

**Verlust des LIM-only Proteins FHL2 verringert
druckinduzierte Herzhypertrophie:
Funktionelle Studien am murinen Herz-Kreislauf-System**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Eleonora Anna Federica Ramadori

aus Mainz

2015

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Reinhard Büttner
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Hans-Peter Fischer

Tag der Mündlichen Prüfung: 06.03.2015

Aus dem Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung.....	10
1.1 Das Kreislaufsystem	10
1.1.1 Der Gefäßtonus	10
1.1.2 Regulation des Gefäßtonus: Das Endothel	11
1.2 Das Herz: Hypertrophie, reaktive Fibrose und Herzinsuffizienz	11
1.2.1 Der Hypertrophiebegriff: Adaptation oder Maladaptation?	11
1.2.2 Reaktive Fibrose des Herzmuskels	12
1.2.3 Das Renin-Angiotensin-System (RAS).....	14
1.2.3.1 Lokales und systemisches RAS	14
1.2.3.2 ANG II und TGF- β	15
1.2.4 Pathologische Endstrecke: Herzinsuffizienz.....	17
1.3 Das LIM-only-Protein FHL2 im kardiovaskulären System	18
1.3.1 Die Superfamilie der LIM-Proteine	18
1.3.2 FHL2 im Herzen	18
1.3.3 FHL2 im Gefäßsystem.....	19
1.3.4 FHL2 vermittelt Protein-Protein-Interaktionen	20
1.3.4.1 FHL2 fungiert als Struktur- und Adapterprotein im Herzen	20
1.3.4.2 FHL2 agiert als Coaktivator und Corepressor der Genexpression.....	22
1.4 Tiermodelle der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz.....	23
1.5 Zielsetzung	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Geräte und Materialien	25
2.1.1 Geräte.....	25
2.1.2 Reagenzien	26
2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Reaktionskits	27
2.1.4 Lösungen	29
2.1.4.1 Myograph.....	29
2.1.4.2 Langendorff-Perfusion	29

2.2	Software	31
2.3	Methoden.....	31
2.3.1	Versuchstiere und ihre Haltung	31
2.3.2	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen	31
2.3.2.1	Transverse Aortenstenose	31
2.3.2.2	Invasive Blutdruckmessung.....	33
2.3.2.3	Organentnahme und Bestimmung der Organgewichte	35
2.3.2.4	Gesamt- RNA- Isolation aus schockgefrorenem Gewebe.....	35
2.3.2.5	Synthese komplementärer DNA (cDNA)	36
2.3.2.6	Real-time-PCR	37
2.3.2.7	Isolation und Fixierung einzelner Kardiomyozyten.....	38
2.3.2.8	Indirekte Immunfluoreszenz	39
2.3.3	<i>Ex-vivo</i> -Untersuchungen	39
2.3.3.1	Der Mulvany-Myograph	39
2.3.3.2	Eichung des Kraftarms	41
2.3.3.3	Durchführung.....	41
2.4	Statistik.....	42
3.	Ergebnisse.....	44
3.1	TAC-Operation	44
3.1.1	Tierzahlen und Mortalitätsraten	44
3.1.2	Untersuchung der Leistungsfähigkeit des hypertrophen Herzens durch Dobutamininfusion.....	49
3.1.2.1	Systolische Ventrikelfunktion.....	49
3.1.2.2	Diastolische Ventrikelfunktion.....	51
3.1.3	Herz- und Lungengewicht.....	52
3.1.4	Expressionsanalyse renaler Renin-mRNA	54
3.1.5	FHL2-Expression fixierter Kardiomyozyten in der indirekten Immunfluoreszenz	56
3.2	Kontraktilitätsuntersuchungen an Aortenringen.....	57
3.2.1	Untersuchung der Kontraktion der Aortenringe	58
3.2.1.1	Rezeptorunabhängig (Kalium).....	58
3.2.1.2	Rezeptorabhängig (PE).....	58

3.2.2	Relaxation isolierter Aortenringe (ACh)	59
4.	Diskussion	61
4.1	Wahl des Tiermodells	61
4.2	Einfluss der FHL2-Defizienz auf die Entwicklung der Herzhypertrophie	62
4.2.1	Vorarbeiten	62
4.2.2	Wahl des postoperativen Zeitraums	63
4.2.3	Mortalität	63
4.3	Kritische Herzhypertrophie und Übergang zur -Insuffizienz	65
4.4	FHL2-Defizienz und kardiale Fibrose	68
4.5	Ein reaktiv gesteigerter vaskulärer Widerstand FHL2 ^{-/-} Tiere schützt vor druckinduzierter Herzhypertrophie und Fibrose.....	70
4.6	Schlussfolgerungen und mögliche Bedeutung für zukünftige Fragenstellungen	72
5.	Zusammenfassung	73
6.	Literaturverzeichnis	76
7.	Danksagung	85

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
ACh	Acetylcholin
ACT	Activator of CREM
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANG II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AOGEN	Angiotensinogen
AP-1	Activator protein 1
BMP	bone morphogenic protein
cDNA	komplementäre Desoxyriboneukleinsäure
c-Raf	c-rapidly accelerated fibrosarcoma
CREB	cAMP response element-binding protein
CREM	cAMP responsive element modulator
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cn	Calcineurin
CNN1	smooth muscle calponin
DAP	diastolischer arterieller Blutdruck
DAPI	4',6-diamidino-phenylindole
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
ERK2	Extra-cellular-regulated Kinase 2
EZM	extrazelluläre Matrix
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FHL2	four-and-a-half-LIM protein 2
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GqPCR	Gq Protein-Coupled Receptor (Gq gekoppelter Rezeptor)
HW/BW	Heartweight/Bodyweight (Herzgewicht/Körpergewicht)
HW/TL	Heartweight/Tibiallength (Herzgewicht durch Tibialänge)
PKC	Protein Kinase C
LW/BW	Lungweight/Bodyweight (Lungengewicht/Körpergewicht)
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase

MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MEK 1/2	Mitogen-activated protein kinase kinase
mRNA	messenger RNA
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
PDGF	platelet derived growth factor
PE	Phenylephrin
PKC	Proteinkinase C
qrt-PCR	quantitative real time-Polymerase Chain Reaction
RAS	Renin-Angiotensin-System
ROCK	Rho-assozierte Protein Kinase
SAP	systolischer arterieller Blutdruck
SMA	smooth muscle alpha actin
SM22	SM22 Protein
TAC	Transverse aortic constriction (Transverse Aortenstenose)
TGF- β	Transforming growth factor β
vSMC	vascular smooth muscle cell
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Das Kreislaufsystem

1.1.1 Der Gefäßtonus

Das Gefäßsystem ist mit Ausnahme des Kapillarnetzes auf ganzer Länge mit glatter Gefäßmuskulatur ausgekleidet, deren kleinste Funktionseinheit die glatte Gefäßmuskulaturzelle (vascular smooth muscle cell, vSMC) ist. Über die glatte Gefäßmuskulatur wird der Ruhetonus des Gefäßsystems vermittelt. Er bestimmt den totalen peripheren Widerstand des Gefäßsystems und somit den Blutdruck.

Der Ruhetonus ergibt sich aus dem konkurrierenden Einfluss zahlreicher nervaler sowie humoraler Stimuli. Vorherrschend, wenn auch in unterschiedlichen Organstromgebieten in unterschiedlich starker Ausprägung, ist jedoch die tonische Aktivität der zwischen Gefäßmedia und Adventitia verlaufenden, sympathisch-adrenergen Nervenfasern (Übersichtsartikel: Parati und Esler, 2012). Aus den Varikositäten dieser terminalen Nervenfasern wird Noradrenalin freigesetzt, welches zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur führt.

Die Menge an freigesetztem Noradrenalin wird nicht nur durch die Frequenz der Aktionspotentiale, sondern auch durch die modulierende Wirkung lokaler Mediatoren bestimmt. Neben der selbstlimitierenden Wirkung des Noradrenalins auf seine eigene Ausschüttung über α_2 -Rezeptoren an der Präsynapse üben H^+ und K^+ - Ionen, Acetylcholin (ACh), Adenosin, Histamin, Serotonin und Prostaglandin E_1 ebenso eine hemmende Wirkung aus.

Hingegen wird die Noradrenalinwirkung durch Angiotensin II (ANG II) potenziert, indem es die Noradrenalinsynthese und die Freisetzung aus den Vesikeln steigert, sowie die Wiederaufnahme in die präsynaptische Membran hemmt. Entscheidend für den Einfluss von ANG II auf den Gefäßtonus ist somit eher die Verstärkung der sympathikoadrenergen Vasokonstriktion als die direkte Wirkung auf die vSMC (Barrett-O'Keefe et al., 2013).

Bei der lokalen Regulation des Gefäßtonus spielt auch das Endothel eine entscheidende Rolle, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

1.1.2 Regulation des Gefäßtonus: Das Endothel

Das Endothel stellt einen entscheidenden Modulator des durch die vSMC vermittelten Gefäßtonus dar. Unter Ruhebedingungen kommt es im Gefäß zu einem Gleichgewicht aus sympathisch-adrenerg vermittelter Vasokonstriktion und den vom Endothel synthetisierten Faktoren, von denen neben einigen ebenfalls gefäßverengenden Stoffen wie Endothelin-1, Urotensin II und dem bereits erwähnten ANG II v.a. das vasorelaxierende Stickstoffmonoxid (NO) zu nennen ist. Es entsteht aus L-Arginin durch die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) (Übersichtsartikel: Eisenreich, 2013). Die eNOS wird konstitutiv exprimiert und sorgt für eine kontinuierliche, basale NO-Freisetzung aus dem Endothel (Übersichtsartikel: Kolluru et al., 2010b). Ständig auf das Endothel einwirkende physikalische Reize, wie die durch die Strömung des Blutes ausgelöste Scherkraft, sowie die durch die Herzaktion entstehenden pulsatorischen Gefäßwanddehnungen, verstärken die NO-Freisetzung zusätzlich (Kolluru et al., 2010a). NO diffundiert in die vSMC, wo es die lösliche Guanylatzyklase aktiviert; steigende cGMP-Spiegel innerhalb der Zelle bewirken eine Kalziumsensibilisierung und folglich eine Vasodilatation. Zusätzlich vermag NO auch direkt eine Vasodilatation herbeizuführen, indem es durch Aktivierung kalziumabhängiger Kaliumkanäle eine Hyperpolarisation der vSMC bewirkt (Bolotina et al., 1994).

1.2 Das Herz: Hypertrophie, reaktive Fibrose und Herzinsuffizienz

1.2.1 Der Hypertrophiebegriff: Adaptation oder Maladaptation?

Im Rahmen einer Druckbelastung des Herzens, wie sie beispielsweise bei arterieller Hypertonie oder Aortenklappenstenose vorkommt, reagiert der Herzmuskel mit einer konzentrischen Hypertrophie. Unter Herzhypertrophie versteht man eine Größenzunahme einzelner Kardiomyozyten auf einen pathologischen Stimulus hin. Sie resultiert aus der Notwendigkeit eines gesteigerten Druckaufbaus, um trotz erhöhten systemischen Druckes eine ausreichende Auswurfleistung zu gewährleisten.

Kurzfristig stellt die Hypertrophie einen Anpassungsmechanismus des Herzmuskels an die veränderten hämodynamischen Verhältnisse dar und ist bei Beseitigung des pathologischen Stimulus zunächst reversibel. Besteht dieser Stimulus jedoch über einen längeren Zeitraum, kommt es bei latenter Hypoxie zur kontinuierlichen Reduzierung der hypertrophierten Kardiomyozyten (Weber et al., 2013) und zu strukturellen Veränderungen im Sinne einer Fibrose.

Beim Übergang der Herzhypertrophie zur Herzinsuffizienz kann es zu einer Verminderung der Relaxation während der Diastole kommen. In dieser Phase kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum und zu einer Anreicherung von Ca^{2+} in den Mitochondrien. Durch die Kalziumüberladung der Mitochondrien gehen diese zugrunde. Die Folge ist eine verminderte ATP-Produktion und eine Leistungsminderung der hypertrophierten Kardiomyozyten (Ling et al., 2009).

1.2.2 Reaktive Fibrose des Herzmuskels

Das Herz ist eine sehr effiziente Pumpe, welche sich aus quergestreiften Muskelzellen, den Kardiomyozyten, und einem Gerüst aus Matrixproteinen zusammensetzt. Diese extrazelluläre Matrix (EZM) besteht im Wesentlichen aus den fibrillären Kollagenen I und III, sowie elastischen Fasern und Proteoglykanen. Die EZM ist nicht minder entscheidend für die eigentliche Pumpleistung als die Muskelkraft, sorgt sie doch für ein strukturelles Netzwerk, welches die Kontraktionen einzelner Myozyten in einer systolischen Gesamtkontraktion bündelt. Des Weiteren sorgt die EZM für eine gewisse Steifheit des Gewebes, welche einer übermäßigen Dehnung der Sarkomere - der kleinsten Funktionseinheit des Herzmuskels - vorbeugt und somit eine optimale Kraftentwicklung gewährleistet. Darüber hinaus schützt die EZM vor übermäßiger Kammerdehnung und -ruptur.

Das Verhältnis von Kardiomyozyten zu EZM ist ein dynamisches: Ist der Herzmuskel einer vermehrten Druckbelastung beispielsweise im Rahmen der Hypertension ausgesetzt, so verschiebt sich dieses sensible Gleichgewicht zunehmend zugunsten der Synthese neuen extrazellulären Matrixmaterials. Zunächst korreliert der Zuwachs an Muskelmasse mit dem Zuwachs an Bindegewebe; ist jedoch ein kritisches Herzgewicht von 250g erreicht, so vermehrt sich die EZM überproportional bis zum Erreichen eines stetigen Anteils von 30% der Organmasse (Übersichtsartikel: Creemers und Pinto, 2011).

Infolge der Hypertension kommt es zu Einzelzellnekrosen bzw. Apoptosen (Ling et al., 2009) der hypertrophen Kardiomyozyten. Immunzellen, T-Zellen und Makrophagen wandern nun in die Adventitia von Koronararterien und -arteriolen ein und aktivieren die dort ansässigen Fibroblasten. Diese transdifferenzieren unter dem Einfluss von Transforming Growth Factor β (TGF- β) zu Myofibroblasten, einem stark sekretorisch aktiven Phänotyp, welcher vermehrt Matrixproteine synthetisiert (Desmouliere et al., 1993). Diese werden vor allem perivaskulär und im Interstitium abgelagert. Durch die sich so entwickelnde fokale Fibrose wird die strukturelle Integrität des Herzmuskels wiederhergestellt. Gleichzeitig werden einzelne Kardiomyozyten durch die Deposition neuer EZM buchstäblich eingeschnürt; die folgende Atrophie dieser Zellen lässt die Kraftminderung des Herzmuskels weiter voranschreiten (Übersichtsartikel: Weber et al., 2013).

Langfristig führt dieser strukturelle Umbauprozess, welcher unter dem Begriff des „cardiac remodeling“ zusammengefasst wird, zu übermäßiger myokardialer Steifheit und zunehmender Dysfunktion (Sun und Weber, 2005). Auch wird das Herz als funktionelles Synzytium durch die Fibrose in seiner Erregungsleitung beeinträchtigt: Es resultieren eine Verlangsamung der elektrischen Fortleitung von Aktionspotentialen im Myokard und damit ein erhöhtes Risiko für Reentrymechanismen (Delpon et al., 2005). Lebensgefährliche Herzrhythmusstörungen bis hin zum plötzlichen Herztod können die Folge sein (Bujak und Frangogiannis, 2007; Khan und Sheppard, 2006). Die Herzhypertrophie wird somit bei Fortbestehen der Ursache von der Herzinsuffizienz gefolgt. Allein in den USA entwickeln jedes Jahr 700.000 Menschen eine Herzinsuffizienz (Esposito et al., 2002) und die Prävalenz beträgt 5,8 Millionen Personen im Alter über 20 Jahre (Houser et al., 2012).

Zusammenfassend wird die Herzhypertrophie in Anbetracht der stetig wachsenden Kenntnisse über die zellulären, subzellulären und molekularen Grundlagen zunehmend als maladaptativer Prozess angesehen.

1.2.3 Das Renin-Angiotensin-System (RAS)

1.2.3.1 Lokales und systemisches RAS

ANG II, ein Octapeptid, stellt den wichtigsten Effektor des für die langfristige Blutdruckregulation zuständigen RAS dar. Es entsteht im Blutstrom durch proteolytische Spaltung aus dem Decapeptid Angiotensin I, katalysiert durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE). Angiotensin I entsteht aus dem der Leber entstammenden Angiotensinogen; vermittelt wird diese Reaktion durch das im juxtaglomerulären Apparat der Niere gebildete und in den Blutstrom abgegebene Renin.

ANG II bindet an zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, den AT₁- und den AT₂-Rezeptor, welche sich in ihrer genomischen Struktur sowie in ihrer Verteilung in unterschiedlichen Geweben unterscheiden. Der AT₁-Rezeptor ist G_{q/11}-gekoppelt und wird an der Oberfläche von vSMC, Kardiomyozyten und Fibroblasten exprimiert. Er vermittelt überwiegend die direkten und indirekten kardiovaskulären Effekte des ANG II. Zu diesen Effekten zählen die direkte Vasokonstriktion, sowie die Stimulation der Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, dem Antidiuretischen Hormon (ADH) aus der Hypophyse und von Endothelin-1 aus dem Endothel ebenso wie die Stimulation des sympathischen Nervensystems.

In den letzten zwei Dekaden ist zu diesem Bild der humoralen Blutdruckregulation durch im Blutstrom zirkulierende Peptide das Wissen um ein lokales, organspezifisches RAS hinzugetreten. Dieses findet sich in Herz, Gefäßsystem, Niere und Gehirn. Es konnte gezeigt werden, dass nahezu alle Komponenten des RAS hier lokal gebildet werden und auto- bzw. parakrin ihre Wirkung entfalten; lediglich über die lokale Bildung des Renins herrscht Uneinigkeit (Paul et al., 2006). Zudem sind mittlerweile auch ACE-unabhängige Wege der ANG II-Bildung bekannt, beispielsweise durch die Chymase, eine Serinprotease, welche vor allem in Mastzellen des linken Ventrikels und der Gefäßwand lokalisiert ist und eine hohe Substratspezifität für Angiotensin I aufweist (Urata et al., 1993) (Abb.1). Des Weiteren gelten auch Cathepsin G (Klickstein et al., 1982), Tonin (Schiller et al., 1976) und Gewebsplasminogenaktivator als Enzyme der ANG-II-Bildung.

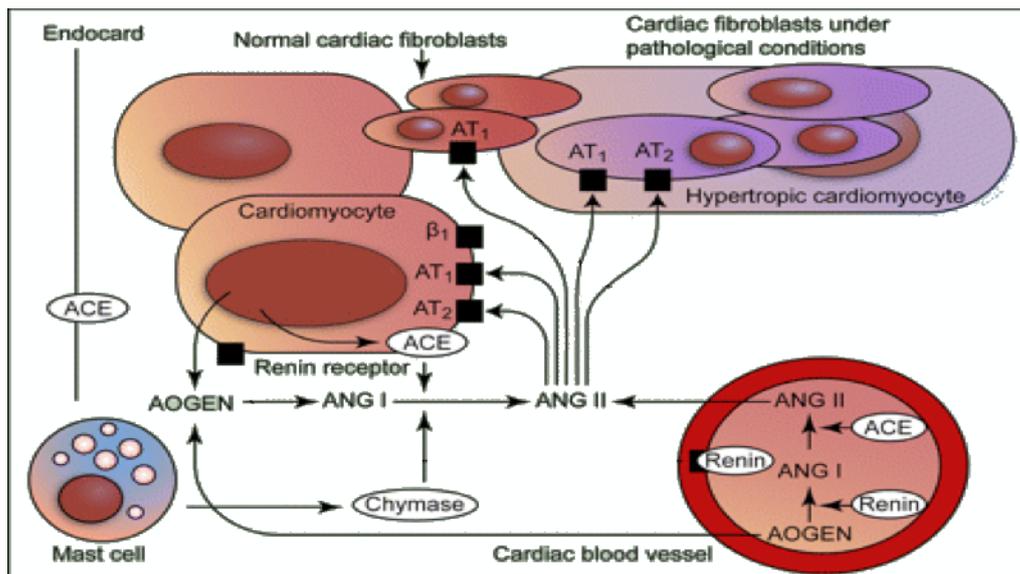


Abb. 1: Lokales Renin-Angiotensin-System im Herzen (modifiziert nach Paul et al., 2006). Renin und Angiotensinogen (AOPEN) werden größtenteils aus dem Plasma in den Kardiomyozyten aufgenommen oder in der Zelle selbst synthetisiert. Bindung von Renin und Prorenin an den Renin-Rezeptor aktiviert intrazelluläre prohypertrophe Signalwege (MAPK und ERK 1/2). Extrazellulär entsteht ANG II auch auf einem alternativen Weg über die von Mastzellen freigesetzte Chymase. Das lokal entstandene ANG II bindet an spezifische Rezeptoren von Kardiomyozyten, vSMC und Fibroblasten.

1.2.3.2 ANG II und TGF- β

Remodelingprozesse des Myokards, welche besonders aus Druckbelastung oder ischämischen Ereignissen des Herzens resultieren, wurzeln in einer durch die mechanische Belastung gesteigerten autokrinen ANG II-Sekretion und den damit einhergehenden trophischen Prozessen (Dostal, 2000). Zwar lässt sich tierexperimentell kein direkter stimulatorischer Effekt von ANG II auf adulte Kardiomyozyten (Wada et al., 1996) zeigen, dennoch kommt es indirekt, durch Hochregulation des Wachstumsfaktors TGF- β in Kardiomyozyten und Fibroblasten, zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Fibrose (Rosenkranz, 2004). Bisher sind die drei Isoformen TGF- β -1, TGF- β -2 und TGF- β -3 identifiziert worden. Im Herzen gilt vornehmlich TGF- β -1 als Induktor der Hypertrophie und der EZM-Synthese. Erhöhte Expressionsniveaus von TGF- β -1-mRNA konnten im linken Ventrikel von Patienten mit idiopathischer hypertropher Kardiomyopathie (Li et al., 1997) und dilatativer Kardiomyopathie (Pauschinger et al., 1999), sowie in Tiermodellen kardialer Hypertrophie gezeigt werden (Takahashi et al., 1994; Villarreal

und Dillmann, 1992). Die Stimulation kardialer Fibroblasten mit ANG II in Kultur führt über den AT₁-Rezeptor zu einer Proliferation von Fibroblasten, einer Differenzierung in Myofibroblasten und zu einer vermehrten Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix, wie Kollagen I und III, Fibronectin und Laminin (Lijnen et al., 2000; Sadoshima und Izumo, 1993) und bedingt somit die mit der Hypertrophie einhergehende kardiale Fibrose. Umgekehrt resultiert die TGF- β -1-Blockade durch neutralisierende Antikörper im druckbelasteten Herzen der Ratte in einer verringerten myokardialen Fibrose und beugt einer diastolischen Dysfunktion vor (Kuwahara et al., 2002). Einen kausalen Zusammenhang von ANGII und TGF- β -vermitteltem kardialen Remodeling zeigten Schultz et al. (2002), indem ihre TGF- β -1-Rag-1^{-/-} Mäuse im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren (WT Tieren) keinerlei Anzeichen kardialer Hypertrophie in Folge der Verabreichung von ANGII entwickelten.

Auf molekularer Ebene liegt diesen TGF- β -induzierten Umbauprozessen die G_q-vermittelte Induktion des MAP-Kinase-Signalwegs zu Grunde, welcher durch Veränderung der Transkription proliferative Prozesse anregt. Auch der Rho/ROCK-Signalweg, welcher zelluläre Funktionen wie die Organisation des Aktin-Zytoskeletts, Zellmotilität und Adhäsion, sowie Genregulation kontrolliert, wird von TGF- β aktiviert. Folglich ist dieser Signalweg während der kardialen Fibrosierung vermehrt aktiv (Kagiyama et al., 2010). Wegweisend für das Verständnis der profibrogenen Wirkung von TGF- β am Myokard waren auch die Untersuchungen von Small et al. (2010), welche zeigten, dass TGF- β über eine Aktivierung des Rho/ROCK-Signalwegs Gene induziert, welche die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten begünstigen. Interessanterweise konnte für beide Hypertrophie vermittelnden Signalwege ein Einfluss des LIM-only Proteins FHL2 nachgewiesen werden, worauf im Kapitel 1.4 noch näher eingegangen wird.

Auch im menschlichen Herzen zeigen sich unter Druckbelastung erhöhte TGF- β -1-Niveaus. Dennoch ist bisher nicht geklärt, ob es diesbezüglich auch zu einer vermehrten Fibrose bzw. einer eingeschränkten kardialen Funktion kommt (Übersichtsartikel: Creemers und Pinto, 2011). Eine spezifische Blockade von TGF- β erscheint in Anbetracht seiner mannigfaltigen Funktionen im menschlichen Körper problematisch. Vielversprechend erscheint daher in Zukunft, ein nachgeschaltetes Molekül des TGF- β -Signalwegs als therapeutisches Zielmolekül zu identifizieren.

1.2.4 Pathologische Endstrecke: Herzinsuffizienz

Langfristig sind die oben geschilderten Umbauprozesse des Myokards prädisponierend für eine Gefügedilatation mit konsekutivem Herzversagen. Bei chronischer Aktivierung des lokalen RAS ist die systolische Ventrikelfunktion verringert, wie Domenighetti et al. (2005) zeigten. In einer 94 Wochen andauernden Studie untersuchten sie TG1306/1R Mäuse, welche sich durch Entwicklung einer ANGII-vermittelten Herzhypertrophie ohne begleitende arterielle Hypertension auszeichnen. Hier wurde die systolische Dysfunktion eindrücklich an einer 30-40% geringeren Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten illustriert. Die Tiere zeichneten sich durch eine mit dem Lebensalter zunehmende systolische und diastolische Dysfunktion und eine gegenüber den WT Tieren erhöhte Mortalität aufgrund dilatativer Kardiomyopathie aus.

Eine dauerhafte Aktivierung des RAS führt nicht nur durch zunehmende Fibrose, sondern auch durch eine gestörte Kalziumhomöostase zu einer diastolischen Dysfunktion des Herzmuskels (Ling et al., 2009). Rothermund et al. (2001) zeigten in einem Tiermodell der Renin-abhängigen linksventrikulären Hypertrophie, dass eine AT_1 -Rezeptorblockade mit Eprosartan nicht nur eine Verringerung der Fibrose, sondern auch eine Normalisierung des zuvor erniedrigten Ca^{2+} -uptakes in das Sarkoplasmatische Retikulum zur Folge hat, welches entscheidend zur Verbesserung der diastolischen Funktion beiträgt.

Beim Übergang einer kompensierten Herzinsuffizienz in ein dekompensiertes Stadium ist TGF- β eine entscheidende Rolle zugeschrieben worden. Hierzu trägt eine erhöhte Empfindlichkeit des adrenergen Systems bei (Rosenkranz et al., 2002; Schluter et al., 1995). *In vitro* hatte die Stimulation von α -Adrenozeptoren einen direkt hypertrophen Einfluss auf Kardiomyozyten (Simpson, 1983). *In vivo* zeigten transgene Mäuse mit einer Überexpression von TGF- β -1 eine gesteigerte Hypertrophie, Fibrose und eine erhöhte Dichte an β -Adrenozeptoren (Rosenkranz et al., 2002). Zudem ist eine TGF- β -1 abhängige Modulation der Anzahl an β -Adrenozeptoren in verschiedenen anderen Zelltypen bewiesen (Iizuka et al., 1994; Kimura und Ogihara, 1999; Nogami et al., 1994).

In der Zusammenschau veranschaulichen diese Untersuchungen die Bedeutung des lokalen RAS im kardiovaskulären Remodeling und erklären einmal mehr den durch-

schlagenden Erfolg von ACE-Inhibitoren und AT₁-Antagonisten in der Bekämpfung kardiovaskulär bedingter Morbidität und Mortalität.

1.3 Das LIM-only-Protein FHL2 im kardiovaskulären System

1.3.1 Die Superfamilie der LIM-Proteine

Erstmalig beschrieben wurde die LIM-Domäne 1988 (Way und Chalfie, 1988). Das Akronym LIM leitet sich von dem in *Caenorhabditis elegans* entdeckten Protein LIN-11, dem der Ratte entstammenden ISL-1 und dem in *C. elegans* gefundenen MEC-3 ab (Chu und Chen, 2011). Der Superfamilie der LIM-Proteine ist die sogenannte LIM-Domäne mit ihrer festgelegten, cysteinreichen Sequenz (CX₂CX₁₆₋₂₃HX₂CX₂CX₂CX₁₆₋₂₁CX(C,H,D)) gemeinsam, welche aus zwei jeweils ein Zinkatom bindenden Zinkfingern besteht. Obgleich Zinkfingerstrukturen klassischerweise DNA direkt zu binden vermögen, besteht bislang für die LIM-Domäne hierfür, zumindest *in vivo*, kein Anhalt (Johannessen et al., 2006).

Generell werden zwei Klassen von LIM-Proteinen unterschieden; jene, die zusätzlich zur LIM-Domäne andere funktionelle Domänen enthalten und sogenannte LIM-only Proteine (Bach, 2000). LIM-only Proteine mit bis zu fünf LIM-Domänen werden in einer Gruppe zusammengefasst, welche die Mitglieder FHL1-4 und ACT zählt. Dabei steht FHL für four-and-a-half, da sich N-terminal nur eine halbe, gefolgt von vier kompletten LIM-Domänen findet. Diese finden sich in einer Vielzahl von Geweben wie Herzmuskel, quergestreiftem Muskel, Prostata, Ovar und Hoden (Muller et al., 2000). Auf subzellulärer Ebene können LIM-only Proteine sowohl im Zytoplasma als Bestandteil des Zytoskeletts lokalisiert sein, als auch im Zellkern, wo sie an der Regulation von Transkriptionsvorgängen beteiligt sein können. Unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen üben Mitglieder der LIM-Familie eine Shuttle-Funktion zwischen Zytoplasma und Zellkern aus (Purcell et al., 2004).

1.3.2 FHL2 im Herzen

Das bestuntersuchte Mitglied der four-and-a-half-LIM-Protein-Familie, FHL2, zeigt bereits während der embryonalen Entwicklung wie auch im Erwachsenen eine besonders

starke Expression im Herzen, insbesondere im ventrikulären Septum und in der Nähe des atrioventrikulären Rings (Chu et al., 2000), sowie in Aorta und Intercostalarterien. Umso erstaunlicher die Tatsache, dass FHL2^{-/-} Mäuse einen gänzlich unauffälligen kardialen Phänotyp unter physiologischen Bedingungen aufweisen. Möglicherweise wird der FHL2-Verlust durch verwandte, ebenfalls im Herzen exprimierte Moleküle wie FHL1 und FHL3 kompensiert. Unter chronischer β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol kommt es zu einer exazerbierten kardialen Hypertrophie FHL2^{-/-} Tiere gegenüber den WT Tieren, begleitet von erhöhten Expressionsniveaus des Hypertrophiemarkers atrial natriuretic peptide (ANP) (Kong et al., 2001). Dies wurde kürzlich durch die Erkenntnis erklärt, dass FHL2 als endogener Repressor fungiert und so eine pathologische Herzhypertrophie verhindert (Hojayev et al., 2012).

1.3.3 FHL2 im Gefäßsystem

Anders als bei Skelett- oder Herzmuskelzellen kommt es bei vSMC nie zu einer terminalen Differenzierung (Lagna et al., 2007). Vielmehr können sie bei Gefäßverletzung vom kontraktilen in einen proliferativen Phänotyp umdifferenzieren, der mit einer verminderten vSMC-Marker-Genexpression und einer vermehrten Matrixdeposition einhergeht. Diese Plastizität ist essentiell für die Entwicklung von Gefäßen, die vaskuläre Homöostase, sowie für die Reparatur von Gefäßdefekten.

Gleichzeitig bereitet sie aber auch den Boden für Gefäßpathologien und die Entwicklung einer Hypertension. Bei der Aufrechterhaltung des kontraktilen Phänotyps von vSMC spielen Wachstumsfaktoren der Familie der Bone Morphogenic Proteins (BMP) eine tragende Rolle (Kang et al., 2012). Die BMP-Proteine sind Teil der TGF- β -Superfamilie und aktivieren daher ebenfalls den RhoA-rho-Kinase-Signalweg. Eine Hochregulation dieses Signalwegs ist für zahlreiche Gefäßpathologien, wie beispielsweise für die arterielle Hypertonie, sowie für zerebrale und koronare Gefäßspasmen beschrieben worden (Wettschureck und Offermanns, 2002).

Die Wachstumsfaktoren der BMP-Familie regulieren die Transkription vSMC spezifischer Gene wie smooth muscle alpha-actin (SMA), smooth muscle calponin (CNN1), SM22alpha (Neuman et al., 2009). Unlängst konnte FHL2 als negativer Regulator der BMP4-vermittelten Induktion vSMC spezifischer Gene identifiziert werden. Nach BMP4-

Stimulation kam es zu einer erheblichen Reduktion der BMP4-vermittelten Expression von SMA und CNN1. Diese ergab sich aus einer vermehrten Anreicherung von FHL2 im Zellkern, wo es die Rekrutierung von Initiationsfaktoren der Transkription zum SMA-Promotor hemmte (Neuman et al., 2009).

Nicht nur die glatte Muskulatur der Gefäße, auch das Endothel weist eine funktionelle Abhängigkeit von FHL2 auf. Kontraktilitätsuntersuchungen an isolierten murinen Aortenringen FHL2^{-/-} Tiere ergaben eine Störung der Endothelfunktion im Sinne einer Störung der endothelvermittelten Relaxation (Neuman et al., 2009).

1.3.4 FHL2 vermittelt Protein-Protein-Interaktionen

1.3.4.1 FHL2 fungiert als Struktur- und Adapterprotein im Herzen

Auf subzellulärer Ebene scheint FHL2 aufgrund seiner zytoplasmatischen Lokalisation in der kontraktile Einheit von Kardiomyozyten, dem Sarkomer, eine entscheidende Rolle bei der Beibehaltung der Zytostuktur zu spielen. Einen Hinweis auf eine derartige Rolle von LIM-Domain Proteinen gaben bereits zahlreiche Studien an Tiermodellen, bei denen der Verlust von für LIM-Proteine kodierenden Genen schwere kardiale Dysfunktionen ähnlich der humanen dilatativen Kardiomyopathie auslöste (Arber et al., 1997; Knoll et al., 2002; Pashmforoush et al., 2001). Lange et al. (2002) konnten nun zeigen, dass FHL2 eng mit dem elastischen Filamentprotein Titin assoziiert ist, welches sich von der M-Bande hin zur Z-Scheibe erstreckt und für die Integrität des Sarkomers von Bedeutung ist. FHL2 bindet Titin innerhalb des Sarkomers an zwei unterschiedlichen Bindungsstellen innerhalb der M-Bande wie auch innerhalb der I-Bande, in direkter Nachbarschaft der Z-Scheibe. Weiterhin bindet FHL2 metabolische Enzyme wie die Kreatinkinase, Adenylatkinase und Phosphofruktokinase. Auf dem Boden dieser Erkenntnisse wurde FHL2 mutmaßlich eine Rolle als Adapterprotein zugesprochen, welches metabolische Enzyme hin zu Orten hohen Energieverbrauchs innerhalb des kardialen Sarkomers rekrutiert (Lange et al., 2002).

Vor einigen Jahren konnte I-Bande-assoziiertes FHL2 als zytoplasmatischer Modulator des MAP-Kinase-Signalwegs identifiziert werden (Hoshijima, 2006). Dieser Signalweg wird bei mechanischem Stress sowie durch bestimmte neuroendokrine Faktoren akti-

viert und stellt einen wesentlichen Hypertrophie-vermittelnden Signalweg im Herzen dar (Bueno et al., 2000; Liang et al., 2001). Purcell et al. (2004) beschrieben die Bindung von nahe der Z-Scheibe lokalisiertem FHL2 an eine der drei Effektor-kinasen des MAP-Kinase-Signalwegs, Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 (ERK2), *in vivo* (Abb. 2). Dabei ist die Affinität von FHL2 zur phosphorylierten, aktivierten Kinase höher, als zum nicht phosphorylierten Enzym. Anders als die eigentlichen Zielproteine von ERK2, nämlich Transkriptionsfaktoren im Kern, wird FHL2 durch die ERK2 nicht phosphoryliert, noch behindert es die Phosphorylierung von ERK2. Dennoch vermag eine Überexpression von FHL2 die Translokation der aktivierten ERK2 in den Kern und folglich die Regulation der Genexpression zu inhibieren (Purcell et al., 2004). Insgesamt deuten diese Erkenntnisse auf eine Schlüsselrolle des LIM-only Proteins FHL2 als Strukturprotein im kardiovaskulären System, sowie als Modulator der Genexpression infolge biomechanischen Stresses hin.

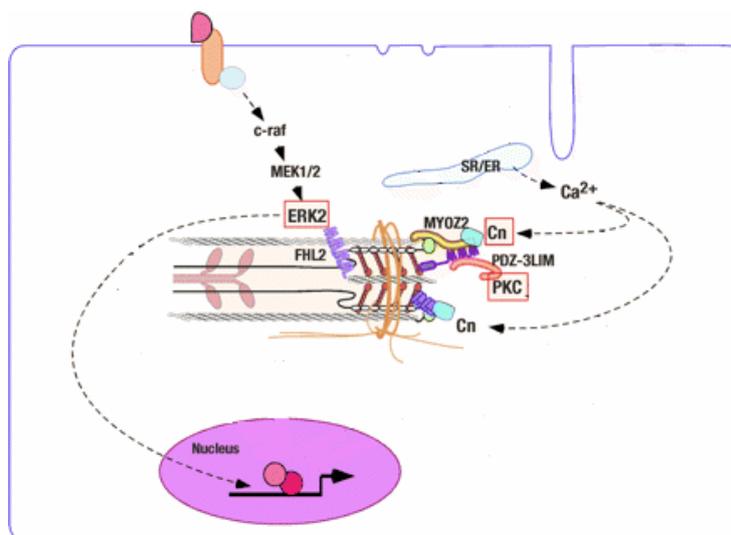


Abb. 2: Interaktion des MAP-Kinase-Signalwegs mit Z-Scheiben nahem FHL2 durch ERK2-FHL2-Assoziation im Kardiomyozyten (modifiziert nach Übersichtsartikel: Hoshijima, 2006). c-Raf = c-rapidly accelerated fibrosarcoma; MEK1/2 = mitogen-activated kinase kinase 1/2. Bei Überexpression von FHL2 vermag es durch Bindung an die ERK2 deren Translokation in den Zellkern und somit eine Modifikation der Genexpression zu verhindern. Kalzium (Ca^{2+}) aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) aktiviert Calcineurin (Cn). Cn interagiert mit Z-Scheibe-assoziierten Proteinen (z.B. MYOZ2). Protein Kinase C (PKC) und ihre Isotypen reichern sich offenbar unter Einfluss von PDZ-3LIM Proteinen in der Nähe der Z-Scheibe an.

1.3.4.2 FHL2 agiert als Coaktivator und Corepressor der Genexpression

Unlängst konnte FHL2 auch als Adapterprotein des Rho-Signalwegs identifiziert werden (Muller et al., 2002). Der Rho-Signalweg kontrolliert zelluläre Funktionen wie die Organisation des Aktin-Zytoskeletts, Zellmotilität und -adhäsion (Wettschreck und Offermanns, 2002). Außerdem ist er in pathologischen Prozessen wie Tumorgenese und Metastasierung aktiviert. Bei rho-GTPase-überexprimierenden Prostatakarzinomen konnte immunhistochemisch eine nukleäre Anfärbbarkeit gegen FHL2 gezeigt werden, die mit dem Grad der Tumordifferenzierung und somit einem erhöhten Risiko der Progression zu maligneren Phänotypen korrelierte (Muller et al., 2000).

Des Weiteren zeigte sich in der Leber transgener Mäusen mit einer Überexpression von FHL2 eine 6-fach erhöhte Proliferation, die mit einer gleichzeitig erhöhten Apoptose einherging. Letzteres konnte auf eine Bindung und Aktivierung von FHL2 an den Promoter von p53 zurückgeführt werden. Nach partieller Hepatektomie kam es zu einer beschleunigten Wiederherstellung des Lebergewichts. In humanem Lebergewebe korrelierte eine erhöhte FHL2-Expression mit dem Grad der Entzündung und Zirrhose (Nouet et al., 2012).

In Myoblasten wurde FHL2 als Corepressor des β -Catenin (Martin et al., 2002) und als Corepressor des promyelozytischen Leukämie-Zink-Finger-Proteins identifiziert (McLoughlin et al., 2002). Doch auch als Coaktivator ist FHL2 in die Regulation der Genexpression involviert. In Epithelzellen der Prostata wird FHL2 nukleär exprimiert und dient dort als spezifischer Coaktivator des Androgenrezeptors. Des Weiteren coaktiviert FHL2 cAMP-responsive-element-binding-protein (CREB) und Wilms-Tumor-Protein 1 (WT1), welche in Differenzierungsprozessen eine Rolle spielen, und activator protein 1 (AP-1), ein wesentlicher Transkriptionsfaktor in der Proliferation und Differenzierung von Kardiomyozyten (Du et al., 2002; Fimia et al., 2000; Morlon und Sassone-Corsi, 2003). Ferner scheint die Translokierung von FHL2 in den Zellkern induzierbar zu sein, so beispielsweise durch 20% Serum und UV-Bestrahlung (Morlon und Sassone-Corsi, 2003).

1.4 Tiermodelle der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz

Zur Induktion kardialer Hypertrophie stehen verschiedene Mausmodelle zur Verfügung. Ein denkbar einfacher, wenn auch zeitaufwendiger Ansatz, ist das Modell der „exercise-induced hypertrophy“, der Induktion einer physiologischen Hypertrophie durch forciertes Schwimm- oder Lauftraining (Gay-Jordi et al., 2013; Radovits et al., 2013). Beim pharmakologischen Modell wird durch Applikation kardiotoxischer Substanzen wie beispielsweise dem β -Agonisten Isoproterenol über einen definierten Zeitraum durch eine metabolische Aktivierung eine kardiale Hypertrophie induziert (Goonasekera et al., 2012; Kong et al., 2001). Darüber hinaus kann eine Herzhypertrophie experimentell durch Gendelektion bzw. Überexpression eines bestimmten Gens erwirkt werden. Huang et al. (2013) zeigten eine spontane Herzhypertrophie in Mäusen mit einer Überexpression der microRNA22, während Mäuse mit entsprechendem Gendefekt auch unter Stress durch Isoproterenol-Infusion keinerlei Zeichen der Herzhypertrophie entwickelten.

Weiterhin kann eine kardiale Hypertrophie auch mechanisch, durch Operation einer transversen Aortenstenose (transverse aortic constriction, TAC) erreicht werden. Hierbei wird der Aortenbogen zwischen Truncus brachiocephalicus und linker Arteria carotis communis legiert und somit eine Aortenstenose imitiert. Die TAC-Operation wurde erstmals von Rockman et al. (1991) durchgeführt. In Folge der TAC kommt es zu einer Druckbelastung des linken Herzens, welche mit einer Erhöhung der Wandspannung einhergeht; diese wird durch eine Verdickung des Herzmuskels, die konzentrische Hypertrophie, gesenkt. Die TAC ist das wahrscheinlich am weitesten verbreitete Modell, da sie durch unterschiedlich starke Ligatur der Aorta eine gezielte Abstufung des Ausmaßes der Herzhypertrophie erlaubt. Zudem kommt es durch den akuten Druckanstieg verlässlich zu einer signifikanten kardialen Hypertrophie. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die hohe Reproduzierbarkeit der so generierten Daten. Nachteilig ist der abrupte Anstieg des Blutdrucks infolge des plötzlichen Eingriffs; die tatsächlichen pathophysiologischen Gegebenheiten der imitierten Aortenstenose werden so nur näherungsweise abgebildet (Patten und Hall-Porter, 2009). Dennoch stellt diese Methode ein probates Modell dar, um Herzhypertrophie und -fibrose sowie die mit diesen Prozessen vergesellschaftete, graduelle Entwicklung der Herzinsuffizienz zu untersuchen.

1.5 Zielsetzung

Das bislang bestuntersuchte Mitglied der four-and-a-half-LIM-Protein-Familie, FHL2, zeigt bereits während der embryonalen Entwicklung wie auch im Erwachsenen eine besonders starke Expression im Herzen (Chu et al., 2000). Umso erstaunlicher die Tatsache, dass FHL2^{-/-} Mäuse einen gänzlich unauffälligen kardialen Phänotyp unter physiologischen Bedingungen aufweisen.

In Modellen der akuten Druckbelastung durch transverse Aortenstenose hingegen ergaben orientierende Untersuchungen des FHL2-Verlusts echokardiographisch keinen Anhalt für eine unterschiedliche Entwicklung kardialer Hypertrophie gegenüber den WT Tieren nach sieben Tagen (Chu et al., 2000). Im Gegensatz dazu konnten Kong et al. (2001) histologisch eine exazerbierte kardiale Hypertrophie FHL2^{-/-} Tiere gegenüber den WT Tieren infolge chronischer β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol zeigen.

Bis heute fehlt jedoch eine umfassende Charakterisierung des kardiovaskulären Phänotyps FHL2^{-/-} Tiere, welche auch die hämodynamischen Verhältnisse adäquat abbildet. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Bewertung der funktionellen Effekte des Fehlens von FHL2 sowohl auf den Gefäßtonus, als auch auf die kardiale Pumpleistung am Modell der Transversen Aortenstenose der Maus unter normalen und unter „Stressbedingungen“.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Käfige	Makrolon, Typ II L, Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld
Waage	Kern EMB 500-1, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Isofluran Vapor	19.3, Dräger, Telford, USA
Beatmungsgerät Minivent	Typ 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Operationsmikroskop	OpMi-191294, ZEISS, Oberkochen
OP-Tisch	Eigenanfertigung der feinmechanischen Werkstatt des Physiologischen Instituts II Bonn; angeschlossenes Wärmebad (42°C), Rhema-Labortechnik, Hofheim
Operationsbesteck	Augenschere, Pinzetten, Retraktoren, Klemmen, Castroviejo Nadelhalter, Fine Science Tools, Foster City, Kalifornien, USA/ Allgaier Instrumente, Frittlingen
Millar-Katheter	Mikro-Tip Pressure Katheter (Nylon) mit 1,4-French-Drucksensor, Millar Instruments Inc., Houston, USA
Kleingefäßmyograph	Danish Myo Technology, Model 610 M, Aarhus, Dänemark
Gefrierschrank (-20)	Liebherr, Biberach an der Riß

Gefrierschrank (-80)	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Osterode
Lichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Immunfluoreszenzmikroskop	Leica DM LB, Leica microsystems GmbH, Wetzlar
Analysewaage	Typ Voyager, Ohaus, Zürich, Schweiz
Schieblehre	Mauser, St. Denis, Frankreich
Vortexer	Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA
Zentrifuge	Model 5415R, Eppendorf AG, Hamburg
FastPrep FP 120 Cell disrupter	Bio 101 Savant, Q Biogene Inc., Carlsbad CA, USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG
Pipetten (10µl, 100µl, 200µl, 1000 µl)	Eppendorf AG
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
DNA engine gradient cycler PTC-200	MJ Research, St. Bruno, Kanada
Spectrophotometer NanoDrop ND100	Spectrophotometer NanoDrop ND100
TaqMan ViiA 7 Real-Time PCR system	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad CA, USA

Tab. 1: Geräte

2.1.2 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Glucose	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck
KCl	Merck
MgSO ₄	Merck
KHPO ₄	Merck
NaHCO ₃	KMF Laborchemie, Lomahr
Isofluran 100%	Abbot, Illinois, USA

Phenylephrin Hydrochlorid	Sigma Aldrich, München
Acetylcholin Chlorid	Sigma Aldrich
β - Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Buprenorphin Hydrochlorid (Temgesic [®])	Ampullen à 0,3 mg/ml Injektionslösung; Fa. Essex Pharma GmbH, München
Ethanol	Merck
Methanol	Merck
TaqMan Gene Expression MasterMix	Applied Biosystems
Laminin	Sigma Aldrich
Triton	X-100, Sigma-Aldrich
FHL2-Antikörper, polyklonal, Rabbit	Aviva Systems Biology, San Diego, USA
Alexa 594, polyklonal, Goat	Life Technologies Corporation, Carlsbad CA, USA
Phalloidin Alexa Fluor 488	Life Technologies Corporation, Carlsbad CA, USA
DAPI	Sigma Aldrich
5 % Milchpulver	Nestlé Research Laboratories, Vevey Switzerland
Collagenase	Sigma Collagenase Blend Typ L, Sigma Aldrich
Trypsin	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma Aldrich
PBS	Sigma Aldrich

Tab. 2: Reagenzien

2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Reaktionskits

Material	Hersteller
Tiereinstreu	Altromin-Tiereinstreu-Granulat, Altromin GmbH & Co. KG., Lage-Lippe
Tierfutter	Altromin Standarddiätfutter Maus und Rat-

	te, Altromin GmbH & Co. KG. Lage-Lippe
Nahtmaterial	Prolene Faden (monofil), Stärke 6-0 und 7-0, mit atraumatischer Nadel; Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien
Endotrachelakanülen	Ø 1-1,2 mm Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Nerbe Plus GmbH, Winsen /Luhe
Spin Bead tubes	MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornien, USA
Eppendorfröhrchen	Brand, Wertheim
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Düsseldorf
Superscript VILO cDNA Synthesis Kit	Invitrogen

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien und Reaktionskits

2.1.4 Lösungen

2.1.4.1 Myograph:

Substanz	Konzentration [M]
KCl	2,95 M
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,109 M
KH ₂ PO ₄	0,12 M
NaHCO ₃	0,625 M
CaCl ₂	0,331 M

Tab. 4: Stammlösungen

Substanz	KBR (1000 ml)	KCl (500ml)
Glucose [g]	0,0055 M	0,00275 M
NaCl [g]	0,1185 M	0
KCl [ml]	0,0047 M	0,125 M
MgSO ₄	0,0012 M	0,0006 M
KH ₂ PO ₄	0,0012 M	0,0006 M
NaHCO ₃	0,025 M	0,0125 M

Tab. 5: Arbeitslösungen

2.1.4.2 Langendorff-Perfusion:

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	135
KCL	4
MgCl ₂	1
HEPES	2
EGTA	2
Titration auf pH 7,4 mittels NaOH	

Tab. 6: EGTA-Tyrode

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	4
KCl	10
MgCl ₂	1
K-Glutamat	130
Glucose	9
HEPES	4
+ 500 µl / 2l 0,1 M CaCl ₂ (Endkonzentration: 25 µM)	
Titration auf pH 7,4 mittels KOH	

Tab. 7: Hochkonzentrierte Kaliumlösung

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	$4,05 \times 10^3$
KCl	120
MgCl ₂	30
CaCl ₂	54
HEPES	60
Pro 10 ml Tyrode: 0,6 g Glucose; 0,3 g BSA und 0,005 g Trypsininhibitor	

Tab. 8: Tyrode

2.2 Software

Zur Aufzeichnung der Elektrokardiogramme, der Blutdruckverläufe und der Kontraktilität von Gefäßringen wurde sich des Programmes LabChart Version 6, PowerLab, AD-Instruments GmbH, Spechbach, Deutschland, bedient.

2.3 Methoden

2.3.1 Versuchstiere und ihre Haltung

Für die *ex vivo* und *in vivo* Untersuchungen wurden männliche Mäuse der Inzuchtlinie C57BL/6J verwandt. FHL2^{-/-} Tiere wurden freundlich zur Verfügung gestellt von R. Bas-
sel-Duby (Kong et al., 2001) und in institutseigener Zucht vermehrt. Mit vier Wochen wurden die Tiere abgesetzt und nach dem Geschlecht getrennt zu je fünf in trans-
parenten 365 x 207 x 140 mm messenden Polycarbonatkäfigen gehalten. Diese waren
mit Altromin-Tiereinstreu, sowie Wasser und Futter ausgestattet. Die Raumtemperatur
betrug 20 bis 22 °C, die relative Luftfeuchtigkeit 50 %; zudem wurde ein 12-Stunden-
Tag-Nacht-Rhythmus eingehalten. Zum Zeitpunkt der TAC-Untersuchungen waren die
Mäuse acht bis zehn Wochen alt. Zum Zeitpunkt der Myograph-Untersuchungen waren
sie hingegen 20 bis 35 Wochen alt und wiesen ein Körpergewicht von 22 bis 25 g auf.
Der Tierversuchsantrag war durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucher-
schutz Nordrhein-Westfalen (Recklinghausen) genehmigt worden (Aktenzeichen 87-
51.04.2010.A024).

2.3.2 *In-vivo*-Untersuchungen

2.3.2.1 Transverse Aortenstenose

Die TAC-Operation wurde erstmals von Rockman et al. (1991) durchgeführt und ist seit-
her ein häufig angewendetes Modell der kardialen Hypertrophie. Die Durchführung der
TAC und die anschließende invasive Blutdruckmessung gestalteten sich entsprechend
dem in unserem Labor etablierten Versuchsprotokoll. Acht bis zehn Wochen alte Mäuse
wurden gewogen und mit Isofluran 2 % intraperitoneal anästhesiert. Buprenorphin 0,05

mgkg⁻¹ intraperitoneal diente als Analgetikum. Die Beatmung erfolgte mittels eingeführter Endotrachealkanüle durch ein Beatmungsgerät mit einem Sauerstofffluss von 1 l/min und einem Atemzugvolumen von 200 µl bei einer Atemfrequenz von ca. 110 Atemzügen pro Minute. Gleichzeitig wurden Körpertemperatur und Elektrokardiogramm aufgezeichnet. Im zweiten Intercostalraum links wurde eine 3 mm messende Thorakotomie durchgeführt und die Aorta zwischen Truncus brachiocephalicus und linker Arteria carotis communis mit einem monofilen Prolene-Faden der Stärke 7-0 legiert (Abb. 3). Als Platzhalter zur standardisierten Konstriktion wurde eine 27G Nadel verwendet, welche nach Ligatur entfernt wurde.

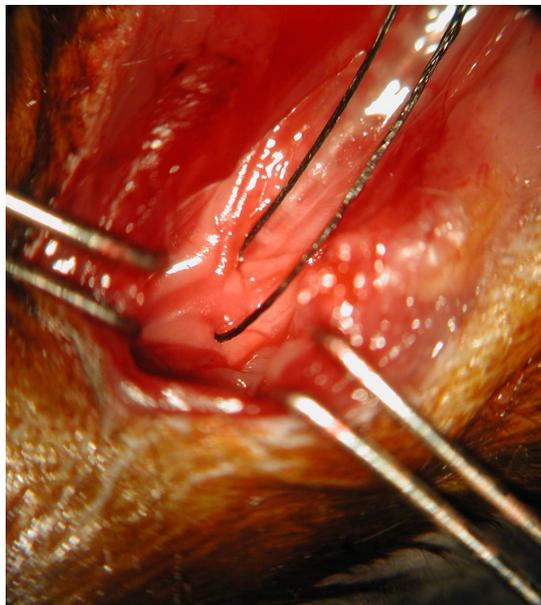


Abb. 3: Legierung des Aortenbogens zwischen Truncus brachiocephalicus dexter und A. carotis communis sinistra im Rahmen der Transversen Aortenstenose der Maus. (Foto von Prof. Meyer, Institut für Physiologie II, Universitätsklinikum Bonn).

Anschließend wurde der Thorax mit einem monofilen Faden der Stärke 6-0 durch ca. 3 intercostale Situationsnähte verschlossen. Es folgte eine Hautnaht, sowie eine Bolusinjektion von 0,1 ml Temgesic-NaCl (0,0015 mg/Tier; Temgesic[®]) zur postoperativen Schmerztherapie. Nach Einsetzen von Spontanatmung und Schutzreflexen wurde die Maus extubiert.

2.3.2.2 Invasive Blutdruckmessung

Die invasive Blutdruckmessung mittels 1,4-French-Millar-Katheter bei geschlossenem Thorax ist als Verfahren zur Erhebung hämodynamischer Daten bereits mehrfach vorbeschrieben (Doevendans et al., 1998; Lorenz und Robbins, 1997).

Vierzehn Tage nach TAC-Operation erfolgte die hämodynamische Evaluation anhand von invasiver Blutdruckmessung und anschließender Dobutaminapplikation. Die Maus wurde in eine Inhalationsbox gesetzt und die Narkose wurde mit 2 Vol. % Isofluran bei einem O₂-Frischgasfluss von 1 l/min eingeleitet. Das Tier wurde auf dem 37 °C warmen Operationstisch immobilisiert, die Narkose mittels Nasenkonus aufrecht erhalten und die Arteriae carotides freipräpariert. Im Anschluss wurde der Millarkatheter in die rechte Arteria carotis eingeführt und retrograd bis hinter die Aortenklappe vorgeschoben. Auch die linke Arteria carotis wurde punktiert, um dort den poststenotischen Blutdruck zu erfassen (Abb. 4). Die Vibration des Katheters zeigte hierbei seine korrekte Lage in der Aorta an. Nun schloss sich eine zehnminütige Blutdruckmessung bei 0,6 % Isofloran, 1 l/min Frischgasfluss und einer Herzrate von 500/min an.

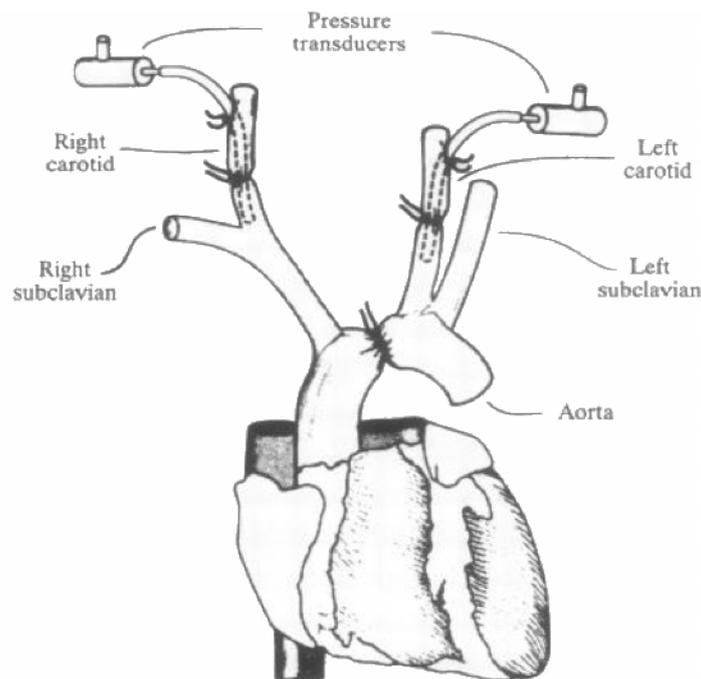


Abb. 4: Verwendete Technik der TAC mit transverser Aortenstenose und invasiver Blutdruckmessung über der Stenose (modifiziert nach Rockman, 1991). (Right subclavian = rechte A. subclavia, Right carotid artery = rechte A. carotis, pressure transducers = Druckumwandler, Left carotid = Linke A. carotis, Left subclavian = linke A. subclavia)

Die Aufzeichnung der Blutdruckdaten erfolgte durch ein an den Katheter angeschlossenes Power Lab Data Acquisition System (ADInstruments). Um nun entsprechende Daten zur Blutdruckanstiegsgeschwindigkeit im Ventrikel und zum enddiastolischen linksventrikulären Druck messen zu können, wurde der Katheter etwas vorgeschoben und erneut für zehn Minuten gemessen. Nach Beendigung der Messung wurde der Katheter langsam zurückgezogen. Darauf folgte die Dobutamin-Applikation in einer Dosis von $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ intraperitoneal.

Die Auswertung der hämodynamischen Daten konnte mithilfe des Programms Chart 4 Windows[®] (ADInstruments) vorgenommen werden. Den peripheren Blutdruck betreffend wurden folgende Zielgrößen errechnet: Systolischer und diastolischer arterieller Blutdruck (SAP und DAP), welche sich aus den gemittelten Maxima bzw. Minima der Blutdruckkurve ergaben. Aus diesen Werten errechnet sich ebenfalls der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), wobei der gemittelte systolische zu 1/3, der gemittelte diastolische arterielle Blutdruck zu 2/3 berücksichtigt wird.

Die Auswertung der ventrikulären Blutdruckkurve ergab folgende Zielgrößen: Systolischer und diastolischer linksventrikulärer Blutdruck (LV SAP und LV DAP), Herzfrequenz, maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit während der Systole (dP/dt_{max}), maximaler Druckabfall während der Diastole (dP/dt_{min}), sowie der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP).

2.3.2.3 Organentnahme und Bestimmung der Organgewichte

Am Ende der Versuchsperiode (14 Tage) wurden die Tiere nach Erhebung der Blutdruckdaten unter Narkose getötet. Herz und Lunge wurden mit PBS gespült und mit einer Präzisionswaage gewogen (Feuchtgewicht). Daraufhin wurden sie für weitere Untersuchungen zusammen mit der Niere in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Weiterhin wurde eine untere Extremität abgetrennt und die Tibia freipräpariert; ihre Länge wurde mittels Schieblehre bestimmt.

2.3.2.4 Gesamt-RNA- Isolation aus schockgefrorenem Gewebe

Die RNA-Isolation erfolgte mithilfe des RNeasy Midi Kits (50) von Qiagen. Das Prinzip der Isolation beruht hierbei auf der selektiven Bindung der RNA an eine Kieselgel-Membran. Die zuvor bei -80°C gelagerten Nieren wurden in spin bead tubes in $600\ \mu\text{l}$ des durch β -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, München) ergänzten RLT-Puffers lysiert und anschließend in einem cell disrupter homogenisiert.

Anschließend wurde das Lysat 3 min. mit einer Beschleunigung von $13000\ \text{x g}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, mit $500\ \mu\text{l}$ 70%igen Ethanol versetzt und mit der Pipette vorsichtig vermischt.

Daraufhin wurden $700\ \mu\text{l}$ des Ansatzes auf eine in einem collection tube befindliche RNeasy spin column pipettiert und 15 s mit $13000\ \text{x g}$ zentrifugiert. Dieses spezielle Röhrchen enthält eine Silikatmembran, an welche die RNA unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den RNA- und den Silikatmolekülen bindet. Nach dem Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit am Boden des collection tubes verworfen und der Vorgang wiederholt, bis das gesamte Probenvolumen die spin column Membran passiert hatte. Nun wurden erst $700\ \mu\text{l}$ RW1 Puffer, dann $500\ \mu\text{l}$ RPE Puffer auf die spin

column pipettiert und 15 s mit 13000 x g zentrifugiert. Wiederum wurde die Flüssigkeit am Boden des collection tubes zwischen den einzelnen Waschschrritten verworfen. Die Waschschrritte dienten der Reinigung der RNA von Proteinkontaminationen.

Zuletzt wurde die spin column in ein neues collection tube überführt und durch Hinzupipettieren von 30 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugieren mit 13000 x g für 1 min. die RNA in Wasser gelöst.

Alle Schritte wurden unter Verwendung von Handschuhen zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen und auf Eis durchgeführt, bevor die isolierte RNA aufgrund ihrer Instabilität bei Raumtemperatur bei -80 °C gelagert wurde.

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurde die in RNase-freiem Wasser gelöste RNA auf ihre Konzentration hin untersucht. Diese wurde mithilfe eines Spectrophotometers anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Ferner konnte der Grad der Verunreinigung mit DNA bzw. RNA gemessen werden; hierfür wurde der Quotient der Extinktionen bei Wellenlängen von 260 nm zu 280 nm bzw. 260 nm zu 230 nm ermittelt. Bei einem Ergebnis von DNA/RNA zwischen 2,0 und 2,15 bzw. Protein/RNA-Quotient wurde die RNA-Probe als für weitere Versuche geeignet eingestuft und bei -80 °C schockgefroren.

2.3.2.5 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Zur Synthese der komplementären DNA wurde das Set SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit der Firma Invitrogen, Karlsruhe, genutzt. Für die cDNA-Synthese wurde der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl aus 4 µl 5xVILO Reaction Mix, 2 µl 10x SuperScript Enzyme Mix und 1 µg RNA zusammenpipettiert. Das Restvolumen wurde durch RNase freies Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz zehn Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 42 °C und 5 Minuten bei 85 °C im Cycler inkubiert.

Erneut wurde die Konzentration im Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt und die Probe anschließend auf eine Konzentration von 50 ng/µl verdünnt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung in der quantitativen Real-Time-PCR (qrtPCR) bei -20 °C gelagert.

2.3.2.6 Real-time-PCR

Zur quantitativen Untersuchung der Expression von Renin-mRNA in der Niere wurden im Rahmen der qrt-PCR neben dem sogenannten target gene Renin zwei house keeping genes, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) und L32 untersucht. Die Basenfolgen der verwendeten Primer sind in Tab. 9 dargestellt.

Die Amplifikation der cDNA erfolgte mittels QuantiTect SYBR Green PCR Kit der Firma Invitrogen, Karlsruhe. Auf einer 384 well Platte wurden pro well 5 µl 2 x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix, 0,3 µl des entsprechenden Primers, je einmal forward und einmal reverse, 1 µl cDNA in einer Konzentration von 50ng/µl sowie 3,4 µl RNase freiem Wasser durchmischt. Pro Probe wurde in zwei weiteren wells eine Verdünnungsreihe aus zwei Verdünnungsschritten von jeweils 1:10 erstellt. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie luftdicht versiegelt und für 2 min. bei etwa 500 x g zentrifugiert.

Nun erfolgte im Applied Biosystems ViiATM 7 Real Time PCR System zunächst eine Inkubation für 5 min bei 95 °C. Daraufhin folgten 40 Zyklen von jeweils 10 s bei 95 °C zur Denaturierung, 30 s zum Anlagern der Primer und Verlängern der DNA-Stränge bei 60 °C. Anschließend wurde eine Schmelzkurve erstellt.

Gen	Basenfolge Primer forward	Basenfolge Primer reverse
GAPDH	ACT GCC ACC CAG AAG ACT G	CAG CAC CCT GTT GCT GTA
L32	CGG GAT GGA GCT GGA GGT GCT GA	GGA ATT CGC CAG CTG TGC TGC TCT TTC
Renin	CGG GAT CCG TGC AGC CGC CTC TAC CTT GCT TGT	GGA ATT CGC AGC TCG GTG ACC TCT CCA AAG G

Tab. 9: Tabelle der in der PCR zu amplifizierenden Gene mit Basenfolgen der zugehörigen Primer.

Im Rahmen der Auswertung wurden die erhobenen Daten in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) exportiert und die Proben quantifiziert.

Die Quantifizierung der gewonnenen DNA erfolgt mithilfe von Fluoreszenzmessungen in Echtzeit. Dabei steigt die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte. Zu Beginn der exponentiellen Phase der PCR steigt die gemessene Fluoreszenz signifikant an; der zugehörige Zyklus wird als threshold cycle C_T bezeichnet. Dieser Wert wurde automatisch am Maximum der zweiten Ableitung der Amplifikationskurve identifiziert. Standardkurven wurden für das target generiert. Mithilfe der Steigung m sowie der Verdünnungsreihe wurde eine Effizienz von $E = 10^{(-1/m)}$ berechnet. Eine Effizienz von $E = 2$ zeigt eine Verdopplung von cDNA in jedem PCR-Schritt der Verdünnungsreihe an. Es resultiert für eine ideale Amplifikation eine Steigung m der Standardkurve von $m = -1/\log_{10}(2) = -3,32$. Über den C_T -Wert und die Effizienz kann das Target quantifiziert werden.

2.3.2.7 Isolation und Fixierung einzelner Kardiomyozyten

Zunächst wurden Kardiomyozyten von Wildtypmäusen 14 Tage nach TAC Operation isoliert. Hierzu wurde sich der Methode nach Langendorff entsprechend laborinternem Protokoll bedient (Langendorff, 1895). Das freipräparierte Herz wurde mit EGTA-Tyrode (Tab. 6) gespült und über die Aorta retrograd kanüliert. Dann wurde die Kanüle mit dem daran befestigten Herzen in das für die Langendorff-Perfusion vorgesehene Gerät verbracht (Gerät aus hauseigener Werkstatt). Bei einer Temperatur von 35,5-36°C folgte zunächst eine 5 minütige Perfusion mit EGTA-Tyrode (Tab. 6), dann mit der hochkonzentrierten Kaliumlösung (Tab. 7), ebenfalls für 5 Minuten. Dann wurde der Kaliumlösung das Enzym Trypsin beigefügt (Verdünnung: 1:600) und das Herz über 4 min. damit perfundiert. Anschließend folgte ein weiterer Perfusionsschritt mit Kaliumlösung und zuletzt eine 5 minütige Verdauung mit Collagenase (10 mg Collagenase auf 25 ml hochkonzentrierte Kaliumlösung). Anschließend wurde das Herz aus der Langendorff-Vorrichtung genommen und in Tyrode (Tab. 8) mit einer Augenschere zerkleinert und mit Hilfe einer Nylongaze filtriert. Nach einem Zentrifugierungsschritt wurde der Überstand des Filtrats abpipettiert, die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert.

Die in Tyrode suspendierten Zellen wurden auf einen mit Laminin (2:100 Verdünnung in Tyrode) beschichteten Objektträger getropft. Während der anschließenden 60 minütigen Inkubation bei 37°C kam es zu einer Adhäsion der Myozyten auf der Lamininoberfläche. Zur Fixierung auf Objektträgern wurden die Myozyten mit Methanol betropft und 3 Minuten auf Eis gelagert. Daraufhin folgte eine Permeabilisierung der Zellmembran in 0,2% Triton/PBS für eine Stunde.

2.3.2.8 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die fixierten Kardiomyozyten gemäß laborinternem Protokoll zunächst 2 Stunden bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver (Nestlé Research Laboratories, Vevey, Switzerland)/PBS inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation mit FHL2-Antikörper (Rabbit polyclonal antibody, Aviva, San Diego, US) über Nacht bei +4 °C. Am Folgetag wurden die Zellen 5 mal in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) gewaschen. Es folgten gleichzeitig die folgenden Färbeschritte über 1 Stunde bei Raumtemperatur: Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa 594 (goat polyclonal secondary antibody, Life Technologies) (Verdünnung 1:500 in TRIS); Färbung des Zellkerns mittels DAPI in TRIS (Verdünnung 1:2000); Färbung der Zellen mit Phalloidin 488 (Life Technologies) (Verdünnung 1:200 in TRIS) zur Identifizierung von Aktinfilamenten. Es folgte erneut ein 5-maliger Waschschrift in TRIS. Anschließend wurden die Zellen in Moviol eingedeckelt und zur weiteren Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop bei +4 °C gelagert.

2.3.3 *Ex-vivo*-Untersuchungen

2.3.3.1 Der Mulvany-Myograph

Der Kleingefäßmyograph ermöglicht die Untersuchung der Kontraktionskraft von Gefäßen unter isometrischen Bedingungen (Abb. 5). Diese Methode wurde erstmals 1977 durch Mulvany und Halpern beschrieben (Mulvany und Halpern, 1977). Zur Untersuchung eignen sich sowohl Segmente größerer Gefäße wie auch kleine Widerstandsgefäße von Mäusen oder Ratten, wobei der Innendurchmesser 100 µm nicht unterschreiten sollte. Anhand der isometrischen Kontraktion kann unter Verwendung un-

terschiedlicher vasoaktiver Substanzen eine pharmakologische Charakterisierung des Gefäßes vorgenommen werden.

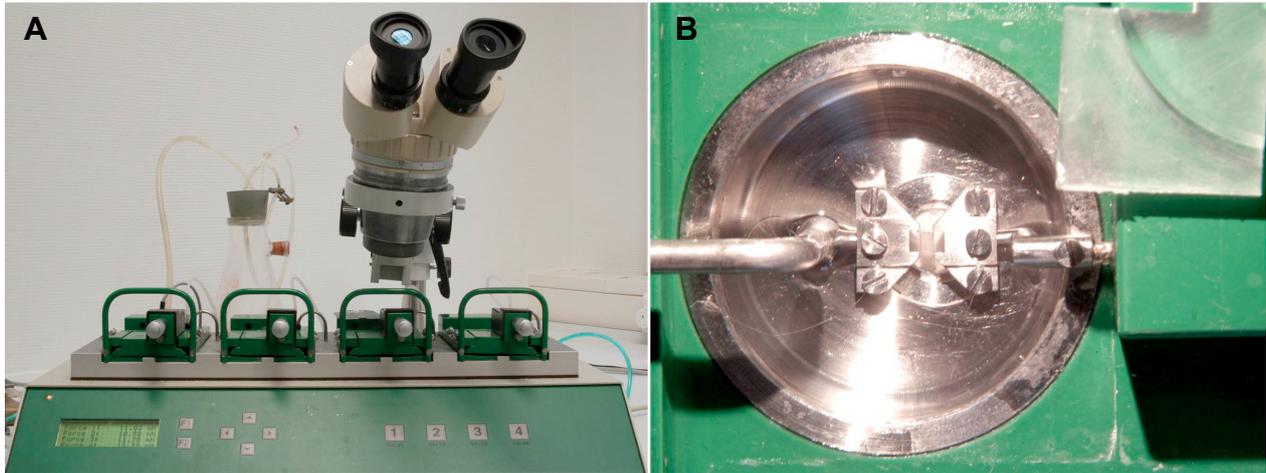


Abb. 5: A Mulvany-Myograph B Myographenkammer mit eingespanntem Gefäßring (Foto von Prof. Meyer, Institut für Physiologie II, Universitätsklinikum Bonn).

Für den Erfolg der Messung ist von besonderer Bedeutung, dass das Einspannen des Gefäßringes in die Kammer des Myographen unter physiologischen Bedingungen erfolgt. Daher muss das Gefäß noch durchblutet entnommen und unverzüglich in physiologische Kochsalzlösung gebracht werden. Weiterhin ist in den vier 15 ml fassenden Edelstahlkammern des Myographen eine kontinuierliche Carbogenbegasung (95 % O₂ und 5 % CO₂) gewährleistet. Eine integrierte Heizung kann auf 37 °C, welches annähernd der Körperkerntemperatur entspricht, eingestellt werden. Ein Thermosensor misst stetig die Temperatur mit einer Genauigkeit von 0,1 °C und sorgt für die Konstanthaltung derselben. Eine Kammerabdeckung, welche ein Evaporieren der Kammerflüssigkeit verhindert, dient zur Konstanthaltung des in der Kammer befindlichen Volumens. Sie enthält Aussparungen für den Temperatursensor, zur Zugabe der Krebs-Ringer- bzw. der Kaliumchloridlösung sowie für eine Absaugvorrichtung, welche über eine Vakuumpumpe mit einer Auffangflasche verbunden ist.

Die Kammern sind mit zwei Trägerbacken ausgestattet, von welchen die eine mit einem Kraftmesser, die andere mit einer Mikrometerschraube verbunden ist (Abb. 5B). Das mit zwei Drähten durchzogene Gefäß wird zwischen den Backen eingespannt.

Mittels Mikrometerschraube kann der Abstand der beiden Trägerbacken zueinander variiert und somit das Gefäß gedehnt bzw. entspannt werden. Im Kraftmesser wird die

isometrische Kontraktionskraft mittels eines Piezo-Elements mit einer Genauigkeit von 0,1 mN in eine elektrische Spannung überführt. Die analogen elektrischen Spannungen werden mittels eines speziellen Interfaces (Myointerface, AD Instruments, Castle Hill, Australien) digitalisiert und in einem PC weiterverarbeitet.

2.3.3.2 Eichung des Kraftarms

Die Eichung des Kraftarms wurde regelmäßig durchgeführt. Dazu wurde ein Draht in die Trägerbacke mit integriertem Kraftmesser eingespannt. Anschließend wurde der Hebelarm einer Kalibrierungswaage zwischen Draht und Trägerbacke platziert. Nun wurde der Hebelarm der Kalibrierungswaage mit einem Gewicht von 2 g beschwert. Der resultierende Ausschlag entsprach einer Kraft von 9,81 N auf den gespannten Draht.

Dies verhielt sich entsprechend folgender der Gleichung:

$$F_{\text{Kraftmesser}} = W \times g \times (\text{Kraftarm} / \text{Hebellänge})$$

$$g = 9,81 \text{ N/s}^{-1}$$

$$W = 2 \text{ g}$$

$$\text{Kraftarmlänge} / \text{Hebelarmlänge} = 2/4$$

2.3.3.3 Durchführung

Zunächst wurde Zellstoff in Isofluran getränkt und die Maus im Exikator narkotisiert. Um Zugkräfte auf das aortale Endothel zu vermeiden, wurde die Maus durch Dekapitation getötet.

Das Peritoneum wurde von kaudal bis zum Diaphragma eröffnet und letzteres durchtrennt. Daraufhin wurden Lunge, Tachea, Ösophagus und Herz entfernt, um bestmögliche Sichtverhältnisse auf die Aorta zu gewährleisten. Unter stereomikroskopischer Sicht bei 16-facher Vergrößerung folgte die Abpräparation periadventitiellen Fettgewebes von der thorakalen Aorta; hierbei war besonders sorgfältig vorzugehen, da die Integrität des aortalen Endothels sichergestellt und somit jegliche Zugwirkung oder Quetschung der Aorta durch die Pinzette vermieden werden musste. Die kaudale Aorta wurde explantiert und unter dem Mikroskop in 2 mm messende Ringe geschnitten. Anschließend wurde,

ebenfalls unter größtmöglicher Schonung des Endothels ein 40 μm starker Stahldraht (Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark) in das Lumen eingebracht.

Jeweils zwei Ringe wurden in den Mulvany Multi Myograph gespannt und in Krebs-Ringer-Lösung unter Carbogenbegasung (95 % O_2 , 5 % CO_2) 30 Minuten bei 37 °C und physiologischem pH ruhen gelassen. Anschließend wurden die Ringe graduell auf 20 mN vorgespannt, bevor die Spannung wieder auf den Basiswert 10 mN vermindert wurde. Die Vordehnung diente der späteren optimalen Kraftentwicklung unter Stimulation. Es folgte eine erneute Ruhephase von 30 Minuten. Exposition gegenüber hochkonzentrierter Kaliumlösung (125 mmol/L) und 10^{-7} M Phenylephrin (PE, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) erlaubte nun die Untersuchung der isometrischen Kontraktionsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur. Während die Phenylephrinkontraktionen darauf abzielten, die Intaktheit des Endothels unter Beweis zu stellen, dienten die Kaliumkontraktionen dem Auffüllen intrazellulärer Kalziumspeicher; hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen resultieren in einer Depolarisation der Zellmembran und in der Folge in einem Kalziumeinstrom von extrazellulär durch spannungsabhängig geöffnete Kalziumkanäle. Dieses extrazelluläre Kalzium dient intrazellulär z.T. im Zuge der Kontraktion der elektromechanischen Kopplung, z.T. wird es in das sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen und dort gespeichert.

Im Anschluss an die Vorkontraktionen wurden Dosis-Wirkungs-Kurven mit dem α -Agonisten Phenylephrin aufgezeichnet; hierzu wurde, ausgehend von einer Anfangskonzentration von 10^{-10} M, die Phenylephrinkonzentration im Abstand von 3 min. um eine halbe Zehnerpotenz bis zu einer Endkonzentration von 10^{-5} M gesteigert. Alle Agonistenlösungen wurden in Ascorbinsäure (1 mg/ml) angesetzt, um der Oxidation von Phenylephrin vorzubeugen. Die isometrischen Kontraktionen wurden mittels Powerlab (ADInstruments GmbH, Spechbach) digitalisiert und kontinuierlich mittels Chart für Windows aufgezeichnet.

2.4 Statistik

Im Rahmen der statistischen Analyse der ermittelten Datensätze wurden die jeweiligen Mittelwerte (MW) und Standardfehler der Mittelwerte (standard error of mean = SEM) errechnet. Mit Hilfe des Programms Prism 3.0 der Firma GraphPad Software, San

Diego, USA wurden Gruppenunterschiede mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (two-way ANOVA) und anschließendem Posthoc-Test nach Bonferroni errechnet. Dabei wurde eine statistische Signifikanz für einen p-wert $< 0,05$ festgelegt. * bezieht sich auf die statistische Auswertung zweier Gruppen mittels Mann-Whitney unpaired t-Test. Die Daten wurden in Balkendiagrammen \pm dem Standardfehler (SEM) wiedergegeben. Die Überlebenszeitanalyse wurde nach der Kaplan-Meier-Methode durchgeführt und anschließend mittels Log-rank Test und Wilcoxon Test getestet.

3. Ergebnisse

3.1 TAC-Operation

3.1.1 Tierzahlen und Mortalitätsraten

WT sowie FHL2^{-/-} Tiere wurden einer standardisierten TAC-Operation unterzogen. Es wurden 36 WT Tiere, sowie 23 FHL2^{-/-} Tiere in die Untersuchung aufgenommen. Hierbei ist die Mortalität ein sensibler Parameter, um die Vulnerabilität der Tiere, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, adäquat abzubilden. Wie in der Abbildung 6 dargestellt, starben bis zum 10. postoperativen Tag 46 % der WT Tiere, jeweils bis zu drei Tiere pro Tag. Die letzten beiden WT Tiere starben am 10. Tag, sodass keine Häufung in der unmittelbar postoperativen Phase zu beobachten war. Im Gegensatz dazu war in der Gruppe der FHL2^{-/-} Tiere die Mortalitätsrate (3 Tiere) mit 13 % signifikant niedriger ($p=0,02$). Am 14. Tag nach TAC standen 20 WT Tiere, 20 FHL2^{-/-} Tiere zur Verfügung. Es wurden 7 WT Tiere und 6 FHL2^{-/-} Tiere scheinoperiert. Durch die Scheinoperation ergab sich keine Mortalität.

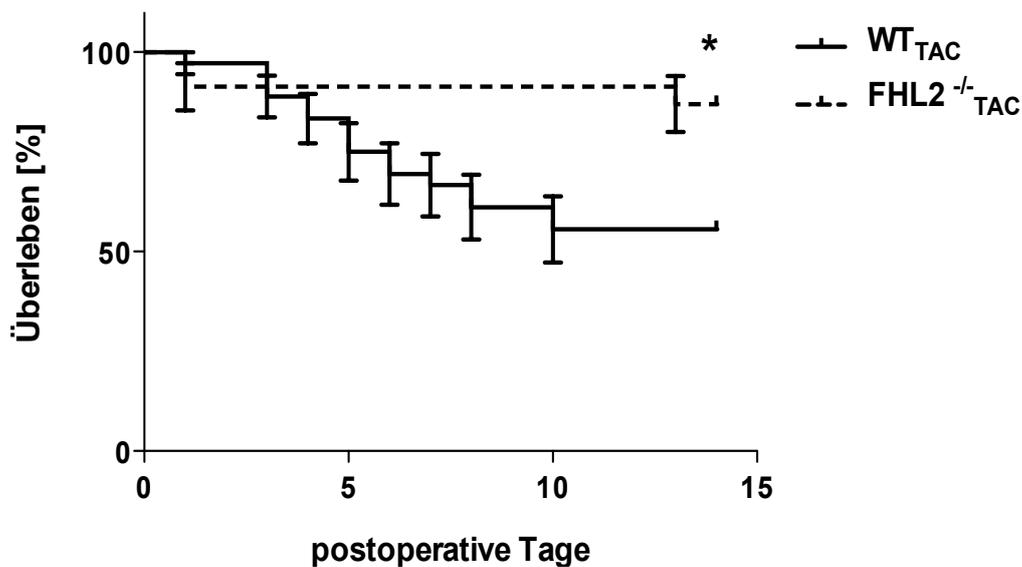


Abb. 6: 14-Tagesüberleben nach TAC-Operation von WT Tieren (schwarze Linie) gegenüber FHL2^{-/-} Tieren (gestrichelte Linie). Während nur 13 % der FHL2^{-/-} Tiere innerhalb von 14 Tagen nach TAC-Operation starben, verstarb innerhalb derselben Zeitspanne eine signifikant höhere Zahl von 46 % der Wildtypiere.

3.1.2 Invasive Blutdruckmessung

Um den Einfluss der Aortenligatur gegen den Effekt der dazu notwendigen Operation abzugrenzen, wurden die Tiere mit TAC nicht mit gänzlich unbehandelten Mäusen verglichen, sondern mit solchen, die einer Scheinoperation unterzogen worden waren. In den im Folgenden beschriebenen Versuchsergebnissen zeigten scheinoperierte FHL2^{-/-} Tiere keinerlei Unterschiede in systolischem und diastolischem Blutdruck zu scheinoperierten WT Tieren (Abb. 7 A, B). Auch im Hinblick auf die systolische und diastolische linksventrikuläre Funktion, welche durch dP/dt_{\max} bzw. dP/dt_{\min} ausgedrückt werden, ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede. Lediglich die Herzfrequenz war signifikant geringer in scheinoperierten FHL2-Tieren gegenüber den WT Tieren ($78,2 \% \pm 3,12 \%$) (Abb. 8).

Bei der TAC-Operation wird bei den Versuchstieren durch Ligatur des Aortenbogens künstlich eine Aortenstenose hervorgerufen, welche obligat zu einem prästenotischen Druckanstieg führt. 14 Tage nach TAC-Operation zeigte eine hochsignifikante Erhöhung des prästenotischen Blutdrucks in allen Versuchstieren den Erfolg der Operation an.

FHL2^{-/-} Tiere wiesen einen noch steileren Anstieg des prästenotischen systolischen Blutdrucks gegenüber den scheinoperierten Tieren auf (182 % ± 3,14 %, p<0,001). Bei TAC-operierten WT Tieren betrug der Anstieg nach TAC 158,03 % ± 1,61 %, p<0,001. Während der prästenotische, diastolische Blutdruck in der Gruppe der Wildtypiere bei den TAC operierten Tieren tendenziell geringer war als bei den scheinoperierten Tieren (93,11 % ± 3,20 %), zeigte sich in der Gruppe der FHL2^{-/-} Tiere eine Erhöhung des prästenotischen diastolischen Blutdrucks gegenüber allen anderen Tieren (125 % ± 3,25 %, p<0,001).

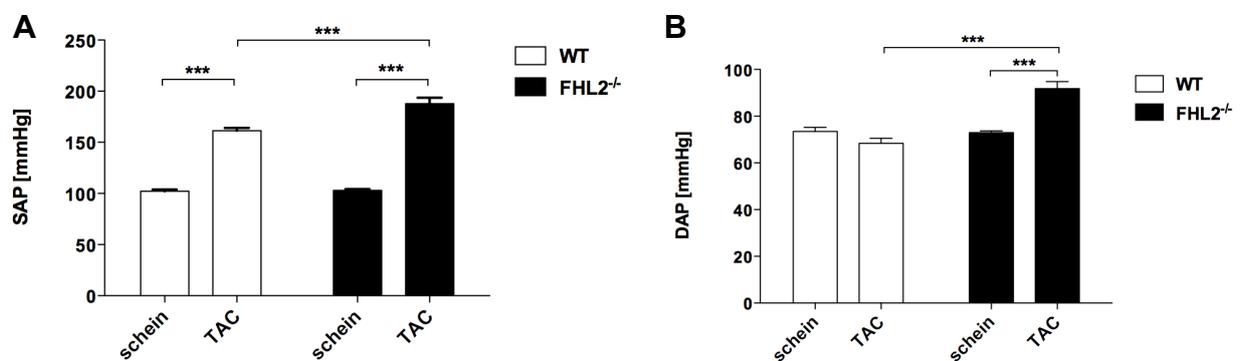


Abb. 7: A Prästenotische systolische arterielle Blutdruckdaten der vier untersuchten Gruppen 14 Tage nach TAC-OP. **B** Prästenotische diastolische arterielle Blutdruckdaten der vier untersuchten Gruppen 14 Tage nach TAC-OP. Sowohl der prästenotische systolische wie auch der prästenotische diastolische Blutdruck waren in FHL2^{-/-} Tieren 14 Tage nach TAC-Operation gegenüber dem WT signifikant erhöht (***) (p<0,001).

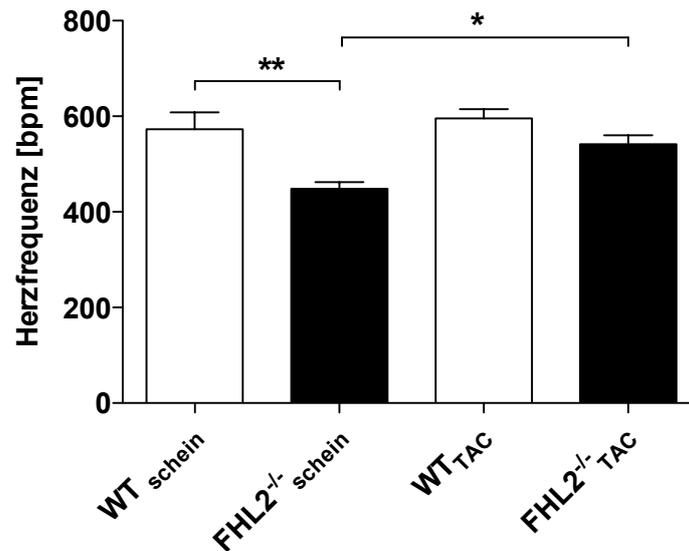


Abb. 8: Herzfrequenz in bpm (beats per minute = Schläge pro Minute) in den vier untersuchten Gruppen. Scheinoperierte FHL2^{-/-} Tiere weisen gegenüber scheinoperierten WT Tieren eine signifikant geringere Herzfrequenz auf (** p<0,01). Während sich die Herzfrequenz nach TAC in der Gruppe der WT nicht signifikant ändert, kommt es in der Gruppe der FHL2^{-/-} Tiere zu einem signifikanten Anstieg (* p<0,05).

Zusätzlich zur üblichen prästenotischen Blutdruckmessung wurden hier auch poststenotische Blutdrücke erfasst (Abb. 9), um die Ursache für die höheren Blutdrücke der FHL2^{-/-} Tiere nach TAC zu untersuchen. Bei den WT TAC Tieren wurde poststenotisch ein systolischer Wert von im Mittel $59,58 \pm 3,11$ mmHg gemessen (n=15), während sich bei den FHL2^{-/-} Tieren ein Mittelwert von $94,96 \pm 5,60$ mmHg ergab (n=11, p<0,05). Der diastolische poststenotische Wert war bei WT TAC Tieren im Mittel $35,54 \pm 1,95$ mmHg (n=6), während er bei den FHL2^{-/-} Tieren $71,94 \pm 1,77$ mmHg betrug (n=3, p<0,05). In der Gruppe der scheinoperierten Tiere betrug der mittlere diastolische Blutdruck 73 mmHg.

Während also bei den WT Tieren poststenotisch systolischer und diastolischer Blutdruck gegenüber den scheinoperierten Tieren verringert waren, zeigte sich bei den FHL2^{-/-} Tieren ein nur leicht erniedrigter systolischer und ein vergleichbarer diastolischer poststenotischer Blutdruck gegenüber den scheinoperierten Tieren. Der daraus resultierende signifikant höhere poststenotische diastolische Blutdruck FHL2^{-/-} Tiere gegenüber den

WT Tieren deutet auf eine mögliche reaktive Hypersensitivität der Gefäßwand innerhalb dieses Genotyps (siehe *ex vivo* Daten) hin.

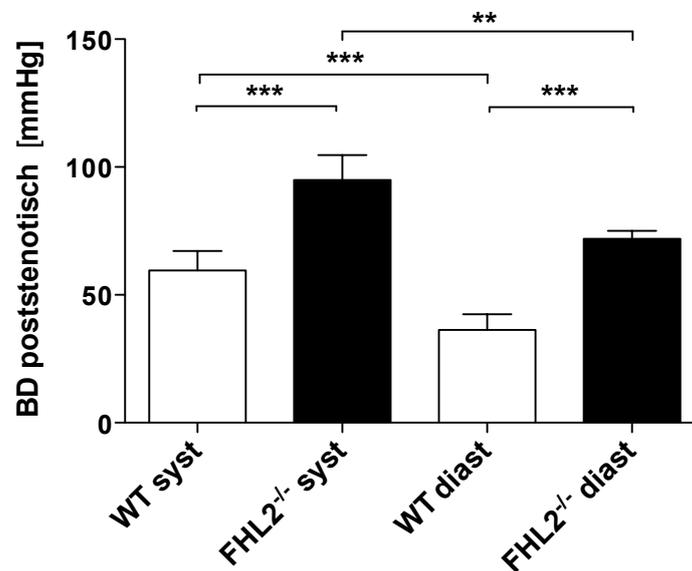


Abb. 9: Poststenotischer systolischer und diastolischer Blutdruck von TAC operierten Tieren beider Genotypen. In FHL2^{-/-} Tieren ist der Blutdruck poststenotisch gegenüber den WT Tieren signifikant erhöht; während der diastolische Druck der FHL2^{-/-} Tiere im physiologischen Bereich liegt, weisen Wildtypiere einen diastolischen Druck auf, der unter dem physiologischen Niveau liegt.

Um zu allen Zeiten eine Vergleichbarkeit der ermittelten Daten in allen vier Versuchsgruppen zu gewährleisten, bedurfte es eines konstanten Blutdruckgradienten über der Aortenstenose. Dieser war für beide Genotypen vergleichbar (Abb. 10: WT $\Delta = 100$ mmHg und FHL2^{-/-} $\Delta = 95$ mmHg (n.s.)).

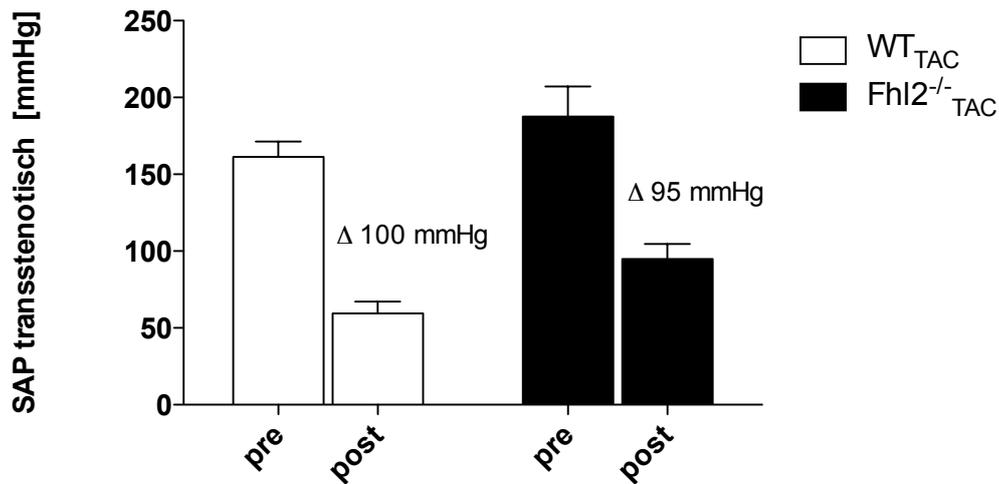


Abb. 10: Systolischer Blutdruck in der Aorta (SAP) vor und hinter der Stenose bei TAC operierten WT Tieren (weiß) und TAC-operierten FHL2^{-/-} Tieren (schwarz). In beiden Genotypen ergibt sich ein vergleichbarer Gradient (Δ).

3.1.2 Untersuchung der Leistungsfähigkeit des hypertrophen Herzens durch Dobutamininfusion

3.1.2.1 Systolische Ventrikelfunktion

Um die Leistungsfähigkeit des hypertrophierten Herzens zu untersuchen, wurden die systolische und die diastolische Funktion gemessen. Als Maß für die systolische ventrikuläre Funktion diente die maximale intraventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}), für die diastolische Funktion wurde der linksventrikuläre enddiastolische Druck herangezogen (LVEDP), unter Ruhebedingungen und direkt nach intraperitonealer Dobutamin-Verabreichung. Dobutamin, ein präferentieller β -Adrenozeptoragonist, wirkt positiv inotrop und chronotrop am Herzmuskel und steigert so das Herzzeitvolumen und somit den Blutdruck. Gleichzeitig kommt es zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch des Myokards.

14 Tage nach der Operation zeigten scheinoperierte FHL2^{-/-} Tiere im Vergleich zu den scheinoperierten WT Tieren zwar niedrigere Werte, jedoch keinen signifikanten Unterschied in ihrer linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit in Ruhe (9699 mmHg/s vs. 12999 mmHg/s) (vgl. Abb. 11). Die scheinoperierten Tiere beider Genotypen wiesen direkt nach Dobutaminverabreichung einen vergleichbaren, hochsignifikanten Anstieg

von dP/dt_{\max} (214 % vs. 194 %, $p < 0,001$) auf (Abb. 11). Die Geschwindigkeit des Druckanstieges war unter Dobutamineinfluss bei den WT Mäusen signifikant höher als bei FHL2^{-/-} Tieren ($p < 0,05$).

Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{\max}) betrug 14 Tage nach TAC-Operation in Ruhe bei den FHL2^{-/-} Tieren 11229 mmHg/s und bei den WT Tieren 10029 mmHg/s. Der Unterschied war nicht signifikant. Die Dobutaminverabreichung führte bei FHL2^{-/-} Tieren zu einem hochsignifikanten Anstieg von dP/dt_{\max} auf 18711 mmHg/s ($115,78 \% \pm 3,09 \%$, $p < 0,001$). Dennoch war der Anstieg von dP/dt_{\max} in TAC-operierten FHL2^{-/-} Tieren geringer als bei den scheinoperierten Tieren desselben Genotyps. Bei den TAC-operierten WT Tieren lag der Ruhewert niedriger als bei den scheinoperierten Tieren; nach Dobutamingabe kam es zu einem nicht signifikanten Anstieg von dP/dt_{\max} auf 12901 mmHg ($77,15 \% \pm 4,24 \%$).

TAC-operierte FHL2^{-/-} Tiere zeigten infolge Dobutaminapplikation eine wesentlich bessere systolische linksventrikuläre Funktion gegenüber den gleichbehandelten WT Tieren ($p < 0,001$).

TAC operierte WT Tiere zeigten gegenüber den scheinoperierten Tieren desselben Genotyps eine starke Reduktion der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit nach intra-peritonealer Dobutamingabe ($51,1 \% \pm 7,55 \%$).

Im Gegensatz dazu erfuhren TAC operierte FHL2^{-/-} Tiere durch Dobutamininfusion keine wesentliche Beeinträchtigung der systolischen Ventrikelfunktion gegenüber den scheinoperierten Tieren des gleichen Genotyps ($89,9 \% \pm 11,73 \%$). Somit zeigte sich eine signifikant bessere kontraktile Antwort der FHL2^{-/-} Tiere auf den β -adrenergen Stimulus als bei den gleichbehandelten WT Tieren.

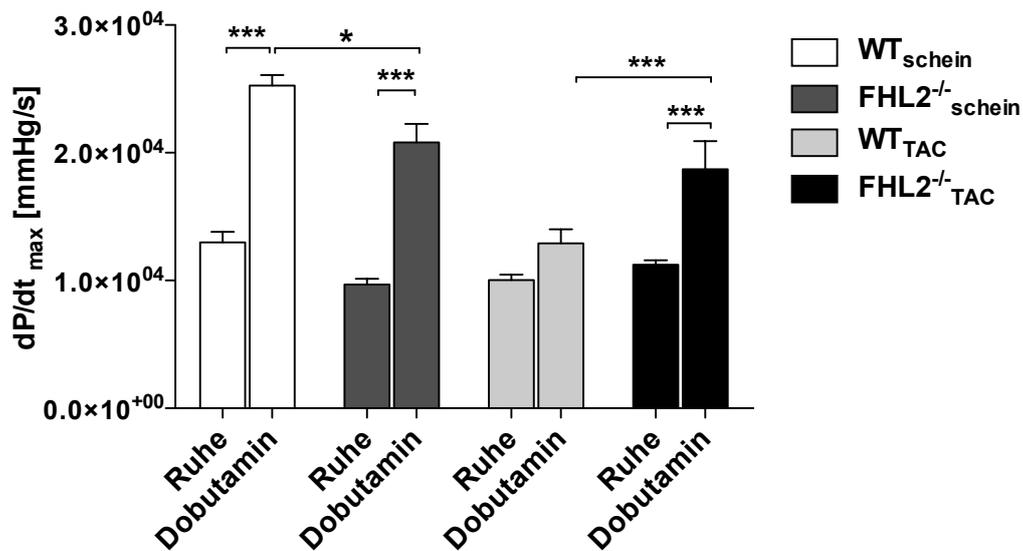


Abb.11: Linksventrikuläre Funktion der vier untersuchten Gruppen in Ruhe und nach intraperitonealer Dobutaminapplikation. dP/dt_{max} auf der Abszisse beschreibt die Druckanstiegsgeschwindigkeit in mmHg/s. Bei beiden Genotypen kam es bei den scheinoperierten Tieren nach Dobutaminapplikation zu einer hochsignifikanten Steigerung der Druckanstiegsgeschwindigkeit im Vergleich zur Druckanstiegsgeschwindigkeit in Ruhe. Während es bei den FHL2^{-/-} TAC Tieren zu einer signifikanten Steigerung der Druckanstiegsgeschwindigkeit nach Dobutamingabe kam, erreichten WT-TAC Tiere nach Dobutamingabe eine nur unwesentliche Steigerung der Druckanstiegsgeschwindigkeit.

3.1.2.2 Diastolische Ventrikelfunktion

Das funktionelle Korrelat der diastolischen Ventrikelfunktion ist der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP). Dieser stellt einen frühen Parameter der ventrikulären Dysfunktion dar und ist pathophysiologisch infolge einer Druckbelastung, beispielsweise eines arteriellen Hypertonus, erhöht.

14 Tage nach der Operation zeigten scheinoperierte FHL2^{-/-} Tiere in Ruhe höhere Werte für den LVEDP (im Mittel 6 mmHg) im Vergleich zu den scheinoperierten WT Tieren (im Mittel 3,6 mmHg), der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Nach Dobutamin-Verabreichung sank der LVEDP bei den scheinoperierten FHL2^{-/-} Tieren auf 3,2 mmHg, während er bei den scheinoperierten WT Tieren auf 0 mmHg absank ($p > 0,05$).

14 Tage nach TAC-Operation stieg der LVEDP in Ruhe bei den FHL2^{-/-} Tieren um ca. 80 % im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren auf 10,7 mmHg. Bei den WT Tieren kam es zu einem hochsignifikanten Anstieg des LVEDP im Vergleich zu den schein-

operierten Tieren auf 19 mmHg (ca. 400 %). Somit lag der LVEDP in Ruhe bei den FHL2^{-/-} Tieren signifikant unterhalb des LVEDP der WT Tiere ($p < 0,05$).

Die Dobutaminverabreichung führte bei FHL2^{-/-} Tieren zu einem Abfall des LVEDP auf 7,9 mmHg und bei den WT Tieren auf 13,9 mmHg. In beiden Fällen waren die Werte nach Dobutaminapplikation im Vergleich zu den Ruhewerten nicht signifikant unterschiedlich.

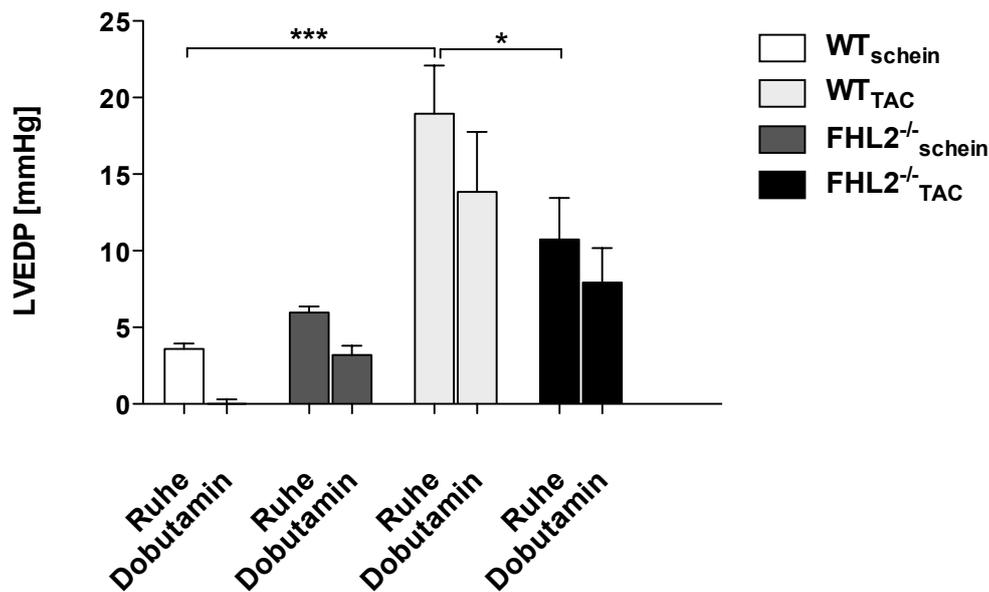


Abb.12: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) der vier untersuchten Gruppen in Ruhe und nach Dobutaminapplikation. Der LVEDP TAC-operierter WT Tiere war in Ruhe gegenüber den scheinoperierten WT Tieren hochsignifikant erhöht ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede im LVEDP TAC-operierter FHL2^{-/-} Tiere gegenüber den scheinoperierten Tieren. Bei den TAC-operierten Tieren lag der LVEDP in Ruhe beim WT signifikant höher als bei FHL2^{-/-} Tieren.

3.1.3 Herz- und Lungengewicht

Scheinoperierte FHL2-defiziente und WT zeigten das relative Herzgewicht betreffend keinerlei Unterschiede ($100,3 \pm 7,355$ vs. $85,91 \pm 2,22$). Es imponierte das hochsignifikant erhöhte Herzgewicht der WT nach TAC gegenüber den scheinoperierten Tieren ($134,5 \pm 21,36$). Bei den FHL2^{-/-} Tieren hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Herzgewichten scheinoperierter Tiere gegenüber den TAC-operierten Tieren ($123,6 \pm 25,85$).

Da das Körpergewicht Schwankungen unterworfen ist, hat sich die Normierung des Herzgewichtes auf die Tibiallänge, welche nach ihrer Ausreifung eine intraindividuelle Konstante darstellt, zur Quantifizierung einer Herzhypertrophie bewährt (Yin et al., 1982). WT zeigten nach TAC eine Steigerung im Quotienten aus Herzgewicht und Tibiallänge (HW/TL) von $183 \% \pm 9 \%$ ($p < 0,001$), während der Quotient in der Gruppe der FHL2^{-/-} Tiere nur $133 \% \pm 7 \%$ ($p < 0,01$) betrug (Tab.1). In ähnlicher Weise verhielt es sich mit dem Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht (HW/BW, Abb. 13 A) (scheinoperiert vs. TAC: WT $p < 0,001$; FHL2^{-/-} nicht signifikant; Abb. 13 A und Tab.10). Die kardiale Hypertrophie (HW/BW) in den FHL2^{-/-} Tieren war im Vergleich zum WT um $16,42 \% \pm 4,30 \%$ signifikant niedriger.

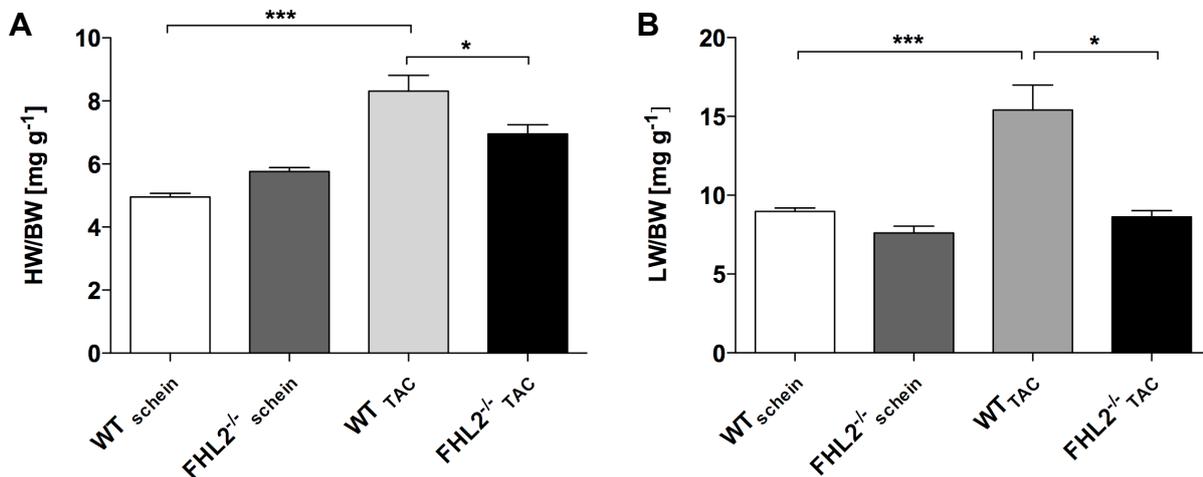


Abb.13: A Relatives Herzgewicht (HW/BW = Herzgewicht/Körpergewicht) und B relatives Lungengewicht (LW/BW = Lungengewicht/Körpergewicht) von WT- und FHL2^{-/-} Tieren und den scheinoperierten Tieren der jeweiligen Genotypen. Die kardiale Hypertrophie ist 14 Tage nach TAC-Operation bei den WT Tieren signifikant stärker ausgeprägt als bei den scheinoperierten Tieren. Ferner ist sie bei FHL2^{-/-} TAC Tieren signifikant geringer ausgeprägt als bei den ebenso behandelten WT Tieren. B Relatives Lungengewicht bezogen auf das Körpergewicht (LW/BW = Lungengewicht/Körpergewicht) von WT und FHL2^{-/-} Tieren und den scheinoperierten Tieren der jeweiligen Genotypen. Hier sind die Veränderungen 14 Tage nach TAC analog zu denjenigen des Herzgewichtes.

	HW/BW [mg g ⁻¹]	HW/TL [mg mm ⁻¹]	LW/BW [mg g ⁻¹]
WT _{schein}	4,95±0,12	5,42±0,14	8,98±0,22
WT _{TAC}	8,32±0,49	9,63±0,60	15,41±1,58
FHL2 ^{-/-} _{schein}	5,76±0,12	6,10±0,27	7,60±0,44
FHL2 ^{-/-} _{TAC}	6,95±0,30	8,10±0,38	8,63±0,39

Tab. 10: HW/BW = Herzgewicht/Körpergewicht, HW/TL = Herzgewicht/Tibiallänge, LW/BW = Lungengewicht/Körpergewicht. Die drei Quotienten Herzgewicht/Körpergewicht, Herzgewicht/Tibiallänge und Lungengewicht/Körpergewicht für die vier untersuchten Gruppen.

Durch die Aortenstenose kommt es im linken Ventrikel zu erhöhten Druckniveaus und somit einem erhöhten Preload. Dieser erhöhte Druck überträgt sich retrograd auf den Lungenkreislauf und führt hier zu einem Lungenödem.

14 Tage nach TAC Operation kam es bei den FHL2^{-/-} Tieren zu einem nicht signifikanten Anstieg des Lungengewichtes gegenüber den scheinoperierten Tieren (von 130 mg ± 9,33 auf 153 mg ± 9,08). Bei den WT Tieren hingegen kam es zu einer hochsignifikanten Steigerung des Lungengewichtes (von 157,8 mg ± 2,63 auf 283,8 mg ± 40,72). Es resultierte ein höherer Quotient aus Lungengewicht und Körpergewicht bei WT Tieren (171,6 % ± 14,5 %) gegenüber FHL2^{-/-} Tieren (113,6 % ± 6,3 %) (Tab.10).

Wie in Abb. 13 B dargestellt ist in der Gruppe der FHL2^{-/-}_{TAC}-Tiere das signifikant geringer ausgeprägte relative Lungengewicht gegenüber WT_{TAC}-Tieren bemerkenswert (p<0,001). Möglicherweise führte das größere Lungenödem in den WT Tieren zu der hohen Sterblichkeit dieser Tiere innerhalb der ersten 10 Tage nach TAC.

3.1.4 Expressionsanalyse renaler Renin-mRNA

Während scheinoperierte FHL2^{-/-} Tiere hinsichtlich der Hämodynamik keine Unterschiede gegenüber den scheinoperierten WT Tieren zeigten, wurde nach TAC anhand eines poststenotisch höheren diastolischen Blutdruckes der FHL2^{-/-} Tiere gegenüber den WT Tieren die Hypothese einer reaktiv differentiellen Blutdruckregulation durch das

RAS in diesen Tieren aufgestellt. Eine denkbare Erklärung dieses Unterschiedes im poststenotischen diastolischen Blutdruck war einerseits eine erhöhte Bildung von ANGII mit direkter vasokonstriktorischer Wirkung auf die Gefäßwand oder im Gegenteil eine geringere Aktivierung des RAS infolge einer mutmaßlich konstitutiv erhöhten Sensitivität der Gefäßwand gegenüber vasokonstriktorischen Stimuli.

Mittels qRT-PCR wurden Nieren von schein- und TAC-operierten WT- und FHL2^{-/-} Tieren, welche 14 Tage zuvor einer TAC-Operation unterzogen worden waren, auf ihren Gehalt an Renin-mRNA hin untersucht. Während die TAC die renale Renin-mRNA in den FHL2^{-/-} Tieren nicht sichtbar beeinflusste, stieg die mRNA in den WT Tieren nach TAC deutlich an, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (Abb. 14). Die fehlende Signifikanz ist sehr wahrscheinlich auf die geringe Anzahl der untersuchten TAC-Tiere zurückzuführen.

Aufgrund dieser Ergebnisse war eine erhöhte ANGII-Produktion als Ursache des erhöhten poststenotischen Blutdrucks bei TAC-operierten FHL2^{-/-} Tieren unwahrscheinlich.

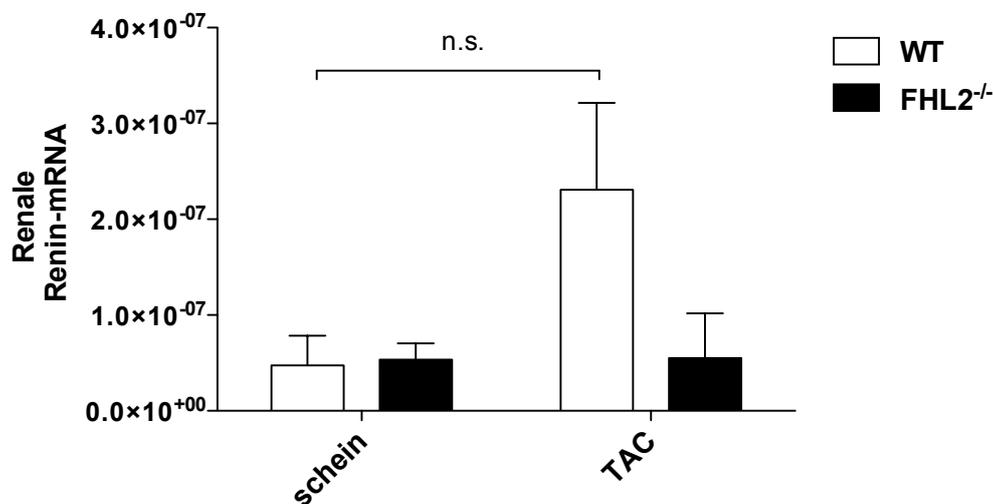


Abb. 14: Renale Renin-mRNA-Expression schein- und TAC-operierter WT (n = 6 bzw. n = 4) und FHL2^{-/-} Tiere (n = 6 bzw. n = 3). In TAC-operierten WT Tieren ist die renale Renin mRNA gegenüber den scheinoperierten Tieren desselben Genotyps erhöht. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Bei den TAC-operierten FHL2^{-/-} Tieren lässt sich 14 Tage nach der Operation kein Anstieg der renalen Renin-Genexpression messen.

3.1.5 FHL2-Expression fixierter Kardiomyozyten in der indirekten Immunfluoreszenz

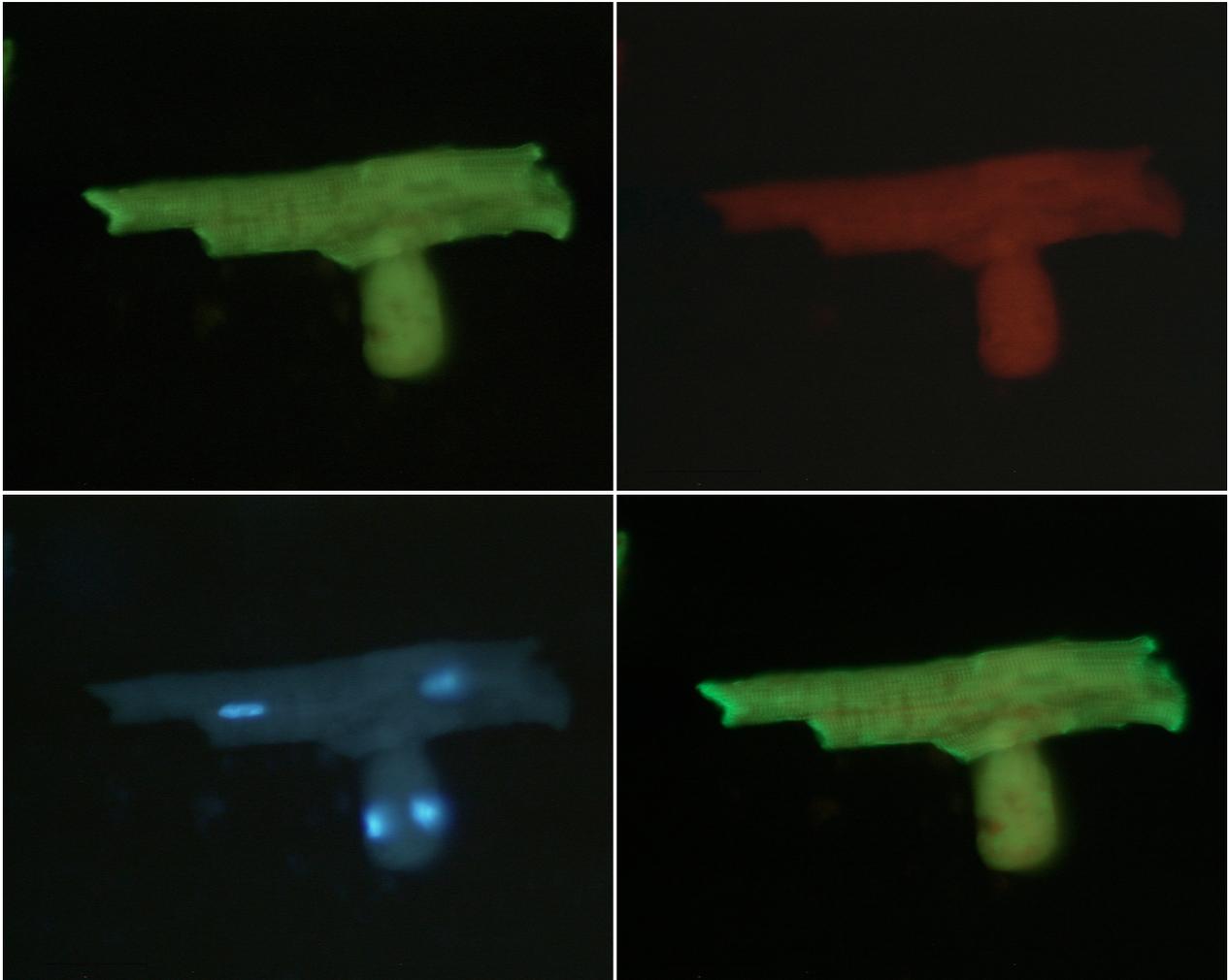


Abb. 15: FHL2 Immunfluoreszenz eines isolierten Kardiomyozyten eines WT-Tiers 14 Tage nach TAC Operation (x 200). A) Phalloidinfärbung B) FHL2-Färbung C) DAPI-Färbung D) A+B. FHL2 findet sich im Zytoplasma des Kardiomyozyten, der Kern zeigt keine erkennbare FHL2-Expression.

Ziel war es, die intrazelluläre FHL2-Lokalisation in Kardiomyozyten in Reaktion auf mechanischen Stress im Rahmen der TAC-Operation mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmethode sichtbar zu machen (Abb. 15).

14 Tage nach TAC zeigt sich eine breite FHL2-Expression im Zytoplasma des Kardiomyozyten, während der Kern keine FHL2-Expression zeigt.

3.2 Kontraktilitätsuntersuchungen an Aortenringen

Um mögliche Kontraktilitätsunterschiede im Bereich der großen Gefäße zwischen WT Tieren und FHL2^{-/-} Tieren zu untersuchen, wurden 2 mm lange Aortenringe aus dem Bereich der Aorta thoracalis entnommen und in den Mulvany-Myographen eingespannt. Hier wurden nach einer Phase der Vorspannung zunächst Vorkontraktionen aufgezeichnet. Diese wurden durch alternierende Gaben von hochprozentiger Kaliumlösung und Phenylephrin hervorgerufen. Daraufhin folgte die Gabe von Phenylephrin in aufsteigender Konzentration bis zu einer Konzentration von 10⁻⁵ M. Dann folgte die Gabe des Antagonisten an der Gefäßwand, Acetylcholin (ACh), bis zu einer Konzentration von 10⁻⁵ M, um die Relaxation zu induzieren (Abb. 15).

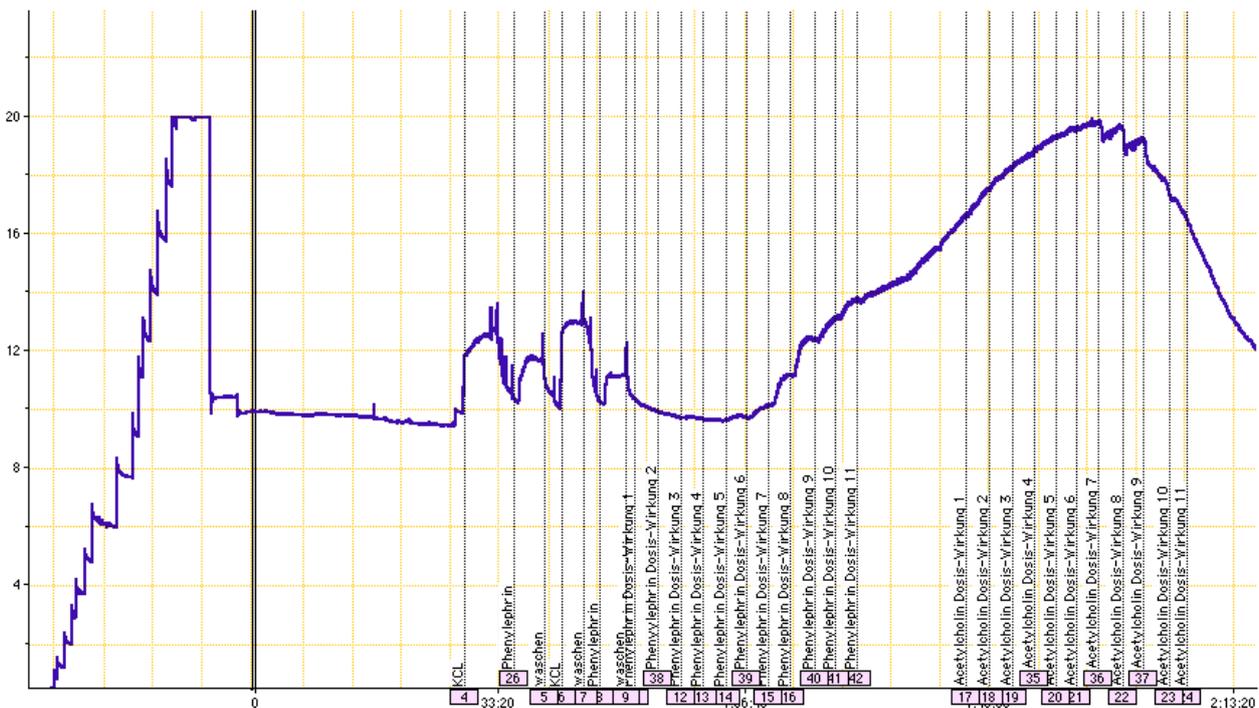


Abb. 16: Originalregistrierung der Kraft eines Aortenrings in Millinewton (mN) als Funktion der Zeit. Beispiel eines Aortenrings eines FHL2^{-/-} Tieres. Verwendet wurden Phenylephrin (PE) als Vasokonstriktor und Acetylcholin (ACh) als Relaxans. Dabei zeigte PE einen protrahierten Effekt auf die Gefäßwand und war bei einer Dosis von 10⁻⁷ ACh antagonisiert. Die Dauer der Messung betrug insgesamt 2 Stunden.

3.2.1 Untersuchung der Kontraktion der Aortenringe

3.2.1.1 Rezeptorunabhängig (Kalium)

Vorgedehnte Aortenringe von WT- und FHL2^{-/-} Tieren wurden einer hohen Kaliumkonzentration (125 mmol/L) ausgesetzt. Es kam zu einer signifikant stärkeren Kontraktion der Aortenringe FHL2^{-/-} Tiere gegenüber denjenigen aus WT Tieren (Abb. 17).

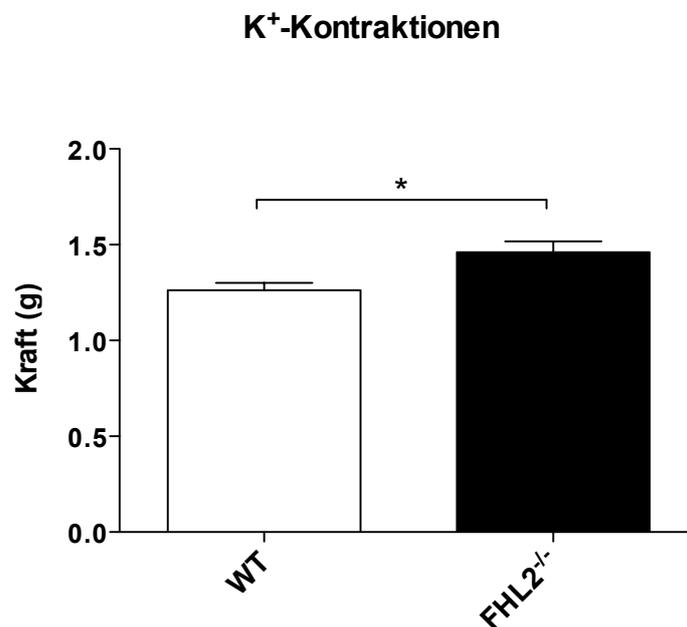


Abb. 17: Untersuchung der rezeptorunabhängigen Kontraktion der Aortenringe in hochkonzentrierter Kaliumlösung (125 mmol/L). Auf der Ordinate ist die ausgeübte Kraft in Millinewton (mN) angegeben. Verwendet wurden Aortenringe aus 9 WT und 11 FHL2^{-/-} Tieren ($p < 0,05$).

3.2.1.2 Rezeptorabhängig (PE)

Die Tatsache, dass FHL2^{-/-} Tiere trotz konstantem Druckgradienten über der erzeugten Stenose einen erhöhten poststenotischen Blutdruck aufwiesen, erlaubte die Hypothese, dass eine Hypersensitivität der Gefäßwand auf vasokonstriktorische Stimuli ein phänotypisches Merkmal FHL2^{-/-} Tiere ist. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden isolierte Aortenringe der thorakalen Aorta von WT Tieren (n=10) und FHL2^{-/-} Tieren (n=10) Kon-

traktilitätsuntersuchungen am Mulvany-Myographen unterzogen. Diese Methode dient der Untersuchung des funktionellen Verhaltens isolierter Blutgefäße nach Gabe von vasoaktiven Substanzen unter isometrischen Bedingungen und erlaubt so Rückschlüsse auf den total peripheren Widerstand *in vivo*.

Die Applikation von Phenylephrin (PE) in Konzentrationsbereichen zwischen 10^{-10} und 10^{-5} M führt zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der isometrischen Kraft. Bei halblogarithmischer Auftragung kann diese durch eine ansteigende sigmoide Kurve angepasst werden. Aortenringe aus FHL2^{-/-} Tieren zeigten ab einer PE-Konzentration von 10^{-7} eine signifikant erhöhte Kontraktionskraft (Abb. 18). Auch die angepasste sigmoide Funktion hat unter diesen Bedingungen signifikant andere Parameter (max: $1,45 \pm 0,06$ * g für WT vs. $1,75 \pm 0,08$ * g für FHL2^{-/-}, $p < 0,05$). Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von PE war für die FHL2^{-/-} Tiere etwas zu den kleineren Konzentrationen hin verschoben ($\log EC_{50} = -6,95 \pm 0,2$ für WT vs. $\log EC_{50} = -7,38 \pm 0,2$).

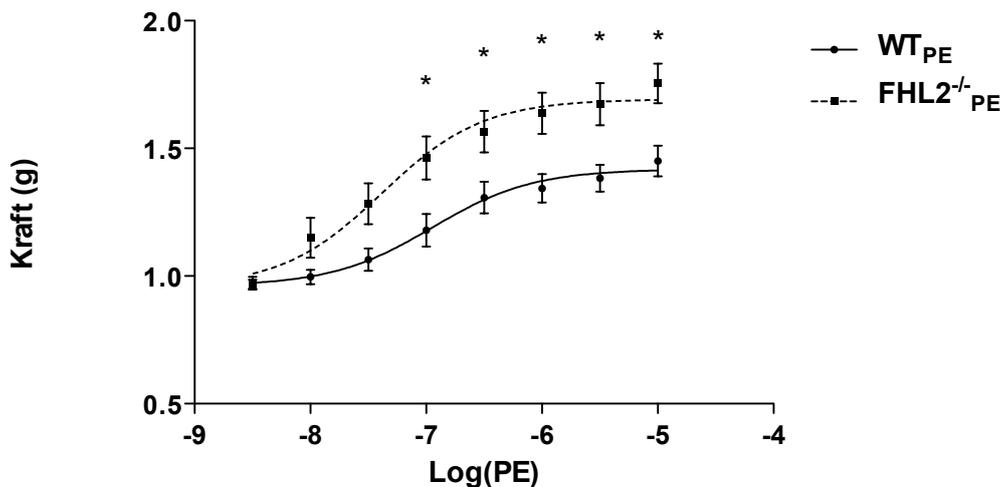


Abb. 18: Darstellung der kontraktiven Kraft isolierter Aortenringe als Funktion der logarithmisch aufgetragenen Phenylephrinkonzentration (PE). Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve des Vasokonstriktors PE ($10^{-8,5}$ M bis 10^{-5} M). Die Kraftentwicklung ist als Konstante der Erdbeschleunigung g dargestellt. Die Darstellung entspricht dem Mittel von jeweils 10 WT bzw. FHL2^{-/-} Tieren \pm dem Standardfehler ($p < 0,05$).

3.2.2 Relaxation isolierter Aortenringe (ACh)

Gleichermaßen wurde anschließend an die PE-Kontraktion die dosisabhängige Acetylcholin (ACh) vermittelte Vasorelaxation untersucht.

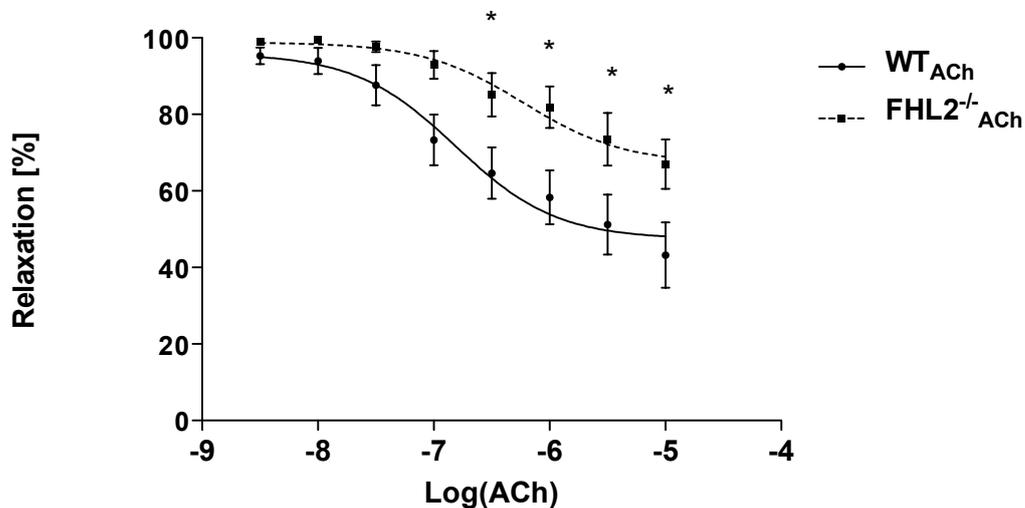


Abb. 19: Prozentuale Relaxation isolierter Aortenringe als Funktion der logarithmisch aufgetragenen AcetylcholinKonzentration (ACh, $10^{-8,5}$ M bis 10^{-5} M). Die Darstellung entspricht dem Mittel von jeweils 10 WT bzw. FHL2^{-/-} Tieren \pm dem Standardfehler ($p < 0,05$).

Es wurden in Anwesenheit von 10^{-5} M PE AcetylcholinKonzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-5} M eingesetzt. Dabei kommt es zu einem konzentrationsabhängigen Abfall der isometrischen Kraft. Bei halblogarithmischer Auftragung kann diese durch eine absteigende sigmoide Kurve angepasst werden (Abb. 19). Aortenringe FHL2^{-/-} Tiere zeigten ab einer ACh-Konzentration von 10^{-7} eine signifikant verminderte Relaxationsfähigkeit (Abb. 19). Dies führte auch zu einer Einschränkung der maximalen Relaxation gegenüber den WT Tieren (84 % für WT vs. 37 % für FHL2^{-/-}). Zusätzlich war die halbmaximale Relaxation zu höheren Konzentrationen verschoben ($\log EC_{50} = -6,84 \pm 0,27$ für WT vs. $\log EC_{50} = -6,2 \pm 0,29$ für FHL2^{-/-}).

4. Diskussion

Diese Arbeit untersucht den Einfluss einer FHL2- Defizienz auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie mit potentielltem Übergang zur Herzinsuffizienz sowie den Einflusses auf den Gefäßtonus.

4.1 Wahl des Tiermodells

Bei der Wahl eines geeigneten Tiermodells zur Darstellung pathophysiologischer Prozesse bemisst sich sein wissenschaftlicher Wert vornehmlich anhand der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie anhand seiner Übertragbarkeit auf den Menschen. Dabei sei herausgestellt, dass kein Tiermodell pathophysiologische Prozesse im Menschen umfassend und in all ihrer Komplexität abzubilden vermag, da diese sich in ihrer Genese zumeist multifaktoriell darstellen. Tiermodelle sind daher immer als Näherung an die tatsächliche Pathophysiologie zu betrachten.

In Tiermodellen zur Darstellung chronischer Herzleiden ergeben sich Limitationen in der Übertragbarkeit auf den Menschen, da die Tiere zumeist jung und die Interventionen plötzlich sind, während sich entsprechende Pathologien im Menschen zumeist schleichend und erst in höherem Alter entwickeln (Muders und Elsner, 2000). Wenn sie auch nur eine vereinfachte Abbildung erlauben, sind standardisierte Tiermodelle für den medizinischen Fortschritt dennoch unabdingbar geworden (Houser et al., 2012), um das Verständnis pathologischer Prozesse zu schärfen und auf dem Boden dieses verbesserten Verständnisses neue Behandlungsstrategien zu erproben.

Bei der Untersuchung der molekularen Mechanismen der Herzhypertrophie, Herzfibrose und Herzinsuffizienz hat sich das hier verwendete Modell der Aortenstenose der Maus in den letzten 20 Jahren besonders etabliert (Mohammed et al., 2012; Rockman et al., 1991). Hinzugekommen ist dann die Untersuchung der Rolle von verschiedenen Genen bei der natürlichen Entwicklung der Herzhypertrophie, Herzfibrose und Herzinsuffizienz mit Hilfe von transgenen (D'Angelo et al., 1997) bzw. gendefizienten Mäusestämmen (Mishra et al., 2010). Die gleichen Technologien (Bernardo et al., 2012; Ling et al., 2009;

Park et al., 2012) sind auch verwendet worden, um die Rolle von bestimmten Genen bei der Induktion einer Herzhypertrophie bzw. Herzinsuffizienz zu untersuchen.

Es ist mittlerweile erwiesen, dass die Folgen der TAC am linken Herzen von mehreren tierspezifischen (Garcia-Menendez et al., 2013) und technischen Charakteristika abhängen. Die Vergleichbarkeit von veröffentlichten Befunden hängt ganz wesentlich vom Vorliegen solcher Angaben ab (Mohammed et al., 2012). Variationen im Versuchsdesign, beispielsweise die Höhe der erzeugten Stenose oder die Wahl der postoperativen Untersuchungszeitpunkte und -methoden betreffend, erschweren dabei zusätzlich einen Vergleich der Ergebnisse.

4.2 Einfluss der FHL2-Defizienz auf die Entwicklung der Herzhypertrophie

4.2.1 Vorarbeiten

Einzelne Aspekte des Einflusses einer FHL2-Defizienz auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie sind in der letzten Dekade bereits aufgezeigt worden. Kong et al. (2001) beschrieben eine überschießend hypertrophe Antwort des Myokards FHL2^{-/-} Mäuse auf eine chronische β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol. Demgegenüber fanden Chu et al. (2000) bei orientierenden Untersuchungen 7 Tage nach einer TAC-Operation keinen relevanten Unterschied zwischen FHL2^{-/-} Tieren (6 Tiere) und WT Tieren (9 Tiere) in der myokardialen Antwort auf mechanischen Stress; auch kam es zu keiner kompensatorischen Erhöhung von FHL1 oder FHL3 (Chu et al., 2000). Angaben über Mortalität bzw. Mortalitätsunterschiede zwischen Wildtyp- und FHL2^{-/-} Tieren wurden nicht gemacht.

Die vorliegende Arbeit stellt die erste umfassende Charakterisierung des kardiovaskulären Phänotyps FHL2^{-/-} Tiere dar. Aufgrund der augenscheinlichen Diskrepanzen der bereits bestehenden Daten, galt es in der vorliegenden Arbeit, hämodynamische Verhältnisse FHL2^{-/-} Tiere in einem prohypertrophen Kontext über einen Zeitraum von 14 Tagen zu beobachten und den Einfluss der Hypertrophie und des Vasotonus auf kardiovaskuläre Remodelingprozesse zu bewerten. Sie ist unseres Wissens daher die erste Arbeit, die funktionelle Aspekte des kardiovaskulären Phänotyps FHL2^{-/-} Tiere umfassend zur Darstellung bringt.

4.2.2 Wahl des postoperativen Zeitraums

Bezüglich des für die Entwicklung einer definitiven Herzhypertrophie erforderlichen Zeitraumes nach TAC ist die Datenlage nicht ganz eindeutig. Einige Autoren befanden anhand der Entwicklung der Zunahme des Herzgewichtes nach TAC einen Zeitraum von 7-10 Tagen als hinreichend (Nakamura et al., 2001; Velten et al., 2012). Andere konnten nach ebendieser Zeitspanne keine nennenswerten Unterschiede zwischen den zu untersuchenden Gruppen feststellen (Chu et al., 2000).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein postoperativer Zeitraum von 14 Tagen gewählt. Dies erscheint rückblickend vor allem im Hinblick auf die in unserem Versuchsdesign aufgetretene Mortalität angemessen, welche in der Gruppe der Wildtypiere bis zum 10. postoperativen Tag zu beobachten war. Vom 10. Bis 14. postoperativen Tag, an dem die invasive Blutdruckmessung stattfand, waren die Tiere stabil. Somit trug der gewählte Zeitraum zur Homogenisierung der zu untersuchenden Gruppe bei.

4.2.3 Mortalität

Der Erwartungshorizont lag unter Berücksichtigung der obig zusammengefassten, bestehenden Literatur in einem Überlebensnachteil FHL2^{-/-} Tiere infolge starker kardialer Hypertrophie und Fibrose durch TAC.

Ganz im Gegenteil konnte am *in vivo* Mausmodell der TAC gezeigt werden, dass FHL2^{-/-} Tiere einer signifikant geringeren postoperativen Mortalität unterliegen als WT Tiere. In der Tat starben 46 % der Wildtypiere innerhalb der ersten 10 Tage nach der Operation, während nur 13 % der FHL2^{-/-} Tiere im selben Zeitraum verstarben. Dies stellt die erstmalige Beschreibung einer bemerkenswert niedrigen Mortalität FHL2^{-/-} Tiere infolge TAC dar.

Für die hohe Mortalität der Wildtypiere ist sicherlich die im Vergleich zur vorbestehenden Literatur recht hoch gewählte Ausprägung der Stenose mitverantwortlich. Sieben Tage nach TAC-Operation betrug die Mortalität 40 %, während Rockman et al. (1991) nur 10 % Verlust der C57BL/6-Tiere verzeichneten. Rockman et al. wählten einen Stenosegrad, welcher einen Druckgradienten von 35 bis 45 mmHg über der Steno-

se produzierte; im vorliegenden Versuchsaufbau war der Druckgradient mehr als doppelt so hoch gewählt, er betrug zwischen 95 und 100 mmHg. Im Vordergrund stand hier die Gegenüberstellung zweier Genotypen in Bezug auf ihren kardiovaskulären Phänotyp; je stärker demnach der Stenosegrad, desto deutlicher treten sowohl interindividuelle, wie auch durch den Genotyp bedingte Unterschiede hervor.

Eine Möglichkeit der Vermeidung einer solch hohen Mortalität in der Gruppe der Wildtypiere unter Beibehaltung des gewählten hohen Stenosegrades zeigt eine kürzlich erschienene Arbeit von Garcia-Menendez (2013) auf. Hier wurde die Auswirkung der kardialen Belastung bei drei Subtypen des Mäusestammes C57BL/6 am Modell der TAC zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Operation untersucht. Echokardiographisch wurden folgende Parameter bestimmt: Linksventrikuläre posteriore Wanddicke als Maß für die entwickelte Hypertrophie, die relative Durchmesserverkürzung (fractional shortening, FS) und der linksventrikuläre interne enddiastolische Durchmesser als Maß für die linksventrikuläre Funktion. Bereits vor der Operation wurde ein kleiner, aber signifikanter Unterschied in der fraktionierten Verkürzung des linken Ventrikels zwischen dem Subtyp CI (39 %) und dem Subtyp JL (45 %) festgestellt. Der enddiastolische Durchmesser des linken Ventrikels war bei den Subtypen CL und TF signifikant höher (3,3 mm) als der bei dem JL Subtyp (3,0 mm). 14 Tage nach der Operation war die fraktionierte Verkürzung bei den CL und TF-Mäusen (auf 23 %) dramatisch reduziert, während bei dem JL-Subtyp nur eine minimale Reduktion (auf 39 %) festgestellt wurde. Parallel und passend zu dieser Veränderung war die Zunahme des enddiastolischen Durchmessers des linken Ventrikels: Dieser wurde bei den Subtypen CI und TF signifikant größer, während er bei dem Subtyp JL konstant blieb. Auch die Zunahme der Wanddicke des linken Ventrikels war bei dem Subtyp JL signifikant größer als bei den Subtypen CL und TF. Interessanterweise ließen also die präoperativen Messungen Rückschlüsse auf den postoperativen Trend bezüglich der kardialen Funktion zu, welches sich auch in einem signifikant besseren Überleben des JL-Subtyps gegenüber den anderen beiden Subtypen widerspiegelte. Somit könnten mit einer derartigen präoperativen echokardiographischen Untersuchung Tiere mit einer a priori schlechteren kardialen Funktion jenseits eines definierten cut-offs von der Untersuchung ausgeschlossen werden, um die postoperative Mortalität künftig zu verringern.

In dieser Arbeit wird die Bedeutung des genetischen Backgrounds der Versuchstiere besonders anhand der frappierenden Unterschiede bezüglich der postoperativen Mortalitätsrate beider Genotypen eindrücklich gezeigt. Die Tatsache, dass die postoperative Mortalität nach dem 10. Postoperativen Tag sistiert, legt ferner nahe, dass keine wesentlichen strukturellen Veränderungen am Herzmuskel jenseits von einer postoperativen Phase von 14 Tagen zu erwarten sind.

4.3 Kritische Herzhypertrophie und Übergang zur -Insuffizienz

Wie bereits oben angesprochen, tragen bei dem Modell der TAC unterschiedliche tier-spezifische und technische Aspekte zu einer unterschiedlichen Toleranz der Tiere gegenüber der erhöhten Druckbelastung des linken Herzventrikels bei. Dabei können zwei Endpunkte unterschieden werden: Die kompensierte Hypertrophie mit erhaltener Kontraktilität und die Hypertrophie mit Übergang zur Dilatation und Insuffizienz. Die Mechanismen, die dieser Transition von initial kompensierter Herzhypertrophie zu zunehmender Dekompensation zugrunde liegen, sind jedoch noch weitgehend ungeklärt. Dies macht die Entwicklung adäquater Versuchsabläufe und ihre konstante Optimierung so essentiell wichtig.

Während sich die Hypertrophie anhand des absoluten Herzgewichtes und verschiedener funktioneller Parameter gut beschreiben lässt, ist der Zustand der Herzinsuffizienz weniger klar fassbar; er setzt sich in der Regel aus dem Zusammenspiel von klinischem Aspekt und funktioneller Beurteilung der Herzleistung zusammen. Zur Beschreibung der Hypertrophie dient einerseits die heart weight to body weight bzw. to tibia length ratio (HW/BW bzw HW/tibia length), welche jedoch keine Unterscheidung zwischen Größenzunahme durch myozytäre Hypertrophie allein oder durch zusätzliche Zunahme der Fibrose zulässt. Daher dient die Größe der Kardiomyozyten in μm^2 als genaueres, zusätzliches Kriterium zur Beschreibung der Hypertrophie (Velten et al., 2012). Zur Beurteilung eines Übergangs zur Herzinsuffizienz spielen zunächst funktionelle Parameter eine entscheidende Rolle. Velten et al. (2012) beschrieben anhand echokardiographischer und invasiver Messungen die Entwicklung einer Herzinsuffizienz 28 Tage nach TAC Operation.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine kardiale Dekompensation 14 Tage nach TAC-Operation durch einen Stresstest induziert werden. In der Tat konnte bereits in Ruhe eine stark kompromittierte diastolische Funktion bei den WT Tieren 14 Tage nach TAC gemessen werden. Eine tatsächliche kardiale Dekompensation entwickelte sich jedoch erst durch einen akuten Stressor, in diesem Fall durch Dobutaminstimulus. Hierbei kam es zu einer unwesentlichen Steigerung der systolischen Pumpfunktion bei den WT Tieren, vereinbar mit einer akuten Herzinsuffizienz. Dieses Ergebnis steht in starkem Kontrast zu der guten Toleranz FHL2^{-/-} Tiere, welche diesem akuten Stress mit einer adäquaten Steigerung der Kontraktilität begegnen konnten.

Ein weiteres Kriterium der Herzinsuffizienz ist das Lungengewicht, welches infolge einer verminderten Pumpfunktion des Herzmuskels zunimmt. Interessanterweise kam es - passend zu den Ergebnissen des Dobutamintests - in den vorliegenden Versuchen trotz des signifikant erhöhten systolischen Druckes in der Kammer zu einem geringer ausgeprägten Herz- und Lungengewicht in der Gruppe der FHL2^{-/-} Tiere gegenüber den WT Tieren.

Möglicherweise ist neben der geringeren Ausprägung der Hypertrophie auch eine geringere Fibroseentwicklung für die bessere Belastbarkeit FHL2^{-/-} Tiere bei akutem Stress und bei einem Zustand nach TAC-Operation verantwortlich. Durch weniger Apoptose leistungsfähiger Kardiomyozyten und deren konsekutiven Ersatz durch fibrosiertes Gewebe stehen mehr kontraktile Einheiten zur Verfügung, welche eine bessere systolische Ventrikelfunktion erlauben. Daher wäre für zukünftige Experimente von zentralem Interesse, die Fibrose in Herzgeweben beider Genotypen zu quantifizieren.

Es bestehen bereits Strategien, welche an diesem Punkt ansetzen, um die Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz zu vermeiden: Takefuji et al. (2013) zeigten, dass unter Ausschaltung des Rho-Signalwegs mittels RhoGEF12^{-/-} Tiere 4 Wochen nach TAC Operation ein bessere Ejektionsfraktion bei geringerer Hypertrophie und Fibrose gegenüber den Kontrolltieren gegeben war. Interessanterweise konnte auch eine bereits eingetretene Verdickung der Ventrikelwand einhergehend mit einer Verschlechterung der Ejektionsfraktion durch Tamoxifen induzierte RhoGEF12 Defizienz 14 Tage nach TAC aufgehoben werden, während Kontrolltiere einen Progress in Richtung Herzinsuffizienz zeigten.

Auch Kong et al. (2001) untersuchten den Einfluss eines chronisch hypertrophen Stimulus auf das Herz FHL2^{-/-} Tiere. Sie beschrieben eine aggravierte kardiale Hypertrophie zehn Tage nach subkutaner Implantation osmotischer Pumpen zur siebentägigen Applikation von Isoproterenol. Nach Gewinnung des Herzgewebes wurde der hypertrophe Effekt anhand der Histologie, sowie anhand der mRNA-Expression des Hypertrophie-markers ANF offenbar. Dabei wurde auf eine hämodynamische Evaluation FHL2^{-/-} Tiere gänzlich verzichtet, sodass eine Beurteilung der systolischen und diastolischen Funktion nicht möglich war. Die Diskrepanz zu den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit ist aufgrund unwesentlich unterschiedlicher Tierzahlen (n=12 gegenüber n=10) und Alter der verwendeten Tiere (6-7 Monate gegenüber 2-3 Monate) am ehesten auf die Verwendung unterschiedlicher Tiermodelle zurück zu führen.

Dabei kommt das Modell der transversen Aortenstenose den tatsächlichen pathophysiologischen Gegebenheiten wesentlich näher. Im von Kong et al. gewählten metabolischen Modell hingegen folgt die Erhöhung des total peripheren Widerstands aus der in unphysiologischer Konzentration applizierten β -adrenergen Stimulation. Darüber hinaus greift das exogen verabreichte Hormon in die physiologische Hormon-Homöostase ein, indem es mit präexistenten Feedbackmechanismen interferiert; auch kommt es zu einer Herunterregulation der Dichte von β -Adrenozeptoren am Herzen und somit zu verminderter ventrikulärer Kontraktilität (Kudej et al., 1997).

Kong et al. (2001) spekulierten in Ermangelung eigener Untersuchungen zur biochemischen Funktion von FHL2 auf einen modulierenden Effekt von FHL2 auf die Genexpression. Sie vermuteten, dass aufgrund der stark ausgeprägten Hypertrophie in Abwesenheit von FHL2, dieses Protein physiologischerweise eine hemmende Funktion in Hypertrophie vermittelnden Signalwegen innehaben müsse. Dies erscheint zumindest in dem hier verwandten Modell der TAC unwahrscheinlich, da in fluoreszenzmikroskopisch untersuchten Herzen von Wilttyptieren vierzehn Tage nach TAC-Intervention FHL2 nukleär kaum anfärbbar war.

Auch Chu et al. (2000) führten eine TAC-Operation durch und bewerteten die kardiale Hypertrophie nach sieben Tagen. Echokardiographisch wurden die Parameter linksventrikuläre posteriore bzw. interventrikuläre Wanddicke als Maß für die Hypertrophie und LVEDP, LVESP und die relative Durchmesserverkürzung (fractional shortening, FS)

als Maß für die linksventrikuläre Funktion erhoben; im Ergebnis konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen festgestellt werden.

Allerdings müssen diese Ergebnisse im Lichte unzureichender Konstanthaltung der Untersuchungsbedingungen betrachtet werden; die Standardabweichungen der Druckgradienten über der Stenose betragen in der Gruppe der WT Tiere nahezu die Hälfte des insgesamt erzeugten Druckes, in der Gruppe der FHL2^{-/-} Tiere sogar mehr als die Hälfte. In der vorliegenden Arbeit konnten ein konstanter Druckgradient über der Stenose mit geringer Standardabweichung, sowie eine signifikant geringer ausgeprägte kardi-ale Hypertrophie der FHL2^{-/-} Tiere festgestellt werden.

Auch die Wahl der Methode betreffend lässt sich festhalten, dass invasive Verfahren eine genauere Untersuchung der Hämodynamik ermöglichen und daher einer allein echokardiographischen Messung vorzuziehen sind. Insgesamt mögen die Unterschiede zwischen den von Chu et al. erhaltenen und den vorliegenden Ergebnissen auch einer verlängerten postoperativen Periode geschuldet sein.

4.4 FHL2-Defizienz und kardiale Fibrose

Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen zur Feststellung des Bindegewebsgehaltes in den Herzen der TAC operierten Tiere durchgeführt wurden, muss aus den funktionellen in Ruhe und unter Stressbedingungen erhobenen Daten geschlossen werden, dass es bei den FHL2 Tieren zu keiner nennenswerten Zunahme des Bindegewebsgehaltes gekommen ist.

Im Herzmuskel ist ein Mindestmaß an Bindegewebe zur Vernetzung der einzelnen Kardiomyozyten unabdingbar. Einerseits werden so die vielen Einzelkontraktionen zu einer systolischen Kontraktion zusammengefasst. Andererseits hilft die Bindegewebsstruktur, in der Diastole die Dehnung des Gewebes zu begrenzen. Ist das Herz jedoch einer übermäßigen Druckbelastung ausgesetzt, so nimmt zunächst das Volumen der Kardiomyozyten zu. Dies prädisponiert allerdings zu zunehmender Apoptose bzw. Nekrose, Rekrutierung von Entzündungszellen und Aktivierung von Myofibroblasten. Als Resultat entsteht die sogenannte reaktive Fibrose. Diese verursacht eine zunehmende diastolische Dysfunktion und vermag auch Herzrhythmusstörungen hervorzurufen, welche einen plötzlichen Herztod zur Folge haben können. Vor diesem Hintergrund ist es daher

verständlich, dass bestimmte antientzündlich wirkende Substanzen sowohl zur Vermeidung der Herzhypertrophie wie auch der Dilatation eingesetzt werden können (Ehrentraut et al., 2011; Velten et al., 2012).

Abgesehen von dem Einfluss von FHL2 auf Hypertrophie vermittelnde Signalwege im Herzen ist auch der Einfluss von FHL2 auf die Entstehung der Fibrose von Interesse. Wixler et al. (2000) untersuchten humane Fibroblasten und fanden eine Präsenz von FHL2 sowohl innerhalb von Zelladhäsionskomplexen, wo es an sogenannte Integrine gebunden nachweisbar ist, wie auch im Zellkern. Auch hier scheint das Protein also als molekularer Adapter zu fungieren, indem es extrazelluläre Signale in den Zellkern weiterleitet. Neuere Daten zeigen, dass der FHL2-Signalweg auch bei der TGF- β -induzierten Myofibroblasten-Transdifferenzierung während der kutanen Wundheilung wichtig ist. Wixler et al. (2007) konnten bei FHL2^{-/-} Mäusen eine verzögerte Wundheilung, sowie reduzierte transkriptionale Aktivierung von α SMA und eine reduzierte Kontraktilität der Myofibroblasten zeigen. Bei der intestinalen Wundheilung konnte gezeigt werden, dass es bei Deletion des LIM-only Proteins FHL2 zu einem gestörten Bindegewebsmetabolismus kommt. Dabei führt eine gestörte Kollagen III Produktion zu Instabilität der intestinalen Narbe (Kirfel et al., 2008). Während diese Daten in der Zusammenschau für eine verminderte Fibroseentwicklung im Rahmen der FHL2-Defizienz sprechen, konnten Huss et al. (2013) eine verstärkte Fibrose in Lebern FHL2^{-/-} Tiere feststellen, welche zuvor einer toxischen Schädigung mit Tetrachlorkohlenstoff unterzogen worden waren (Huss et al., 2013). Die genaue Rolle des multifunktionalen FHL2 in der Fibroseentstehung bleibt demzufolge - besonders im Hinblick auf das Herz - bislang offen.

Interessant scheinen neuere Arbeiten zu sein, die die unterschiedliche Rolle der beiden Rho-associated coiled-coil kinases-Genotypen ROCK1 und ROCK2 bei der Herzhypertrophie bzw. bei der Herzfibrose untersuchen. Insbesondere von großem Interesse könnte die mögliche Interaktion zwischen ROCK2 und FHL2 bei der Entstehung der Herzhypertrophie sein (Okamoto et al., 2013). Die Hemmung des ROCK1-Genes könnte hingegen entscheidend zur Verhinderung der Fibroseentwicklung beitragen (Shi et al., 2010).

Im Rahmen zukünftiger Experimente wäre es daher reizvoll, einen besonderen Fokus auf den Zusammenhang zwischen FHL2 und Fibroseentstehung im druckbelasteten Herzen zu legen.

4.5 Ein reaktiv gesteigerter vaskulärer Widerstand FHL2^{-/-} Tiere schützt vor druckinduzierter Herzhypertrophie und Fibrose

Pathophysiologisch betrachtet erfordert ein Zustand nach TAC eine gesteigerte Druckentwicklung im linken Ventrikel. Nur so kann eine ausreichende Auswurfleistung erzielt werden, um eine adäquate Sauerstoffversorgung peripherer Gewebe zu gewährleisten. Daher kommt es nach TAC obligat zu einer prästenotischen Erhöhung des Blutdrucks. Dennoch konnte in der Gruppe der FHL2^{-/-} Tiere im Vergleich zu den WT Tieren ein signifikant höherer prästenotischer Blutdruck beobachtet werden. Dieser Effekt könnte durch eine stärker ausgeprägte Stenose erzeugt worden sein. Dies konnte durch prä- und poststotische Blutdruckmessung ausgeschlossen werden, welche einen in beiden Genotypen vergleichbaren Druckgradienten von 95 bis 100 mmHg ergab. Auffällig bei den FHL2^{-/-} Tieren war der im Vergleich zu den WT Tieren prästenotisch höhere diastolische Blutdruck. Er ist ein Hinweis auf eine reaktiv verminderte Elastizität der ascendierenden Aorta, wodurch die Windkesselfunktion der Aorta vermindert wird.

Bei der TAC resultiert infolge der Stenose poststenotisch zunächst ein Blutdruckabfall. Hier greift nun die Niere als zentrales Organ der Langzeitblutdruckregulation ein: Die verminderte renale Perfusion ist der adäquate Stimulus für eine gesteigerte Reninfreisetzung aus dem juxtaglomerulären Apparat. Entsprechend sind gesteigerte mRNA-Niveaus von Renin zu finden (Tufro-McReddie et al., 1993). Die anschließend gesteigerte ANGII- und Aldosteronfreisetzung sorgt letztendlich für die Blutdruckanpassung an die suprarenale Stenose durch Steigerung des vaskulären Widerstands und Erhöhung des Intravasalvolumens.

Durch Unterschiede in den poststenotischen Blutdruckniveaus der beiden Genotypen kam es insgesamt zu einer unterschiedlichen Reaktion der Niere. Während die poststenotischen Blutdruckwerte TAC operierter FHL2^{-/-} Tiere mit den scheinoperierten Tieren vergleichbar waren, zeigten WT Tiere einen DAP, der unter dem der scheinoperierten Tiere lag. Ein geringerer poststenotischer Blutdruck der WT Tiere ist gleichbedeutend mit einem erniedrigten arteriellen Mitteldruck in der Niere. Entsprechend war bei diesen Tieren eine Wiederherstellung eines adäquaten MAP durch eine gesteigerte Reninfreisetzung der Niere im Rahmen des Feedback-Mechanismus des RAS zu erwarten. In der Tat zeigten sich höhere Renin-mRNA-Niveaus in den Nieren TAC-operierter WT Tiere

gegenüber FHL2^{-/-} Tieren. Bei den FHL2^{-/-} Tieren hingegen scheint die Blutdruckregulation über die Niere nach TAC durch andere vasokonstriktive Mechanismen ersetzt zu werden. Nur so kann der höhere poststenotische diastolische Blutdruck bei diesen Tieren erklärt werden. Für eine höhere Sensitivität gegenüber humoralen Stimuli zur Regulation der Gefäßweite spricht die Beobachtung, dass in FHL2^{-/-} Tieren der EC₅₀-Wert für PE in Richtung geringerer Konzentrationen verschoben war.

Der niedrigere ANGII-Spiegel kann die geringere Herzhypertrophie bei den TAC-operierten FHL2^{-/-} Tieren erklären. Diese Hypothese wurde in einer anderen Arbeit unserer Arbeitsgruppe bestätigt (Besmens, in Bearbeitung). Infusion von ANGII führte in FHL2^{-/-} Tieren zu einer gegenüber den WT Tieren stärkeren Herzhypertrophie.

Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, wurde das kontraktile Verhalten isolierter Aortenringe am Mulvany-Myograph getestet. In Ergänzung zu den Arbeiten von Neuman et al. (2009) ergab sich bei der Untersuchung isolierter Aortenringe durch kumulative Dosis-Wirkungskurven des endothelabhängigen Vasodilatators Acetylcholin nicht nur eine signifikante, sondern gar eine hochsignifikante Relaxationsstörung der FHL2^{-/-} Aorten; ebenfalls lag eine abnorm gesteigerte Kontraktionsfähigkeit der großen Gefäße vor, welche sich in den Dosis-Wirkungskurve des Vasokonstriktors Phenylephrin zeigte. Eine denkbare Erklärung für die Diskrepanzen zu den Arbeiten von Neuman et al. ist bezüglich der Relaxationsstörung am ehesten eine zu geringe Gruppengröße, welche die Detektion signifikanter Unterschiede nicht erlaubt. Sie untersuchten lediglich drei Tiere je Genotyp, während hier zehn Tiere je Genotyp untersucht wurden.

Es liegt die Vermutung nahe, dass die FHL2-Defizienz möglicherweise eine Steigerung des endothelialen, adrenergen Rezeptorbesatzes bedingt. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da Aortenringe FHL2^{-/-} Tiere bereits auf hohe Kaliumkonzentrationen in ähnlicher Weise reagierten wie auf Phenylephrin, wobei die Kaliumkontraktion rezeptorunabhängig ist. Folglich ist die Ursache dieser Veränderung der reaktiven Gefäßmotorik bei FHL2-Defizienz im Sinne eines kombinierten Vitiums aus reaktiv gesteigerter Kontraktion einerseits und einer Relaxationsstörung andererseits am ehesten in einer veränderten Signaltransduktion der vSMC zu vermuten.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass FHL2^{-/-} Tiere eine veränderte Vasomotorik gegenüber den WT Tieren im Sinne eines reaktiv erhöhten vaskulären Widerstands bei gleichzeitig niedrigerer Expression des Reningens aufweisen. Da diese erhöhte Emp-

findlichkeit der Gefäßwand gegenüber vasoaktiven Stimuli bereits bei Stimulation mit hochkonzentrierter Kaliumlösung besteht, liegt die Ursache für diese veränderte Vasomotorik vermutlich in einer veränderten Signaltransduktion der vSMC. Im Ergebnis schützt die fehlende Aktivierung des RAS den Herzmuskel dieser Tiere vor dem ungünstigen Einfluss von ANGII. Es ist unklar, ob dieser Mechanismus auch die verminderte Mortalitätsrate FHL2^{-/-} Tiere nach TAC-Operation erklären kann.

4.6 Schlussfolgerungen und mögliche Bedeutung für zukünftige Fragenstellungen

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine kardioprotektive Wirkung einer FHL2-Defizienz auf eine druckinduzierte kardiale Hypertrophie gezeigt werden. Diese ließ sich im Gegensatz zu dem starken Blutdruckabfall der WT Tiere hinter der Stenose durch einen poststenotisch physiologischen Blutdruck in der Gruppe der FHL2^{-/-} Tiere erklären. Da unter diesen Bedingungen bei FHL2^{-/-} Tieren mit einer geringeren ANGII-Produktion zu rechnen ist, fällt auch der prohypertrophe Stimulus auf den Herzmuskel geringer aus. In der Konsequenz dieser Ergebnisse erscheint es sinnvoll, den poststenotischen Blutdruckverhältnissen mehr Aufmerksamkeit zu schenken, um die Prozesse, die zu der Entwicklung einer Herzhypertrophie beitragen, in ihrer Gesamtheit besser zu verstehen.

Des Weiteren hat der Vergleich mit den WT Tieren 14 Tage nach TAC-Operation erlaubt, zwei Modelle der positiven (bei FHL2-Defizienz) und der „pathologischen“ (Wildtypiere) Herzhypertrophie zu entwickeln, die für die zukünftige Bearbeitung von Fragestellungen des kardialen „Remodeling“ nützlich sein könnten.

5. Zusammenfassung

Einleitung. Die Reaktion des Herzmuskels auf einen erhöhten Druck im Kreislaufsystem besteht in einer Größenzunahme der Herzmuskelzellen (Hypertrophie). Ab einer kritischen Grenze der Hypertrophie kommt es zu zunehmendem Untergang der Herzmuskelzellen und parallel vermehrter Ablagerung von Bindegewebe. Daraus resultiert eine Verminderung der kardialen Kontraktionskraft, insbesondere unter Stressbedingungen. Unlängst ist dem LIM-only Protein FHL2 eine Rolle bei der Entstehung der Herzhypertrophie sowie bei der Vasomotorik zugeschrieben worden. Die Auswirkungen der Ausschaltung des FHL2-Gens auf den Hypertrophieprozess des Herzmuskels bzw. auf die Regulation des Gefäßtonus sind allerdings bislang nur in Ansätzen untersucht worden.

Material und Methoden: FHL2^{-/-} und C57 BL6/J-Wildtypiere wurden im Alter von 12 Wochen einer TAC- bzw. einer Scheinoperation unterzogen. 14 Tage nach der Operation wurden invasiv sowohl prästenotisch wie auch poststenotisch systolische und diastolische Blutdruckdaten erhoben. Zur Beurteilung der ventrikulären Funktion wurden linksventrikulärer enddiastolischer Druck und ventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit sowohl in Ruhe wie auch unter intraperitonealer Verabreichung von Dobutamin gemessen. Die Tiere wurden dann geopfert, Herz- und Lungengewichte bestimmt. Aus Nierengewebe wurde RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der Reninexpression mithilfe der PCR-Technik verwendet. Mittels indirekter Immunfluoreszenzmethode wurde die intrazelluläre FHL2-Expression einzelner Kardiomyozyten von WT_{TAC} Tieren dargestellt.

Am Mulvany-Myograph wurden isolierte Aortenringe unbehandelter Tiere beider Genotypen bezüglich funktioneller Unterschiede der Gefäßwand in ihrer Reaktion auf vasoaktive Stimuli untersucht.

Ergebnisse. Innerhalb der ersten zehn Tage nach TAC starben 46 % der WT Tiere und 13 % der FHL2^{-/-} Tiere. Dies, obwohl der prästenotische systolische und diastolische Druck tendenziell bei den FHL2^{-/-}_{TAC} Tieren größer war als bei den WT_{TAC} Tieren. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck war bei den WT_{TAC} Tieren hochsignifikant höher als bei den scheinoperierten und auch den FHL2^{-/-}_{TAC} Tieren. Poststenotisch war der

systolische und diastolische Blutdruck bei den FHL2^{-/-} Tieren höher als bei den WT Tieren.

Dobutaminverabreichung führte zu einer signifikanten Steigerung der intraventrikulären Druckerhöhungsgeschwindigkeit der FHL2^{-/-}_{TAC} Tiere gegenüber den scheinoperierten Tieren, während dieser Anstieg bei den WT Tieren nach TAC nicht signifikant war.

Bei WT Tieren war das relative Herzgewicht 14 Tage nach der TAC Operation sowohl hochsignifikant höher als bei den scheinoperierten Tieren desselben Genotyps, als auch signifikant höher als das relative Herzgewicht der TAC-operierten FHL2^{-/-} Tiere. Bei den TAC-operierten FHL2^{-/-} Tieren war die Steigerung des relativen Herzgewichtes nicht signifikant höher als bei den scheinoperierten Tieren desselben Genotyps. Analoge Verhältnisse herrschten hinsichtlich des relativen Lungengewichts vor.

Während es bei den WT_{TAC} Tieren zu einer signifikanten Steigerung der Reninexpression in der Niere kam, konnte diese Steigerung bei den FHL2^{-/-} Tieren nach TAC nicht festgestellt werden.

Die *ex vivo* Stimulation von Aortenringen FHL2^{-/-} Tiere mit Phenylephrin bzw. Acetylcholin zeigte bei der Messung nach Mulvany und Halpern eine gesteigerte Kontraktilität bzw. verringerte Relaxationsfähigkeit gegenüber denjenigen Ringen aus WT Tieren.

Schlussfolgerungen. Die WT Tiere entwickelten nach TAC-Operation eine signifikante Herzhypertrophie mit funktionellen Zeichen des kardialen Remodeling in Richtung einer Herzinsuffizienz. Dies wurde eindrucksvoll gezeigt durch den massiv erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck in Ruhe und durch die fehlende Steigerung der intraventrikulären Druckerhöhungsgeschwindigkeit infolge Dobutamin-Verabreichung.

Trotz eines erhöhten prästenotischen Blutdruckes und eines reaktiv erhöhten Gefäßtonus entwickeln FHL2^{-/-} Tiere eine geringere Herzhypertrophie bei erhaltener systolischer Ventrikelfunktion im Dobutaminstressstest. Der poststenotisch erhöhte diastolische Druck bei fehlendem Anstieg der Reninexpression in der Niere bei FHL2^{-/-} Tieren weist auf eine konstitutiv erhöhte Empfindlichkeit der Gefäßwand auf bisher unbekannte vasoaktive Stimuli hin.

In der Zusammenschau dürfte eine fehlende Steigerung der Genexpression von Renin in der Niere unter TAC-Bedingungen bei den FHL2^{-/-} Tieren einen niedrigeren Spiegel von ANGII im Blut gegenüber den WT Tieren zur Folge haben. Dies könnte angesichts

der bekannten Rolle von ANGII im kardialen Remodeling eine Erklärung für die verminderte kardiale Hypertrophie FHL2^{-/-} Tiere gegenüber den WT Tieren nach TAC sein.

6. Literaturverzeichnis

Arber S, Hunter JJ, Ross J Jr, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 1997; 88: 393-403

Bach I. The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev* 2000; 91: 5-17

Barrett-O'Keefe Z, Witman MA, McDaniel J, Fjeldstad AS, Trinity JD, Ives SJ, Conklin JD, Reese V, Runnels S, Morgan DE, Sander M, Richardson RS, Wray DW. Angiotensin II potentiates alpha-adrenergic vasoconstriction in the elderly. *Clin Sci (Lond)* 2013; 124: 413-422

Bernardo BC, Gao XM, Winbanks CE, Boey EJ, Tham YK, Kiriazis H, Gregorevic P, Obad S, Kauppinen S, Du XJ, Lin RC, McMullen JR. Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 17615-17620

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368: 850-853

Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 2000; 19: 6341-6350

Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 184-195

Chu PH, Bardwell WM, Gu Y, Ross J Jr, Chen J. FHL2 (SLIM3) is not essential for cardiac development and function. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 7460-7462

Chu PH, Chen J. The novel roles of four and a half LIM proteins 1 and 2 in the cardiovascular system. *Chang Gung Med J* 2011; 34: 127-134

D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, Dorn GW, 2nd. Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 8121-8126

Delpon E, Caballero R, Gomez R, Nunez L, Tamargo J. Angiotensin II, angiotensin II antagonists and spironolactone and their modulation of cardiac repolarization. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 155-161

Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122: 103-111

Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 34-49

Domenighetti AA, Wang Q, Egger M, Richards SM, Pedrazzini T, Delbridge LM. Angiotensin II-mediated phenotypic cardiomyocyte remodeling leads to age-dependent cardiac dysfunction and failure. *Hypertension* 2005; 46: 426-432

Dostal DE. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Regul Pept* 2000; 91: 1-11

Du X, Hublitz P, Gunther T, Wilhelm D, Englert C, Schule R. The LIM-only coactivator FHL2 modulates WT1 transcriptional activity during gonadal differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1577: 93-101

Ehrentraut H, Weber C, Ehrentraut S, Schwederski M, Boehm O, Knuefermann P, Meyer R, Baumgarten G. The toll-like receptor 4-antagonist eritoran reduces murine cardiac hypertrophy. *Eur J Heart Fail* 2011; 13: 602-610

Eisenreich A. Regulation of vascular function on posttranscriptional level. *Thrombosis* 2013; 2013: 948765

Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, Takaoka H, Thomas SA, Koch WJ, Rockman HA. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* 2002; 105: 85-92

Fimia GM, De Cesare D, Sassone-Corsi P. A family of LIM-only transcriptional coactivators: tissue-specific expression and selective activation of CREB and CREM. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 8613-8622

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

Gay-Jordi G, Guash E, Benito B, Brugada J, Nattel S, Mont L, Serrano-Mollar A. Losartan prevents heart fibrosis induced by long-term intensive exercise in an animal model. *PLoS One* 2013; 8: e55427

Goonasekera SA, Hammer K, Auger-Messier M, Bodi I, Chen X, Zhang H, Reiken S, Elrod JW, Correll RN, York AJ, Sargent MA, Hofmann F, Moosmang S, Marks AR, Houser SR, Bers DM, Molkentin JD. Decreased cardiac L-type Ca^{2+} channel activity induces hypertrophy and heart failure in mice. *J Clin Invest* 2012; 122: 280-290

Hojayev B, Rothermel BA, Gillette TG, Hill JA. FHL2 binds calcineurin and represses pathological cardiac growth. *Mol Cell Biol* 2012; 32: 4025-4034

Hoshijima M. Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H1313-1325

Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, Rockman HA, Kass DA, Molkentin JD, Sussman MA, Koch WJ, American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences CoCC, Council on Functional G, Translational B. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res* 2012; 111: 131-150

Huang ZP, Chen J, Seok HY, Zhang Z, Kataoka M, Hu X, Wang DZ. MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. *Circ Res* 2013; 112: 1234-1243

Huss S, Stellmacher C, Goltz D, Khlistunova I, Adam AC, Trebicka J, Kirfel J, Buttner R, Weiskirchen R. Deficiency in four and one half LIM domain protein 2 (FHL2) aggravates liver fibrosis in mice. *BMC Gastroenterol* 2013; 13: 8

Iizuka K, Sano H, Kawaguchi H, Kitabatake A. Transforming growth factor β -1 modulates the number of β -adrenergic receptors in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26: 435-440

Johannessen M, Moller S, Hansen T, Moens U, Van Ghelue M. The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 268-284

Kagiyama S, Matsumura K, Goto K, Otsubo T, Iida M. Role of Rho kinase and oxidative stress in cardiac fibrosis induced by aldosterone and salt in angiotensin type 1a receptor knockout mice. *Regul Pept* 2010; 160: 133-139

Kang H, Louie J, Weisman A, Sheu-Gruttadauria J, Davis-Dusenbery BN, Lagna G, Hata A. Inhibition of microRNA-302 (miR-302) by bone morphogenetic protein 4 (BMP4) facilitates the BMP signaling pathway. *J Biol Chem* 2012; 287: 38656-38664

Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor- β in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 2006; 118: 10-24

Kimura M, Ogihara M. Transforming growth factor- β 1 inhibits the growth of primary adult rat hepatocyte cultures by increasing cAMP levels. *Eur J Pharmacol* 1999; 386: 271-277

Kirfel J, Pantelis D, Kabba M, Kahl P, Roper A, Kalff JC, Buettner R. Impaired intestinal wound healing in FHL2-deficient mice is due to disturbed collagen metabolism. *Exp Cell Res* 2008; 314: 3684-3691

Klickstein LB, Kaempfer CE, Wintroub BU. The granulocyte-angiotensin system. Angiotensin I-converting activity of cathepsin G. *J Biol Chem* 1982; 257: 15042-15046

Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, Chien KR. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 2002; 111: 943-955

Kolluru GK, Siamwala JH, Chatterjee S. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie* 2010b; 92: 1186-1198

Kolluru GK, Sinha S, Majumder S, Muley A, Siamwala JH, Gupta R, Chatterjee S. Shear stress promotes nitric oxide production in endothelial cells by sub-cellular delocalization of eNOS: A basis for shear stress mediated angiogenesis. *Nitric Oxide* 2010a; 22: 304-315

Kong Y, Shelton JM, Rothermel B, Li X, Richardson JA, Bassel-Duby R, Williams RS. Cardiac-specific LIM protein FHL2 modifies the hypertrophic response to beta-adrenergic stimulation. *Circulation* 2001; 103: 2731-2738

Kudej RK, Iwase M, Uechi M, Vatner DE, Oka N, Ishikawa Y, Shannon RP, Bishop SP, Vatner SF. Effects of chronic β -adrenergic receptor stimulation in mice. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2735-2746

Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. Transforming growth factor- β function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 2002; 106: 130-135

Lagna G, Ku MM, Nguyen PH, Neuman NA, Davis BN, Hata A. Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signaling through the myocardin-related transcription factors. *J Biol Chem* 2007; 282: 37244-37255

Lange S, Auerbach D, McLoughlin P, Perriard E, Schafer BW, Perriard JC, Ehler E. Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci* 2002; 115: 4925-4936

Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. Pflügers Arch 1895; 61: 291-332

Li RK, Li G, Mickle DA, Weisel RD, Merante F, Luss H, Rao V, Christakis GT, Williams WG. Overexpression of transforming growth factor- β 1 and insulin-like growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 1997; 96: 874-881

Liang Q, Wiese RJ, Bueno OF, Dai YS, Markham BE, Molkenin JD. The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. Mol Cell Biol 2001; 21: 7460-7469

Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by angiotensin II. Methods Find Exp Clin Pharmacol 2000; 22: 709-723

Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chen J, Bers D, Brown JH. Requirement for Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. J Clin Invest 2009; 119: 1230-1240

Lorenz JN, Robbins J. Measurement of intraventricular pressure and cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse. Am J Physiol 1997; 272: H1137-1146

Martin B, Schneider R, Janetzky S, Waibler Z, Pandur P, Kuhl M, Behrens J, von der Mark K, Starzinski-Powitz A, Wixler V. The LIM-only protein FHL2 interacts with β -catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. J Cell Biol 2002; 159: 113-122

McLoughlin P, Ehler E, Carlile G, Licht JD, Schafer BW. The LIM-only protein DRAL/FHL2 interacts with and is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. J Biol Chem 2002; 277: 37045-37053

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. J Cardiovasc Pharmacol 2010; 56: 598-603

Mohammed SF, Storlie JR, Oehler EA, Bowen LA, Korinek J, Lam CS, Simari RD, Jr BJ, Redfield MM. Variable phenotype in murine transverse aortic constriction. Cardiovasc Pathol 2012; 21: 188-198

Morlon A, Sassone-Corsi P. The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 3977-3982

Muders F, Elsner D. Animal models of chronic heart failure. Pharmacol Res 2000; 41: 605-612

Muller JM, Isele U, Metzger E, Rempel A, Moser M, Pscherer A, Breyer T, Holubarsch C, Buettner R, Schule R. FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J* 2000; 19: 359-369

Muller JM, Metzger E, Greschik H, Bosserhoff AK, Mercep L, Buettner R, Schule R. The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus. *EMBO J* 2002; 21: 736-748

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 1977; 41: 19-26

Nakamura A, Rokosh DG, Paccanaro M, Yee RR, Simpson PC, Grossman W, Foster E. LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H1104-1112

Neuman NA, Ma S, Schnitzler GR, Zhu Y, Lagna G, Hata A. The four-and-a-half LIM domain protein 2 regulates vascular smooth muscle phenotype and vascular tone. *J Biol Chem* 2009; 284: 13202-13212

Nogami M, Romberger DJ, Rennard SI, Toews ML. TGF- β 1 modulates β -adrenergic receptor number and function in cultured human tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1994; 266: L187-191

Nouet Y, Dahan J, Labalette C, Levillayer F, Julien B, Jouvion G, Cairo S, Vives FL, Ribeiro A, Huerre M, Colnot S, Perret C, Nhieu JT, Tordjmann T, Buendia MA, Wei Y. The four and a half LIM-only protein 2 regulates liver homeostasis and contributes to carcinogenesis. *J Hepatol* 2012; 57: 1029-1036

Okamoto R, Li Y, Noma K, Hiroi Y, Liu PY, Taniguchi M, Ito M, Liao JK. FHL2 prevents cardiac hypertrophy in mice with cardiac-specific deletion of ROCK2. *FASEB J* 2013; 27: 1439-1449

Parati G, Esler M. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J* 2012; 33: 1058-1066

Park CS, Cha H, Kwon EJ, Jeong D, Hajjar RJ, Kranias EG, Cho C, Park WJ, Kim do H. AAV-mediated knock-down of HRC exacerbates transverse aorta constriction-induced heart failure. *PLoS One* 2012; 7: e43282

Pashmforoush M, Pomies P, Peterson KL, Kubalak S, Ross J Jr, Hefti A, Aebi U, Beckerle MC, Chien KR. Adult mice deficient in actinin-associated LIM-domain protein reveal a developmental pathway for right ventricular cardiomyopathy. *Nat Med* 2001; 7: 591-597

Patten RD, Hall-Porter MR. Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present. *Circ Heart Fail* 2009; 2: 138-144

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; 86: 747-803

Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Schultheiss HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999; 99: 2750-2756

Purcell NH, Darwis D, Bueno OF, Muller JM, Schule R, Molkenin JD. Extracellular signal-regulated kinase 2 interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1081-1095

Radovits T, Olah A, Lux A, Nemeth BT, Hidi L, Birtalan E, Kellermayer D, Matyas C, Szabo G, Merkely B. Rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy: hemodynamic characterization using left ventricular pressure-volume analysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305: H124-134

Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J Jr, Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8277-8281

Rosenkranz S. TGF- β 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 2004; 63: 423-432

Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, Schluter KD, Bohm M. Alterations of β -adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF- β (1). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1253-1262

Rothermund L, Pinto YM, Vetter R, Herfort N, Kossmehl P, Neumayer HH, Paul M, Kreutz R. Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene. *J Hypertens* 2001; 19: 1465-1472

Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993; 73: 413-423

Schiller PW, Demassieux S, Boucher R. Substrate specificity of tonin from rat submaxillary gland. *Circ Res* 1976; 39: 629-632

Schluter KD, Zhou XJ, Piper HM. Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF- β in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1995; 269: C1311-1316

Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, Kimball TR, Doetschman T. TGF- β 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest* 2002; 109: 787-796

Shi J, Zhang YW, Yang Y, Zhang L, Wei L. ROCK1 plays an essential role in the transition from cardiac hypertrophy to failure in mice. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 49: 819-828

Simpson P. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J Clin Invest* 1983; 72: 732-738

Small EM, Thatcher JE, Sutherland LB, Kinoshita H, Gerard RD, Richardson JA, Dimaio JM, Sadek H, Kuwahara K, Olson EN. Myocardin-related transcription factor- α controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction. *Circ Res* 2010; 107: 294-304

Sun Y, Weber KT. Animal models of cardiac fibrosis. *Methods Mol Med* 2005; 117: 273-290

Takahashi N, Calderone A, Izzo NJ Jr, Maki TM, Marsh JD, Colucci WS. Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor- β 1 expression in rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 1470-1476

Takefuji M, Kruger M, Sivaraj KK, Kaibuchi K, Offermanns S, Wettschureck N. RhoGEF12 controls cardiac remodeling by integrating G protein- and integrin-dependent signaling cascades. *J Exp Med* 2013; 210: 665-673

Tufro-McReddie A, Chevalier RL, Everett AD, Gomez RA. Decreased perfusion pressure modulates renin and ANG II type 1 receptor gene expression in the rat kidney. *Am J Physiol* 1993; 264: R696-702

Übersichtsartikel: Creemers EE, Pinto YM. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc Res* 2011; 89: 265-272

Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, Husain A. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest* 1993; 91: 1269-1281

Velten M, Duerr GD, Pessies T, Schild J, Lohner R, Mersmann J, Dewald O, Zacharowski K, Klaschik S, Hilbert T, Hoeft A, Baumgarten G, Meyer R, Boehm O, Knuefermann P. Priming with synthetic oligonucleotides attenuates pressure overload-induced inflammation and cardiac hypertrophy in mice. *Cardiovasc Res* 2012; 96: 422-432

Villarreal FJ, Dillmann WH. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF- β 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* 1992; 262: H1861-1866

Wada H, Zile MR, Ivester CT, Cooper Gt, McDermott PJ. Comparative effects of contraction and angiotensin II on growth of adult feline cardiocytes in primary culture. *Am J Physiol* 1996; 271: H29-37

Way JC, Chalfie M. *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* 1988; 54: 5-16

Weber KT, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodeling of the heart. *Nat Rev Cardiol* 2013; 10: 15-26

Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med (Berl)* 2002; 80: 629-638

Wixler V, Geerts D, Laplantine E, Westhoff D, Smyth N, Aumailley M, Sonnenberg A, Paulsson M. The LIM-only protein DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several α and β integrin chains and is recruited to adhesion complexes. *J Biol Chem* 2000; 275: 33669-33678

Wixler V, Hirner S, Muller JM, Gullotti L, Will C, Kirfel J, Gunther T, Schneider H, Bosserhoff A, Schorle H, Park J, Schule R, Buettner R. Deficiency in the LIM-only protein FHL2 impairs skin wound healing. *J Cell Biol* 2007; 177: 163-172

Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* 1982; 243: H941-947

7. Danksagung

All den Menschen, von denen ich während der Generierung der Daten und der Abfassung dieser Arbeit stetige Unterstützung erfahren habe, möchte ich von Herzen danken.

Im Besonderen sind dies:

- ❖ Prof. Dr. Reinhard Büttner (Institut für Pathologie, Universität zu Köln) für das Interesse an dieser Arbeit und seine großzügige Unterstützung durch ein internes Promotionsstipendium.
- ❖ Prof. Dr. Rainer Meyer (Institut für Physiologie II) für die ständige Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft. Außerdem danke ich für die mehrfache, äußerst aufmerksame und konstruktive Korrektur der Textfassung.
- ❖ Dr. Diane Goltz für die Einarbeitung in das Promotionsthema, die Anleitung und Hilfe bei den TAC-Operationen und die fortwährende freundliche Betreuung.
- ❖ Meinem Vater ohne dessen stetes Antreiben und Ermutigen das Manuskript vermutlich nicht fertig geworden wäre. Ferner danke ich ihm für sein allzeit offenes Ohr und seine kritischen Anmerkungen während des Schreibprozesses.
- ❖ Anne Dörr für die Einarbeitung in die Methodik des Mulvany-Myographen und die seither bestehende, großartige Freundschaft.
- ❖ Dr. Sebastian Huss und Dr. Frederike Göke für die Vermittlung in diese Arbeitsgruppe und ihre moralische Unterstützung.
- ❖ Hanne Bock (Institut für Physiologie II) für die freundliche Hilfsbereitschaft bei allen Labortätigkeiten.