

Aus dem Bereich Innere Medizin-Klinisch-Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. med Ulrich Laufs

Einfluss der Statinen auf die kardiale Myokardhypertrophie und Rac 1 Expression in vivo

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

Vorgelegt von Svetlana Rodionycheva,
geb. am: 28.04.1977 in Kujbushev(Samara), Russland

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen: Isabel Paetz-Malez und Julia Michaeli bei molekularbiologischen Untersuchungen und bei der Durchführung der Operationen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Homburg, den

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden Beamten.

Meinem Vater gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung	6
1.1. Deutsch	6
1.1. Englisch	7
2. Einleitung	9
2.1. Myokardhypertrophie	9
2.2. Kleine GTP-bindende Proteine	10
2.3. Statine	12
2.4. Oxidativer Stress und NAD(P)H-Oxidase	15
2.5. Fragestellung der Arbeit	17
3. Material und Methoden	18
3.1. Aortic Banding	18
3.1.1. Versuchstiere	18
3.1.2. Operationsinstrumentarium	19
3.1.3. Anästhesie	19
3.1.4. Einleitung	20
3.1.5. Endotracheale Intubation	20
3.1.6. Aortenligatur	21
3.1.7. Extubation	23
3.2. Blutdruckmessung	24
3.3. Zubereitung des Ausgusspräparates	25
3.4. Proteinexpression und Western Blot	26
3.4.1. Proteinisolation	27
3.4.2. Proteinbestimmung nach Lowry	27
3.4.3. Gelelektrophorese	27
3.4.4. Protein-Transfer	27
3.4.5. Antikörperinkubation	28
3.5. GST-Fusions-Pull-Down-Assay	28
3.5.1. Präparation der GST-Fusions-Proteine	28
3.5.2. Pull Down Proteine	29
3.5.3. Analyse	29

3.6.	NAP(P)H-Oxidase Assay.....	30
3.7.	Sirius-Red-Färbung	30
3.7.1.	Sirius-Red-Lösung.....	30
3.7.2.	Sirius-Red-Färbung	30
3.8.	Immunfärbung für α -sarkomerisches Aktin	31
3.9.	Auswertung.....	31
3.9.1.	Densitomieren und Fotografien	31
3.9.2.	Statistik.....	31
3.10.	Verwendete Substanzen	32
4.	Ergebnisse	35
4.1.	Druckinduzierte Myokardhypertrophie	35
4.1.1.	Druckinduzierte Zunahme des Herzgewichts	35
4.1.2.	Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht nach Aortenligatur	38
4.1.3.	Mikroskopischer Nachweis der Myokardhypertrophie	41
4.1.4.	Systolische Druckverhältnisse im linken Ventrikel invasiv gemessen.....	43
4.1.5.	Lungen- und Leberfeuchtgewichte nach Aortenligatur	47
4.2.	Rac1-Aktivität	49
4.3.	NAD(P)H-Oxidase-Aktivität	51
5.	Diskussion	52
5.1.	Aortenligatur führt zur Nachlasterhöhung	52
5.2.	Antihypertrophe Effekt der Statinen bei Nachlasterhöhung.....	53
5.3.	Zusammenhang zwischen den antihypertrophen Statinen-Wirkung und Rac1-Aktivität	55
5.4.	Statine vermindern die NAD(P)H-Oxidase Aktivität	57
5.5.	Limitationen der Arbeit.....	59
6.	Literaturverzeichnis	60

1. Zusammenfassung

Einleitung: Die Myokardhypertrophie ist einer der wichtigsten Kompensationsmechanismen bei einer Nachlasterhöhung z.B. bei Hypertonie oder Aortenstenose. Das kleine GTP-bindende Protein Rac1 spielt eine wichtige Rolle für die molekulare Genese der Myokardhypertrophie. Statine können durch die Inhibition der Synthese von Isoprenylderivaten die durch Ras-Proteine vermittelten Prozesse hemmen. Statine erhöhen die lokale Verfügbarkeit an Stickstoffmonoxid durch die Hemmung der Geranylgeranylierung von Rho-GTPase und führen zu einer Verminderung der Aktivität der Rho-Kinase. Statine senken die Aktivität von Rac-abhängigen NAD(P)H-Oxidase durch die Hemmung der Synthese von Geranylgeranylpyrophosphat und vermindern dadurch oxidativen Stress und die Produktion von Sauerstoffradikalen. In Zellkulturexperimenten führten die Statine zur Herabregulation des kardialen hypertrophen Phänotyps. Wir prüften daher die Wirkung der Statine *in vivo* an hypertrophierten Mäuseherzen nach Aortenligatur (TAC).

Methoden: Bei 6-10 Wochen alten Mäusen, C67/black6 wurde eine Aortenligatur = transverse aortic constriction (TAC) durchgeführt. Die Behandlung mit Statinen wurde drei Tage vor der Operation begonnen und dauerte insgesamt 10 oder 21 Tage. Die Mäuse wurden in drei Gruppen eingeteilt: TAC (nur die Aortenligatur), TAC+Statine (Aortenligatur + Behandlung mit Atorvastatin) und SHAM. Die Blutdruckmessung erfolgte invasiv mittels eines Mikro-Tip Druck-Katheters, anschließend wurden die Körper-, Herzgewicht, Lungen- und Leberfeuchtgewicht dokumentiert. Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Expression von Rac1-Proteinen wurde mittels GST-PAK pull down assay bestimmt. Die Messung der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase erfolgte mittels Lucigenin chemiluminescenten Assay. Zur mikroskopischen Nachweis der Größenzunahme der Kardiomyozyten wurden diese Immunfärbung(DAPI) unterzogen. Die statistische Signifikanz wurde mittels des ANOVA-Testes bestimmt und für $p < 0,05$ angenommen.

Ergebnisse: Nach 7 und 21 Tagen Aortenligatur entwickelten die Mäuse in der TAC-Gruppe eine konzentrische Hypertrophie. Die Gabe von Atorvastatin verminderte das Ausmaß der Hypertrophie, wobei der gemessene linksventrikuläre systolische Druck in den TAC- und TAC+Statin-Gruppen keinen signifikanten Unterschied zeigte. Lungen- und Leberfeuchgewichte als Ausdruck der Herzinsuffizienz nahmen in der TAC-Gruppe stärker zu und zeigten nach 7 Tagen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Aortenligatur führte zu einer fünffachen Erhöhung der Rac1-Aktivität, die nach der Behandlung mit Statinen deutlich reduziert und in der SHAM-Gruppe deutlich geringer war. Die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase stieg in der TAC-Gruppe vierfach im Vergleich zur SHAM-Gruppe an, dies wurde durch Statine verhindert.

Schlussfolgerung: Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Statine in einem tierexperimentellem Modell der Entwicklung einer Myokardhypertrophie entgegen wirken können. Die Rac1-GTPase ist in diesen Prozess involviert. Durch die Hemmung der Rac1-Aktivität mittels Statinen wird die Entwicklung der Herzhypertrophie vermindert. Ein wichtiger Mechanismus ist die Hemmung der Superoxidproduktion NADP(H)-Oxidasen durch die Statine.

1.2 Summary

Introduction: Pressure-overload induced cardiac hypertrophy and heart failure are common diseases and causes of mortality in industrialized countries. For this reason investigation of their pathogenetic mechanisms and creation of new strategies in their treatment are important. Data obtained from cell culture experiments suggest that cardiomyocyte hypertrophy can be reduced through the inhibition of the small GTP-binding proteins by statins. Hence, in this study the influence of atorvastatin on the left ventricular hypertrophy in mouse model of aortic banding was investigated.

Methods: In 6-10-week-old wild-type (C57Bl6) mice transverse aortic constriction (TAC) or sham-operation (SHAM) was performed. The animals were separated into three groups: one control group (SHAM) and two experimental groups (TAC and TAC+STATIN). Atorvastatin or vehicle administration started 3 days before surgery

and continued 10 or 21 days until the end of each set of experiment. Left ventricular (LV)-pressure was invasively measured. Body weight, heart weight, lung weight and liver weight were obtained. Activity of Rac1 was evaluated by GST-PAK pull down assay. Activity of NAD(P)H-Oxidase was measured by Lucigenin chemiluminescent assay. The measurement of cardiomyocyte short-axis diameter was performed using sections immunostained for α -sarcomeric actin. Results are presented as mean \pm standard error of the mean. Statistical significance was estimated by ANOVA-Test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results: Pressure overload for 7 and 21 days increased left ventricular systolic pressure in both experimental groups and caused concentric left ventricular hypertrophy which was significantly reduced by treatment with statin. Aortic ligation for 7 days significantly increased lung and liver wet weight, compared with the SHAM-group. Cardiac hypertrophy was accompanied by tremendous increase of both Rac1- and NAD(P)H-Oxidase-activity which was substantially diminished by treatment with statin.

Conclusion: The data show that aside from its cholesterol-lowering action statin reduces myocardial hypertrophy in mouse model of aortic ligation. This effect can be explained by the inhibition of pro-hypertrophic signal transduction pathways through inactivation of Rac1 and by diminishing oxidative stress through decrease of NAD(P)H-Oxidase-activity.

2. Einleitung

2.1. Myokardhypertrophie

Wenn das Herz einer chronischen Nachlasterrhöhung z.B. der Hypertonie oder Aortenstenose ausgesetzt ist, wird die Aufrechterhaltung der Herzfunktion durch Kompensationsmechanismen wie den Frank-Starling-Mechanismus, durch neurohumorale Mechanismen und durch Myokardhypertrophie gewährleistet. Der Frank-Starling-Mechanismus basiert auf einer Erhöhung des Schlagvolumens bei einer vermehrten Volumenbelastung, wobei die Dehnung des Herzmuskels eine effektive Überlappung der Myofibrillen mit verbesserter Kontraktilität bewirkt. Die Wirksamkeit dieses Mechanismus ist nur auf ein gewisses linksventrikuläres Volumen begrenzt, bei einer Überschreitung dieses Volumens kommt es zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz mit einer konsequenter Verminderung des Schlagvolumens.

Unter den neuroendokrinen Mechanismen versteht man die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des sympathischen Systems sowie die vermehrte Ausschüttung von ADH (Antidiuretisches Hormon), was zur Steigerung der myokardialen Kontraktilität führt, welche initial der Aufrechterhaltung der Herzfunktion dient. Jedoch kommt es im weiteren Verlauf zur Erhöhung von Vor- und Nachlast mit einer Dekompensation, was letztendlich zu einem Versagen der Pumpfunktion des Herzens führen kann. Die Myokardhypertrophie spielt eine zentrale Rolle bei der Kompensation der chronischen hämodynamischen Belastung. Bei chronischer Druckbelastung wird aus diesem Kompensationsmechanismus ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung der Herzinsuffizienz. Myokardhypertrophie ist ein bedeutender Indikator für kardiovaskuläre Erkrankungen und plötzlichen Herztod (54,9). Man unterscheidet zwei Formen der Herzhypertrophie, die exzentrische und die konzentrische: Die exzentrische Hypertrophie entsteht durch eine Volumenbelastung, die mit einem erhöhten Schlagvolumen und gleichzeitig einem größeren endsystolischen Volumen des linken Ventrikels einhergeht und führt primär zu einer verstärkten Replikation und Dilatation, dadurch zur Verlängerung der Sarkomeren und letztendlich zur

Muskelhypertrophie des Ventrikels. Die konzentrische Hypertrophie entsteht durch die Erhöhung des intraventrikulären Drucks, das endsystolische Ventrikelvolumen bleibt nahezu gleich. Es kommt zu einer Zunahme der Wanddicke und der Herzmuskelmasse durch Erhöhung der Myozytenbreite sowie der Anzahl an Sarkomeren.

Die molekulare Pathogenese der Herzhypertrophie ist erst teilweise bekannt. Beide Formen der Hypertrophie sind mit einer Veränderung der Genexpression assoziiert. Dabei kommt es zur verstärkten Expression von Protoonkogenen, z. B. solchen wie c-jun, c-fos (108,85) und eagl, und zur erneuten Expression der Gene, welche in der fetalen Entwicklung aktiv waren und z. B. den Atrialen Natriuretischen Faktor und β -Myosinschwerketten(53) kodieren. Diese Veränderungen betrachtet man als Hinweis für eine Hypertrophieentwicklung. Der Auslösemechanismus dieser Veränderungen bleibt bis heute unbekannt. Die molekularen Mechanismen, welche für den Übergang der kompensierten Myokardhypertrophie in die Herzinsuffizienz verantwortlich sind, sind ebenfalls nicht vollständig geklärt.

Inzwischen ist bekannt, dass die Hypertrophie über Agonisten an heterotrimeren G-Protein-Rezeptoren wie z. B. Endothelin 1 (87), platelet-derived growth factor und epidermal growth factor (23) sowie über Agonisten am gp130-Zytokin-Rezeptor (104) wie Cardiotrophin-1 und leukämieinhibitorischer Faktor (LIF) (85) vermittelt wird. Es lässt sich anhand der aktuellen Publikationen vermuten, dass in der Auslösung der Signalkaskade kleine GTP-bindende Signaltransportproteine der Rho-Familie eine wichtige Rolle für die molekulare Genese der Herzhypertrophie spielen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Klärung der Rolle eines dieser Proteine, der Rac1-GTPase.

2.2. Kleine GTP-bindende Proteine

Das kleine G-bindende Protein Rac1 gehört zu der Rho-Familie, die wiederum ein Teil der Ras-Superfamilie ist. Aufgabe dieser Proteine ist vor allem die Zellregulation bezüglich Zytokinese, Phagozytose, Pinozytose, Morphogenese, Axon-Führung, Zellpolarität und Zellwanderung (17). Das Rac1-Protein, wie die Proteine der Ras-

Superfamilie, hat eine Molekularmasse von 21 kDa und wird kodiert von einem Ras Gen, wobei man H-, N- und K-Ras-Gene unterscheidet. Es funktioniert wie ein molekularer Schalter, d. h. es ändert seine Konformation zwischen der aktiven GTP-gebundenen Form und der inaktiven GDP-gebundenen Form. Seine Aktivierung erfolgt über guanine nucleotide exchange Faktoren (GEF), von denen mehr als 30 Rho-spezifische GEF's bekannt sind. Die inaktivierenden Proteine nennt man GAP (GTPase-aktivierende Proteine), mehr als 20 sind Rho-spezifische GAPs. Die Inaktivierung erfolgt mittels Hydrolyse (75). Das Rac1-Protein entfaltet seine Funktion mittels einer Membranverankerung, die durch eine posttranslationale Modifikation eines lipophilen, hypervariablen C-terminalen Proteinanteils ausgelöst wird. Am C-Terminus dient die CAAX-Box als Erkennungssequenz für die Farnesyltransferase. Nach Anhängen des Farnesylrestes an das Cystein werden die drei C-Terminus liegenden Aminosäuren abgespalten (33). Zur Membranverankerung finden noch andere Modifizierungen statt, bei einigen Ras-Isoformen beispielsweise zusätzliche Palmitoylierungen an C-terminalen Cysteinen.

Zu einer der pharmakologischen Möglichkeiten zur Beeinflussung der Rho-GTPase Rac1 zählen die HMG-CoA Reduktasehemmer, die auch Statine genannt werden. Statine können durch Inhibition der Synthese der Isoprenylderivate die durch Ras-Proteine vermittelten Prozesse reduzieren. In Zellkulturexperimenten führt eine Hemmung von Rac1 durch Statine zu einer Herabregulation des kardialen hypertrophen Phänotyps (91). Darüber hinaus gibt es indirekte Hinweise aus klinischen Studien für eine günstige antihypertrophe Wirkung dieser Medikamentengruppe. Es war daher erforderlich, die Ergebnisse aus den Zellkulturexperimenten an Tiermodellen für eine Herzhypertrophie zu überprüfen. Diese Arbeit beschreibt ein Tiermodell für Myokardhypertrophie und die Auswirkung der Statinen-Behandlung auf dieses Modell. Dabei soll die Wirkung der HMG-CoA-Reduktasehemmer auf die kardiale Physiologie und molekularen Veränderungen im Myokard detailliert charakterisiert werden.

2.3. Statine

Statine sind ursprünglich Naturprodukte. Einer der ersten entdeckten Statine war Mevastatin, der im Jahr 1973 beim Screening von tausenden Pilzextrakten aus *Penicillium citrinum* von der japanischen Pharmafirma Akiro Endo identifiziert wurde. Lovastatin (Mevacor®) wurde 1987 als erstes Statin von Merck & Co auf den Markt gebracht, dieser wurde aus *Aspergillus terreus* isoliert (27). Mevastatin, Lovastatin und Simvastatin liegen als Lactone vor. Sie sind Prodrugs und werden *in vivo* zum aktiven Inhibitor hydrolysiert. Cerivastatin, Atorvastatin und Rosuvastatin werden vollsynthetisch hergestellt, haben einen offenen Ring und liegen als Carboxylate vor (Abb. 1). Der Hexahydronaphthalenring wurde durch verschiedene Heterozyklen ersetzt (27).

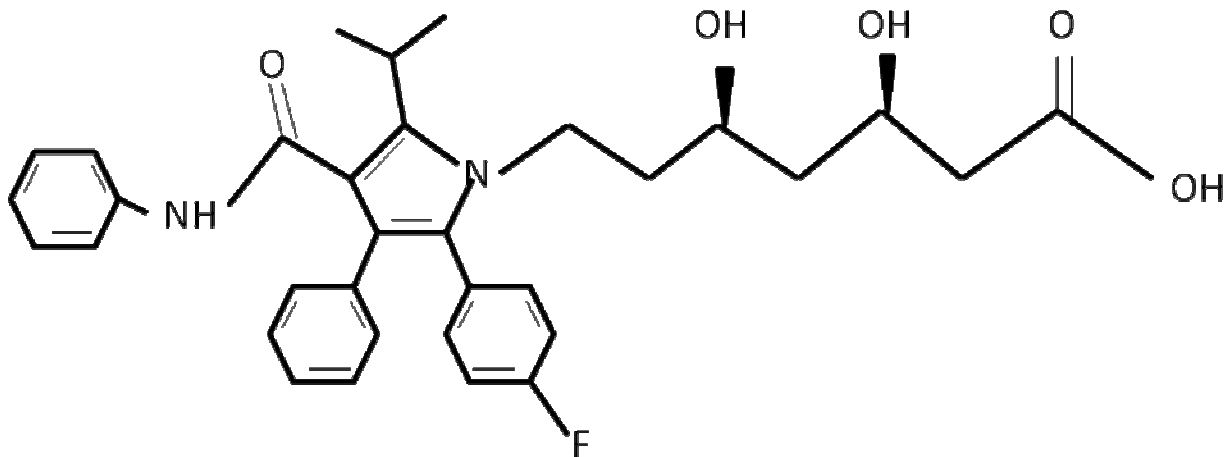


Abb. 1: Chemische Strukturformel des Atorvastatins.

Statine führen über eine kompetitive Hemmung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase zur Reduktion der Cholesterinbiosynthese und kompensatorischen Zunahme der hepatischen Low-density-Lipoprotein (LDL)-Rezeptoren, was eine deutliche Abnahme des Plasma-LDL zur Folge hat. Diese günstige Regulation der Cholesterinbiosynthese ist ein wichtiger Hebel in der Entstehung der kardiovaskulären Erkrankungen und der Herzinsuffizienz, und kann zu deren primären und sekundären Prävention genutzt werden (101, 90, 17). Im Rahmen der Senkung des Plasma-LDLs führt die Behandlung mit Statinen zur Stabilisation der atheromatosen Plaques, verlangsamt das Fortschreiten der Atherosklerose sowie verbessert die endotheliale Funktion (5). Aber nicht nur

Patienten mit hohen, sondern auch mit normalen LDL-Cholesterinspiegeln können von der Therapie mit Statinen profitieren und haben ein niedrigeres Risiko bei der Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung (46, 18, 56). Diese Tatsache führte zur Annahme, dass der Profit von Statinen nicht nur auf Lipidsenkung basieren könnte. Tatsächlich sind die Statine inzwischen auch durch die sogenannten cholesterinunabhängigen Wirkungen bekannt geworden. Viele dieser nichtlipidsenkenden Effekte von Statinen werden durch die Hemmung der Zwischenprodukte der Cholesterinsynthese erklärt. Zu diesen Zwischenprodukten gehören auch beide Isoprenylderivate Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat, die als Lipidanker für intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle wie die GTPasen Rho, Ras, Rac dienen (98, 38). Die Reduktion der Synthese von Isoprenylderivaten führt zu einer Beeinträchtigung der intrazellulären Transportprozesse und subzellulären Lokalisation der membranassoziierten Proteine (43) (s. Abb. 2).

Zu den nichtlipidsenkenden Effekten von Statinen gehört die Stabilisierung der Endothelfunktion, die über eine Zusammensetzung verschiedener Mechanismen vermittelt wird. Zu einem ist die Erhöhung der lokalen Verfügbarkeit an Stickstoffmonoxid zu erwähnen, die durch eine Hemmung der Geranylgeranylierung der GTPase Rho und dadurch zu einer Verminderung der Aktivität der Rho-Kinase führt. Dadurch wird die Expression der Sticstoffoxydsynthase und die Stabilität ihrer mRNA erhöht. Zum anderen wird die Produktion von Sauerstoffradikalen durch die Hemmung der Synthese von Geranylgeranylpyrophosphat, die die Aktivität von Rac-abhängiger NAD(P)H-Oxidase reduziert, vermindert. Vasodilatierende Effekte werden verstärkt und vasokonstriktorische abgeschwächt (28).

Die Hemmung der Cholesterinbiosynthese vermindert die Freisetzung von Zytokinen und die Aktivierung von Makrophagen und Monozyten, was die Entstehung von atherosklerotischen Plaques verhindert. Die Konzentration des C-reaktiven Proteins, die mit dem KHK-Risiko positiv korreliert (76), wird durch Statine vermindert (86, 11). Als weitere KHK-Risiken gelten hohe Konzentrationen von Fibrinogen und Homozystein, die durch Statine ebenfalls gesenkt werden. Über die Blockade der

Isoprenylierung der GTPasen der Rho und Ras wird der antiproliferative Effekt auf die glatten Muskelzellen der Gefäße vermittelt. Rho nimmt an der PDGF-induzierten DNA-Synthese der Gefäßmuskelzellen teil und Ras beeinflusst den Zellzyklus über eine Aktivierung der MAP-Kinase. Schließlich werden durch diese molekularbiologischen Mechanismen in den arteriosklerotisch geschädigten Gefäßen die Restenosierung und Neovaskularisation günstig beeinflusst (82). Durch direkte Hemmung der proteolytischen Matrix-Metalloproteasen verbessern die Statine die Plaquestabilität. Unter anderem wird die Thrombozytenaggregation ebenfalls durch Statine verringert, indem die Thromboxan-A2-Synthese gehemmt und die Dichte der Oberflächenproteine der Thrombozyten CD62 und CD63 (P-Selektin und GP53) reduziert wird (50). Die Expression des Gewebsplasminogenaktivators wird erhöht, die des Gewebsplasminogenaktivator-Inhibitors-1 dagegen vermindert.

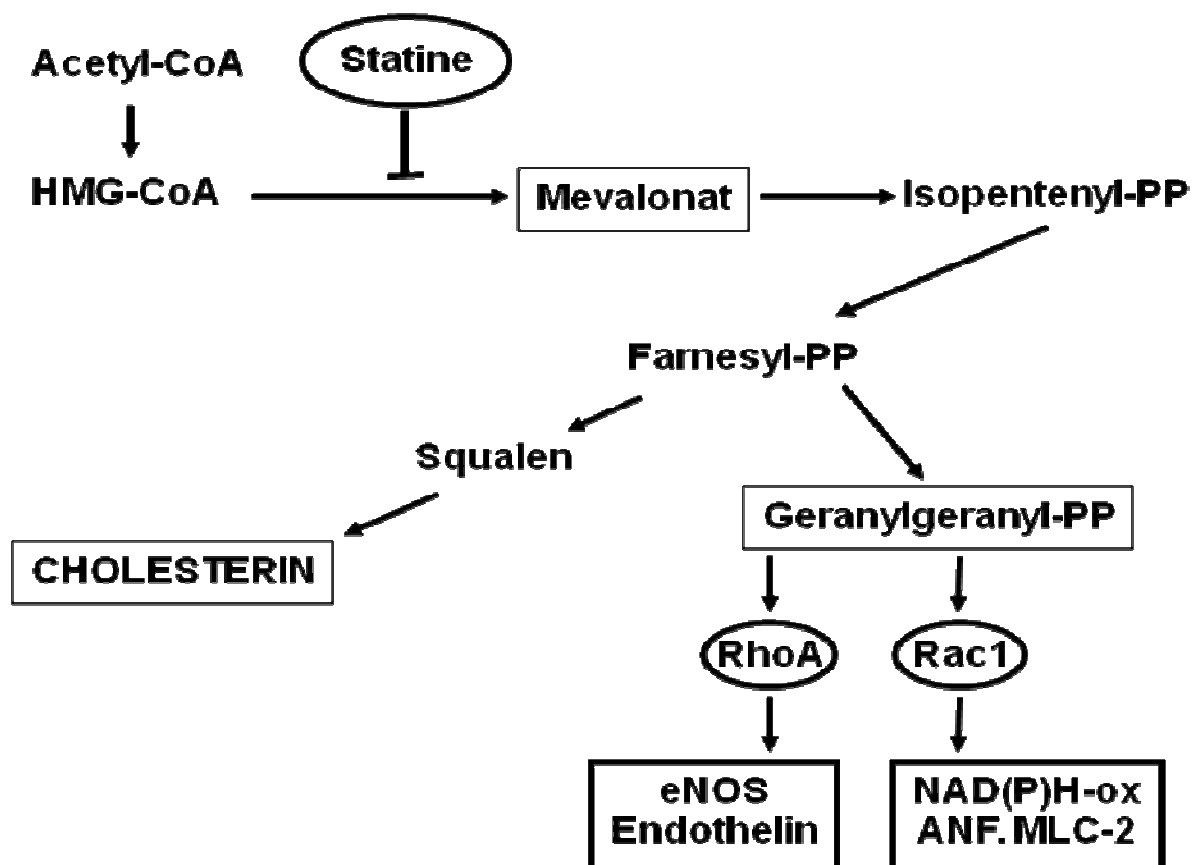


Abb. 2: Die Hemmung der Isoprenylierung der kleinen G Proteine RhoA und Rac1 durch Statine führt im Tierversuch zur Hochregulation der endothelialen NO-

Synthetasen (eNOS) sowie zu einer Hemmung der Endothelin-Expression, der NAD(P)H-Oxidase vermittelten Sauerstoffradikalfreisetzung und zur Hemmung der Markergene für eine Hypertrophie der Kardiomyozyten, ANF und MLC-2.

2.4. Oxidativer Stress und NAD(P)H-Oxidase

Reaktive Sauerstoffradikale (ROS) beeinflussen viele physiologische Prozesse, unter anderem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Herzinsuffizienz und Hypertrophie. Diese beiden Erkrankungen sind durch den „oxidativen Stress“, der bei der verstärkten Freisetzung der Sauerstoffradikalen entsteht, charakterisiert. NAD(P)H-Oxidasen sind Enzyme mit mehreren Untereinheiten, die die Produktion von freien Sauerstoffradikalen katalysieren. Bei dieser Reaktion wird NAD(P)H zu NAD(P)⁺ oxidiert und die dabei entstandenen freien Elektronen auf die andere Seite der Zellmembran transportiert, um dort auf der Außenseite der Zelle freie Sauerstoffradikale zu bilden.

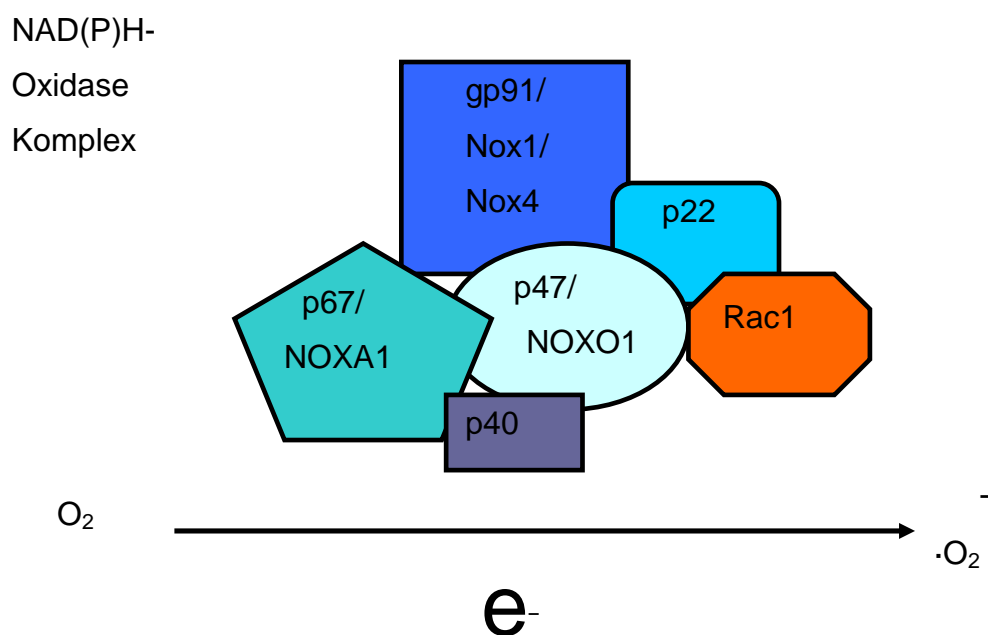


Abb. 3: Enzymatische Wirkung der NAD(P)H-Oxidase bei der Entstehung von freien Sauerstoffradikalen[·O⁻]. NAD(P)H-Oxidase besteht aus mehreren Untereinheiten: gp91phox (oder deren Homologen Nox1 und Nox4), p22phox, p47phox (oder NOXO1), p67phox (oder NOXA1), und p40phox.

Entdeckt wurde die NAD(P)H-Oxidase in den neutrophilen Granulozyten. Zurzeit sind fünf Untereinheiten dieses Enzyms bekannt: p47phox, p67phox, p40phox, p22phox und die katalytische Untereinheit gp91phox (auch „Nox2“ genannt) (7, 20). Die Untereinheiten p47phox, p67phox und p40phox befinden sich im inaktivierten Zustand im Zytosol, während die p22phox und gp91phox in der Zellmembran lokalisiert sind, wo sie ein heterotrimeres Flavoprotein, Cytochrom b558 bilden (93). Durch die Stimulation wird p47phox phosphoryliert, was zu der Bildung eines Komplexes aus zytosolischen Komponenten führt, der zu der Zellmembran transloziert wird. Dort verbindet sich dieser Komplex mit Cytochrom b558 zur aktiven Oxidase-Form, die Elektronen vom O_2 zu $\cdot O_2^-$ transportiert (94). Diese Aktivierung erfordert die Teilnahme von Rac1 und Rpa1A(13).

Außer Phagozyten, in welchen die NAD(P)H-Oxidasen bei der Immunabwehr eine Rolle spielen, exprimieren auch andere Gewebe diese Enzyme. Es sind einige homologe Untereinheiten schon entdeckt worden. Inzwischen sind sieben Mitglieder der sogenannten NOX-Familie der NAD(P)H-Oxidasen bekannt: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 und Duox2 (41). Die Produktion findet in verschiedenen Geweben statt und deren biologische Funktion ist vielfältig. Nox1 findet man im Colon sowie in glatten Gefäßmuskelzellen und ist für die Immunantwort und das Zellwachstum verantwortlich. Park et al zeigten, dass Rac-GEF(guanine nucleotide exchange factor) β -PIX ist für die EGF-induzierte ROS-Produktion in Caco-2(human epithelial colorectal adenocarcinoma cells) und HEK(human embryonic kidney)293-Zellen notwendig. β -PIX oder aktivierter Rac1 bindet an der C-terminalen Domain von NOX1 im Bereich der proximalen Membran, und das führt zur Blockade EGF-induzierten ROS-Produktion(73). Nox2 ist die katalytische Untereinheit einer Oxydase in Phagozyten, wird aber auch in den Gefäßen, Herz, Nieren und Nervenzellen gebildet. Die Studien mit HEK293-Zellen zeigen, dass auch die Nox2 für die Entfaltung ihrer Wirkung zusätzlich den aktivierten Rac1 benötigt, was bei der Nox1 in Anwesenheit von NOXO1(Nox-organizer 1) und NOXA 1 (Nox-aktivator 1) Proteinen nicht unbedingt notwendig ist (21, 92).

Die Nox3 befindet sich im fetalen und erwachsenen Innenohr und spielt in der Vestibularfunktion eine Rolle. Die Nox3 Aktivität ist weitgehend unabhängig von Rac-

Proteinen. Es gibt jedoch doch Hinweise darauf, dass die Expression von N17Rac1 einen kleinen Effekt auf die Nox3-Aktivität in CHO(Chinese hamster ovary) Zellen hat(96).Nox4 heißt auch „Renox“ (renale Oxidase), weil sie häufiger in den Nieren, aber auch in den Gefäßzellen, Osteoklasten und in den Mitochondrien der Kardiomyozyten vorkommt. In den letzten Publikationen gibt es Hinweise darauf, dass die Nox4 eine wichtige Quelle für den oxidativen Stress in den Mitochondrien und auch für die Entstehung der kardialen Dysfunktion verantwortlich ist (55). Die meisten Studien zeigen aber, dass die Nox4 im Gegensatz von Nox1, Nox2 und Nox3 für ihre Aktivität p22phox benötigt, und unabhängig von p47phox/p67phox oder NOXO1/NOXA1 Proteinen und auch Rac1 ist (2, 66). Aber in Mesangiumzellen führt die Nox4 zur Verminderung der intrazellulären ROS vermittelte Produktion der Arachidonsäure (39), was zur Zunahme der Angiotensin II Stimulation und als Folge auch Rac1-Aktivität führt. So wurde die Angiotensin II und L61Rac1 induzierte Aktivierung von Akt wurde durch die Reduktion von Nox4 Expression blockiert. Diese Studie beweist, dass die Nox4 Aktivierung in Mesangiumzellen eine Rac1 abhängige Signalkaskade ist (39). Nox5 ist Ca²⁺-abhängig und befindet sich in den Gonaden und in lymphoidem Gewebe, aber auch in Gefäßzellen. Duox1 und 2 fand man in der Schilddrüse, dort spielen sie bei der Synthese der Schilddrüsenhormone eine Rolle (93). Wahrscheinlich gibt es noch mehr Mitglieder dieser Familie, die in der nächsten Zeit entdeckt werden. Zurzeit ist die Rolle der Rac-Proteinen in Nox5 Aktivierung noch nicht untersucht.

2.5. Fragestellung dieser Arbeit

In Experimenten an den Zellkulturen führte die Hemmung von Rac 1 durch Statine zur Verminderung der Hypertrophie. Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, die Ergebnisse aus den Zellkulturexperimenten an den Tiermodellen für eine Herzhypertrophie zu überprüfen. Daher wird in dieser Arbeit die antihypertrophe Wirkung der Statinen als HMG-CoA-Reduktase-Hemmer an einem Mäuseherzmodell geprüft. Weiterhin wird der molekularbiologische Mechanismus der Hypertrophie und die Rolle des Rac1 sowie die Produktion von NAD(P)H-Oxidase als ein Marker für den oxidativen Stress charakterisiert.

3. Material und Methoden

3.1. Aortic Banding

3.1.1. Versuchstiere

Für diese Arbeit wurden weibliche, 6 bis 10 Wochen alte Mäuse der Art C57/black 6 verwendet. Eine kurze postoperative Erholungszeiten waren die wichtigen Argumente bei der Wahl dieser Tierart für unser Modell. Aufgrund des geringen Körpergewichts der Mäuse ließen auch wirksame Substanzspiegel mit geringeren Wirkstoffmengen erzielen. Das durchschnittliche Ausgangsgewicht der Tiere betrug etwa 18 bis 22 g. Sie erhielten normales Laborfutter und Wasser ad libitum und wurden bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Zyklus und einer Raumtemperatur von 22° C gehalten. Die Applikation der Medikamente erfolgte oral mit Hilfe einer pharyngealen Sonde. Die Applikation begann am dritten präoperativen Tag und dauerte insgesamt je nach Versuch 24 oder 10 Tage.

Wir untersuchten den Wirkstoff – Atorvastatin (Sortis®), das in den Dosierungen 0,2 mg/kg und 2 mg/kg den Tieren verabreicht wurde.

Je nach Operationsart wurden die Mäuse in eine von drei Gruppen eingeteilt:

TAC , SHAM und TAC + Atorvastatin.

Tabelle 1 zeigt die Anzahl der Tiere in den drei Gruppen, die in jeweilige Versuchsreihen eingegangen sind.

	SHAM	TAC	TAC+Atorvastatin
nach 7 Tagen	n=5	n=5	n=7
nach 21 Tagen	n=15	n=18	n=21

Tab. 1: Die Anzahl der Tiere in den Gruppen nach 7/21 Tagen. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin nach transverse aortic constriction.

3.1.2. Operationsinstrumentarium

Im Versuch kamen folgende Geräte zum Einsatz:

- OP- Mikroskop „Nikon SMZ800“
- 11051 Pinzetten (FST)
- FD281R Knüpfpinzetten (Aeskulap)
- Präparationsschere 14088-10 (FST)
- Nadelhalter BM 350R (Aeskulap)
- Nähnadeln SUPRAMA (Payr556-3)
- Fäden Firma SUPRAMA(Seide usp 6/0) (Hautnaht, Thorax)
- Fäden Firma ETHICON® (Prolene)
- Herzkatheterführungsdraht (Guide Wire F 014 (= 0,36 mm)), BIOTRONIK , 15 mm
- Führungshilfe (24G Kanüle)
- Desinfektionslösung (Softasept®N)
- Intubationstubus:
 - 20mm Kunstspitze einer 22 G Kanüle verbunden mit einem 20 mm langen Metallstück einer 18 G Nadel + Adapterstück zum Beatmungsgerät
- Beatmungsgerät:
 - MiniVent TYPE 845 (Hugo Sachs Elektronik)
- Wärmematte

3.1.3. Anästhesie

Narkotisiert wurden die Tiere mittels Ketavet® 100mg/ml (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid) und Rompun® 2% (Bayer, Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid).

Ketavet-Lösung: Ketavet® 100mg/ml + 0,9 % NaCl [1:10].

Rompun-Lösung: Rompun® 2% + 0,9 % NaCl [1: 10].

Pro 20 g schweres Tier applizierten wir 0,3 ml fertiger Ketavet®-Rompun®-Mischung (2:1) intraperitoneal. Diese Menge versetzte die Mäuse in eine Tiefnarkose für ca.45

Minuten, die für die Operationsdauer in der Regel ausreichte. Um Narkose zu verlängern wurden 0,05 ml einer Ketavet-Rompun-Mischung intraperitoneal nachappliziert. Nach der Extubation erhielten die Mäuse Atropin 0,04 mg/kg (Atropin[®] (Braun, Wirkstoff: Atropinsulfat) + 0,9 % NaCl [1:50]). Ergänzt wurde die Narkose mit einer Rimadyl[®]-Lösung: (Wirkstoff:Carprofen) Rimadyl[®] + 0,9 % NaCl [1:15], die häufig in der Veterinärmedizin eingesetztes nichtsteroidales Antiphlogistikum, die analgetische, antiphlogistische und antipyretische Eigenschaften aufweist.

Bei jeder Operation wurde eine Checkliste geführt.

3.1.4. Einleitung

i.p. Narkose (s.o.)

Wiegen des Tieres (Waage (KERN))

Rasieren des Operationsfeldes (Einwegrasierer)

Auftragen der Augensalbe(Bepanthen[®])

3.1.5.Endotracheale Intubation

Die Maus wurde in einer längsgestreckten Position mittels einer Fadenschlinge um die Schneidezähne fixiert (Abb. 4). Mit einer atraumatischen Pinzette wurde die Zunge seitlich aus der Mundhöhle herausluxiert, mit einer anderen atraumatischen Pinzette wurde die Mundhöhle soweit gespreizt, bis man einen direkten Einblick auf die Stimmritze hatte, um die Maus unter Sichtkontrolle endotracheal zu intubieren.

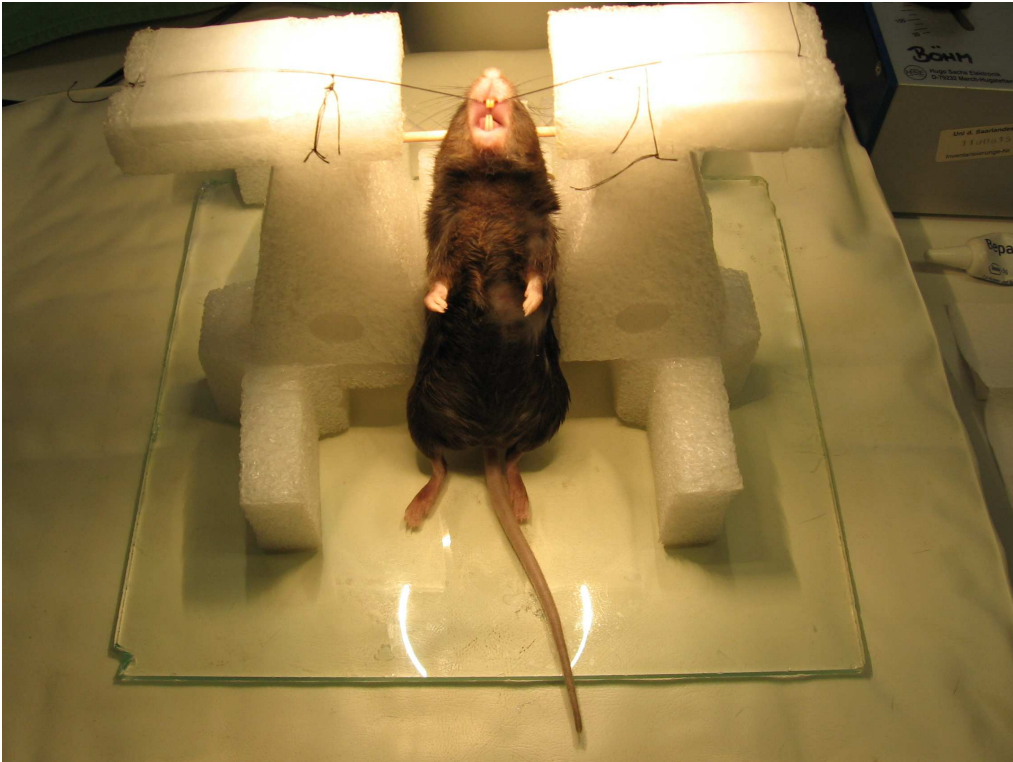


Abb. 4: Eine narkotisierte Maus, bereit zum Intubieren.

3.1.6. Aortenligatur

Vor Beginn der Operation befand sich jedes Tier in einer Tiefnarkose, die Schutzreflexe waren nicht auslösbar, Spontanatmung fehlte. Die Operation erfolgte unter halbsterilen Bedingungen. In der Rückenlage mit nach kranial luxiertem linken oberem Pfötchen wurde die Maus auf einer Glasplatte fixiert (Abb. 5). Die für Thorakotomie vorgesehene Stelle wurde rasiert und desinfiziert.

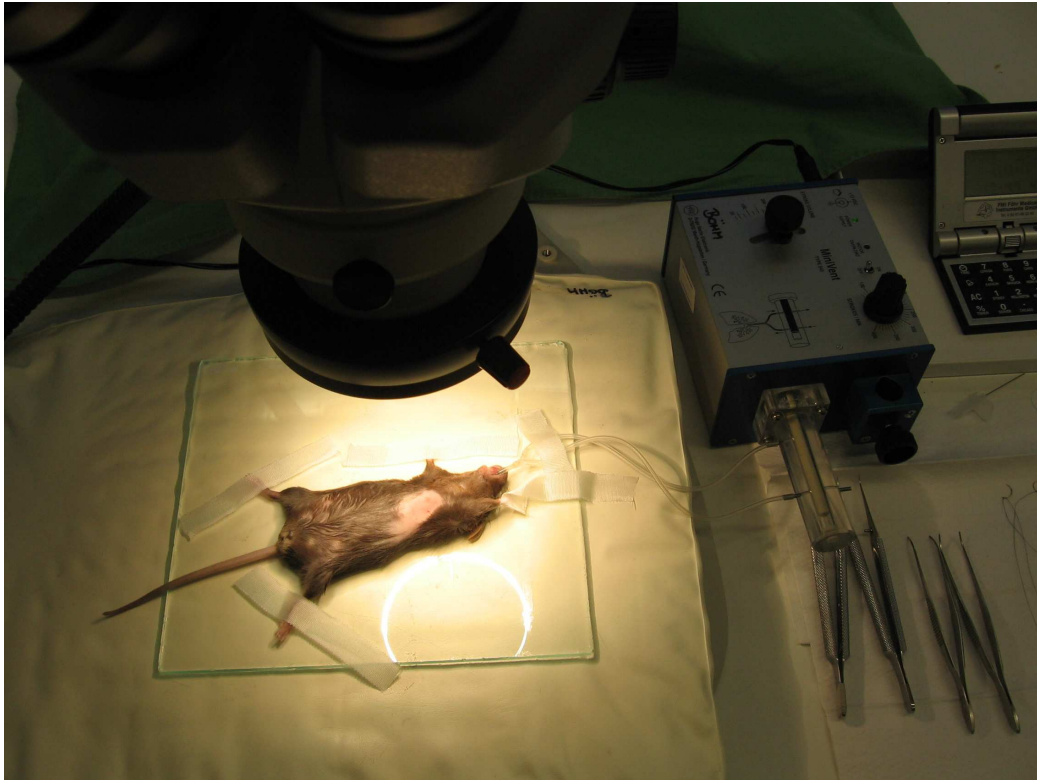


Abb. 5: Eine intubierte Maus fixiert auf dem Operationstisch.

Die Inzision erfolgte am kaudalem Rand des Brustmuskels (entspricht in etwa beim Menschen dem M. pectoralis), der wulstig hervortrat. Nach Einkerben unter dem Brustmuskel gelangte man bis zur Interkostalmuskulatur. Nach Abzählen der Rippen, trennte man die Interkostalmuskeln, in der Regel im Bereich der 2. ICR, durch. Die oberen und unteren Rippen wurden auseinander gespreizt und mit Haltefäden fixiert. Diese Exposition ermöglichte einen guten Einblick auf das Herz und die großen Gefäße. Als Orientierungshilfe diente das linke Herzohr, welches gewöhnlich bei linksseitiger anterolateralen Thorakotomie sehr gut zu sehen war. Über dem Herzohr kranial rechts befand sich der Aortenbogen. Falls der Einblick auf den Aortenbogen das substernale Fettgewebe behinderte, wurde dieses stumpf präpariert und entfernt. Nach dem Darstellen der Aorta wurde der erste Abgang, der dem menschlichen Truncus brachiocephalicus entsprechen würde, identifiziert. Das umgebende Bindegewebe dorsal des Aortenbogens wurde stumpf entfernt, so dass dieses ohne Hindernis mit einer Ligatur mittels Führungshilfe (24G Nadel) umgeschlungen werden konnte. Nach dem Umschlingen des Bogens platzierte man ein L-förmig gebogenes Stück (in unserem Fall ein Führungsdraht von einem Herzkatheter, D = 360 μ m) gegebenen Durchmessers (von ventral) auf die Aorta, so

dass das L-Stück parallel zum Bogenverlauf zu liegen kam. Anschließend knüpfte man mit der Ligatur die Aorta und das L-Stück mit vier entgegengesetzten chirurgischen Einzelknoten fest zusammen. Während dieser Zeit war die Aorta zwischen dem ersten Abgang des Aortenbogens (entsprechend dem menschlichen Truncus brachiocephalicus) und dem zweiten (entsprechend der linken Arteria carotis communis) maximal komprimiert, so dass der Blutfluss an dieser Stelle unterbunden war. Für diesen kurzen Moment erfolgte der Blutstrom über eine Umgehung, d.h. über den ersten Abgang (Truncus brachiocephalicus) zum Cranium und dort über die intracraniellen Anastomosen, und vom Kopf nach kaudal über den zweiten Abgang (linke A. carotis communis und A. vertebralis) zurück in den Aortenbogen und anschließend in die Aorta descendens zu den peripheren Organen. Somit war die Durchblutung des Gehirns und auch die der peripheren Organe auch für die kurze Zeit des Knotens gewährleistet. Danach wurde das L-Stück seitlich aus der Ligaturschlinge entfernt, wodurch der Blutfluss im Aortenbogen wiederhergestellt war. Der Grad der Stenosierung entsprach dabei in etwa dem Durchmesser des L-Stücks, also in unserem Fall etwa 360 µm. Anschließend erfolgte der Verschluss des Thorax und die Vernähung der jeweiligen Schichten. Vor dem Extubieren wurde die Lunge kurzzeitig überbläht, um die während der Operation entstandenen atelektischen Bezirke wieder zum Ventilieren zu bringen.

3.1.7. Extubation

Vier Minuten vor der geplanten Extubation wurde 0,08 ml Atropin intraperitoneal appliziert. Die Injektion des Atropins als Parasympatholytikum beschleunigte das Einsetzen der Spontanatmung, was wahrscheinlich durch die Bronchodilatation, aber möglicherweise auch durch die positive chronotrope und dromotrope Wirkung am Herzen zu erklären wäre, und verbesserte die Überlebensrate der Tiere in den ersten postoperativen Minuten. Vor dem Extubieren prüfte man den Wachheitsgrad der Tiere mittels Schutzreflexe, sobald das Tier die Schutzreflexe zeigte entfernte man den Beatmungstubus. Die Spontanatmung setzte in der Regel innerhalb der ersten zwanzig Sekunden ein. Als Analgetikum und Antiphlogistikum zur Ergänzung der Narkose wurde die Rimadyl-Lösung (0,1 ml) subkutan verabreicht. Jedes Tier wurde durch eine Wärmematte vor dem Abkühlen geschützt.

Abbruchkriterien für die Versuche waren: eitrige Infektionen, Kachexie (massiver Gewichtsverlust von mehr als 20 %) sowie struppiges Fell bei den Tieren. Solche Tiere wurden mittels einer CO₂-Narkose eingeschläfert.

3.2. Blutdruckmessung

Die hämodynamischen Veränderungen nach Ablauf von 21 oder 7 Tagen nach Aortenligatur wurden mit einem Mikro-Tip Druck-Katheter erfasst.

Die Tiere wurden wie für die oben beschriebene Operation vorbereitet:

- Narkotisiert
- Gewogen
- Intubiert
- Fixiert auf der Glassplatte in Rückenlage

Als Zugang zu der Spitze des linken Ventrikels wurde meistens 6-7 ICR links lateral gewählt. Mit der Nadel, die sich an der Spitze des Katheters befand, wurde die linke Herzkammer punktiert. Die Messung dauerte 4-6 Minuten. Die richtige Position der Nadel prüfte wurde anhand der arteriellen Druckkurve geprüft. Gleichzeitig wurden systolischer, mittlerer und diastolischer Druck (mmHg), Herzfrequenz (Bpm) sowie die Druckveränderung $dP/dt +$ und $dP/dt -$ (mmHg/s) angezeigt und aufgezeichnet. Anschließend wählten wir das repräsentative Intervall für die Messung und berechnete mit einem Programm für den TIPP-Katheter die mittleren Druck- und Herzfrequenzwerte.

Nach der Blutdruckmessung wurden die Mäuse durch einen Genickbruch getötet. Die Organe (Lungen, Leber und Herzen) wurden entnommen, makroskopisch beurteilt und gewogen. Die Herzen wurden zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3. Zubereitung des Ausgusspräparates

Um ein Ausgusspräparat anzufertigen, wurden benötigt:

- Plexiglasklebstoff - Acrifix 150 (Firma Röhm),
- 20% Verdünner Typ 32 (Firma Röhm)
- 4%tiger Katalysator
- Farbstoff

Ca. 200 µl des Gemisches wurden in die Bauchorta eines toten Tieres injiziert und über 24 h härten lassen. Anschließend wurde das Präparat in 1 M KOH Lösung für Woche eingelegt, bis sich die organischen Weichteile aufgelöst haben. Der gefärbte Plexiglasklebstoff, der Prolene-Faden sowie Knochen waren KOH-resistent. Anschließend zeigte das fertige Präparat die Gefäßen und Herzhöhlen des Tieres, die mit gefärbtem Plexiglasklebstoff ausgefüllt waren(Abb. 6).

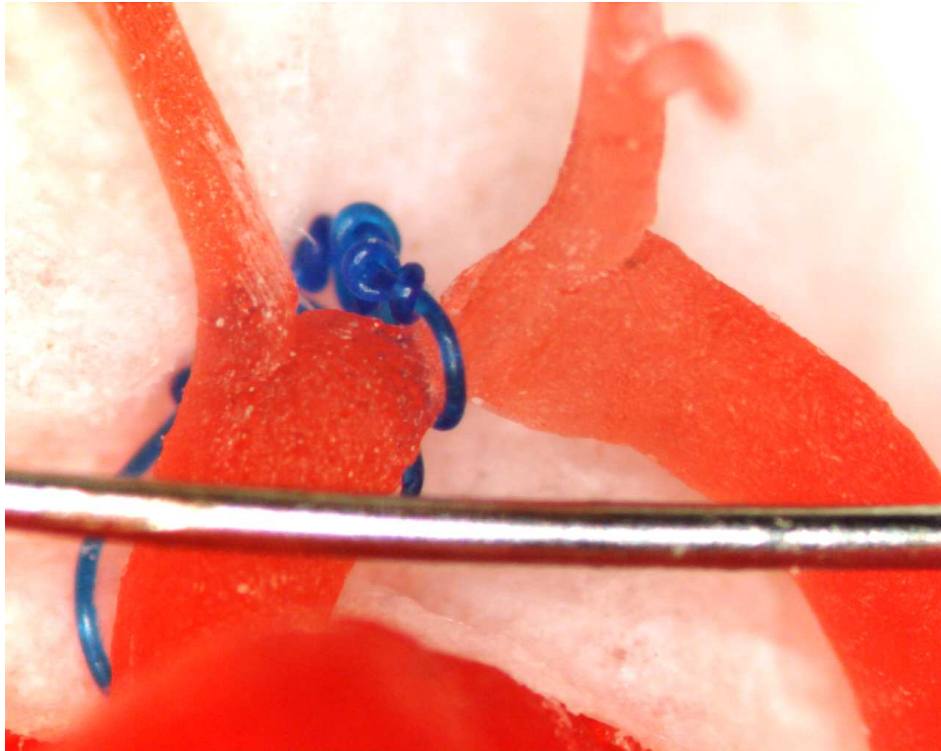


Abb. 6: Ausgusspräparat des Aortenbogens eines gebänderten Tieres. Zentral Knoten aus Prolene-Faden zwischen den ersten und zweiten Abgang des Aortenbogens, unten ein Stück vom Herzkatheterführungsdraht (360 μm).

3.4. Proteinexpression und Western Blot

Der Western Blot stellt eine molekularbiologische Methode dar, mit der eine quantitative Protein-Bestimmung möglich ist. Dazu wird aus Zellen das Gesamtprotein gewonnen und gelelektrophoretisch aufgetrennt, um Proteine unterschiedlicher Größe zu separieren. Das Gesamtprotein wird vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Blot) und mit einem spezifischen Antikörper (gegen das gesuchte Protein) inkubiert. Nach Abwaschen der ungebundenen Antikörperfragmente wird mit einem zweiten Antikörper, welcher Peroxidase konjugiert ist, inkubiert. Nach erneutem Abwaschen wird ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben, welcher durch die Peroxidase katalysiert wird und zu fluoreszieren beginnt. Die Fluoreszenz wird mit Hilfe eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht und das Signal durch Densitometrie quantifiziert.

3.4.1. Proteinisolation

Um die Proteinexpression bestimmen zu können, wurden die Zellen mit Hilfe eines Lysepuffers (0,1 M Tris, pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerol, Leupeptin 1µg/ml, Aprotinin 1µg/ml) von den Kulturschalen abgeschabt. Das gewonnene Gesamtlysate wurde 4 Minuten bei 95°C erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu gewährleisten.

3.4.2. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung des Gesamtlysates aus glatten Gefäßmuskelzellen erfolgte nach der Methode von LOWRY et al., (1951), eine der Biuret-Methode verwandten, kolorimetrischen Methode. Im ersten Schritt wird ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet (Biorad[®], D_C Protein Assay Reagent A). Dieser Komplex reduziert dann ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagens; Biorad[®], D_C Protein Assay Reagent B), wobei sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration intensiv blau färbt. Die Absorption der Lösung wurde bei 540 nm photometrisch gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100 - 1000 µg/ml.

3.4.3. Gelelektrophorese

Um die Konzentration des interessierenden Proteins bei verschiedenen Versuchsbedingungen vergleichen zu können, wurden jeweils 25 µg des Gesamtlysates auf ein Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde ein 10% SDS-Polyacrylamidgel verwendet. Die Elektrophorese wurde in Anwesenheit eines β-Mercaptoethanolpuffers (5 % β-Mercaptoethanol, 20 % Glycerol, 20 % 10%-es SDS, 2,5 % Bromphenol Blau) durchgeführt.

3.4.4. Protein-Transfer

Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte mit Hilfe eines Transfer-Puffers (20 % Methanol, 14,5g/l Glycin, 2,9 g/l Trizma[®]) und Filtern sowie der Semi-Dry-Transfer-Cell von Biorad[®].

3.4.5. Antikörperinkubation

Um die unterschiedliche Proteinexpression auf den so hergestellten proteinbeladenen Nylonmembranen untersuchen zu können, wurden sie mit einem monoklonalen Rabbit-Rac1-Antikörper (sc-217, 1:250 Verdünnung; Santa Cruz Biotechnology INC., Santa Cruz, CA) für 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Die nichtgebundenen Antikörperfragmente wurden mit PBS-Tween-Puffer (8 g/L NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,24 g/l KH₂PO₄, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 1 ml/l TWEEN) abgewaschen. Danach wurden die Membranen mit einem peroxidasekonjugiertem Goat-Anti-Rabbit-Antikörper (1:4000 Verdünnung, 30 Minuten, Raumtemperatur; Sigma Deutschland) inkubiert. Die ungebundenen Fragmente wurden ebenfalls mit PBS-Tween abgewaschen. Die an die Proteinbanden gebundenen Fragmente wurden mit dem ECL-Kit (enhanced chemiluminescence) von Amersham auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht und densitometrisch quantifiziert.

3.5. GST-Fusions-Pull-Down-Assay

GST-Fusionsproteine (in unserem Fall Pak 1B) binden mit ihrer GTPase binding domain (GBP, für Pak 1B aa 56-141) mit sehr hoher Affinität an ihre jeweilige GTPase (Rac). Diese Eigenschaft der Downstream-Effektor-Moleküle wird beim GST-Fusions-Pull-Down-Assay genutzt, um direkt und selektiv den Aktivierungslevel von kleinen G-Proteinen zu bestimmen. Die Fusionsproteine werden in *E. coli* exprimiert und anschließend isoliert, um dann die jeweilige GTPase auszufällen. Dazu wird gereinigtes Zellysat mit den spezifischen GST-Proteinen inkubiert, welche die geeignete GTPase binding domain enthalten. Da diese zuvor an Glutathion-Sepharose gebunden wurden, lassen sich nun die GTP-gebundenen Formen der kleinen G-Proteine problemlos herauszentrifugieren. Danach werden die Proben gewaschen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des Western Blots analysiert.

3.5.1. Präparation der GST-Fusions-Proteine

Zuerst wurden die *E. coli* Bakterien (je eine Pipettenspitze) über Nacht in 50 ml LBamp-Medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Hefe + 50 µl Ampillicin) pro

Bedingung bei 37°C und 130 U/min wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurde das Medium 1:10 verdünnt und die Bakterien für eine weitere Stunde wachsen gelassen. Die GST-Fusions-Protein Produktion wurde durch die Zugabe von 50 µl 1 M IPTG (Endkonzentration: 0,1 mM) für zwei Stunden in Gang gesetzt. Danach wurde die Suspension für 5 Minuten, mit 4500 Umdrehungen bei 4°C in einer Heräus Megafuge R 2.0 zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 10 ml Bacterial-Lysispuffer (20 % Sucrose, 10 % Glycerol, 50 mM Tris pH 8,0, 0,2 mM Na₂S₂O₅, 2 mM MgCl₂, 2 mM DTT) resuspendiert. Die Suspension wurde für 5 Minuten zur weiteren Lyse ins Ultraschallbad gelegt und anschließend 30 Minuten mit 4500 Umdrehungen bei 4°C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde für 30 Minuten mit 1 ml 50 % Glutathion-Sepharose-Slurry (2 ml PBS + 2 ml Glutathion-Sepharose) bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (3000 U/min, 4°C, 5 Minuten) wurde der Überstand verworfen und das entstandene gelartige Pellet dreimal mit Bacterial-Lysispuffer gewaschen (5 Minuten, 4°C, 3000 U/min). Das Glutathion-Sepharose-Pellet wurde in 500 µl GST-Fish-Puffer (10 % Glycerol, 50 mM Tris pH 7,4, 100mM NaCl, 1 % NP-40, 2 mM MgCl₂) resuspendiert.

3.5.2. Pull Down Proteine

Pro Bedingung wurde eine 15 cm Schale mit glatten Gefäßmuskelzellen verwendet. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und fünf Minuten bei 4°C mit GST-Fish-Puffer inkubiert. Danach wurden sie auf Eis abgeschabt und für 5 Minuten bei 4°C und 1.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem oben gewonnenen Glutathion-Sepharose-GST-Protein-Komplex inkubiert (30 Minuten, 4°C). Nach erfolgter Zentrifugation (5 Minuten, 4°C, 3000 U/min) wurde das Pellet in GST-Fish-Puffer dreimal gewaschen (5 Minuten, 4°C, 3000 U/min) und anschließend in 200 µl Proteinlysispuffer (siehe Proteinisolation) aufgenommen.

3.5.3. Analyse

Die Proben wurden wie im Kapitel Western Blot beschrieben, gelelektrophoretisch getrennt und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers analysiert.

3.6. NAD(P)H-Oxidase activity Assay

Die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase wurde mit einem Lucigenin verstärkten chemiluminiscenten Assay in einem Puffer B, welches (in mmol/l) Phosphat 50 (pH 7,0), EGTA 1, Protease Hemmer (Complete®, Roche), Saccharose 150, Lucigenin 0,005 und NAD(P)H 0,1 enthält, gemessen. Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Teflonhomogenisator in eiskaltem Puffer ohne Lucigenin und Substrat lysiert. Die Gesamtproteinkonzentration wurde auf 1 mg/ml angepasst. Das Lysat vom linksventikulären Myokard wurde in An- und Abwesenheit vom Atorvastatin, 1µmol/l, 10 Minuten lang bei 37°C inkubiert. 100µl des zubereiteten Proteins wurde über 10 Minuten unter Verwendung von NAD(P)H als Substrat in Scintillationszähler mit einem Intervall von 1 Minute gemessen.

3.7 Sirius-Red-Färbung

3.7.1. Sirius-Red-Lösung

32 ml destillierten Wasser werden mit gesättigter wässriger Pikrinsäure (12%) bis auf 500 ml vermischt. Dazu werden 0,5 g Sirius Red Farbstoff gegeben, verrührt und über Nacht stehen gelassen.

3.7.2. Sirius-Red-Färbung

Objektträger mit Paraffinschnitten wurden für 20 Minuten bei 70° C aufgewärmt. Das verflüssigte Paraffin wurde durch Eintauchen in Xylol jeweils 10 Minuten lang dreimal abgewaschen. Danach wurden die Objektträger in Ethanol-Lösungen verschiedener Konzentrationen (100%, 90%, 70%, 30%) jeweils 2-5 Minuten dehydriert und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Gefärbt wurden die Präparate 1 Stunde lang in 0,1 % Sirius Red Lösung. Rehydrierung erfolgte durch Eintauchen in Ethanol (90%,100%) und schließlich Xylol. Anschließend wurden die Kollagengewebeschichten mit Entellan-Lösung gedeckt und die Deckgläser auf den Objektträger befestigt.

3.8. Immunfärbung für α -sarkomerisches Aktin

Die Mäuseherzen wurden in das Paraffin eingebettet. Nach dem Zuschneiden wurde das Paraffin entfernt. Zu den Präparaten wurde Citrat-Puffer zugeführt. Dann stellte man sie in die Mikrowelle bei 560 Watt für 10 Minuten. Die Blockade erfolgte mit 4 % BSA und 4xSSC 10 Minuten lang im Wasserbad bei +37°C. Die Antikörper wurden gegen quergestreiften Aktin 1:50 mit der Blockadelösung aufgelöst, anschließend erfolgte die Inkubation der Präparaten mit diesen in einer Feuchtekammer im Kühlschrank bei + 4° C über Nacht. Abwaschen erfolgte mit 4xSSC. Zu den vorgefertigten Präparaten wurden Anti-Maus-IgM-TRITC-Antikörper 1:30 mit 4xSSC verdünnt pipetiert. Anschließend inkubierte man sie in der Feuchtekammer in einem Wasserbad bei 37°C eine Stunde lang, danach erfolgte erneutes Abwaschen mit 4SSC. Zum Schluss wurden die Präparate mit DAPI (1:50) in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur gefärbt. Die Präparate wurden mit dem Fluoreszenz-Medium eingedeckt.

3.9. Auswertung

3.9.1. Densitometrien und Fotografien

Alle Autoradiogramme wurden mit dem Programm PRISM ausgewertet. Die Fotografien dieser Arbeit wurden mit Hilfe des UVP ImageStore 7500-Systems (Sony) erstellt. Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele wurden über UV-, Autoradiogramme über weißem Durchlicht (UVP White / UV Transluminator) mit der Videokamera des Systems fotografiert und die Fotos als TIFF-Dateien auf Diskette gespeichert.

3.9.2. Statistik

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels des ANOVA-Testes bestimmt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

3.10. Verwendete Substanzen

Acrylamid, Bio Rad, München

Ammoniumacetat, E. Merck, Darmstadt

Ampicillin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Anti-Maus-IgM-TITC-Antikörper, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Aprotinin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Bromphenolblau, E. Merck, Darmstadt

Collagenase (Typ I), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Cytosintriphosphat (CTP), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

5,6-Dichlorobenzimidazol (DRB), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Denhardt's Solution, E. Merck, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt

Dithiothreitol (DTT), Ambion, Austin

Dodecylsulfat (SDS), E. Merck, Darmstadt

Dublecco's modifiziertes Eagle Medium (ohne Natriumpyruvat, mit 4500 mg/l Glucose) Gibcco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

Dublecco's modifiziertes Eagle Medium (Ohne Phenol und Östrogen), Gibcco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

Genestein, Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden

Glukose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Glycerol, Serva, Heidelberg

Glycin, Serva, Heidelberg

Dup753, Dupont

EGTA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Ethanol, E. Merck, Darmstadt

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Fetales Kälberserum (FKS), Böhringer, Mannheim

Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagens, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Formaldehyd, E. Merck, Darmstadt

Formamid, Carl Roth GmbH + Ko, Karlsruhe, Deutschland

FURA-2/AM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Goat-Anti Mouse IgG, Biotin-konjugiert, Dianova

Guanosintriphosphat (GTP), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Hefeextrakt, Difco, Detroit
Hyperfilm™MP, Amersham Buchler GmbH & Co.KG, Braunschweig
ICI 182780, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Igepal Ca-630, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol, E. Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid, E. Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid, E. Merck, Darmstadt
LY 294002, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Magnesiumacetat, E. Merck, Darmstadt
M2-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt
Methanol, Riedel-De Hën, Seelze
Mineralöl, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
M-MLV Reverse Transkriptase, Life Technologies, Eggenstein
Monoclonal Anti α -sarkomerisches Actin-IgM-Antikörper, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Monoklonaler Rabbit-Rac1-Antikörper, Santa Cruz Biotechnology INC., Santa Cruz, CA
Morpholinopropan-Sulfonsäure (MOPS), E. Merck, Darmstadt
N,N,N`N`-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Bio Rad, München
Natriumacetate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumchlorid, Carl Roth GmbH + Ko, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat, E. Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS), Serva, Heidelberg
NucTrap Columns, Stratagene GmbH, Heidelberg
17 β -Östradiol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Pankreas-Elastase, Serva Feinbiochemica, Heidelberg
PD 98059, Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Penicillin/Streptoverdinlösung, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Pertussitoxin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Deisenhofen
Piperazin-N` (2-Ethan)-Sulfonsäure (HEPES), Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Deisenhofen
Rinderalbumin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Salzsäure, Merck, Darmstadt
SB 203580, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Sodium Acetate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Succrose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tobramycin, Lilly, Gießen
Tryptone, Difco, Detroit
Tween, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Uridintriphosphat (UTP), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Vectashield Mounting Medium für Fluoreszenz; Linaris, Germany

4. Ergebnisse

4.1. Druckinduzierte Myokardhypertrophie

Die Aortenligatur erzeugte die Entwicklung einer konzentrischen linksventrikulären Hypertrophie in Mäuseherzen. Es wurden vier Versuchsreihen durchgeführt, insgesamt wurden 193 Tieren operiert, 118 Tiere haben die Operation erfolgreich überstanden. Die hohe Sterblichkeit war durch die Etablierung der Methode begründet. Gegen Ende des Projektes konnte die Sterblichkeit auf ca. 10% reduziert werden. Die mittlere Operationsdauer betrug ca. 30 Minuten.

Die Einteilung der Versuchstiere erfolgte in drei Gruppen:

SHAM-Gruppe, TAC-Gruppe (nur Aortenligatur) und die TAC + Atorvastatin-Gruppe (Aortenligatur plus Atorvastatin). Die Atorvastatin-Gruppe erhielt 2mg/kg/KG und 0,2 mg/kg/KG per os mit Hilfe einer Knüpfkanüle verabreicht. Die Atorvastatin-Gabe wurde 3 Tage präoperativ begonnen und anschließend 21 oder 7 Tage postoperativ weitergeführt. Die Mäuse der Kontrollgruppen erhielten per os das Lösungsmittel DMSO, in den gleichen Mengen pro kg/KG wie die TAC + Atorvastatin-Gruppe.

4.1.1. Druckinduzierte Zunahme des Herzgewichts

Makroskopisch erzeugte die Aortenligatur eine deutliche Zunahme der Herzgröße. Die Abb. 7 zeigt links das Herz einer Maus nach 21 Tagen SHAM-Operation, welches ein Gewicht von 0,078 g aufweist, rechts nach 21 Tagen TAC (Aortic banding), welches ein Gewicht von 0,194 g hat.

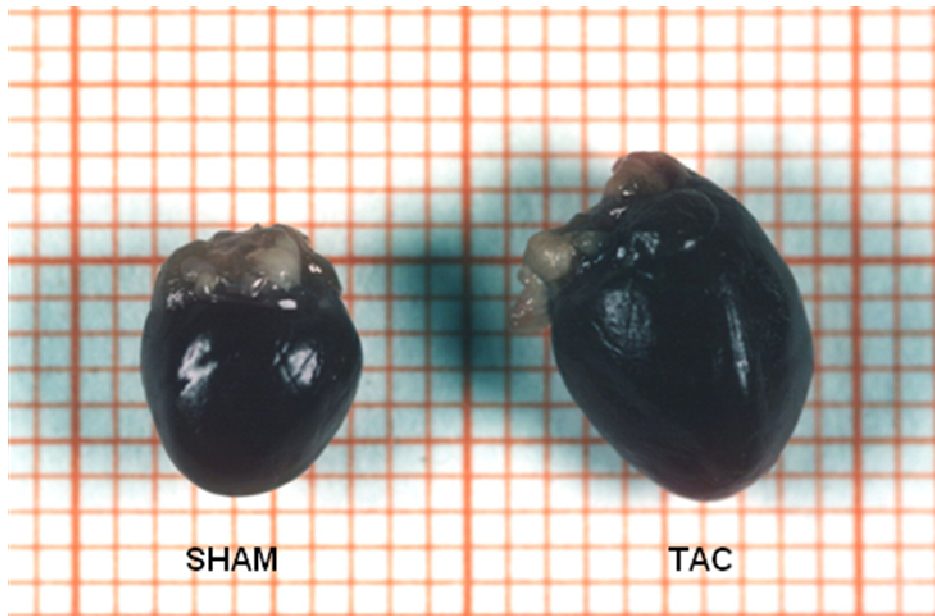


Abb. 7: Druckinduzierte Myokardhypertrophie, C67/Bl6; thorakale Aortenligatur (TAC), 360 μ m, 21 Tagen, SHAM vs. TAC.

Schon nach Ablauf von 7 Tagen zeigten die Herzen eine deutliche Hypertrophie mit den Höchstgewichten in der TAC-Gruppe von $0,118 \pm 0,0087$ g. Der gegenüber wies die SHAM-Gruppe die kleinsten Herzgewichte mit $0,079 \pm 0,0037$ g. Die TAC+Atorvastatin-Gruppe hatte mit $0,097 \pm 0,0028$ g ebenfalls niedrigere Herzgewichte als die TAC-Gruppe (Abb. 8), aber schwerer als die SHAM-Gruppe.

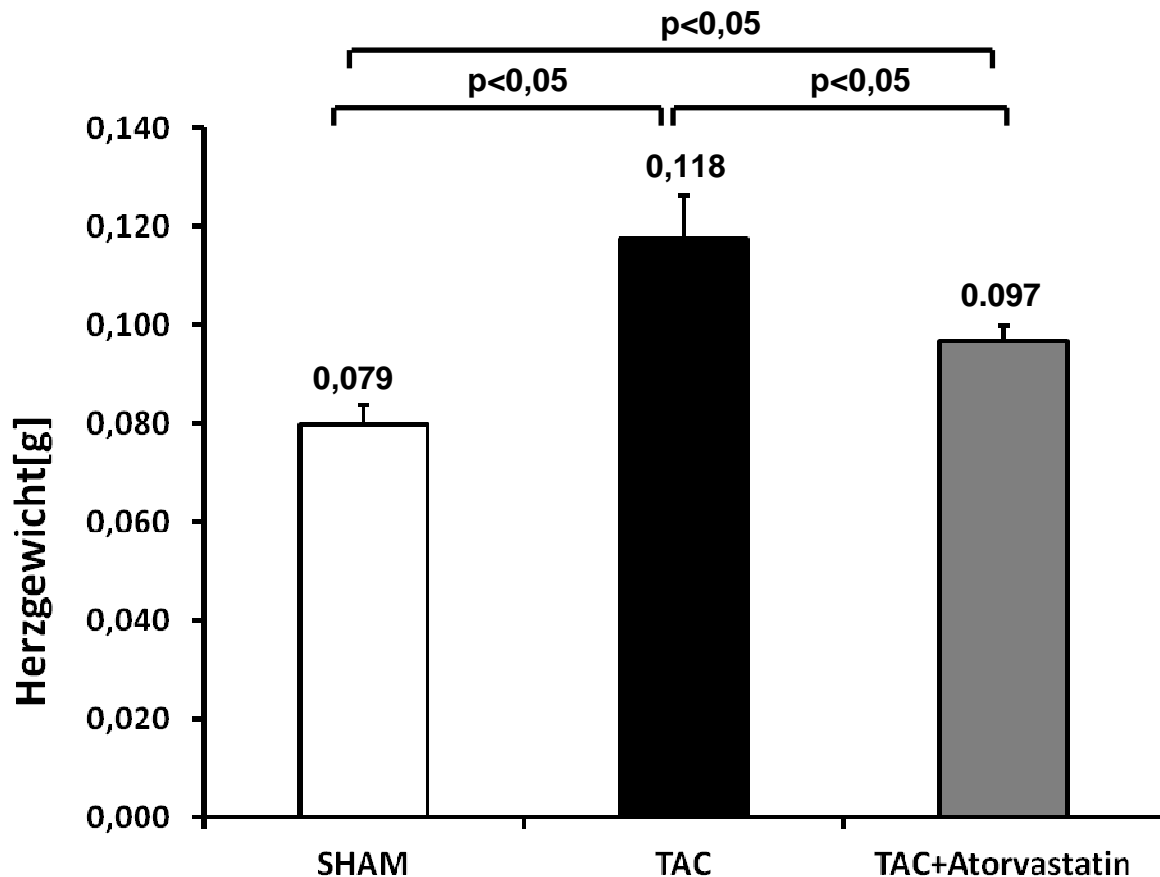


Abb. 8: Herzgewicht [g] nach 7 Tagen TAC (Aortic banding), C67/BI6. TAC führt zur signifikanten Zunahme des Herzgewichts. Behandlung mit Atorvastatin vermindert die Zunahme des Herzgewichts, und zeigt signifikanten Unterschied sowohl zu SHAM als auch zu TAC-Gruppe. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin nach transverse aortic constriction. n(SHAM)=5, n(TAC)=5, n(TAC+Atorvastatin)=7.

Wir fassten die drei Versuche, die 21 Tage dauerten, zusammen, da alle drei Versuchsreihen unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden: die Tiere waren 6-10 Wochen alt, wurden 3 Tagen präoperativ mit 2 mg/kg/KG Atorvastatin bzw. Lösungsmittel vorbehandelt, wurden in der gleichen Umgebung gehalten und erhielten dasselbe Futter.

Auch nach 21 Tagen war die durchschnittliche Herzmasse in der TAC-Gruppe mit $0,17 \pm 0,01$ g gegenüber der SHAM-Gruppe mit $0,10 \pm 0,003$ g ($p < 0,01$) wesentlich höher. Die mit Atorvastatin behandelten Mäuse lagen mit ihrem mittleren Herzgewichten von $0,14 \pm 0,01$ g zwischen beiden Kontrollgruppen und zeigten signifikante Unterschiede zu beiden (Abb. 9)

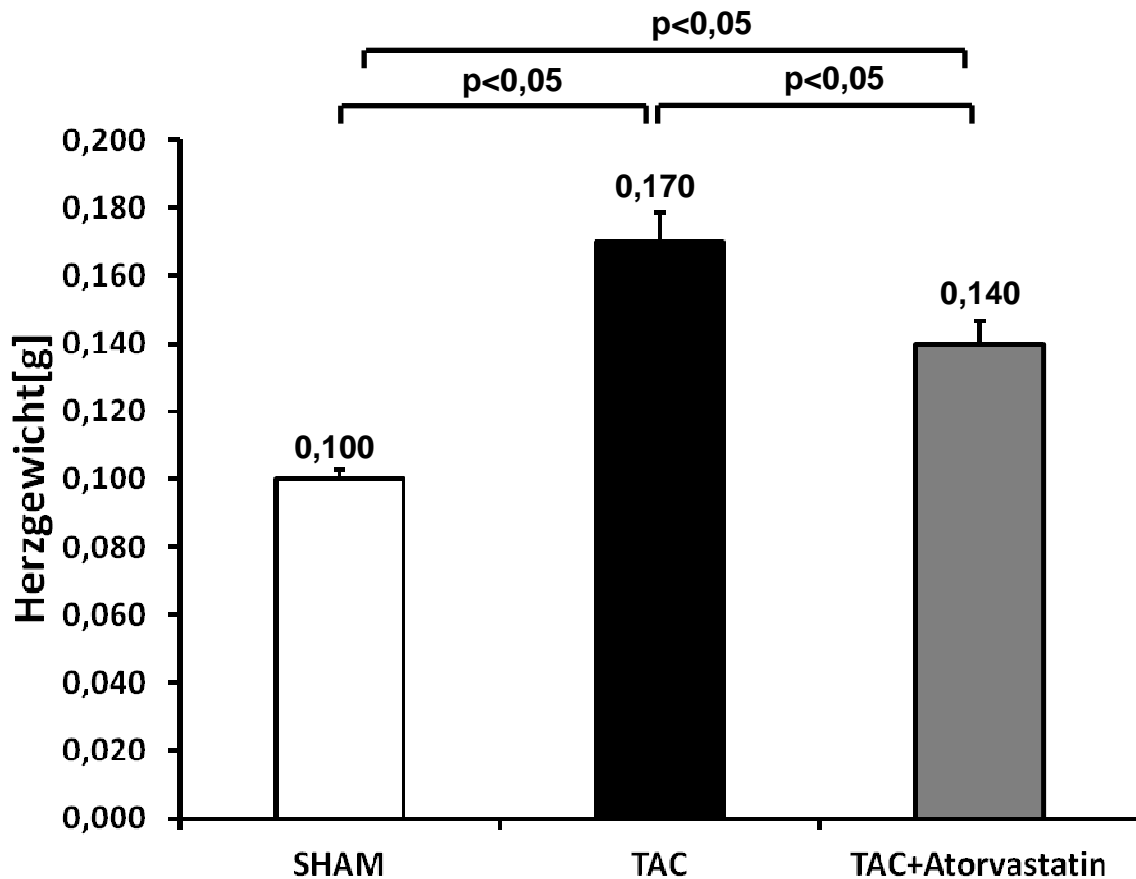


Abb. 9: Herzgewicht [g] nach 21 Tagen TAC(Aortic banding), C67/Bl6. Nach 21 Tagen TAC kommt es zu weiteren Zunahme des Herzgewichts in der TAC-Gruppe. Behandlung mit Atorvastatin vermindert immer noch die Zunahme des Herzgewichts signifikant. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin nach transverse aortic constriction. n(SHAM)=15, n(TAC)=18, n(TAC+Atorvastatin)=21.

4.1.2. Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht nach Aortenligatur

Als indirektes Zeichen der Hypertrophie nahm der prozentuale Herzanteil am Körpergewicht schon nach 7 Tagen in der TAC-Gruppe mit $0,69 \pm 0,06\%$ deutlich zu. Die niedrigste Zunahme des Herzanteils zeigte die SHAM-Gruppe mit $0,43 \pm 0,02\%$. Die TAC + Atorvastatin-Gruppe lag mit $0,50 \pm 0,02\%$ wieder zwischen den beiden Kontrollgruppen. Alle drei Gruppen waren untereinander signifikant(Abb.10).

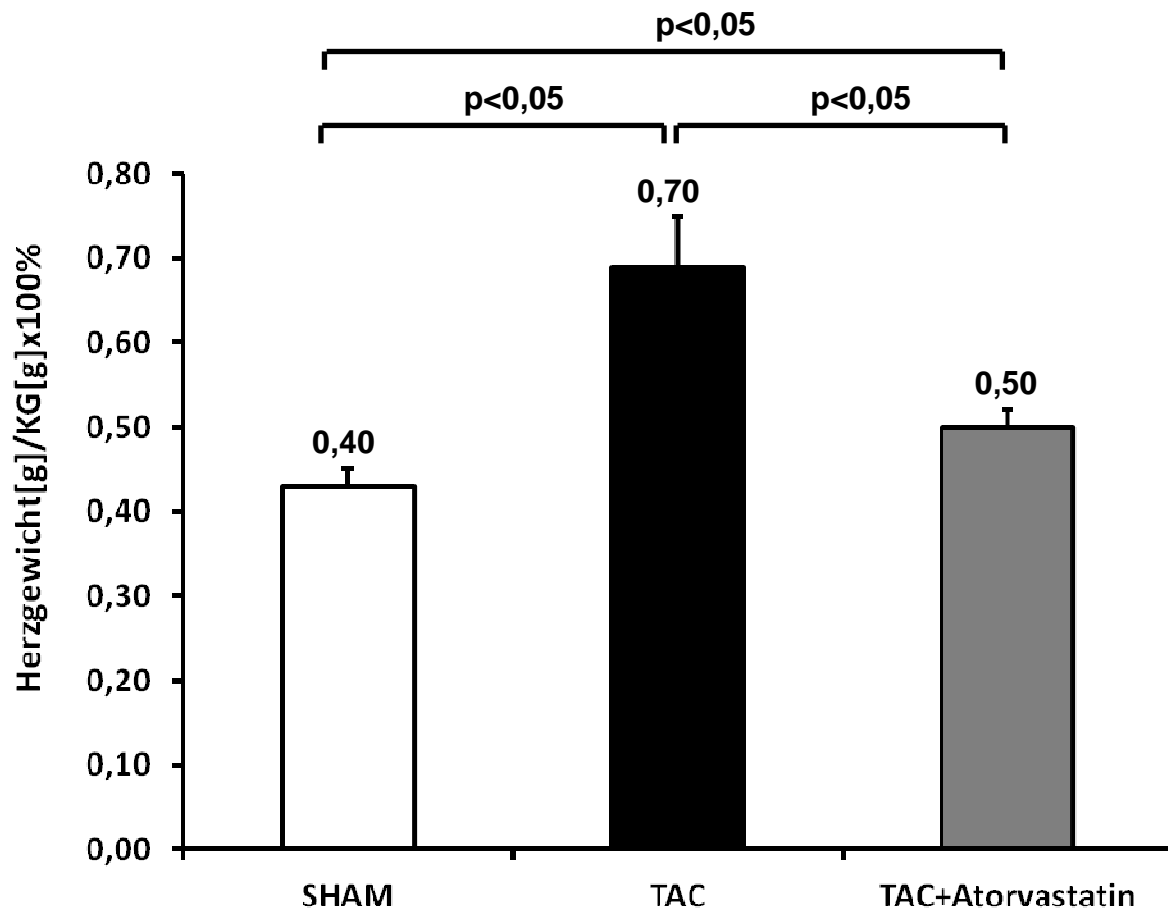


Abb. 10: Relation Herzgewicht/Körpergewicht [%] nach 7 Tagen TAC, C67/Bl6. TAC führt nach 7 Tagen zur Zunahme des prozentuellen Anteils des Herzens am Körpergewicht. Atorvastatin vermindert diese Zunahme signifikant. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin nach transverse aortic constriction. $n(\text{SHAM})=5$, $n(\text{TAC})=5$, $n(\text{TAC+Atorvastatin})=7$.

Nach Ablauf der 21 Tage blieb das Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht mit $0,70 \pm 0,04$ % in der TAC-Gruppe am höchsten, gefolgt von der Atorvastatin-Gruppe mit $0,60 \pm 0,03$ %, die eine Zunahme um 0,1% gegenüber dem 7-Tage-Versuch zeigte. Am niedrigsten war dieses Verhältnis in der SHAM-Gruppe mit $0,40 \pm 0,01$ %, das sowohl nach 7 als auch 21 Tagen konstant blieb (Abb. 11).

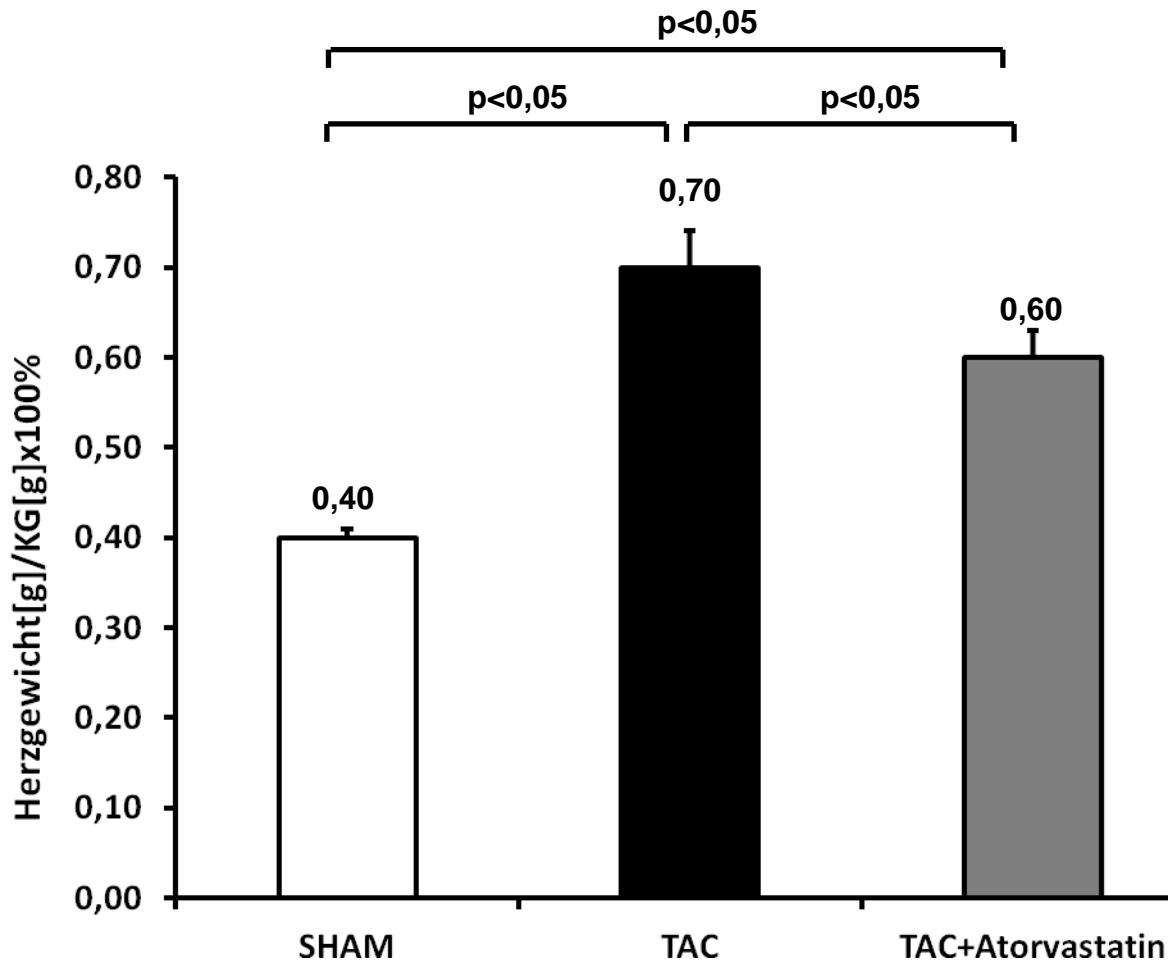


Abb. 11: Relation Herzgewicht/Körpergewicht [%] nach 21 Tagen TAC, C67/Bl6. Nach 21 Tagen TAC ist der prozentuale Anteil des Herzgewichts an Körpergewicht immer noch hoch im Vergleich zur SHAM-Gruppe. Atorvastatin vermindert die Zunahme des Herzgewicht/Körpergewicht signifikant. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin nach transverse aortic constriction. n(SHAM)=15, n(TAC)=18, n(TAC+Atorvastatin)=21.

4.1.3. Mikroskopischer Nachweis der Myokardhypertrophie

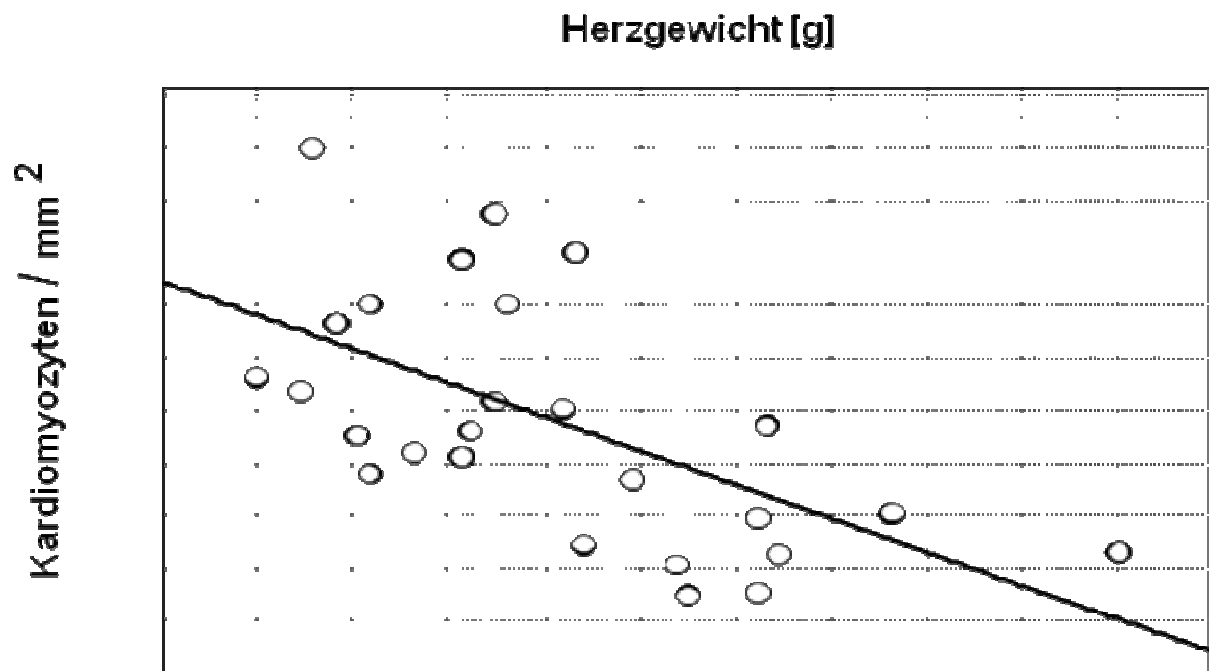


Abb. 12: Korrelation zwischen Kardiomyozytenzahl/mm² und Herzgewicht [g] , R=-0,67, p=0,0001.

Die Myokardhypertrophie ist mit Abnahme der Kardiomyozytenzahl pro mm² charakterisiert. Die Abbildung 12 zeigt eine negative Korrelation zwischen der Kardiomyozytenzahl pro mm² und dem Herzgewicht, d.h. je ausgeprägter Hypertrophie ist desto weniger Kardiomyozyten pro mm² gibt es zu sehen.

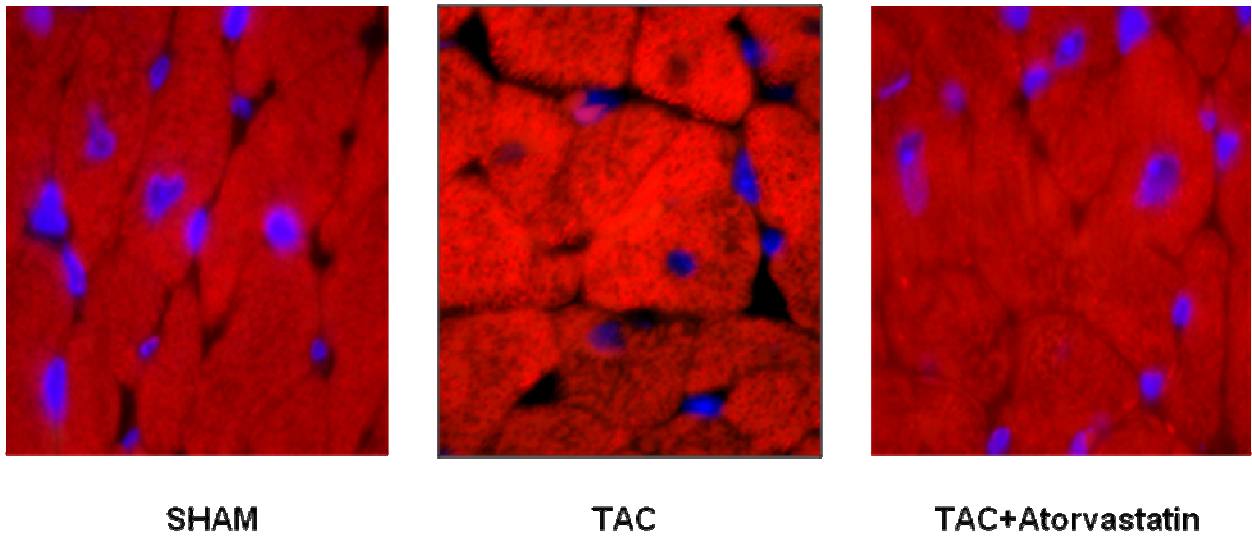


Abb. 13: Größenzunahme der Kardiomyozyten nach 21 Tagen TAC, C57/Bl6, α -sarkomerisches Actin in rot, Zellkerne in blau (DAPI). Die TAC-Gruppe zeigt niedrigste Kardiomyozytenzahl pro mm^2 . TAC+Atorvastatin und SHAM-Gruppen zeigen höhere Kardiomyozytenzahlen pro mm^2 als TAC-Gruppe. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin nach transverse aortic constriction.

Nach Immunfärbung des α -sarkomerischen Actins wurde auch mikroskopisch eine deutliche Größenzunahme der Kardiomyozyten in der TAC-Gruppe beobachtet (Abb. 13), deren Kardiomyozytenoberfläche mit $308,13 \mu\text{m}^2$ mehr als doppelte der Kardiomyozytenoberfläche in der SHAM-Gruppe ($130,27 \mu\text{m}^2$) ausmachte. Die TAC+Atorvastatin-Gruppe lag mit der durchschnittlichen Kardiomyozytenoberfläche bei $181,87 \mu\text{m}^2$ etwas über die SHAM-Gruppe. Die Unterschiede der Kardiomyozytenoberflächen aller drei Gruppen waren untereinander hochsignifikant.

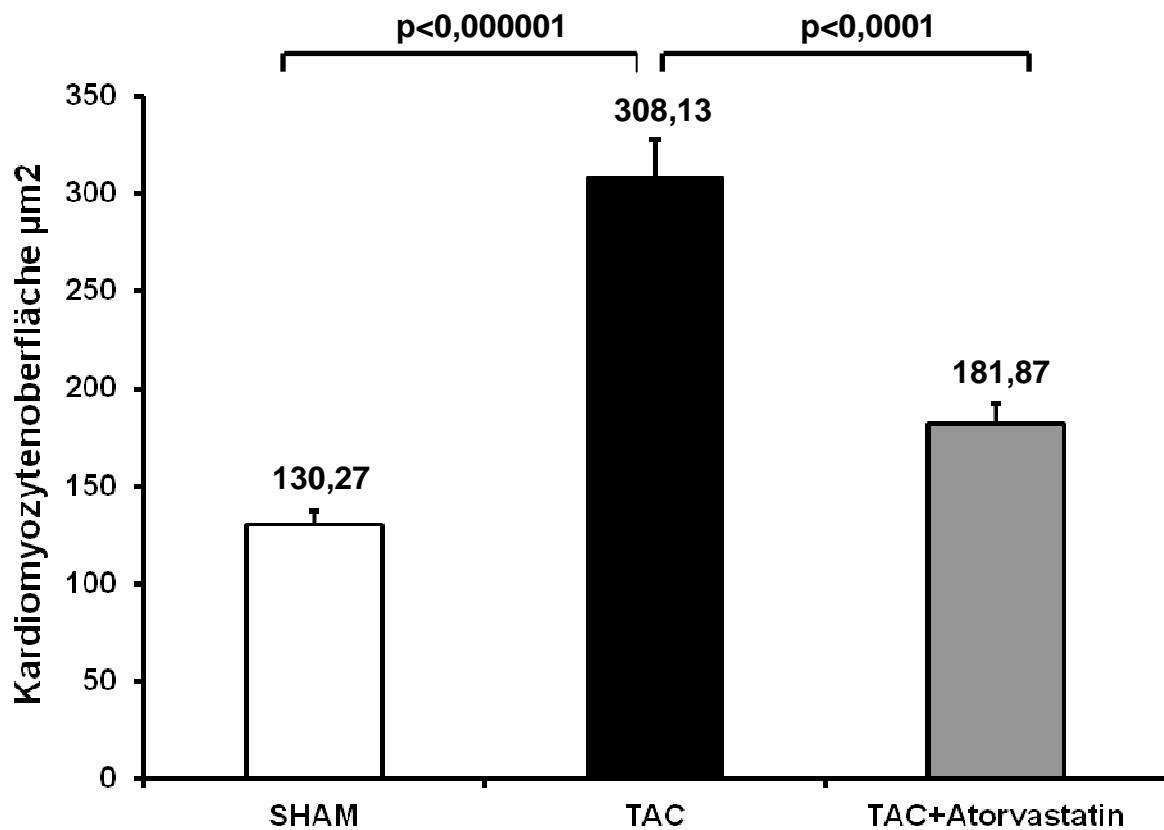


Abb.14: Kardiomyozytenoberfläche in μm^2 nach 21 Tagen TAC, C57/Bl6. Kardiomyozyten in der TAC-Gruppe zeigen die größte Oberfläche als Ausdruck der Hypertrophie (308,13 μm^2), die TAC+Atorvastatin-Gruppe zeigt mit 181,87 μm^2 fast nur halb so großen Kardiomyozyten wie TAC-Gruppe, und in der SHAM-Gruppe sind die Kardiomyozyten mit 130,27 μm^2 am kleinsten, wobei zwischen den SHAM und TAC+Atorvastatin-Gruppe kein signifikanter Unterschied besteht. $n(\text{SHAM})=15$, $n(\text{TAC})=18$, $n(\text{TAC+Atorvastatin})=21$.

4.1.4. Systolische Druckverhältnisse im linken Ventrikel invasiv gemessen

Schon nach 7 Tagen des Aortic banding kam es zu einer signifikanten systolischen linksventrikulären Druckdifferenz vom 40 mmHg zwischen TAC und SHAM-Gruppen, die jeweils 94 ± 15 mmHg und 54 ± 4 mmHg ausmachten. Der systolische linksventrikuläre Druckanstieg auf 78 ± 2 mmHg wurde auch bei den mit Atorvastatin behandelten Tieren beobachtet. Der linksventrikuläre systolische Druck in der TAC+Atorvastatin-Gruppe zeigte aber keinen signifikanten Unterschied zu der TAC-Gruppe (Abb.15).

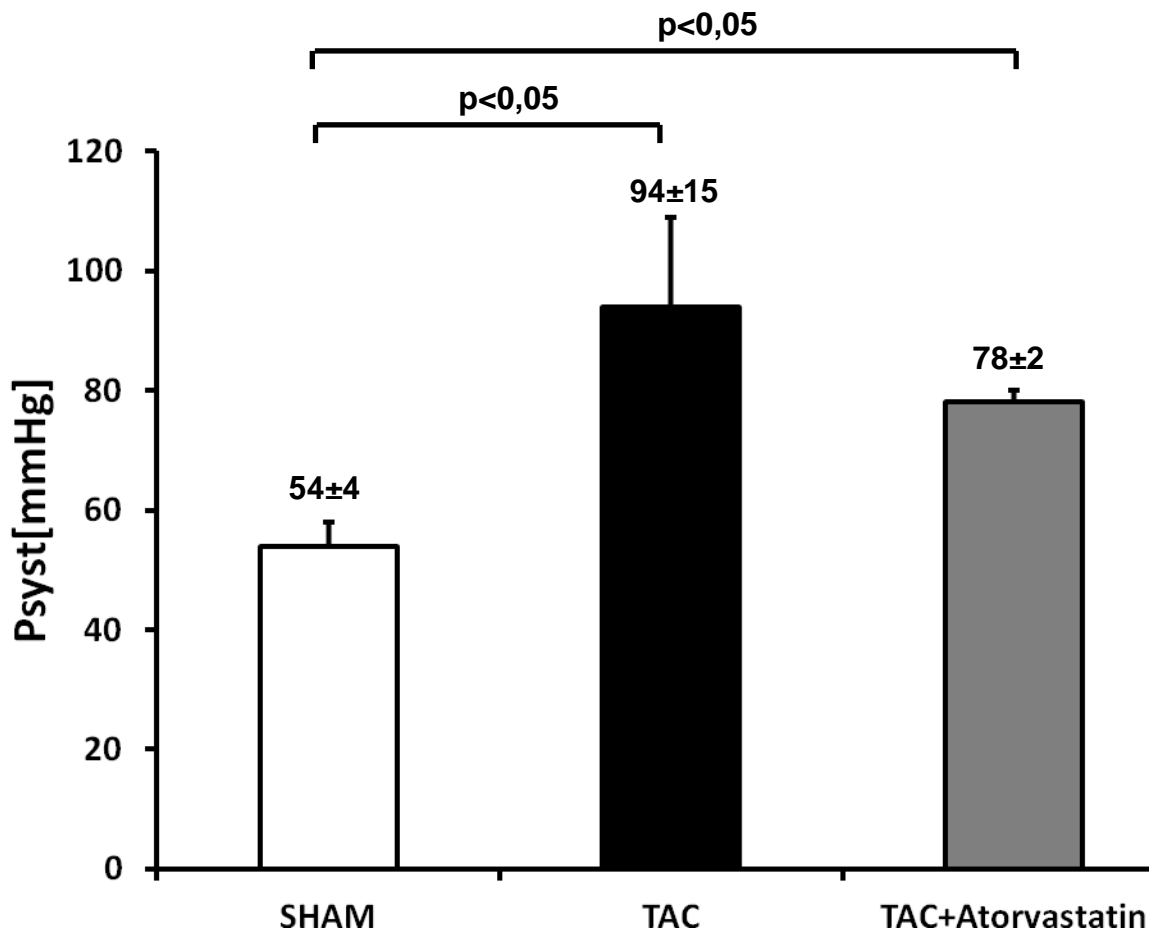


Abb. 15: Systolischer Blutdruck nach 7 Tagen thorakaler Aortenligatur (TAC), C67/Bl6. TAC führt zur signifikanten Steigung des linksventrikulären systolischen Drucks. Die TAC+Atorvastatin-Gruppe zeigt ebenfalls ein Anstieg des linksventrikulären systolischen Drucks. Die Unterschiede zwischen den beiden TAC-Gruppen sind nicht signifikant. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin nach transverse aortic constriction. n(SHAM)=5, n(TAC)=5, n(TAC+Atorvastatin)=7.

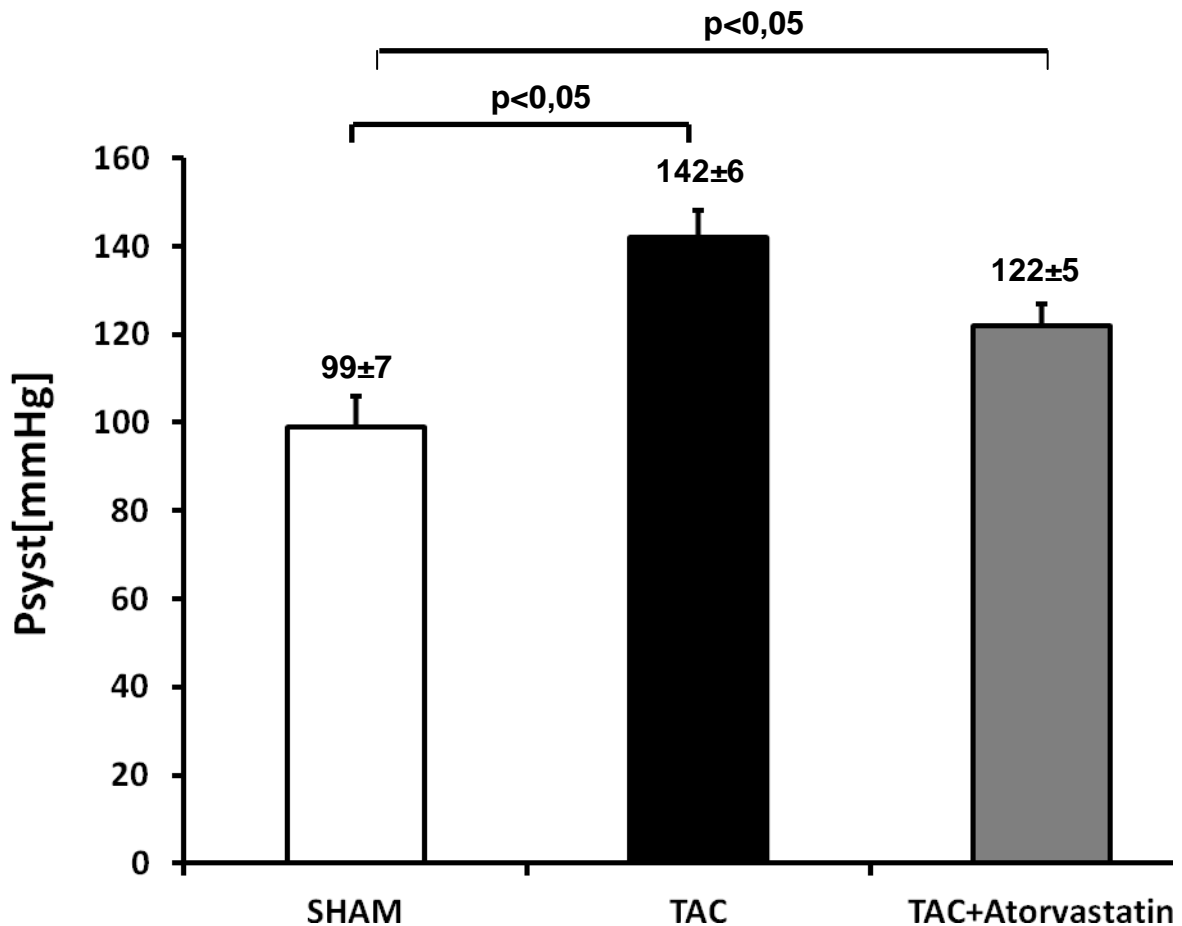


Abb. 16: Systolischer Blutdruck nach 21 Tagen thorakaler Aortenligatur (TAC), C67/Bl6. Nach 21 Tagen kommt es zu weiteren linksventrikulären systolischen Druckanstieg in der TAC-Gruppe. In der TAC+Atorvastatin-Gruppe beobachtet man ebenfalls weiteren Anstieg des linksventrikulären systolischen Drucks. Die Druckunterschiede in den beiden Gruppen bleiben immer noch nicht signifikant. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin nach transverse aortic constriction. n(SHAM)=15, n(TAC)=18, n(TAC+Atorvastatin)=21.

Nach 21 Tagen der Aortenligatur stieg der linksventrikuläre systolische Druck in der TAC-Gruppe weiter an, 142 ± 6 mmHg ($p < 0,01$), in der SHAM-Gruppe waren die Druckwerte deutlich niedriger (99 ± 7 mmHg), aber auch diese Gruppe weist einen linksventrikulären systolischen Druckanstieg auf, wenn man die Druckwerte nach 7 Tagen betrachtet. Die Atorvastatin-Gruppe lag nach wie vor mit ihren systolischen

Druckwerten zwischen den beiden Kontrollgruppen mit 122 ± 5 mmHg und zeigte weiterhin keinen signifikanten Unterschied zur TAC-Gruppe (Abb.16).

Es wurde beobachtet, dass der systolische Druck in allen drei Gruppen verhältnismäßig gleich vom Tag 7 bis 21 angestiegen ist: In der TAC-Gruppe um 48 mmHg, in der SHAM-Gruppe um 45 mmHg, in der TAC-Atorvastatin-Gruppe um 44 mmHg.

Die Verteilung der linksventrikulären diastolischen und mittleren Druckwerte nach 7 und 21 Tagen in allen drei Gruppen SHAM, TAC, TAC + Atorvastatin sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt.

Pmittel (mmHg)	SHAM	TAC	TAC+Atorvastatin
nach 7 Tagen	18 \pm 3,06	32 \pm 6,39	26 \pm 0,85
nach 21 Tagen	29 \pm 3,69	35 \pm 2,02	48 \pm 2,63

Tab. 2: Verteilung der linksventrikulären mittleren Druckwerte [mmHg] nach 7/21 Tagen, SHAM vs. TAC vs. TAC-Atorvastatin

Pdaistolic (mmHg)	SHAM	TAC	TAC+Atorvastatin
nach 7 Tagen	5,0 \pm 1,63	3,3 \pm 0,56	0,5 \pm 0,29
nach 21 Tagen	-9,8 \pm 3,96	-7,9 \pm 2,63	1,8 \pm 2,08

Tab. 3. Verteilung der linksventrikulären diastolischen Druckwerte [mmHg] nach 7/21 Tagen, SHAM vs. TAC vs. TAC-Atorvastatin

4.1.5. Lungen- und Leberfeuchtgewichte nach Aortenligatur

Das Verhältnis zwischen dem Lungenfeuchtgewicht und dem Körpergewicht, als Ausdruck der linksventrikulären Dekompensation, war nach 7 Tagen in der TAC-Gruppe mit $1,58 \pm 0,37$ % am höchsten. Die SHAM und TAC + Atorvastatin-Gruppen hatten mit jeweils $0,982 \pm 0,09$ % und $0,903 \pm 0,02$ % annähernd vergleichbare Werte, die untereinander nicht signifikant unterschiedlich waren, wohl aber beide einen signifikanten Unterschied zur TAC-Gruppe aufwiesen (Abb.18).

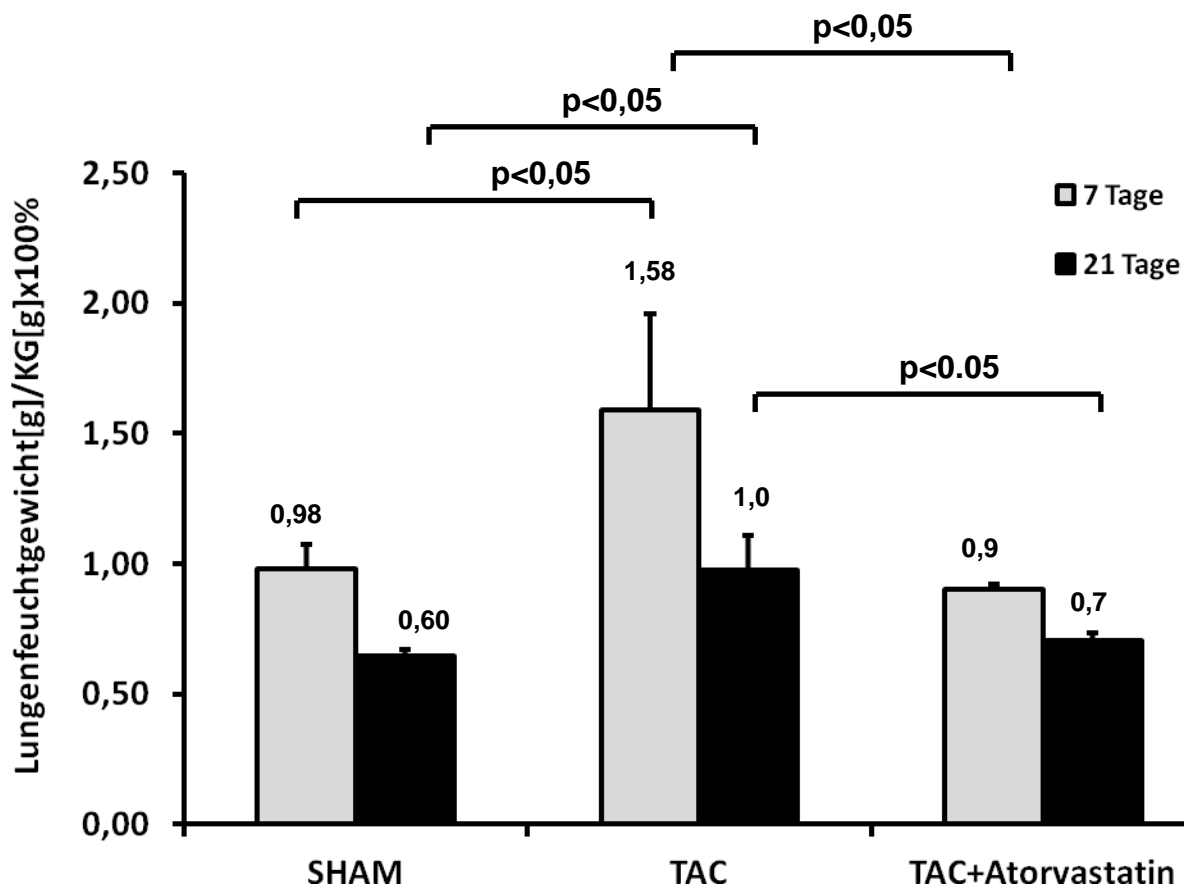


Abb. 17: Lungenfeuchtgewicht in Relation zum Körpergewicht nach 7/21 Tagen TAC, C67/BI6. TAC führt zur signifikanten Zunahme der Ratio Lungenfeuchtgewicht/Körpergewicht nach 7 Tagen, nach 21 Tagen nimmt diese Relation wieder ab und ist nicht signifikant zu den anderen Gruppen. Atorvastatin verhindert die Zunahme der Ratio Lungengewicht/Körpergewicht nach 7 Tagen und nach 21 Tagen. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin nach transverse aortic constriction.

Nach Ablauf der 21 Tage blieb die Relation zwischen Lungenfeuchtgewicht und Körpergewicht in der SHAM-Gruppe am niedrigsten $0,60 \pm 0,02$ % ($p < 0,01$). Die TAC-Gruppe zeigte mit $0,10 \pm 0,13$ % als Ausdruck der maximal ausgeprägten Herzinsuffizienz den höchsten Wert. Die Lungen in der TAC + Atorvastatin-Gruppe waren im Verhältnis zum Körpergewicht mit $0,7 \pm 0,03$ % nicht so schwer wie in der Banding-Gruppe. SHAM und TAC + Atorvastatin zeigten keinen signifikanten Unterschied untereinander, waren aber beide im Vergleich zu der TAC-Gruppe signifikant (Abb. 17).

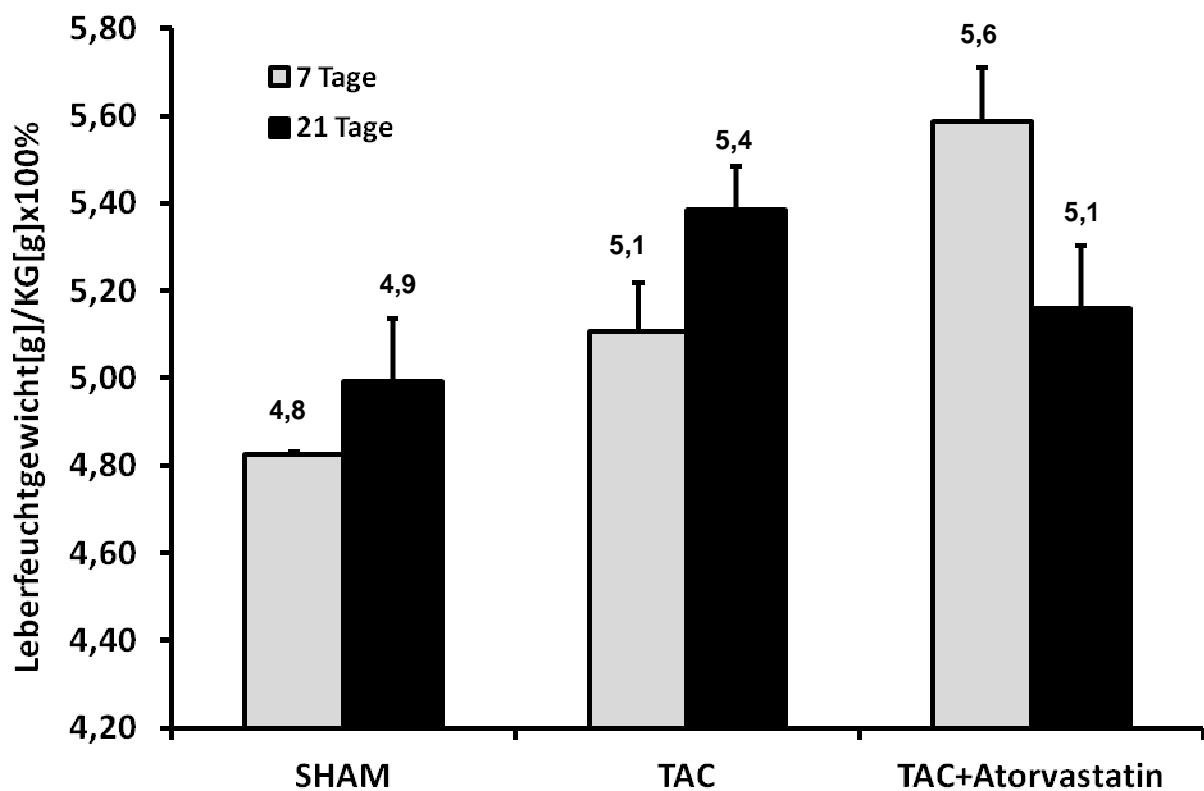


Abb. 18: Leberfeuchtgewicht in Relation zum Körpergewicht nach 7/21 Tagen TAC, C67/BI6. TAC führt zu nicht signifikanter Zunahme des Leberfeuchtgewichtes/Körpergewicht sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen. Nach der Behandlung mit Atorvastatin kommt es nach 7 Tagen zu nicht signifikanter Zunahme des Leberfeutgewichtes/Körpergewicht, nach 21 Tagen zu nicht signifikanter Abnahme. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic

constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin nach transverse aortic constriction.

Das Verhältnis zwischen dem Lebergewicht und dem Körpergewicht, als Ausdruck der globalen Herzdekompensation, lag nach 7 Tagen in der SHAM-Gruppe am niedrigsten mit $4,8 \pm 0,06\%$, und in der TAC + Atorvastatin am höchsten mit $5,6 \pm 0,1\%$. Die TAC-Gruppe zeigte nach 7 Tagen mittelschwere Leberfeuchtgewichte mit $5,1 \pm 0,1\%$. Die Werte aller drei Gruppen waren nicht untereinander signifikant. Nach 21 Tagen nahm das Leberfeuchtgewicht in der SHAM-Gruppe minimal zu ($4,9 \pm 1,4\%$), in der TAC-Gruppe etwas stärker zu ($5,4 \pm 0,1\%$). Und in der TAC + Atorvastatin-Gruppe nahm das Verhältnis Leberfeuchtgewicht/Körpergewicht ab, und erreichte den Wert von $5,16 \pm 0,1\%$. Die Ergebnisse blieben aber weiterhin in allen drei Gruppen nicht signifikant.

4.2. Rac1-Aktivität

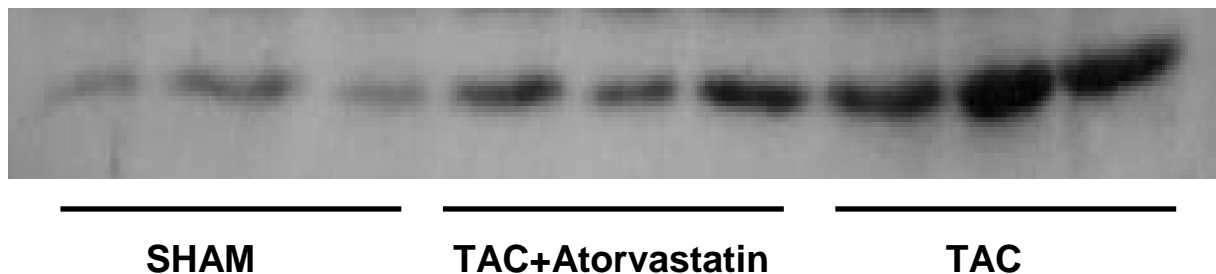


Abb. 19: Representatives Western Blot von RhoGDI α -Rac1-Assoziation im linken Ventrikel nach 21 Tagen TAC, C57/Bl6. TAC führt zur verstärktem Nachweis der Rac1-RhoGDI α -Assoziation, als Ausdruck der verstärkten Rac1-Aktivität. Nach Atorvastatin-Behandlung ist die Anzahl an Rac1-RhoGDI α -Verbindungen vermindert. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin nach transverse aortic constriction.

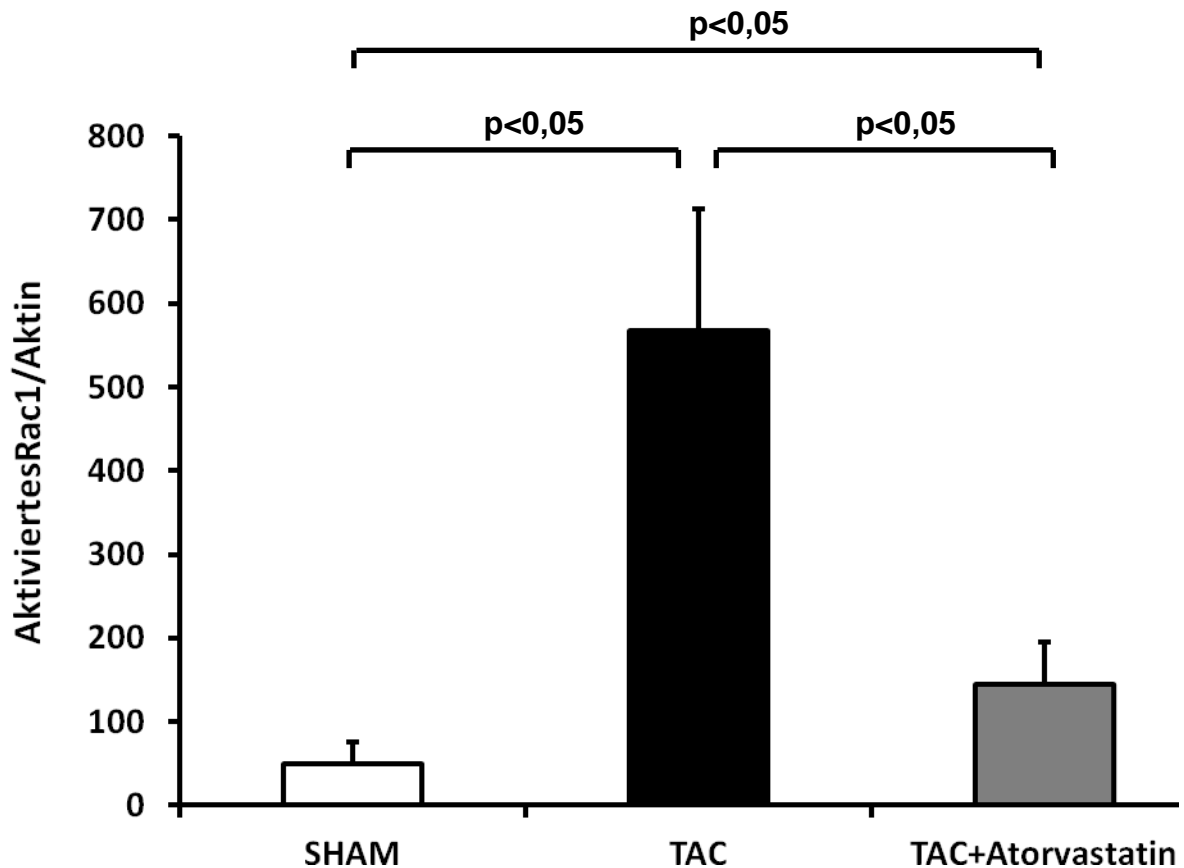


Abb. 20: Quantifizierung von aktiviertem Rac1/Aktin in linkem Ventrikel nach 21 Tagen TAC, C57/Bl6. TAC führt zur 5-fachen Steigung der Rac1 Aktivität. Statine vermindern die Zunahme die Rac1 Aktivität. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin nach transverse aortic constriction.

GST-PAK pull down assay zeigt eine fünffache Erhöhung der Rac1 Aktivität bei druckinduzierter linksventrikulärer Hypertrophie in der TAC-Gruppe ($567 \pm 146\%$) im Vergleich zu SHAM-Tieren ($p < 0,05$). In der Abb. 20 sieht man eine Reduktion der Rac1-Aktivität durch die Behandlung mit Statinen auf $144 \pm 51\%$ und in der SHAM-Gruppe ist die Rac1-Aktivität kaum nachweisbar.

4.3. NAD(P)H-Oxidase-Aktivität

Die Aktivitätssteigerung des Rac1 in der TAC-Gruppe ist mit der vierfachen Zunahme der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase assoziiert ($412 \pm 137\%$ im Vergleich zu SHAM, $p < 0,05$). Die Statine heben die NAD(P)H-Aktivität fast komplett auf ($163 \pm 52\%$, im Vergleich zu SHAM).

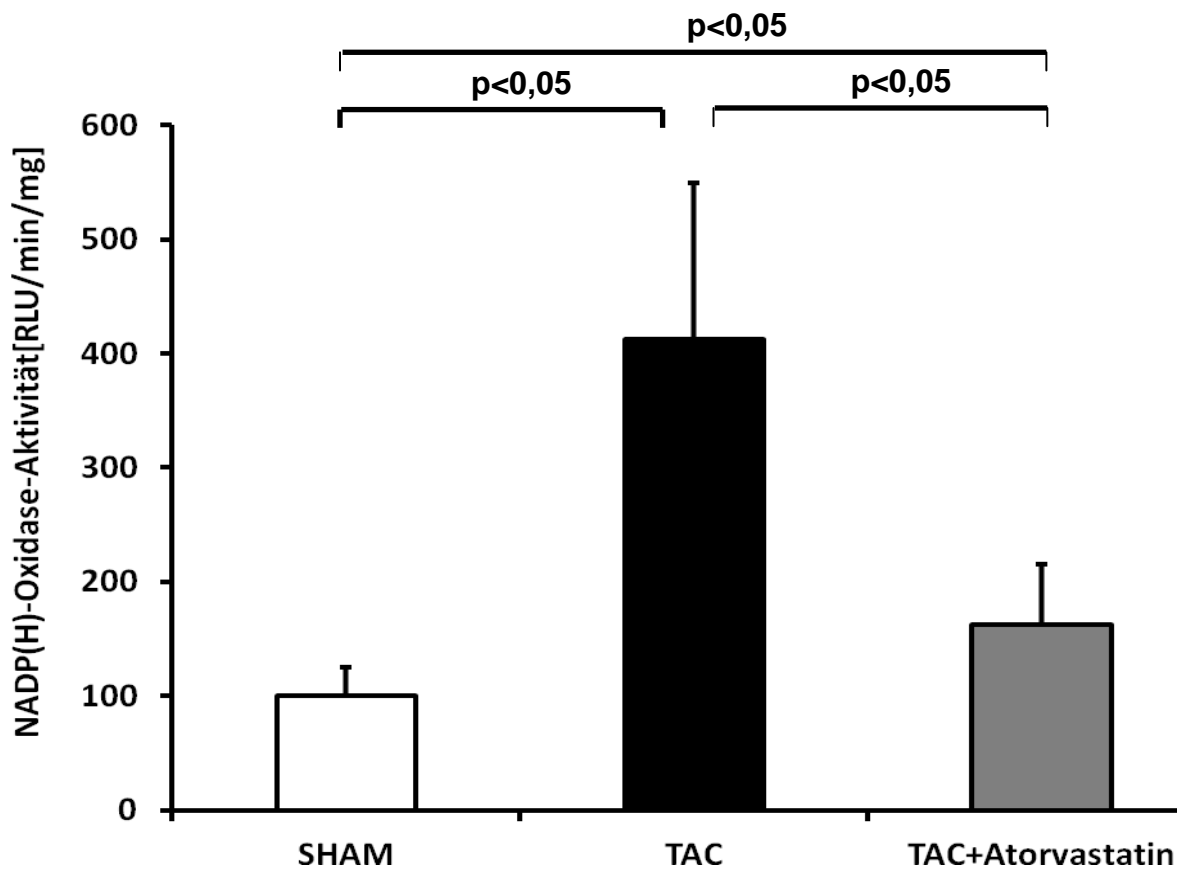


Abb. 21: NADP(H)-Oxidase-Aktivität nach 21 Tagen TAC, C67/Bl6. SHAM=sham-operated mice; TAC=transverse aortic constriction; TAC+Atorvastatin=Behandlung mit Atorvastatin/Rosuvastatin nach transverse aortic constriction.

5. Diskussion

5.1. Aortenligatur (TAC) führt zur Nachlasterhöhung

In unserem Tiermodell wurden die Herzen der Tieren mittels Aortenligatur einer Druckbelastung ausgesetzt, die mit der Zunahme der Nachlast, die mit einer Aortenklappenstenose oder infolge der chronischen Hypertonie bei Menschen vergleichbar wäre, einhergeht. Die Tiere entwickelten eine linksventrikuläre konzentrische Hypertrophie und wiesen eine signifikante Zunahme der Herzmasse von $0,118 \pm 0,0087\text{g}$ nach 7 Tagen und $0,17 \pm 0,01\text{g}$ nach 21 Tagen auf, was die Effektivität der durchgeführten Operation bestätigt. Unsere Ergebnisse sind mit den Ergebnissen anderer Autoren bei ähnlichen Tiermodellen vergleichbar. Bei Hara M. wiesen nach dem Banding der Aorta abdominalis mittels 26G Nadel die Mäuse vom Wildtyp Tiere ein Herzgewicht von $171,6 \pm 11,4 \text{ mg}$ auf (44). Hill berichtete über die Zunahme der Herzmasse bei 6-8 Wochen alten Mäusen vom Typ C67/Bl6 nach Banding der Aorta thorakalis um 63 %, er benutzte ein 27G Nadel, drei Wochen später zeigten die Tiere ein Herzgewicht von $190 \pm 10 \text{ mg}$ (47). Boulaksil M zeigte eine Zunahme der Herzmasse auf $168,6 \pm 0,009\text{g}$ in der TAC-Gruppe nach 16 Wochen (15).

Die Zunahme des Verhältnisses Herzmasse/Körpermasse in der TAC-Gruppe versus SHAM als Ausdruck der linksventrikulären Hypertrophie wurde in unserem Tiermodell ebenfalls sowohl nach 7 Tagen als auch nach 21 Tagen beobachtet. Ähnliche Ergebnisse waren in der Arbeit von Hara M. mit Zunahme des LV/BW-Ratio von $4,32 \pm 0,05 \text{ mg/g}$ auf $6,17 \pm 0,43 \text{ mg/g}$ nach 4 Wochen, welches nach 15 Wochen mit $6,53 \pm 0,67 \text{ mg/g}$ fast unverändert blieb. Bei der Gruppe von Hill kam es zu einer Steigerung desselben Verhältnisses von $4,6 \pm 0,1$ auf $7,8 \pm 0,4 \text{ mg/g}$ nach 3 Wochen. Parallel zu der linksventrikulären Masse nahm auch der linksventrikuläre systolische Druck zu, der zu der Entwicklung der konzentrischen Hypertrophie führte. Nach 7 Tagen erreichte dieser in unserem Tiermodell die Werte von $94 \pm 15 \text{ mmHg}$ in der TAC-Gruppe, nach 21 Tagen lag der systolische Druckwert schon bei $142 \pm 6 \text{ mmHg}$. Hill zeigte vergleichbare Werte für den linksventrikulären systolischen Druck von $135,3 \pm 10,8\text{mmHg}$ nach 4 Wochen des Bandings der Aorta

thoracalis, die nach 15 Wochen wieder auf $106,0 \pm 13,1$ mmHg sanken, was wahrscheinlich auf die Effektivität endogener Kompensationsmechanismen zurückzuführen war. Die Relation vom Lungenfeuchtgewicht zum Körpergewicht als Ausdruck der akuten Linksherzdekompensation nahm nach 7 Tagen des Aortic banding deutlich zu, und fiel nach 21 Tagen wieder ab, wahrscheinlich ebenfalls infolge der Rekompensationsmechanismen einer chronischen Druckbelastung. Etwas anders verhielt sich die Relation vom Leberfeuchtgewicht zum Körpergewicht, die nach 7 Tagen zunahm und im weiteren Verlauf stetig anstieg, was die chronische Rechtsherzbelastung mit der Entwicklung einer globalen Herzinsuffizienz als Folge widerspiegeln würde.

Die Hypertrophie als die adaptive Antwort auf die hämodynamische Belastung führt zur Veränderung der Expression der kardialen Gene. Die früheren Untersuchungen haben gezeigt, dass die Hypertrophie mit der Überexpression des G-Proteins gekoppelten Rezeptors vor allem kleiner G-Proteine einhergeht (29, 30). Es ist schon mehrfach berichtet worden, dass das kleine G-Protein Rac1 an der Signaltransduktion der Myokardhypertrophie beteiligt ist. In unserem Tiermodell zeigten die Kardiomyozyten nach Aortic banding nicht nur die Entwicklung einer signifikanten linksventrikulären Hypertrophie, sondern auch eine Überexpression der Rac 1-Proteine. Und folglich als Ausdruck für den oxidativen Stress kam es mit der zunehmenden Hypertrophie auch zu einer Steigung der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase.

5.2. Antihypertrophe Effekt der Statinen bei Nachlasterrhöhung

Mit der Erhöhung der Nachlast entwickelten die Mäuse, die einer Aortenligatur ausgesetzt waren, eine konzentrische linksventrikuläre Herzhypertrophie. Bei den Patienten mit den kardiovaskulären Erkrankungen betrachtet man die Herzhypertrophie als einen negativen Prognosefaktor (53), der nach der Framingham-Studie mit erhöhter Morbidität und Tod einhergeht (3, 6). Außerdem führt die erhöhte linksventrikuläre Masse häufiger zum plötzlichen Herztod (3,6). Anfangs als Kompensationsmechanismus zu betrachten, wirkt die Entwicklung der Hypertrophie durch die Reduktion der Wandspannung einer Verschlechterung der

Ventrikelfunktion entgegen und dient somit der Aufrechterhaltung der hämodynamischen Leistung des Herzen (49, 50). Die Anpassung über den Frank-Starling-Mechanismus bei der Erhöhung des Afterloads führt zur Steigerung des Schlagvolumens durch das vermehrte enddiastolische Volumen, was mit einer stärkeren Vordehnung der Myofibrillen und erhöhter Kontraktilität einhergeht. Später kann die Kontraktilität nicht mehr gesteigert werden, das Herzzeitvolumen sinkt, erhöhter Sympathikotonus führt zu steigendem Energie- und Sauerstoffverbrauch, welches durch die relative Koronarinsuffizienz und die Herzinsuffizienz verstärkt wird, was wiederum zur weiteren Senkung des Herzzeitvolumens führt. Letztendlich führt die Hypertrophie zu einer Dekompensation mit Verschlechterung der klinischen Symptomatik mit Dyspnoe und starker Belastungseinschränkung. Ist die Herzhypertrophie ein „günstiger“ Kompensationsmechanismus? Oder sollte man, um die Dekompensation zu vermeiden und zur allgemeinen Prognose-Verbesserung, die Entwicklung einer Herzhypertrophie bremsen oder gar stoppen? Kann dadurch die Entwicklung einer Herzinsuffizienz vermieden werden? Man hat herausgefunden, dass bei den Knockoutmäusen, die durch einen Gendefekt keine Herzhypertrophie entwickeln können, es nach der Aortenligatur nicht zur Entwicklung der Myokardhypertrophie kam, das führte zur Aufrechterhaltung der linksventrikulären Funktion trotz akuter Steigung der Nachlast, und somit wurde die Entwicklung einer Herzinsuffizienz verhindert (32, 51).

Wie erwartet, kam es in unserem Experiment nach 21 Tagen nach der Aortenligatur zur linksventrikulären Hypertrophie, die sich sowohl auf dem organischen (die Zunahme der Herzmasse und Zunahme des Verhältnisses der Herzmasse zur Körpermasse) als auch auf dem zellulären Niveau (die Vergrößerung der Kardiomyozyten und die Abnahme der Zahl der Kardiomyozyten pro mm²) zeigte. Die in den Ergebnissen dargestellte Korrelation bestätigt den Zusammenhang der organischen und zellulären Veränderungen.

Die Behandlung mit Statinen hob den Effekt der Aortenligatur auf. Die mit Atorvastatin-behandelte Mäusen zeigten eine geringere Zunahme der Herzmassen, genauso gering war die Relation von Herz- zu Körpergewicht als indirekter Ausdruck der wenig ausgeprägten Hypertrophie nach Statin-Gabe, was mit den Ergebnissen

anderer Forschungsgruppen korreliert. Der antihypertrophe Effekt der Statine wurde schon nach 7 Tagen beobachtet. Die systolischen Blutdruckwerte stiegen ebenfalls etwas weniger an als in der TAC-Gruppe. Wurde dieser Effekt infolge einer Senkung des peripheren Widerstands oder sogar durch zu lockerer Ligatur der TAC + Atorvastatin-Gruppe hervorgerufen? Es ist auch bekannt, dass die Behandlung mit Statinen zu einer Steigerung der Produktion von NO-Synthasen führt, was mit Erhöhung der NO-Produktion und peripheren Vasodilatation einhergeht (49). Die am Ende des Versuchs durchgeführten invasiven Druckmessungen im linken Ventrikel demonstrieren keine signifikanten Druckunterschiede zwischen der TAC- und TAC + Atorvastatin-Gruppe. Somit wird die unterschiedliche Stärke des Bandings in beiden Gruppen widerlegt. Der antihypertrophe Effekt der Statine kann nicht nur auf einer Senkung der Nachlast infolge einer Vasodilatation basieren. Ein anderer Mechanismus führt diesen Effekt herbei.

5.3. Zusammenhang zwischen den antihypertropen Statine-Wirkung und Rac1-Aktivität

Bei der Entstehung der Herzhypertrophie kommt es zu diversen Veränderungen in der Zelle. Beide Formen der Hypertrophie führen zur erneuten Expression der unreifen fetalen kardialen Gene, die für Modifizierung der Zusammensetzung und Regulation der motorischen Einheit, eine Änderung des Energiestoffwechsels sowie Kodierung der hormonellen Antwort (ANP, ACE) verantwortlich sind (33,63). Infolgedessen kommt es zur Veränderung der Zusammensetzung der intrazellulären Ionen (Abnahme der Ca-ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum [SERCA-2](34) und zur Zunahme des Na⁺/Ca²⁺-Austausches (36, 37)) und Abnahme der parasymphatischen und sympathischen Rezeptoren (β 2-Adrenorezeptoren und M2-Muscarinrezeptoren) sowie zur Zunahme des Verhältnisses von Angiotensin II zu AT1-Rezeptor (37, 57, 58) und vermehrten Freisetzung von Endothelin-1 (59, 60). Diese Veränderungen führen zur vermehrten Expression der langsamen Myosin-ATPase der β -Myosinschwerketten im Gegensatz zur schnellen Myosin-ATPase der α -Myosinschwerketten als adaptiver Mechanismus des myoenergetischen Sparens (33). Bei den Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie kommt es zu weiteren genetischen Veränderungen, die die Freisetzung von kontraktilen Proteinen wie

Troponin T und I, α -Tropomyosin, myosinbindenden Protein C, Myosinleichtketten 1 und 2, α -Aktin, aber auch Titin und mitochondrialen DNA kodieren (53, 54, 55, 56). Insgesamt führt all das zur Entstehung der myokardialen Hypertrophie. Mehrere von diesen Prozessen werden durch die Aktivierung der kleinen G-Proteine ausgelöst (52). In unseren Untersuchungen haben wir die Rolle eines dieser Proteine, nämlich den Rac1, erforscht. Rac1 gehört zu der Ras-Superfamilie, die man in Rho, Rac, und Cdc42 einteilen kann (34). Ähnlich wie die alpha-Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine, wechseln sie zwischen aktivem GTP-gebundenem und inaktivem GDP-gebundenem Zustand (38, 40, 41). Rho-GTPasen sind das größte Substrat für die posttranslationelle Modifikation der Isoprenylation, und die Isoprenylation für den Transport der Rho-GTPasen zur Zellmembran und somit deren Aktivierung verantwortlich (41, 43, 45, 46, 61). Zu den Aktivatoren der Rho-Proteine zählen Wachstumsfaktoren, Cytokine, Integrine und G-Proteinen gekoppelte Liganden oder Hormone, wie Bradykinin oder Lysophosphatidsäure (46, 61, 62). Der Schlüsselschritt zur Rac-Aktivierung ist der Anbau von Geranylgeraniol, einem Isoprenoid, dem Zwischenprodukt der Cholesterolsynthese (62).

Statine hemmen die Geranylgeraniolsynthese oder als Geranylgeraniolsynthase-Hemmer den Anbau von Geranylgeraniol an den kleinen G-Proteinen und inhibieren somit die Membrantranslokation von Rho und dessen Aktivität (22, 62). Dadurch werden cholesterinunabhängige Statineffekte ausgelöst, die nicht nur in den Gefäßzellen, sondern auch in anderen Zellen wie Leukozyten und Knochenmarkzellen auf unterschiedliche Art und Weise beobachtet wurden (64, 61, 65, 67). Wir vermuteten, dass die Statine durch die Hemmung der Geranylgeraniolsynthese und folglich der Rac1-Aktivierung auch einen antihypertrophen Effekt haben können.

Im von uns durchgeführten Pull-Down-Assay zeigten die hypertrophierten Mäuseherzen vermehrte Aktivierung von Rac1, was die wichtige regulatorische Rolle dieses Proteins in der Entstehung der Hypertrophie bestätigt. Nach der Behandlung mit dem HMG-CoA-Reduktase Hemmer Atorvastatin kam es zur deutlichen Verminderung der Rac1-Aktivität, die mit einer signifikante Verminderung der linksventrikulären Hypertrophie korrelierte. Dieser Zusammenhang bestätigt, dass der antihypertrophe Effekt der Statine unter anderem auf der Hemmung der

Geranylbiosynthese und Inhibition der Rac1-Membrantranslokation, somit der Verminderung deren Aktivität wie unsere Pull-Down-Assay zeigte, basiert.

5.4. Statine vermindern die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität

NAD(P)H-Oxidase(NOX) ist ein zellulärer membrangebundener multimolekularer Komplex, der in der Zellmembran und einigen anderen Zellorganellen lokalisiert ist. Es existieren die ganzen Gruppen der NAD(P)H-Oxidasen, die sich in der Anzahl der Untereinheiten, der zellulären Spezifität, der Regulation und anderen Parametern unterscheiden. Unter anderem spielen die NAD(P)H-Oxidasen eine wichtige Rolle bei der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), die viele physiologische Prozesse wie z.B. die Immunabwehr, die Hormonbiosynthese und die zelluläre Signalübertragung beeinflussen. Verschiedene Erkrankungen gehen mit erhöhten ROS-Produktion (sog. "oxidativem Stress") einher, u.a. kardiovaskuläre Erkrankungen einschließlich der Hypertonie, Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz, aber auch Diabetes, Atherosklerose, chronische Niereninsuffizienz sowie Insult. Alle diese Erkrankungen sind durch die überschüssige Produktion von Oxidantien und verminderten Bioverfügbarkeit an Stickstoffmonoxid (NO) charakterisiert. Die ROS-Familie besteht aus vielen Molekülen, die unterschiedliche Auswirkungen auf die zelluläre Funktion zeigen, wie z.B. Regulation von Zellwachstum und Differenzierung, Regulierung der Produktion und Verteilung der Proteine in der extrazellulären Matrix, Inaktivierung von NO und Stimulation von vielen Kinasen und proinflammatorischen Genen (69, 70, 71). Viele dieser pathologischen Veränderungen beobachtet man bei den kardiovaskulären Erkrankungen und auch bei der Herzhypertrophie. Die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kann man in zwei Hauptgruppen unterteilen: freie Radikale wie z.B. Superoxid [$O_2^{\cdot-}$], Hydroxid [OH^{\cdot}], Stickstoffoxid [NO^{\cdot}] und nichtradikale Sauerstoffderivate wie z.B. H_2O_2 und ONOO- (72, 74). Freie Radikale besitzen ein oder mehrere ungepaarte Elektronen, was ihnen eine hohe Reaktivität verleiht und sie instabil macht. Die nichtradikalen Sauerstoffderivate sind weniger aktiv, stabiler und haben eine längere Halbwertszeit. ROS werden auch in den Kardiomyozyten und Endothelzellen produziert, dabei scheinen $\cdot O_2^-$ und H_2O_2 eine besonders wichtige Rolle zu spielen (68). Die NAD(P)H-Oxidasen katalysieren die $\cdot O_2^-$ -Produktion und dienen als Elektronendonator:

$2O_2 + NAD(P)H \rightarrow 2 \cdot O_2^- + NAD(P)^{++} + H^+$. Die NAD(P)H-Oxidase kann also als ein Marker für den oxidativen Stress dienen, um diesen Prozess zu untersuchen und um neue Wege zu finden, um den oxidativen Stress zu beeinflussen.

Die Experimente an Mäusen und Ratten zeigen, dass eine Blutdruckerhöhung mittels Infusion von Angiotensin II zur Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase führte, die Expression von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten wie Nox1, Nox2, Nox4, p22phox verstärkte und die Generation an ROS zunimmt (26). Die ROS-Produktion ist die Aktivierung des AT1-Rezeptors mittels Angiotensin II mit folgender Aktivierung von NAD(P)H-Oxidase. Die Statine können die Angiotensin II induzierte ROS-Produktion auf zwei Wege inhibieren: Zum einem vermindern sie die Expression des AT-1-Rezeptor-Gen durch die Destabilisation von AT-1-mRNA. Zum anderen vermindern die Statine die Rac1-Aktivierung, was zur Aktivierung von NAD(P)H-Oxidase durch die Hemmung der Geranylgeranyl-abhängigen Translokation von Rac1 vom Zytosol zu der Zellmembran führt (80, 81, 82).

In unseren Experimenten zeigten sich im NAD(P)H-Oxidase Activity Assay ebenfalls eine erhöhte Aktivität der NAD(P)H-Oxidase bei den hypertrophierten Mäuseherzen. Also war auch in unserem Tiermodell die linksventrikuläre Hypertrophie mit verstärkter Aktivität der NAD(P)H-Oxidase assoziiert, was am ehesten durch die Produktion der reaktiven Sauerstoffradikalen induziert wird. In der Gruppe, die mit Statinen behandelt wurde, wurden signifikant niedrigere NAD(P)H- und Rac1-Aktivitäten gemessen. Das korrelierte wiederum mit einer wenig ausgeprägten linksventrikulären Hypertrophie. Das unterstreicht, dass die Kaskade der Signalübertragung über die Rac1-Aktivierung durch Geranylgeranylation und die daraus resultierende Steigerung der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase in den Kardiomyozyten läuft. Also auch bei der Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie steht die Zunahme der Rac1-Aktivität mit Steigerung ROS-Produktion in einem direkten Zusammenhang, was für die nichtphagozytären Zellen schon beschrieben wurde.

Die Suche nach den Mediatoren für die Ausbildung der Myokardhypertrophie hat schon vor Jahren begonnen. Heutzutage weiß man, dass die G-proteingekoppelten Neurohormone wie Angiotensin II und Endothelin1 nicht eine auslösende, sondern

eher eine Rolle des Verstärkers in der biomechanischen Signaltransduktion der Hypertrophie spielen. Auch Calcineurin und Calcium calmodulinabhängige Phosphatase können die Herzhypertrophie in einigen Tiermodellen beeinflussen, in anderen wiederum nicht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das kleine G-Protein - Rac1 eine wichtige Rolle bei der Hypertrophieentstehung spielt. Jedoch legt bis heute die Zusammensetzung der experimentellen Beobachtungen an Mensch und Tier nahe, dass die Entstehung der Herzhypertrophie ein komplexer Mechanismus mit mehreren Signalwegen ist, und die Ausschaltung eines einzelnen kann möglicherweise zur verstärkten Aktivierung alternativer Signalkaskaden führen (64).

5.5. Limitationen der Arbeit

Wie in allen Tierversuchen stellt sich natürlich die Frage der Übertragbarkeit dieses Modells auf den Menschen. In unserem Tiermodell wurden gesunde Tiere, bevor man die einer Aortenligatur oder SHAM-OP unterzog, untersucht. Im menschlichen Kollektiv ist die Hypertrophie und folgende Herzinsuffizienz ein jahrelang bestehendes Krankheitsbild, welches ein langsam progredienten Verlauf zeigt. Zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns ist die Hypertrophie des menschlichen Myokards schon viel ausgeprägter als in unserem Tiermodell, in welchem wir die Behandlung mit Statinen drei Tagen vor der Aortenligatur begannen. Die Tiere weisen somit schon präoperativ im Serum einen Medikamentenspiegel auf, damit die Statine ihre Wirkung zum Zeitpunkt der Hypertrophieentwicklung im Herzen und ganzen Organismus komplett entfalten können. Bei den Menschen beginnt die Behandlung der Hypertrophie erst mit der Diagnosestellung, so dass mögliche präventive Wirkung der Statinen ausbleibt und jahrelange Myokardhypertrophie und auch mit ihr verbundenen molekularbiologischen Veränderungen im menschlichen Körper möglicherweise schon irreversibel sind. Um eine endgültige Aussage zu machen, wie gut die Statine ihre Wirkung in diesem Fall entfalten können und der Entwicklung der Herzhypertrophie entgegen wirken können, benötigen wir noch die Untersuchungen und Bestätigungen durch die menschlichen Studien.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahmad S, Cesana F, Lamperti E, Gavras H, Yu J. Attenuation of angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing a type 1 receptor mutant. *Am J Hypertens.* 2009 Dec;22(12):1320-5. Epub 2009 Sep 24.
2. Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, Brandes RP.: Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 2004 Oct 29;279(44):45935-41. Epub 2004 Aug 18.
3. Aprahamian T, et al. Simvastatin treatment ameliorates autoimmune disease associated with accelerated atherosclerosis in a murine lupus model. *J. Immunol.* 2006;177:3028–3034.
4. Arai M, Yoguchi A, Iso T, Takahashi T, Imai S, Murata K, Suzuki T. Endothelin-1 and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol.* 1995 May;268(5 Pt 2):H2084-91.
5. Archbold RA, Timmis AD. Cholesterol lowering and coronary artery disease: mechanisms of risk reduction. *Heart.* 1998;80:543–547.
6. Assmus B, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ. Res.* 2003;92:1049–1055.
7. Babior BM: NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 16: 42-47, 2004
8. Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol.* 1990 Aug;259(2 Pt 2):H324-32.
9. Balogun MO, Dunn FG.:Left ventricular hypertrophy as a risk factor in hypertension. *Afr J Med Med Sci.* 1996 Sep;25(3):277-83.
10. Bell JR, Kennington E, Fuller W, Dighe K, Donoghue P, Clark JE, Jia LG, Tucker AL, Moorman JR, Marber MS, Eaton P, Dunn MJ, Shattock MJ.Characterization of the phospholemman knockout mouse heart: depressed left ventricular function with increased Na-K-ATPase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Feb;294(2):H613-21. Epub 2007 Dec 7.
11. Biasucci LM, Biasillo G, Stefanelli A.Review: Inflammatory markers, cholesterol and statins: pathophysiological role and clinical importance. *Clin Chem Lab Med.* 2010 Sep 27. [Epub ahead of print]
12. Böhm M.:Hypertension and heart failure. Are there approaches for differential therapy? *MMW Fortschr Med.* 2000 Feb 17;142(7):31-3.
13. Bokoch GM, Zhao T:Regulation of the phagozyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxid Redox Signal* 8: 1533-1548, 2006
14. Bos JL.All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J.* 1998 Dec 1;17(23):6776-82.
15. Boulaksil M, Noorman M, Engelen M A , T.A.B. van Veen, M.A. Vos, J.M.T. de Bakker, and H.V.M. van Rijen Longitudinal arrhythmogenic remodelling in a mouse model of longstanding pressure overload. *Neth Heart J.* 2010 October; 18(10): 509–515.

16. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F.:The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. 1991 Jan 10;349(6305):117-27.
17. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 2004;116:167–179.
18. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM; Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators.Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2004 Apr 8;350(15):1495-504. Epub 2004 Mar 8.
19. Cannon CP, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med*. 2004;350:1495–1504.
20. Chabarashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, Welch WJ, Wilcox CS: Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension* 39: 269-274, 2002
21. Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD.: Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox.*J Biol Chem*. 2004 Aug 13;279(33):34250-5. Epub 2004 Jun
22. Chorvatova A, Hart G, Hussain M. Na⁺/Ca²⁺ exchange current (I(Na/Ca)) and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 1;61(2):278-87.
23. Clerk A, Aggeli IK, Stathopoulou K, Sugden PH.:Peptide growth factors signal differentially through protein kinase C to extracellular signal-regulated kinases in neonatal cardiomyocytes. *Cell Signal*. 2006 Feb;18(2):225-35. Epub 2005 Jun 3.
24. Clerk A, Sugden PH.Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ Res*. 2000 May 26;86(10):1019-23.
25. Custodis F, Eberl M, Kilter H, Böhm M, Laufs U.: Association of RhoGDIalpha with Rac1 GTPase mediates free radical production during myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2006 Jul 15;71(2):342-51. Epub 2006 Apr 19.
26. Dröge W.Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):47-95.
27. Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *Journal of Lipid Research*, 1992, 33, 1569-1582
28. Endres M, Laufs U: Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke*. 2004 Nov; 35(11 Suppl 1):2708-11. Epub 2004 Sep 16.
29. Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, Rockman HA.Cardiac hypertrophy: role of G protein-coupled receptors. *J Card Fail*. 2002 Dec;8(6 Suppl):S409-14.
30. 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 Jan 1; 105(1):85-92.
31. Foody JM, et al. Statins and mortality among elderly patients hospitalized with heart failure. *Circulation*. 2006; 113:1086–1092.

32. Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):18515-7.
33. Frohlich ED. Cardiac hypertrophy in hypertension. *N Engl J Med.* 1987 Sep 24;317(13):831-3.
34. Gelb MH. Protein prenylation, et cetera: signal transduction in two dimensions. *Science.* 1997 Mar 21;275(5307):1750-1.
35. Giunti S, Calkin AC, Forbes JM, Allen TJ, Thomas MC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. The pleiotropic actions of rosuvastatin confer renal benefits in the diabetic Apo-E knockout mouse. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010 Sep;299(3):F528-35. Epub 2010 Jun 16.
36. Glomset JA, Farnsworth CC. Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:181-205. No abstract available.
37. Go AS, et al. Statin therapy and risks for death and hospitalization in chronic heart failure. *J. Am. Med. Assoc.* 2006;296:2105–2111.
38. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 1990;343:425–430.
39. Gorin Y, Ricono JM, Kim NH, Bhandari B, Choudhury GG, Abboud HE. Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Aug;285(2):F219-29.
40. Greenwood J, et al. Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J.* 2003;17:905–907.
41. Griending KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Oct;20(10):2175-83.
42. Griending KK: NADPH oxidases: new regulators of old functions. *Antioxid Redox Signal* 8: 1443-1445, 2006
43. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998 Jan 23;279(5350):509-14.
44. Hara M, Ono K, Hwang MW, Iwasaki A, Okada M, Nakatani K, Sasayama S, Matsumori A. Evidence for a role of mast cells in the evolution to congestive heart failure. *J Exp Med.* 2002 Feb 4;195(3):375-81.
45. Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med.* 2006 Apr;259(4):351-63.
46. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2002 Jul 6;360(9326):7-22.
47. Hill JA, Rothermel B, Yoo KD, Cabuay B, Demetroulis E, Weiss RM, Kutschke W, Bassel-Duby R, Williams RS. Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function. *J Biol Chem.* 2002 Mar 22;277(12):10251-5. Epub 2002 Jan 10.
48. Hordijk PL.: 2. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res.* 2006 Mar 3;98(4):453-62. Review.
49. Horwich TB, et al. Statin therapy is associated with improved survival in ischemic and non-ischemic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004;43:642–648.

50. Huhle G, Abletshauser C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, Heene DL.:Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. *Thromb Res.* 1999 Sep 1;95(5):229-34.
51. Ishikura S, Koshkina A, Klip A.Small G proteins in insulin action: Rab and Rho families at the crossroads of signal transduction and GLUT4 vesicle traffic. *Acta Physiol (Oxf).* 2008 Jan;192(1):61-74.
52. Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Fujisaki H, Adachi S, Akimoto H, Ohta Y, Marumo F. Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation.* 1994 May;89(5):2198-203.
53. Kai H, Muraishi A, Sugiu Y, Nishi H, Seki Y, Kuwahara F, Kimura A, Kato H, Imaizumi T.:Expression of proto-oncogenes and gene mutation of sarcomeric proteins in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res.* 1998 Sep 21;83(6):594-601.
54. Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev.* 2000 Jun;5(2):167-73.
55. Kieć-Wilk B, Olszanecka A, Mikołajczyk M, Kawecka-Jaszcz K.:Role of the M235T (c.704c>T) polymorphism of angiotensinogen gene as well as A724A (c.2171G>A) polymorphism of SERCA2a gene in etiopathogenesis of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Przegl Lek.* 2010;67(3):151-6.
56. Kjekshus J, Dunselman P, Blideskog M, Eskilson C, Hjalmarson A, McMurray JV, Waagstein F, Wedel H, Wessman P, Wikstrand J; CORONA Study Group.A statin in the treatment of heart failure? Controlled rosuvastatin multinational study in heart failure (CORONA): study design and baseline characteristics. *Eur J Heart Fail.* 2005 Oct;7(6):1059-69.
57. Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J.NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Aug 31;107(35):15565-70. Epub 2010 Aug 16.
58. Kuroda J, Sadoshima J.NADPH oxidase and cardiac failure. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010 Aug;3(4):314-20. Epub 2010 Mar 31.
59. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK.Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation.* 1998 Mar 31;97(12):1129-35.
60. Laufs U, Liao JK.Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem.* 1998 Sep 11;273(37):24266-71.
61. Laufs U, Liao JK.Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2000 Sep 29;87(7):526-8.
62. Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK.:3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1) . *J Biol Chem.* 1999 Jul 30;274(31):21926-31.
63. Li H, He C, Feng J, Zhang Y, Tang Q, Bian Z, Bai X, Zhou H, Jiang H, Heximer SP, Qin M, Huang H, Liu PP, Huang C. Regulator of G protein signaling 5 protects against cardiac hypertrophy and fibrosis during biomechanical stress of pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Aug 3;107(31):13818-23. Epub 2010 Jul 19.

64. Lorell BH, Carabello BA.:Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000 Jul 25;102(4):470-9.
65. Maron BJ.Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 1997 Jul 12;350(9071):127-33.
66. Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG.: Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal*. 2006 Jan;18(1):69-82. Epub 2005 May 31.
67. McCarey DW, et al. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004;363:2015–2021.
68. Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG.ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Feb;25(2):274-8. Epub 2004 Oct 28.
69. Mumby SM.Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Apr;9(2):148-54.
70. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G.Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. . *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1946-9.
71. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science*. 1998 May 1;280(5364):750-2.
72. Paravicini TM, Touyz RM.NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31 Suppl 2:S170-80.
73. Park HS, Lee SH, Park D, Lee JS, Ryu SH, Lee WJ, Rhee SG, Bae YS.: Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, beta Pix, Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of H2O2. *Mol Cell Biol*. 2004 May;24(10):4384-94.
74. Rebollo A, Martínez-A C.Ras proteins: recent advances and new functions. *Blood*. 1999 Nov 1;94(9):2971-80.
75. Reuter CW, Morgan MA, Bergmann L. :Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1655-69.
76. Ridker PM :Are associations between infection and coronary disease causal or due to confounding? *Am J Med*. 1999 Mar;106(3):376-7.
77. Satoh M, Ogita H, Takeshita K, Mukai Y, Kwiatkowski DJ, Liao JK. Requirement of Rac1 in the development of cardiac hypertrophy. Cardiovascular and Hematology Divisions, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA.
78. Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F, Kimura A.Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. . *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Aug 27;262(2):411-7.
79. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) *Lancet*. 1994;344:1383–1389.
80. Schultz Jel J, Glascock BJ, Witt SA, Nieman ML, Nattamai KJ, Liu LH, Lorenz JN, Shull GE, Kimball TR, Periasamy M.Accelerated onset of heart

- failure in mice during pressure overload with chronically decreased SERCA2 calcium pump activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Mar;286(3):H1146-53. Epub 2003 Nov 20.
81. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*. 2002 Sep 6;91(5):406-13.
 82. SHI Q et. Al., 1998
 83. Singh R, Wang B, Shirvaikar A, Khan S, Kamat S, Schelling JR, Konieczkowski M, Sedor JR. The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive cell activation in inflammation. *J Clin Invest*. 1999 Jun;103(11):1561-70.
 84. Sprang SR. G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:639-78.
 85. Stejskal D, Ruzicka V.: Cardiotrophin-1. Review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2008 Jun;152(1):9-19.
 86. Strandberg TE, Vanhanen H, Tikkanen MJ.: Associations between change in C-reactive protein and serum lipids during statin treatment. *Ann Med*. 2000 Nov;32(8):579-83.
 87. Sugden PH, Clerk A.: Endothelin signalling in the cardiac myocyte and its pathophysiological relevance. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005 Oct;3(4):343-51.
 88. Sugden PH, Clerk A.: Endothelin signalling in the cardiac myocyte and its pathophysiological relevance. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005 Oct;3(4):343-51.
 89. Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J*. 2008 Jul;275(13):3249-77. Epub 2008 May 30.
 90. Sytkowski PA, et al. Changes in risk factors and the decline in mortality from cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med*. 1990;322:1635-1641.
 91. Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, Liao JK.: Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2001 Nov;108(10):1429-37.
 92. Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nuno H, Sumimoto H.: Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem*. 2003 Jul 4;278(27):25234-46. Epub 2003 Apr 25.
 93. Tamara M. Paravicini PHD, Rhian M. Touyz, MD, PHD.: NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. *Diabetes Care*, Volume 31, Supplement 2, February 2008
 94. Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL: c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:981-987, 2003
 95. Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005 Mar;14(2):125-31.
 96. Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H.: The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):23328-39. Epub 2005 Apr 11.

97. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griending KK. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem*. 1998 Jun 12;273(24):15022-9.
98. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. 1997 Sep 15;11(18):2295-322.
99. Waldman A, Kritharides L. The pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors: their role in osteoporosis and dementia. *Drugs*. 2003;63(2):139-52.
100. Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med*. 2008 Jan;14(1):37-44.
101. Watkins H, Seidman JG, Seidman CE. Familial hypertrophic cardiomyopathy: a genetic model of cardiac hypertrophy. *Hum Mol Genet*. 1995;4 Spec No:1721-7.
102. Weitz-Schmidt G, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat. Med*. 2001;7:687-692.
103. Yagi S, Akaike M, Aihara K, Ishikawa K, Iwase T, Ikeda Y, Soeki T, Yoshida S, Sumitomo-Ueda Y, Matsumoto T, Sata M. Endothelial nitric oxide synthase-independent protective action of statin against angiotensin II-induced atrial remodeling via reduced oxidant injury. *Hypertension*. 2010 Apr;55(4):918-23. Epub 2010 Mar 1.
104. Yamauchi-Takahara K. gp130-mediated pathway and heart failure. *Future Cardiol*. 2008 Jul;4(4):427-37.
105. Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol*. 1999 Jun 17;83(12A):53H-57H.
106. Youssef S, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature*. 2002;420:78-84.
107. Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:241-69.
108. Zhou D, Liang Q, He X, Zhan C. Changes of c-fos and c-jun mRNA expression in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and effects of sodium tanshinone IIA sulfonate. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 2008 Oct;28(5):531-4. Epub 2008 Oct 10.

Veröffentlichungen:

Statine hemmen die druck-induzierte Myokardhypertrophie und die kardiale Rac1 Expression in vivo. Werner Nickl, Svetlana Rodionychewa, Christoph Maack, Tanja Kartes, Michael Böhm, Ulrich Laufs. Poster, Mannheim, 2004

Aortic valve repair leads to a low incidence of valve-related complications. Aicher D, Fries R, Rodionychewa S, Schmidt K, Langer F, Schäfers HJ. Eur J Cardiothorac Surg. 2010 Jan;37(1):127-32. doi: 10.1016/j.ejcts.2009.06.021. Epub 2009 Jul 29.

Preoperative aortic root geometry and postoperative cusp configuration primarily determine long-term outcome after valve-preserving aortic root repair. Kunihara T, Aicher D, Rodionychewa S, Groesdonk HV, Langer F, Sata F, Schäfers HJ. J Thorac Cardiovasc Surg. 2012 Jun;143(6):1389-95. doi: 10.1016/j.jtcvs.2011.07.036. Epub 2011 Sep 8.

Causes and management of aortic valve regurgitation after aortic valve reimplantation. Giebels C, Aicher D, Kunihara T, Rodionychewa S, Schmied W, Schäfers HJ. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Mar;145(3):774-80. doi: 10.1016/j.jtcvs.2012.03.016. Epub 2012 Apr 11.

Mid-term results after sinutubular junction remodelling with aortic cusp repair. Asano M, Kunihara T, Aicher D, El Beyrouti H, Rodionychewa S, Schäfers HJ. Eur J Cardiothorac Surg. 2012 Dec;42(6):1010-5. doi: 10.1093/ejcts/ezs120. Epub 2012 Apr 14.

Outcomes after valve-preserving root surgery for patients with Marfan syndrome. Kunihara T, Aicher D, Rodionychewa S, Asano M, Tochii M, Sata F, Schäfers HJ. J Heart Valve Dis. 2012 Sep;21(5):615-22.

Lebenslauf

1977	28. April, geboren in Kujbushev/Samara in Rußland als Tochter von Vera Rodionycheva, geb. Kozlova, und Valentin Rodionychev
09/1984 – 05/1992	Allgemeinschule in Samara
09/1984 – 05/1992	Musikschule in Samara, Instrument: Geige
09/1992 – 06/1994 09/1994 – 07/1995	Medizinisches Lizeum-Kolleg in Samara, Abschluss: Abitur 1. und 2. Semester an der medizinischen Staatsuniversität, Samara, Russland
10/1995 – 02/1997 10/1997	Abitur am Studienkolleg der Universität des Saarlandes Beginn des Studiums an der medizinischen Fakultät der Universitätskliniken des Saarlandes
09/2000 09/2002 09/2004	Ärztliche Vorprüfung 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2003-07/2005	Wissenschaftliche Tätigkeit an der Klinik III für Innere Medizin der Universität des Saarlandes (Direktor: Professor Dr. med. Böhm) Arbeitsgruppe Professor Dr. med. Laufs Forschungsschwerpunkt: Einfluss der Statinen auf die Myokardhypertrophie
10/2004-09/2005	Praktisches Jahr an der Universitätskliniken des Saarlandes
10/2005	Ärztliche Prüfung
01/2006-02/2012	Assistenzarzt der Klinik für Herz, Thorax- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes
02/2012 bis heute	Assistenzarzt in Weiterbildung der SHG-Klinik für Herz-, Thoraxchirurgie in Völklingen

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Laufs, der durch seine Betreuung und sein Glauben mich zum Schreiben dieser Arbeit stets ermutigt und bei Planung und Durchführung der Experimente unterstützt hat.

Herrn Professor Dr. Böhm gilt mein Dank für seine Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten zu wecken und für die Möglichkeit, die vorgelegte Experimente in den Forschungslaboratorien der Klinik III für Innere Medizin der Universität des Saarlandes durchführen zu können.

Für das sehr angenehme und gute Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Ärzten, Doktoranten und technischen Assistenten des Labors der Klinik herzlich bedanken.

Besonders bei meiner Mutter, meinem Mann und meiner Tochter möchte ich mich für Ihre motivierende Unterstützung herzlich bedanken.