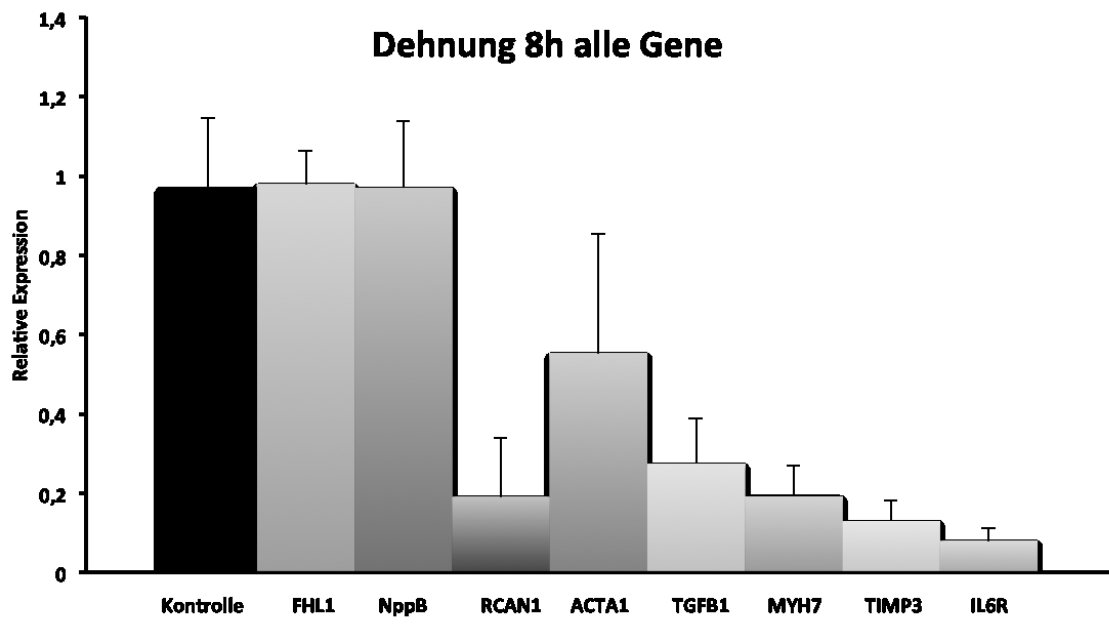


Abbildung 40 Alle Gene im Ventrikel nach 8 Stunden

## 4 Diskussion

### 4.1 BNP

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Hochregulation von BNP im ventrikulären und im atrialen Myokard durch akute Dehnung nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Befunden von Toischer und Kögler et al, die an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten aus Kanninchen- und Human-Myokard unter Last über 6 Stunden eine ähnlich hohe Expressionssteigerung finden konnten. (18) In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass BNP bereits nach 6h auf Dehnung reagiert. Eine Expressionssteigerung von BNP auf Proteinebene wird typischerweise durch eine Zunahme der Wandspannung ausgelöst (57), was durch Dehnung in Trabekel Streifen simuliert werden kann. Grundsätzlich muss aber hierbei zwischen Änderungen der Proteinexpression durch veränderte Translation und Proteindegradation und veränderte Transkription unterschieden werden.

Für die Transkription konnten nämlich Alves et al. (44) zeigen, dass neben der Wandspannung auch adrenerge und Angiotensinrezeptor-vermittelte und nachgeschaltete kalziumabhängige Mediatoren wie cAMP, Phosphokinase A und Phosphokinase C an der Regulation von Kalzium beteiligt sind, was die Expression von BNP regulieren könnte. Eine Dehnbelastung führt sowohl zu einer Aktivierung von Kalzium Kanälen als auch zu einer chronischen Erhöhung des diastolischen Kalziumlevel und Verteilungsmuster von intrazellulärem Kalzium (Shannon et al. und Cooling et al. (34, 49)). Über diesen Mechanismus könnte es zu einer Aktivierung von Calcineurin (Kehat et Molkenin (10)) kommen, das zur gesteigerten Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-AT führt und direkt die Expression von BNP beeinflusst. Wie später beschrieben, wurden in dieser Arbeit auch andere direkte Downstream Gene von NF-AT gemessen, so ACTA1, Nppa(ANP) und  $\beta$ -MHC. Eine direkte Hemmung dieses Transkriptionsfaktors durch FK-506 und ein dadurch bedingtes Ausbleiben der BNP-Expressionsantwort könnte diesen Mechanismus in Folge-Studien unter Beweis stellen.

Für das kardiale Remodeling bedeuten die vorliegenden Ergebnisse, dass eine Dehnbelastung durch die Expressionssteigerung von BNP einen kompensatorischen Mechanismus im ventrikulären Myokard hervorruft. BNP wirkt antihypertroph, diuresefördernd und vasodilatierend (Jensen et al.(20) und Sun et al. (58)), alles Wirkungen, die einem maladaptiven Remodeling entgegenwirken.

Für die Genexpression im Ventrikel ist aufgrund der niedrigen Fallzahl keine Aussage über Expressionsveränderungen durch Dehnung möglich.

## **4.2 ANP**

Korrelierend mit einem Anstieg von BNP konnte ein Anstieg von ANP nach 8 stündiger Dehnungsbelastung festgestellt werden, dieser ist signifikant. Wie von Kinnunen et al. (26) am Rattenmodell gezeigt, bewirkt passives dehnen eine Expressionssteigerung von ANP. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein ANP Anstieg in humanen atrialen und ventrikulären Myokard nach 8 stündiger Dehnung nachweisbar ist. Es kommt durch Dehnung zur Zunahme von atrialer Wandspannung und hierdurch zu einer Sekretion und zusätzlich zu einer gesteigerten Expression von ANP (25), die Dehnung des Atriums ist der wichtigste Reiz für eine Erhöhung von ANP. Allerdings gilt wie für BNP auch für ANP ein Zusammenhang mit adrenerger Stimulation, wie durch Alves J. et al. gezeigt wurde (44). Hierbei ist der gleiche Mechanismus wie bereits oben beschrieben über einen Anstieg von cAMP verantwortlich.

Da ANP auch durch den Calcineurin/NF-AT Signalweg hochreguliert wird, ist es wenig verwunderlich, dass es bei einem Anstieg von BNP auch zu einem Anstieg von ANP kommt. ANP wirkt wie BNP, antihypertroph, diuresefördernd und vasodilatierend (59), so dass durch die ANP-Expressionsantwort ein kompensativer adaptiver Mechanismus angenommen werden kann.

### **4.3 FHL1**

Wie für die oben beschriebenen Hypertrophiemarker konnte auch für Four –and-a-half-lim 1 (FHL1) eine Expressionssteigerung nachgewiesen werden und zwar eine signifikante Steigerung um den Faktor 3,94 nach 8h Dehnung.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt zeigt Hutchinson et al. dass es bei Mäusen nach Aortalem Banding und der dadurch verursachten Nachlast-Erhöhung zu einer Expressionssteigerung von FHL-1 und FHL-2 kommt. (30) Klinische Relevanz haben Mutationen in FHL-1, diese führen zu Emery-Dreifuss Muskeldystrophie. Aber es gibt auch nonsense Mutationen in FHL-1, welche zu einer kardialen Hypertrophie führen(60).

Im Rattenmyokard konnte von *Gaussin A. et al.* gezeigt werden, dass für die Entstehung von  $\beta$ -adrenerger Hypertrophie FHL1 eines der wichtigsten Träger-Gene ist (61).

In seiner Funktion ist FHL-1 ein Regulator der Muskelmasse, wobei die genaue Funktionsweise weiterhin ungeklärt bleibt. In Mäusen mit gesteigerter FHL1 Expression wurde in skeletalen Muskelzellen eine Hypertrophie induziert und es kam zu einem Wechsel des Muskelfasertypus. Diesen Pathomechanismus konnte man in Versuchen mit NF-AT Inhibition unterbinden (62). Dies könnte auch für Folge-Experimente der Arbeitsgruppe, in der diese Diplomarbeit durchgeführt wurde, in denen eine Hemmung von Calcineurin mit FK-506 angestrebt, wird von Relevanz sein. Eine Angiotensin-1 vermittelte Aktivierung scheint auch von Relevanz zu sein, in Rattenmodellen wurde über eine AT-1 Blockade eine FHL1 Expression unterdrückt (63).

Für die Genexpression im Ventrikel ist aufgrund der niedrigen Fallzahl keine Aussage über Expressionsveränderungen durch Dehnung möglich.

### **4.4 MYH7**

In dieser Arbeit konnte für  $\beta$ -MHC nachgewiesen werden, dass es zu einer Steigerung der Expression nach 6h und 8h kam, wobei die Expressionssteigerung nach 6 Stunden signifikant war. Für den Ventrikel ist der Trend zu einer Herunterregulation zu erkennen, allerdings ist dieser Fund aufgrund der geringen Fallzahl nicht aussagekräftig. Dieses Ergebnis ist schlüssig mit den Vorbefunden wie durch Guggilam A. et al. an Ratten mit aortocavalen Fisteln in *in vivo* und *in vitro* Experimenten an männlichen Sprague-Dawley

Ratten gezeigt. Kommt es bei diesen Ratten zu einem Umbau von  $\alpha$ -MHC zu  $\beta$ -MHC Isoform. Die Mäuse wurden hierbei durch die Aorto-cavale Fistel einer erhöhten Vorlast ausgesetzt. Es kam in den Mäusen nach 21 Wochen zu einer Ausbildung einer linksventrikulären exzentrischen Dilatation und auf zellulärer Ebene zu einem Umbau der MHC Untergruppen.  $\beta$ -MHC ist Energie effizienter als  $\alpha$ -MHC (64).

Zu einer Expressionssteigerung von  $\beta$ -MHC auf molekularer Ebene kommt es wie bei BNP durch eine Erhöhung des Wandspannungsstress. Es kommt über eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums und hierbei über CAMK-II zu einer Expressionssteigerung von  $\beta$ -MHC.

Wie für BNP bereits beschrieben führt ein erhöhtes diastolisches Kalzium zu einer Aktivitätssteigerung von CAMK-II. Die Zunahme von diastolischen Kalzium findet aufgrund verringerter SERCA-2a Aktivität statt, welche für den Abtransport von Kalzium aus dem Zytosol verantwortlich ist. Ein Anstieg des enddiastolischen Kalziums führt über den oben beschriebenen Calcineurin und Calmodulin vermittelten Signalweg zu einer Aktivierung von NF-AT und CAMK-II und damit zu einer Steigerung von  $\beta$ -MHC.

## **4.5 TGFB**

TGFB zeigt nach 6h eine signifikante Expressionssteigerung, aber auch nach 8h ist der Trend zur Steigerung erkennbar. Für den Ventrikel ist der Trend zu einer Herunterregulation zu erkennen, allerdings ist dieser Fund aufgrund der geringen Fallzahl nicht aussagekräftig.

Wie von Stefan Rosenkranz gut zusammengefasst, kommt es bei linksventrikulärer Dilatation oder HOCM zu einer Hochregulation von TGF- $\beta$ . Das Ausmaß der Aktivitätssteigerung von TGF- $\beta$  lässt sich mit dem Umfang der Fibrose korrelieren. *In vitro induziert* TGF- $\beta$  die Produktion von Extrazellulärmatrix dazu gehört Fibronectin, Kollagen und Proteoglykane von Fibroblasten, außerdem aktiviert es das fetale Genexpressionsmuster, all dies sind Marker für eine Hypertrophie. (65)

Durch Okumura K et al. konnte am Rattenmodell gezeigt werden, dass über eine Blockade mit Carvedilol (beta-Blocker) eine Zunahme der Fibrose bei Patienten mit pulmonalem Hypertonus (Wandspannungsstress) erzielt werden konnte.(66)

Davon ausgehend, dass es bei pulmonalem Hypertonus und Dehnung zu einer Expressionssteigerung von TGFB1 kommt, konnte in unserem Setting davon ausgegangen werden, dass es zu einer Steigerung kommt.

## **4.6 RCAN1**

Für RCAN1 konnte wie oben gezeigt, ein Trend zur Steigerung nach 6h sowie nach 8h erkannt werden, leider ist dieser nicht signifikant. Für den Ventrikel ist der Trend zu einer Herunterregulation zu erkennen, allerdings ist dieser Fund aufgrund der geringen Fallzahl nicht aussagekräftig. In diesem Ergebnis spiegelt sich die Vermutung wieder, dass RCAN1 autoregulativ in den Calcineurin Stoffwechsel eingreift.

Wie von Vega et al. Gezeigt, kommt es in RCAN1-knockout Mäusen durch eine gesteigerte Nachlast zu verringerten Hypertrophie als in Mäusen ohne die Mutation(37). Bartelds B. et al. konnten an Mäusen mit erhöhter Nachlast durch aorto-cavalen Shunt oder pulmonal Arterie Banding (PAB) zeigen, dass es abhängig von der Art des Stimulus zu verschiedenen Molekularen Adaptionsmechanismen kommt. Beide Methoden führten hier zu einer ähnlich stark ausgeprägten Hypertrophie. In Mäusen mit PAB kam es zu einer Hochregulation von RCAN1, welches für eine Aktivierung des Calcineurin Signalweg steht. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse nach aorto-cavalen Banding keine Expressionssteigerung.(67)

Diese Studien mit gegensätzlichem Ergebnis zeigen, dass der Einfluss von RCAN1 noch nicht vollständig geklärt ist, RCAN1 aber durchaus einen Einfluss auf Hypertrophie Entstehung hat.

In Folgestudien der Arbeitsgruppe, welche sich mit diesem Thema weiterbeschäftigt kann untersucht werden, ob durch eine Hemmung dieser Signalkaskade, durch z.Bsp. FK-506, die Genexpressionssteigerung von RCAN1 reduziert werden kann. Falls dies möglich ist, wäre es ein indirekter Beweis für den NF-AT Calcineurin Signalweg im menschlichen Myokard und seinen Rolle auf Hypertrophie Entstehung.

## 4.7 ACTA1

Für das Gen ACTA1 konnte nach 6 stündiger Dehnung ein geringer Anstieg der Expression (n.s.) festgestellt werden, nach 8h aber eine signifikante Expressionssteigerung im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Für den Ventrikel ist der Trend zu einer Herunterregulation zu erkennen, allerdings ist dieser Fund aufgrund der geringen Fallzahl nicht aussagekräftig. Da ACTA1 skeletales  $\alpha$ -Aktin Bestandteil des fetalen Genexpressionsmusters ist, ist dieses Ergebnis gut vergleichbar mit vorher durchgeführten Studien und bestätigt, dass es auch hier zu einem frühen Umbauprozess kommt.

Wie durch Copeland O. et al. in humanem und Ratten-Myokard gezeigt wurde, kommt es bei Hypertrophie zu einem signifikanten Anstieg des Anteils von skeletales  $\alpha$ -Aktin. Beim Menschen und Ratten ohne Hypertrophie wurden 21 +/- 2% skeletales  $\alpha$ -Aktin gemessen, die restlichen 79 +/- 2% bestehen aus actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1) und beim Menschen mit terminalen Herzversagen 53 +/- 5% skeletales  $\alpha$ -Aktin gemessen am Rattenmyokard sogar 60 +/- 7% . (68) Es kommt demnach zu einer Steigerung von ACTA1 bei Dilatation und Dehnung von Myokard. Es ist bekannt, dass Mutationen in dem für ACTA1 codierenden Gen zu angeborener Muskeldystrophie mit kardialer Beteiligung führen (Nemalin Kardiomyopathie)(28, 69).

Wie BNP, ANP und  $\beta$ -MHC ist auch ACTA1 ein Bestandteil der fetalen Genexpression so wird auch ACTA1 durch eine Störung der Ionenhomöostase durch Kalzium Anstieg und konsekutiver CaN/CaMK-II Aktivität gesteigert. Eine Unterexpression (Mutation) von ACTA1 führt zur Dystrophie und seine Aktivitätssteigerung führt zu Hypertrophie.

Wie bei BNP bereits beschrieben, kommt es zu einer Aktivierung von ACTA1 durch NF-AT aber auch durch die TEF-Familie, also durch adrenerge Stimulation wird die ACTA1 Expression gesteigert. Der Einfluss von Angiotensin auf ACTA1 scheint von geringerer Bedeutung zu sein.

## **4.8 IL6R**

Wie in Ergebnissen an Abb. 29 konnte für Interleukin 6 Rezeptor(IL6R) nach 6h und 8h eine Expressionssteigerung festgestellt werden, diese sind signifikant. Für den Ventrikel ist der Trend zu einer Herunterregulation zu erkennen, allerdings ist dieser Fund aufgrund der geringen Fallzahl nicht aussagekräftig. Dies passt zu der Funktion von Interleukin-6(IL6) als immunologische Erstantwort. Die stärkere Expression nach 6h könnte man als Primärantwort diskutieren und nach 8 Stunden kam es bereits zu einer schwächeren Expression, da es für eine chronische Belastung steht.

IL6 wird nach akuter Schädigung sezerniert und aktiviert Immunzellen und zelluläre protektive Antworten. Für kurze Zeiträume verhindert IL-6 schwere Schäden, bei chronischer Erhöhung wird es aber zu einem pathogen. Es kommt zu chronischer Entzündung und fibrotischen Umbau. (70) Es gibt mehrere Studien, die den IL6-Rezeptor in diesem Zusammenhang als mögliches neues Ziel einer anti-proliferativen Therapie sehen (71, 72). IL6R Expression wird im Falle einer Entzündungsreaktion und dem Vorhandensein von IL6 erhöht. Als Fibrose Marker und Marker für Remodeling in humanem Myokard kann er deswegen sehr gut verwendet werden.

## **4.9 TIMP3**

Im atrialen Myokard konnte nach 6h eine signifikante Hochregulation von TIMP3 gefunden werden. Für den Ventrikel ist der Trend zu einer Herunterregulation zu erkennen, allerdings ist dieser Fund aufgrund der geringen Fallzahl nicht aussagekräftig.

Die Annahme eines Anstieges von TIMP3 beruht auf der Tatsache, dass es ein elementarer Bestandteil im Remodeling von Myokard darstellt. Fan D et al haben im *in vivo* an Ratten gezeigt dass es bei TIMP3 und TIMP2 Knockout Mäusen, also Mäusen mit fehlender Expression von TIMP3/TIMP2 nach Angiotensin II Infusion zu gravierender Zunahme der Linksventrikulären Steifigkeit kam. Aufbauend auf dieser Studie kann man davon ausgehen dass Metalloproteinase einen wichtigen Schutzfaktor für myokardiale Remodelingprozesse darstellt. (32)

TIMP3 wird durch TGFB1 als auch durch BNP in seiner Aktivität gesteigert und wirkt wie ein physiologischer Gegenregulator gegen übermäßige Fibrose.(34)

## **4.10 Limitationen**

In der vorliegenden Diplomarbeit hat sich gezeigt, dass die Streuung zwischen den einzelnen Proben innerhalb des gleichen Experimentsettings (Kontrolle vs. Kontrolle, Dehnung vs. Dehnung) der gleichen Herzen hoch ist. Diese Streuung ist aufgrund multifaktorieller Genese und lag über der erwarteten Streuung. Aufgrund der hohen Qualitätsansprüche an die extrahierte RNA wurde die Fallzahl weiter signifikant verringert, da einige Proben von der weiteren Messung ausgeschlossen wurden. Leider lassen sich dadurch teilweise nur Trends ohne Signifikanz zeigen. Insbesondere im ventrikulären Myokard waren dadurch keine aussagekräftigen Ergebnisse zu erzielen.

## Anhang – Tabellen

Tabelle 5

<b>Experiment:</b>	Ventrikel 8h	Ventrikel 8h	Ventrikel 8h
<b>Geschlecht:</b>	w	w	m
<b>Alter:</b>	56a	72a	64a
<b>LV-EF</b>	50%	55%	65%
<b>LV-Vergrößert:</b>	j	n	n.v.
<b>PAP(systolisch)</b>	25mmHg	n.v.	n.v.
<b>PAP-Wedge</b>	n.v.	9mmHg	n.v.
<b>LVESD</b>	n.v.	21mm	37mm
<b>LVEDD</b>	n.v.	37mm	n.v.
<b>Andere:</b>	n.v.	Diast. Dysfunktion, E/A: 0,8, IVS diast 14mm	IVS: 10mm, TAPSE 35mm
<b>Operation:</b>	Explantation	Explantation	Explantation bei interkranialer Blutung
<b>Zusatzdiagnosen:</b>	n.v.	n.v.	n.v.

Tabelle 6

<b>Experiment:</b>	Vorhof 6h	Vorhof 6h	Vorhof 6h	Vorhof 6h	Vorhof 6h
<b>Experimentdatum:</b>	01.07.13	05.07.13	14.10.13	24.10.13	31.10.13
<b>Geschlecht:</b>	m	m	m	m	m
<b>Alter:</b>	77a	61a	51a	65a	54a
<b>LV-EF:</b>	n.v.	57%	n.v.	60%	n.v.
<b>LV-vergrößert:</b>	n.v.	N	n.v.	N	N
<b>RA-vergrößert:</b>	n.v.	N	n.v.	N	N
<b>VHF:</b>	N	N	N	J	N
<b>Operation:</b>	Aortenklappen- ersatz	CABG	CABG	CABG	Aortenklappen- ersatz
<b>Zusatzinformationen:</b>	Cor Hypertonium, art. Hypertonie, KHK ohne wirksame Stenose	3G-KHK, art. Hypertonie	3G-KHK, art. Hypertonie	3G-KHK, art. Hypertonie	Hochgradige Aortenklappen- stenose bei bicuspidar Aortenklappe

Tabelle 7

<b>Experiment:</b>	Vorhof 8h	Vorhof 8h	Vorhof 8h	Vorhof 8h
<b>Experimentdatum:</b>	06.03.13	21.03.13	11.04.13	29.04.13
<b>Geschlecht:</b>	w	m	m	W
<b>Alter:</b>	56a	80a	72a	66a
<b>LV-EF:</b>	55%	35%	60%	60%
<b>LV-vergrößert:</b>	N	N	J	N
<b>RA-vergrößert:</b>	N	J	N	N
<b>VHF:</b>	N	N	N	N
<b>Operation:</b>	CABG	CABG und Aortenklappenersatz	CABG	CABG
<b>Zusatzinformationen:</b>	2G-KHK, Art. Hypertonie	3G-KHK, schwergradige Aortenstenose	2G-KHK, art. Hypertonie	2G-KHK, art. Hypertonie, Z.n. PAE

Tabelle 8

<b>Experiment:</b>	Vorhof 8h	Vorhof 8h	Vorhof 8h	Vorhof 8h
<b>Experimentdatum:</b>	02.05.13	13.05.13	05.06.13	07.06.13
<b>Geschlecht:</b>	m	m	m	m
<b>Alter:</b>	70a	78a	81a	77a
<b>LV-EF:</b>	60%	n.v.	n.v.	n..v
<b>LV-vergrößert:</b>	J	n.v.	N	N
<b>RA-vergrößert:</b>	N	n.v.	N	N
<b>VHF:</b>	N	N	N	N
<b>Operation:</b>	CABG	CABG	Aortenklappen- ersatz	CABG
<b>Zusatzinformationen:</b>	3G-KHK. Art. Hypertonie, DM- II	3G-KHK, St. N. Reanimation	Schwere Aortenklappen- stenose	3G-KHK, leichtgradige Aortenklappen- stenose

## Literaturverzeichnis

1. Houser SR, Molkentin JD. Does contractile Ca<sup>2+</sup> control calcineurin-NFAT signaling and pathological hypertrophy in cardiac myocytes? *Science signaling*. 2008;1(25):pe31.
2. Tarkia M, Stark C, Haavisto M, Kentala R, Vahasilta T, Savunen T, et al. Cardiac remodeling in a new pig model of chronic heart failure: Assessment of left ventricular functional, metabolic, and structural changes using PET, CT, and echocardiography. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology*. 2015.
3. Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 1992;19(7):1550-8.
4. Sawada K, Kawamura K. Architecture of myocardial cells in human cardiac ventricles with concentric and eccentric hypertrophy as demonstrated by quantitative scanning electron microscopy. *Heart and vessels*. 1991;6(3):129-42.
5. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81(4):1161-72.
6. Dorn GW, 2nd, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circulation research*. 2003;92(11):1171-5.
7. Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *European journal of clinical investigation*. 2013;43(9):986-95.
8. Weinreuter M, Kreusser MM, Beckendorf J, Schreiter FC, Leuschner F, Lehmann LH, et al. CaM Kinase II mediates maladaptive post-infarct remodeling and pro-inflammatory chemoattractant signaling but not acute myocardial ischemia/reperfusion injury. *EMBO molecular medicine*. 2014;6(10):1231-45.
9. Manyari DE. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *The New England journal of medicine*. 1990;323(24):1706-7.
10. Kehat I, Molkentin JD. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation*. 2010;122(25):2727-35.
11. Kannan A, Janardhanan R. Hypertension as a risk factor for heart failure. *Current hypertension reports*. 2014;16(7):447.
12. Sun JP, Xu TY, Lee AP, Yang XS, Liu M, Li Y, et al. Early diastolic dyssynchrony in relation to left ventricular remodeling and function in hypertension. *International journal of cardiology*. 2015;179:195-200.
13. Tamura T, Said S, Harris J, Lu W, Gerdes AM. Reverse remodeling of cardiac myocyte hypertrophy in hypertension and failure by targeting of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 2000;102(2):253-9.
14. Schaub MC, Hefti MA, Zaugg M. Integration of calcium with the signaling network in cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006;41(2):183-214.
15. Hedayat M, Mahmoudi MJ, Rose NR, Rezaei N. Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. *Heart failure reviews*. 2010;15(6):543-62.
16. Vatta M, Sinagra G, Brunelli L, Faulkner G. Remodeling of dystrophin and sarcomeric Z-band occurs in pediatric cardiomyopathies: a unifying mechanism for force transmission defect. *Journal of cardiovascular medicine (Hagerstown, Md)*. 2009;10(2):149-56.
17. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *The Journal of clinical investigation*. 1975;56(1):56-64.

18. Toischer K, Kogler H, Tenderich G, Grebe C, Seidler T, Van PN, et al. Elevated afterload, neuroendocrine stimulation, and human heart failure increase BNP levels and inhibit preload-dependent SERCA upregulation. *Circulation Heart failure*. 2008;1(4):265-71.
19. Greene SJ, Maggioni AP, Fonarow GC, Solomon SD, Bohm M, Kandra A, et al. Clinical profile and prognostic significance of natriuretic peptide trajectory following hospitalization for worsening chronic heart failure: findings from the ASTRONAUT trial. *European journal of heart failure*. 2015;17(1):98-108.
20. Jensen KT, Carstens J, Pedersen EB. Effect of BNP on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones in humans. *The American journal of physiology*. 1998;274(1 Pt 2):F63-72.
21. Flynn TG, de Bold ML, de Bold AJ. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochemical and biophysical research communications*. 1983;117(3):859-65.
22. Ishizaka Y, Kangawa K, Minamino N, Ishii K, Takano S, Eto T, et al. Isolation and identification of C-type natriuretic peptide in human monocytic cell line, THP-1. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992;189(2):697-704.
23. Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). *Biochemical and biophysical research communications*. 1984;118(1):131-9.
24. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*. 1988;332(6159):78-81.
25. Dietz JR. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. *Cardiovasc Res*. 2005;68(1):8-17.
26. Kinnunen P, Vuolteenaho O, Uusimaa P, Ruskoaho H. Passive mechanical stretch releases atrial natriuretic peptide from rat ventricular myocardium. *Circulation research*. 1992;70(6):1244-53.
27. Kuwahara K, Nishikimi T, Nakao K. Transcriptional Regulation of the Fetal Cardiac Gene Program. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2012;119(3):198-203.
28. O'Grady GL, Best HA, Oates EC, Kaur S, Charlton A, Brammah S, et al. Recessive ACTA1 variant causes congenital muscular dystrophy with rigid spine. *European journal of human genetics : EJHG*. 2014.
29. Hartmannova H, Kubanek M, Sramko M, Piherova L, Noskova L, Hodanova K, et al. Isolated X-linked hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel mutation of the four-and-a-half LIM domain 1 gene. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2013;6(6):543-51.
30. Hutchinson KR, Saripalli C, Chung CS, Granzier H. Increased myocardial stiffness due to cardiac titin isoform switching in a mouse model of volume overload limits eccentric remodeling. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014;79C:104-14.
31. Stathopoulou K, Cuello F, Candasamy AJ, Kemp EM, Ehler E, Haworth RS, et al. Four-and-a-half LIM domains proteins are novel regulators of the protein kinase D pathway in cardiac myocytes. *The Biochemical journal*. 2014;457(3):451-61.
32. Fan D, Takawale A, Basu R, Patel V, Lee J, Kandalam V, et al. Differential role of TIMP2 and TIMP3 in cardiac hypertrophy, fibrosis, and diastolic dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2014;103(2):268-80.
33. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology*. 2006;118(1):10-24.
34. Shannon TR, Pogwizd SM, Bers DM. Elevated sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. *Circulation research*. 2003;93(7):592-4.

35. Kinugawa T, Kato M, Yamamoto K, Hisatome I, Nohara R. Proinflammatory cytokine activation is linked to apoptotic mediator, soluble Fas level in patients with chronic heart failure. *International heart journal*. 2012;53(3):182-6.
36. Askevold ET, Gullestad L, Dahl CP, Yndestad A, Ueland T, Aukrust P. Interleukin-6 signaling, soluble glycoprotein 130, and inflammation in heart failure. *Current heart failure reports*. 2014;11(2):146-55.
37. Vega RB, Rothermel BA, Weinheimer CJ, Kovacs A, Naseem RH, Bassel-Duby R, et al. Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(2):669-74.
38. Abbasi S, Lee JD, Su B, Chen X, Alcon JL, Yang J, et al. Protein kinase-mediated regulation of calcineurin through the phosphorylation of modulatory calcineurin-interacting protein 1. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(12):7717-26.
39. Shin SY, Yang HW, Kim JR, Heo WD, Cho KH. A hidden incoherent switch regulates RCAN1 in the calcineurin-NFAT signaling network. *Journal of cell science*. 2011;124(Pt 1):82-90.
40. Hill JA, Rothermel B, Yoo KD, Cabuay B, Demetroulis E, Weiss RM, et al. Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(12):10251-5.
41. Maack C, O'Rourke B. Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic research in cardiology*. 2007;102(5):369-92.
42. Mishra S, Ling H, Grimm M, Zhang T, Bers DM, Brown JH. Cardiac hypertrophy and heart failure development through Gq and CaM kinase II signaling. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2010;56(6):598-603.
43. Eder P, Molkentin JD. TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circulation research*. 2011;108(2):265-72.
44. Alves AJ, Eynon N, Oliveira J, Goldhammer E. RAAS and adrenergic genes in heart failure: Function, predisposition and survival implications. *World journal of cardiology*. 2010;2(7):187-97.
45. Bers DM. Ca(2)(+)-calmodulin-dependent protein kinase II regulation of cardiac excitation-transcription coupling. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2011;8(7):1101-4.
46. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(8):589-600.
47. Wilkins BJ, Molkentin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;322(4):1178-91.
48. Bueno OF, van Rooij E, Molkentin JD, Doevendans PA, De Windt LJ. Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc Res*. 2002;53(4):806-21.
49. Cooling MT, Hunter P, Crampin EJ. Sensitivity of NFAT cycling to cytosolic calcium concentration: implications for hypertrophic signals in cardiac myocytes. *Biophysical journal*. 2009;96(6):2095-104.
50. Tsika RW, Ma L, Kehat I, Schramm C, Simmer G, Morgan B, et al. TEAD-1 overexpression in the mouse heart promotes an age-dependent heart dysfunction. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(18):13721-35.
51. Blanchard EM, Smith GL, Allen DG, Alpert NR. The effects of 2,3-butanedione monoxime on initial heat, tension, and aequorin light output of ferret papillary muscles. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1990;416(1-2):219-21.
52. Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circulation research*. 1989;65(5):1441-9.

53. Fliedner A. Einfluss von vascular endothelial growth factor, transforming growth factor-beta-1, Interleukin-6, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide und Cortisol auf die Gen-Expression des menschlichen Herzmuskels in vitro: Medizinische Fakultät Freiburg; 2003.
54. Gwathmey JK, Hajjar RJ, Solaro RJ. Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium. *Circulation research*. 1991;69(5):1280-92.
55. Phillips RM, Altschuld RA. 2,3-Butanedione 2-monoxime (BDM) induces calcium release from canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996;229(1):154-7.
56. Fryer MW, Neering IR, Stephenson DG. Effects of 2,3-butanedione monoxime on the contractile activation properties of fast- and slow-twitch rat muscle fibres. *The Journal of physiology*. 1988;407:53-75.
57. Schott P, Asif AR, Graf C, Toischer K, Hasenfuss G, Kogler H. Myocardial adaptation of energy metabolism to elevated preload depends on calcineurin activity : a proteomic approach. *Basic research in cardiology*. 2008;103(3):232-43.
58. Sun Y, Zhang Y, Yan M, Wu Y, Zheng X. B-type natriuretic peptide-induced cardioprotection against reperfusion is associated with attenuation of mitochondrial permeability transition. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2009;32(9):1545-51.
59. Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2006;69(2):318-28.
60. Gossios TD, Lopes LR, Elliott PM. Left ventricular hypertrophy caused by a novel nonsense mutation in FHL1. *European journal of medical genetics*. 2013;56(5):251-5.
61. Gaussin V, Tomlinson JE, Depre C, Engelhardt S, Antos CL, Takagi G, et al. Common genomic response in different mouse models of beta-adrenergic-induced cardiomyopathy. *Circulation*. 2003;108(23):2926-33.
62. Cowling BS, McGrath MJ, Nguyen MA, Cottle DL, Kee AJ, Brown S, et al. Identification of FHL1 as a regulator of skeletal muscle mass: implications for human myopathy. *The Journal of cell biology*. 2008;183(6):1033-48.
63. Vignier N, Le Corvoisier P, Blard C, Sambin L, Azibani F, Schlossarek S, et al. AT1 blockade abolishes left ventricular hypertrophy in heterozygous cMyBP-C null mice: role of FHL1. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2014;28(3):249-56.
64. Guggilam A, Hutchinson KR, West TA, Kelly AP, Galantowicz ML, Davidoff AJ, et al. In vivo and in vitro cardiac responses to beta-adrenergic stimulation in volume-overload heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013;57:47-58.
65. Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2004;63(3):423-32.
66. Okumura K, Kato H, Honjo O, Breitling S, Kuebler WM, Sun M, et al. Carvedilol improves biventricular fibrosis and function in experimental pulmonary hypertension. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2015.
67. Bartelds B, Borgdorff MA, Smit-van Oosten A, Takens J, Boersma B, Nederhoff MG, et al. Differential responses of the right ventricle to abnormal loading conditions in mice: pressure vs. volume load. *European journal of heart failure*. 2011;13(12):1275-82.
68. Copeland O, Nowak KJ, Laing NG, Ravenscroft G, Messer AE, Bayliss CR, et al. Investigation of changes in skeletal muscle alpha-actin expression in normal and pathological human and mouse hearts. *Journal of muscle research and cell motility*. 2010;31(3):207-14.
69. Friedman B, Simpson K, Tesi-Rocha C, Zhou D, Palmer CA, Suchy SF. Novel large deletion in the ACTA1 gene in a child with autosomal recessive nemaline myopathy. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2014;24(4):331-4.
70. Fontes JA, Rose NR, Cihakova D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine*. 2015.

71. Jugdutt BI. Preventing adverse remodeling and rupture during healing after myocardial infarction in mice and humans. *Circulation*. 2010;122(2):103-5.
72. Mollmann H, Nef HM, Troidl C. 'Turning the right screw': targeting the interleukin-6 receptor to reduce unfavourable tissue remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2010;87(3):395-6.

# **Anhang –Projektplan**

Dezember 2012-Januar 2013 Einarbeitungsphase

Februar 2013 – Dezember 2013 Experimentläufe und Probengewinnung

Januar 2014 – April 2014 RNA-Isolation/ cDNA schreiben

Mai 2014 – Januar 2015 PCR-Läufe