Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg Vorstand: Prof. Dr. med. Kuhn

Auswirkung der SPRED2-Defizienz auf die kardiale Funktion und Beeinflussung durch die Behandlung mit dem Aldosteronantagonisten Eplerenon

Dissertation zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

Anne Marie Augustin

aus Würzburg

Würzburg, 2017

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer.nat. Kai Schuh Koreferent/Koreferentin: Univ.-Prof. Dr. med. Christoph Maack Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2018

Die Promovendin ist Ärztin

Meiner Familie, meinen Freunden und Andreas.

Inhalt

1	Ein	leitung1		
	1.1	Der	r Ras/ERK-MAPK-Signalweg	1
	1.2	Ma	lignome und Rasopathien infolge der Fehlregulation des Ras/ERK-MAP-	
	Kinase-Signalweges		nalweges	2
	1.3	SPF	RED	4
1.3.1 Struktur		.1	Struktur	4
	1.3	.2	Expression	6
	1.3	.3	Funktion	7
	1.3	.4	Klinischer Bezug	8
	1.3	.5	Phänotyp der SPRED2-KO-Maus	9
1.4 Mausmodell		usmodell 1	3	
	1.4	.1	"Gene-trap"-Methode1	3
	1.5	Das	s Renin-Angiotensin-Aldosteron-System14	4
	1.6	Ald	osteron1	6
	1.6	.1	Aldosteronantagonisten 18	8
	1.6	.2	Hyperaldosteronismus der SPRED2-KO Tiere aufgrund einer gesteigerten	
	Expression der Aldosteron-Synthase		sion der Aldosteron-Synthase 20	D
	1.7	Kol	lagen und Fibrosierung im Herzen2	1
	1.8	Ele	ktrophysiologie des Herzens 22	2
	1.9	Kar	diologische Untersuchungsmethoden2	3
	1.9	.1	Das Elektrokardiogramm 2	3
	1.9	.2	Die elektrophysiologische Untersuchung2	5
	1.10	Ele	ktrokardiogramm der Maus20	6

	1.11	Her	zrhythmusstörungen	28
	1.1	1.1	Bradykarde Herzrhythmusstörungen	28
	1.1	1.2	Tachykarde Herzrhythmusstörungen	30
	1.12	Plö	tzlicher Herztod	32
	1.13	lsop	proterenol	33
	1.14	Rec	duzierte Lebenserwartung der SPRED2-KO Mäuse	34
	1.15	Ziel	der Arbeit	35
2	Ma	teria	al und Methoden	37
	2.1	Kol	lektivbeschreibung	37
	2.2	Che	emikalien	38
	2.3	Ant	ikörper	39
	2.4	Ver	wendete Geräte	39
	2.5	Sof	tware	40
	2.6	Pro	teinanalyse	40
	2.6	.1	Proteingewinnung	40
	2.6	.2	SDS-PAGE und Western Blot	41
2.7 Kardio		Kar	diologische Untersuchungen	43
	2.7	.1	Elektrokardiogramm (EKG)	43
	2.7	.2	Arrhythmie-Score	45
	2.7	.3	Invasive Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)	47
	2.7	.4	Gruppen für die kardiologischen Untersuchungen	50
	2.8	Hist	tologische Untersuchungen	52
	2.8	.1	PSR-Färbung	52
	2.8	.2	HE-Färbung	54
	2.8	.3	X-Gal-Färbung	55

	2.9	Stat	tistik und Datenanalyse	56
3	Erg	ebni	sse	57
	3.1	X-G	al-Färbung	57
	3.2	We	stern Blot-Analysen	58
	3.3	EKG	6 Auswertung	60
	3.3	.1	Auswertung der basalen Ruhe- und Stress-EKGs	60
	3.3	.2	Auswertung der Ruhe- und Stress-EKGs der mit Eplerenon behandelter	۱
	Tie	rgru	open	66
	3.4	EKG	GArrhythmieauswertung	71
	3.4	.1	Basale Arrhythmieauswertung	71
	3.4	.2	Arrhythmieauswertung nach Eplerenon-Behandlung	73
	3.5	EPL	J	76
	3.5	.1	Basale EPU-Ergebnisse	76
	3.5	.2	EPU-Ergebnisse nach Eplerenon-Behandlung	80
	3.6	Koll	lagenbestimmung	83
4	Dis	kussi	ion	85
	4.1	Kar	diologischer Phänotyp der SPRED2-KO-Mäuse und Risikofaktoren für der	n
	plötzli	cher	า Herztod	85
	4.2	Нур	peraldosteronismus	86
	4.3	Elel	ktrokardiogramm	88
	4.4	Arrl	hythmien im EKG	91
	4.5	Elel	ktrophysiologie	93
	4.6	Nar	kosebedingte Beeinflussung	94
	4.7	Koll	lagenbestimmung	94
	4.8	Ma	usmodell	95

4	1.9	Gesamtbewertung	97	
5	Zus	sammenfassung	100	
6	Lite	eraturverzeichnis	102	
7	Abl	bildungsverzeichnis	132	
8	Tab	bellenverzeichnis	135	
Da	Danksagung			

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ACTH	Adrenocorticotropin
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
АТР	Adenosintriphosphat
BNP	B-type natriuretisches Peptid (Brain natriuretic peptide)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
ERK	Extrazellulär signalregulierte Kinase
ES	Embryonale Stammzellen
FGF	Fibroblast growth factor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
НСС	Hepatozelluläres Karzinom
HET	Heterozygot
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K⁺	Kalium-Ion
КВD	c-Kit-bindende Domäne
КО	Knockout
lacZ	β-Galactosidase Gen
МАРК	Mitogen-Aktivierte Proteinkinase
MR	Mineralkortikoidrezeptor
Na⁺	Natriumion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma

Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SA-Block	Sinuatrialer Block
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNRT	Sinusknotenerholzeit
SPRED	Sprouty-related protein with EVH1 domain
SOS	Son of sevenless
TEMED	Tetramethylethylendiamin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

1.1 Der Ras/ERK-MAPK-Signalweg

Der MAP-Kinase-Signalweg oder die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade ist ein intrazellulärer Signaltransduktionsweg, der über mindestens drei seriell geschaltete Kinasen regulierend in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus eingreift. Bei diesen Phosphorylierungskaskaden wird das Signal durch Phosphorylierung und konsekutive Aktivierung der jeweils nachgeschalteten Kinase weitergegeben, was eine Aktivierung von Zielproteinen in Zytoplasma und Zellkern zur Folge hat. MAP-Kinase-Signalwege kontrollieren eine Vielzahl an grundlegenden zellbiologischen Abläufen wie Zellproliferation, - differenzierung und -wachstum sowie den programmierten Zelltod. Auch im Rahmen der Embryogenese spielen MAPKs eine entscheidende Rolle [1-4].

Bis heute wurden vier verschiedene MAP-Kinase-Familien im Säugetier entdeckt und nach den jeweils beteiligten MAP-Kinasen benannt: Extrazellulär-signalregulierte Kinase 1 und 2 (ERK1/2), c-Jun N-terminale Kinase (JNK), p38 und ERK5. Weitere Kinasen wie ERK3/4 und ERK7/8 zeigen zwar Ähnlichkeiten mit den typischen MAPKs, unterscheiden sich aber im Aktivierungsmechanismus, was nahelegt, dass es sich nicht um Bestandteile des klassischen MAP-Kinasesignalwegs handelt [5]. Als klassischer MAP-Kinase-Signalweg wird heute der Ras/ERK-MAPK-Signalsweg (ERK1/2) angesehen. Über Aktivierung durch Liganden wie Mitogene, Wachstumsfaktoren und Zytokine wirkt dieser Signalweg hauptsächlich auf Zellwachstum, -proliferation und differenzierung [6]. Eine bedeutende Rolle hat dies auch für die Kanzerogenese - bei ca. 30 Prozent aller Tumorerkrankungen zeigt sich dieser Signalweg verstärkt aktiviert [7, 8].

Durch Bindung des jeweiligen Liganden an den extrazellulären Teil der Rezeptortyrosinkinase (RTK), ein Transmembranrezeptor, dessen intrazellulärer Teil eine Tyrosinkinaseaktivität aufweist, erfolgt durch Konformationsänderung eine Dimerisierung des Rezeptors. Durch die Dimerisierung wird die Autophosphorylierung des Rezeptors ermöglicht, was wiederum für die Signaltransduktion unentbehrlich ist.

Es folgt die Kopplung an Adaptermoleküle wie Shc und Grb2, worüber es zur Bindung des Austauschfaktors Sos an den Signalkomplex kommt [9]. Sos bewirkt die Aktivierung der GTPase Ras, welches wiederum direkt mit der Proteinkinase Raf interagiert. Raf wird von weiteren nicht direkt am Signalweg beteiligten Kinasen phosphoryliert und aktiviert MEK, welches wiederum MAP Kinasen wie ERK1 und ERK2 aktiviert. Letztlich kommt es zur Translokation von ERK in den Zellkern, worüber die Regulation von Transkriptionsfaktoren erfolgt [10-13].



Abbildung 1: Ras/ERK-MAPK-Signalweg

Stimulation der RTK durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine führt zur Aktivierung der MAPK ERK1 und ERK2. ERK phosporyliert zytoplasmatische und nukleäre Zielproteine, wodurch die Regulierung von Zielgenen erfolgt. Abbildung basierend auf Bundschu, 2005.

1.2 Malignome und Rasopathien infolge der Fehlregulation des

Ras/ERK-MAP-Kinase-Signalweges

Eine pathologisch gesteigerte Aktivität des Ras/ERK-MAP-Kinase-Signalweges wurde mit verstärkter Zellproliferation, Invasivität, Defekten der Apoptose und ausgeprägter

Neovaskularisierung in Verbindung gebracht. Dies führte zu der Untersuchung dieses Signalweges im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen, deren ätiopathologische Grundlage stets ein Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod ist. Aktivierende Mutationen von Ras oder B-Raf können beim Menschen in verschiedensten Geweben zu malignen Neoplasien führen [8, 14-18].

Darüber hinaus kann eine Fehlregulation des Ras/ERK-MAPK-Signalwegs als ursächlich für eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe von Erkrankungen gesehen werden, welche aufgrund der ihr zugrundeliegenden Hochregulation des Ras-abhängigen Signalweges als "Rasopathien" bezeichnet werden [19]. Der häufig auch als Neuro-Kardio-Fazio-Kutan-Syndrome (NCFC-Syndrome) bezeichneten Syndromgruppe liegen Keimbahnmutationen in Genen zugrunde, die für Proteine des Ras/ERK/MAP-Kinase-Signalswegs kodieren. Die klinische Symptomatik der einzelnen Syndrome präsentiert sich sehr heterogen, jedoch gibt es auch starke Überlappungen zwischen den einzelnen Krankheitsbildern, wie zum Beispiel charakteristische kraniofaziale Auffälligkeiten, kardiale Defekte, mentale Retardierung und Verhaltensauffälligkeiten sowie ein erhöhtes Tumorrisiko.

Das Noonan-Syndrom ist unter den Rasopathien mit 1:1000 – 1:2500 eine relativ häufige genetische Erkrankung und folgt einem autosomal-dominanten Erbgang. Zu den typischen Merkmalen des Noonan-Syndroms zählen charakteristische kraniofaziale Dysmorphien, proportionierter Minderwuchs, angeborene Herzfehler und neurokognitive Entwicklungsverzögerungen [19-22].

Das Costello-Syndrom ist eine mit vergleichsweise geringerer Inzidenz (1:100 000) eher sporadisch auftretende genetische Erkrankung mit autosomal-dominantem Erbgang. Phänotypisch zeigen sich hierbei kraniofaziale Auffälligkeiten, wie vergröberte Gesichtszüge und Makrozephalus, Gedeihstörungen, kardiale und muskuloskelettale Anomalien sowie häufig eine geringgradige geistige Retardierung [23].

Eine weitere den Rasopathien angehörende Erkrankung ist die autosomal-dominant vererbte Neurofibromatose Typ 1, der eine Mutation des NF1-Gens auf Chromosom 17 zugrunde liegt. Der hierdurch entstehende Mangel an Neurofibromin bewirkt eine andauernde Aktivierung von Ras, was wiederum als Ursache für die typischen

Erkrankungsmerkmale, wie multiple Neurofibrome, Café-au-lait-Flecken, Hamartone der Iris - sogenannte Lisch-Knoten - und Optikusgliome, gesehen wird.

Die meisten den Rasopathien angehörenden Syndrome haben außerdem ein erhöhtes Malignomrisiko gemein. Die aufgeführten Erkrankungen verdeutlichen die immense Wichtigkeit eines strikt regulierten Ras/ERK-MAP-Kinase-Signalwegs für die physiologische Entwicklung des Menschen [24].

Konsekutiv bietet die Entwicklung von Wirkstoffen, deren Angriffspunkt der molekulare MAP-Kinase-Signalweg ist, ein vielversprechendes Feld der aktuellen Krebstherapieforschung. Verschiedene dieser Wirkstoffe, wie zum Beispiel VEGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (Vascular endothelial growth factor receptor), befinden sich bereits in fortgeschrittenen Stadien der klinischen Entwicklung [8, 25-27].

1.3 SPRED

SPRED-Proteine sind membranassoziierte Inhibitoren des Ras/ERK-MAPK-Signalwegs. Zusammen mit anderen strukturverwandten Sprouty-Proteinen wirken sie über die Inhibierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen regulierend auf die Proliferation, Differenzierung und das Wachstum der Zellen eines Organismus [28]. Bisher wurden drei Isoformen von SPRED im Säugetier beschrieben, die sich sowohl in ihrer chromosomalen Lokalisation, als auch in der Ausprägung ihrer Expression in verschiedenen Geweben unterscheiden: SPRED1, SPRED2 und SPRED3 [29, 30].

1.3.1 Struktur

SPRED-Proteine bestehen aus drei Domänen: Einer N-terminalen Enabled/VASP homologen (EVH1-) Domäne, einer zentralen c-Kit-bindenden Domäne (KBD) und einer C-terminalen cysteinreichen und mit Sprouty verwandten (SPR-) Domäne [28, 29]. Murines SPRED2 ist ein 46 kDa großes Protein bestehend aus 411 Aminosäuren. Das dafür kodierende Gen besteht aus 1233 proteinkodierenden Nukleotiden aufgeteilt auf sechs Exons. Exon 1 -3 kodieren für die EVH1 Domäne, Exon 4 und 5 kodieren für die

Region zwischen EVH1 und KBD und Exon 6 kodiert für die KBD- und die SPR-Domäne [31].

Die genomische Struktur des murinen SPRED1 ist der von SPRED2 sehr ähnlich, sie enthält jedoch ein weiteres Exon, welches für einen Teil der Region zwischen EVH1 und KBD kodiert. SPRED3 verfügt mit sechs Exons über eine ähnliche Struktur wie SPRED2, jedoch ist hier wegen des Austauschs von Arginin durch Glycin die KBD-Domäne nicht funktionell [29].

Die N-terminale EVH1-Domäne ist eine evolutionär konservierte Proteindomäne bestehend aus circa 115 Aminosäuren. Als Protein-Interaktionsmodul erkennt und bindet es spezifisch an prolinreiche Sequenzen. Aktuell sind vier Proteinklassen, welche EVH1-Domänen enthalten, bekannt: Ena/VASP Proteine, Homer/Vesl Proteine, die Wiskott-Aldrich Syndrom Proteine und die SPRED-Proteine [32]. Dass die EVH1-Domäne für die Funktion der SPRED-Proteine essenziell ist, zeigte der Verlust der inhibitorischen Wirkung auf den MAP-Kinase-Signalweg, ausgelöst durch N-terminale Deletion der Domäne in SPRED1 und SPRED2 Mutanten [28, 33].

Die c-Kit-bindende Domäne (KBD) besteht aus ungefähr 50 Aminosäuren und befindet sich im Zentrum des Proteins [28, 34].

Die Sprouty-Domäne (SPR) ist eine hochkonservierte cysteinreiche Region bestehend aus ungefähr 110 Aminosäuren. Die SPR-Domäne ist homolog zu dem C-Terminus der Sprouty-Proteine, welche ähnlich wie SPRED als Inhibitoren des MAP-Kinase-Signalweges beschrieben wurden [35, 36]. Die SPR-Domäne ist in SPRED2 essentiell für die MAPK-Signalweg-Regulierung [37, 38], während sie in SPRED1 für die Inhibierung der ERK-Phosphorylierung nicht notwendig zu sein scheint [33].





Exon (Ex) 1, 2 und 3 kodieren für die EVH1-Domäne, Exon 4 und 5 für den Mittelteil und Exon 6 für die KBD- und SPR-Domäne. Die Zahlen über den Exons stehen für die 1233 Protein-kodierenden Nukleotide der SPRED2-cDNA, welche in das 411 Aminosäuren umfassende SPRED2-Protein translatiert werden. Abbildung basierend auf Bundschu, 2005 [31].

1.3.2 Expression

Die endogene SPRED-Promotor-Aktivität und die Expression von SPRED im Menschen und im Tiermodell konnte im Rahmen von Untersuchungen auf RNA-Ebene durch Northern Blots, RT-PCR und In-situ-Hybridisierung sowie auf Proteinebene durch Western Blots und Immunhistochemie weitgehend erforscht werden. Darüber hinaus konnte durch das Erzeugen der SPRED2-KO-Maus (Knockout) via "Gene-trap"-Methode die Promoter-Aktivität von SPRED2 analysiert werden.

Während der murinen Embryogenese zeigte sich eine starke endogene SPRED2-Promotor-Aktivität in ektodermalen und mesodermalen Geweben, danach in sich entwickelndem neuronalem Gewebe, Drüsengewebe, Herz, Lunge, Intestinum, Urogenitaltrakt und Extremitäten [39, 40].

In der adulten Maus wird SPRED2 nahezu ubiquitär exprimiert mit vorherrschender Expression im Gehirn und anderen neuronalen Geweben, Drüsengewebe und in den glatten Muskelzellen von Gefäßen, Darm und Uterus [41].

Während SPRED1 ebenfalls ubiquitär mit Prädominanz im Gehirn vorhanden ist, wurde SPRED3 bisher fast ausschließlich im Gehirn nachgewiesen [29, 42]. Folglich zeigen die SPRED-Isoformen ein spezifisches Expressionsmuster in unterschiedlichen Geweben. Dass SPRED2 eine wichtige Rolle in der Organogenese spielt, wird durch die Beobachtung verdeutlicht, dass insbesondere die in der Entwicklung befindlichen Gewebe eine erhöhte SPRED2-Expression aufweisen.

Im Menschen konnte SPRED2 durch Messung der Immunreaktion mittels Multi-Tissue-Arrays bislang in Leber, Haut, in der Mukosa des Magen-Darm-Trakts und in Drüsengewebe wie Schweißdrüsen, Prostata und Speicheldrüsen nachgewiesen werden [42].

1.3.3 Funktion

Als Inhibitoren des weit verbreiteten Ras/ERK-MAP-Kinase-Signalweges sind SPRED-Proteine an der Regulation von Zellproliferation und –differenzierung einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen beteiligt. Die Aktivierung des Ras/ERK-MAP-Kinase-Signalweges infolge Bindung an Rezeptortyrosinkinasen wird durch unterschiedliche Liganden, wie Wachstumsfaktoren (FGF, EGF, VEGF), Zytokine und Chemokine, vermittelt.

Der notwendige inhibitorische Effekt durch SPRED wird durch Interaktion mit unterschiedlichen Komponenten des Signalwegs vermittelt, deren Position am ehesten zwischen der RTK und Ras oder zwischen Ras und Raf zu liegen scheint [28].



Abbildung 3: SPRED als Inhibitor des Ras/ERK/MAPK-Signalsweges

Stimulation der RTK durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine führt zur Aktivierung der MAPKs ERK1 und ERK2. ERK phosporyliert zytoplasmatische und nukleäre Zielproteine, wodurch die Regulierung von Zielgenen erfolgt. SPREDs inhibieren den Ras/ERK/MAPK-Signalweg an unterschiedlichen Stellen wie zum Beispiel zwischen Ras und Raf. Abbildung basierend auf Bundschu, 2005.

1.3.4 Klinischer Bezug

Durch die Verwendung von unterschiedlichen Mausmodellen wurden die Auswirkungen der Defizienz von SPRED auf verschiedene Organsysteme genauer untersucht. Nach aktuellem Kenntnisstand nimmt SPRED regulatorisch Einfluss auf das Knorpel- und Knochenwachstum [43], auf hämatopoetische Prozesse [44], beeinflusst die Allergen-induzierte Eosinophilie der Atemwege [45] und ist am zytoplasmatischen Vesikeltransport [42, 46] beteiligt. Darüber hinaus wirkt SPRED hemmend auf Zellmotilität und Metastasierung [27, 47].

Seit der Entdeckung von SPRED im Jahre 2001 wurden erste Hinweise auf die Folgen einer fehlenden oder veränderten SPRED-Expression beim Menschen gefunden. Unlängst legten Forschungen, welche die Dysregulation der menschlichen SPRED-Expression in Verbindung mit dem Auftreten von Neoplasien wie Brust-, Prostata-, Haut- und Leberkrebs bringen konnten, den Verdacht nahe, dass diese Proteine eine

wichtige Rolle bei der Tumorgenese spielen und SPRED als prognostischer Tumormarker fungieren könnte [48-53]. Darüber hinaus zeigte sich die Mutation des menschlichen SPRED1 mit partieller oder vollständiger Defizienz als ursächlich für das Legius-Syndrom [54]. Diese genetische Erkrankung weist große Ähnlichkeit zu der Neurofibromatose auf und gehört zu den Rasopathien.

In der Humanmedizin ergab außerdem die Untersuchung der Tumoren bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) eine erhöhte ERK-Phosphorylierung und eine herabgesetzte Expression von SPRED1/2. Weiterhin konnte bei HCC Patienten mit niedriger SPRED Expression eine erhöhte Inzidenz von Tumorwachstum und Metastasierung nachgewiesen werden, wohingegen bei Patienten mit erhöhten SPRED-Levels eine verminderte Invasivität und Metastasierungsneigung festgestellt werden konnte [55]. Wenn auch SPRED-Mutationen bislang für keine Tumorentität als alleinige Ursache gesehen werden, könnten sie in Zukunft wegen dieser Feststellungen und aufgrund ihrer antiproliferativen Wirkung als Prognosefaktoren und potenzielle Ziele in der Krebstherapie dienen.

1.3.5 Phänotyp der SPRED2-KO-Maus

SPRED2-KO-Mäuse zeigen phänotypisch einen Achondroplasie-ähnlichen Minderwuchs mit im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vermindertem Wachstum und Körpergewicht, was sich bei den Männchen stärker zeigt als bei den Weibchen. Darüber hinaus weisen sie verkürzte Tibia-Längen und verschmälerte Wachstumsfugen [43] sowie eine erhöhte Blutungsneigung im Rahmen von Verletzungen auf. Dabei ist sowohl der absolute Blutverlust erhöht als auch die Blutungszeit signifikant verlängert. Ob dies einer Dysfunktion der Thrombozyten bei der primären Blutstillung geschuldet ist oder aber andere Pathomechanismen eine Rolle spielen, ist bislang noch nicht geklärt.

Bei den SPRED2-KO-Tieren konnte weiterhin eine häufig unilateral ausgebildete Nierendegeneration unter Ausbildung einer Hydronephrose, mit Lymphozyteninfiltration und Atrophie des Nierengewebes festgestellt werden.

Weitere Auffälligkeiten der SPRED-2-KO-Mäuse sind ein exzessives Putzverhalten, unter welchem es gehäuft zu selbstzugefügten Verletzungen kommt. Grund hierfür

könnte eine generell gesteigerte Anfälligkeit für Stress sein, was vor dem Hintergrund einer erhöhten Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (HPA) mit konsekutiv erhöhten Spiegeln an Stresshormonen bei den KO-Tieren plausibel erscheint.

Die Tiere zeigen des Weiteren eine Polydipsie mit nahezu verdoppeltem täglichem Wasserkonsum. Hierbei konnte ein Diabetes mellitus als Ursache für die Polydipsie ausgeschlossen werden. Auch ein Diabetes insipidus centralis war mit Hilfe der Durchführung eines Durstversuches und der unveränderten ADH-Konzentration im Serum, die vor und nach dem Dursten bestimmt wurden, nicht nachweisbar. Da darüber hinaus bei den KO-Mäusen eine erhöhte Serumosmolalität feststellbar war, die keine Kompensation durch die Polydipsie zeigte, vermutete man zunächst eine Störung der renalen Salzausscheidung, welche zur osmotischen Diurese und gesteigertem Trinkverhalten führt. Jedoch scheint bei der SPRED2-KO-Maus keine Dysregulation des Salz- und Wassertransports zugrundezuliegen, sondern die erhöhte Serumosmolalität vielmehr einer gestörten Hormonhomöostase geschuldet zu sein. So konnte bei den KO-Tieren ein Hyperaldosteronismus mit nahezu verdoppelten Aldosteronspiegeln festgestellt werden. Eine Hyperkaliämie, welche zu erhöhter Aldosteronsynthese führt, konnte hingegen nicht nachgewiesen werden, des Weiteren auch keine erhöhte Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems, was eine primäre Genese des Hyperaldosteronismus nahelegt [56]. Der beim Menschen häufig mit Hyperaldosteronismus assoziierte arterielle Hypertonus konnte demgegenüber bei den SPRED2-Mäusen nicht beobachtet werden, sowohl bei der nichtinvasiven als auch bei der invasiven Blutdruckmessung lagen die Werte im Mittel im normotensiven Bereich (siehe Abbildung 4).

Abschließend konnten initiale kardiologische Untersuchungen eine kardiale Hypertrophie mit erhöhter Herz-/Körpergewicht-Ratio (siehe Abbildung 5), des Weiteren eine erhöhte Wanddicke des linken Ventrikels und eine gesteigerte Ejektionsfraktion (siehe Abbildung 6) nachweisen. Dies führte zu der Annahme, dass der Phänotyp der SPRED2-KO-Maus sich auch in einer pathologisch veränderten

Herzleistung niederschlägt und hierüber die Überlebenszeit der Tiere negativ beeinflusst werden könnte [57].



Abbildung 4: Ergebnisse der Blutdruckmessung von Ullrich et al.

Blutdruckmessungen bei WT- und KO-Mäusen. Sowohl bei Betrachtung des systolischen (SBP) als auch des diastolischen (DBP) und des mittleren Blutdrucks (MBP) zeigte sich im Mittel kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Nach Ullrich et al.



Abbildung 5: HW/BW-Ratio

Erhöhte Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio bei den KO-Mäusen aufgrund kardialer Hypertrophie bei insgesamt vermindertem Körpergewicht. Nach Ullrich et al.



Abbildung 6: Ergebnisse aus Hämodynamik von Ullrich et al.

Erhöhte Ejektionsfraktion (EF) bei den KO-Tieren (entspricht dem prozentualen Anteil des Schlagvolumens am enddiastolischen Volumen). Dies spricht für eine zum Zeitpunkt der Messung kompensierte kardiale Auswurfsituation bei den KO-Tieren. Nach Ullrich et al.

1.4 Mausmodell

Die Maus als Modellorganismus stellt ein bedeutsames biologisches und biomedizinisches Werkzeug zur Durchführung von in vivo Untersuchungen dar. Seit zur Jahrhundertwende das menschliche und das murine Genom vollständig sequenziert werden konnten [58-60], steht die Wissenschaft nun vor der Aufgabe, die Funktionen der proteinkodierenden Sequenzen zu untersuchen. Zur Erforschung der Genfunktionen von Säugetieren haben sich Mäuse hierbei wegen ihrer genetischen Ähnlichkeit zum Menschen als besonders wertvoll herausgestellt. Als Säugetiere bieten sie eine große Vergleichbarkeit mit dem Menschen bezüglich Entwicklung, Physiologie, Verhalten und Erkrankungen [61]. Die hohe Reproduktionsrate, begrenzte räumliche Anforderungen, einfache Haltung sowie den daraus resultierenden niedrigen Kosten stellen darüber hinaus praktische Vorteile dar. Vor dem Hintergrund der Übertragung auf den Menschen spielt die Manipulation von Genen eine wichtige Rolle für das Verständnis der Genfunktion und die Erforschung von Krankheiten, bei welchen eine genetische Ursache vermutet wird.

Bei der KO-Maus werden mittels Manipulation von embryonalen Stammzellen, welche anschließend in die murine Keimbahn eingebracht werden, ein oder mehrere Gene gezielt deaktiviert. Die im Jahre 2007 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichneten Wissenschaftler Capecchi, Evans und Smithies legten 1989 durch die erstmalige Kombination von gezielter Genmodifikation [62, 63] mit der in vitro Kultivierung von embryonalen Stammzellen [64, 65] den Grundstein für die Entwicklung der ersten KO-Maus.

1.4.1 "Gene-trap"-Methode

Gene-trapping ist eine schnelle und kostengünstige Technik zur Herstellung einer großen Vielfalt an Insertionsmutationen im gesamten Genom und ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung von Expressionsmustern spezieller Gene im Mausmodell [66-69]. Im Gegensatz zum "Gene-targeting" basiert "Gene-trapping" auf der zufälligen Integration eines speziellen "Gene-trap"-Vektors ins Genom. Hierbei wird der Gene-Trap-Vektor über Elektroporation oder retrovirale Infektion von embryonalen

Stammzellen (ES-Zellen) in das murine Genom eingebracht. Die ES-Zellen mit dem integrierten Vektor werden in Blastozysten injiziert und diese in die Mäuseweibchen reimplantiert. Ein Gene-trap-Vektor besteht aus einem promotorlosen Reportergen, zum Beispiel lacZ, welches eine Verfolgung der endogenen Promotoraktivität ermöglicht. Des Weiteren beinhaltet er einen genetischen Selektionsmarker, meist ein Gen für eine Antibiotika-Resistenz wie neo^R, welches die positive Selektion von ES-Zellen mit erfolgreich integriertem Gen-Trap-Vektor aus einer mit Antibiotika versetzten Kultur ermöglicht. Die so gewonnenen embryonalen Stammzellen werden zur Erzeugung chimärer KO-Mäuse verwendet. Mit Hilfe des Reportergens können nun Gewebe identifiziert werden, in denen das betreffende Gen aktiv ist. Diese exprimieren die β-Galaktosidase und können durch X-Gal-Färbung detektiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten SPRED2-KO-Mäuse wurden zwecks Genablation und Funktionserforschung im lebenden Organismus mit Hilfe des ES-Zellklons XB228 generiert [43]. Der dort enthaltene "Gene-trap"-Vektor inseriert zwischen Exon 4 und 5 im SPRED2-Gen und wurde so unter die Kontrolle des endogenen SPRED2-Promotors gebracht. Die Durchführung von X-Gal-Färbungen ermöglichte so die Untersuchung der Promotoraktivität in jedem Organ. Die Intensität der Farbreaktion korreliert hierbei mit dem Gehalt an β -Galaktosidase [70].

1.5 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) besteht aus verschiedenen Hormonen und Enzymen, die den Flüssigkeits- und Salzhaushalt steuern und stellt eines der wichtigsten blutdruckregulierenden Systeme des Körpers dar [71]. Das in den juxtaglomerulären Zellen der Niere synthetisierte und gespeicherte Enzym Renin wird bei Blutdruckabfall [72, 73], eine durch die Macula densa Zellen detektierte erniedrigte Kochsalzkonzentration [74] und durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems [75, 76] vermehrt freigesetzt [77-82]. Renin bewirkt als Protease eine Abspaltung von Angiotensin I aus dem in der Leber gebildeten Peptid Angiotensinogen [83].

Angiotensin I wird vom Angiotensin Converting Enzyme (ACE), eine Zink-Metalloprotease, die unter anderem in den luminalen Endothelzellen der Lunge und

Nebennieren vorkommt, in das Oktapeptid Angiotensin II überführt, welches das eigentliche Effektorpeptid des RAAS darstellt. Als Vasokonstriktor der peripheren Gefäße bewirkt Angiotensin II eine direkte Steigerung des Blutdrucks [84]. In den Nieren reguliert Angiotensin II in Abhängigkeit des arteriellen Blutdrucks den renalen Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Hierzu führt Angiotensin II bei Hypotension zu einer Verengung der Vasa efferentia, bei Hypertension zu einer Vasokonstiktion der Vasa afferentia [85, 86]. In der Nebennierenrinde führt Angiotensin II zu einer Freisetzung von Aldosteron [87]. Über seine Wirkung auf das zentrale Nervensystem fördert Angiotensin II Durstgefühl und Salzhunger.

Einer überschießenden Wirkung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems wird durch negative Rückkopplung entgegengewirkt. Hypertonus, Angiotensin II und Aldosteron führen so zu einer verminderten Freisetzung von Renin [78, 88]. Neben den physiologischen Effekten zeigen Angiotensin II und Aldosteron auch eine Beteiligung an pathophysiologischen Effekten, wie der Hypertrophie und Fibrosierung des Myokards und der Gefäße im Rahmen von Hypertonie oder Herzinsuffizienz [89].

Das RAAS mit seinen verschiedenen Komponenten stellt somit einen essenziellen Regelkreislauf für eine adäquate Reaktion auf Schwankungen des Blutdrucks und Störungen des Salz- und Flüssigkeitshaushalts dar [90].



Abbildung 7: Vereinfachtes Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Abspaltung von Angiotensin I aus Angiotensinogen durch Renin, durch ACE wiederum Abspaltung von Angiotensin II. Förderung von Vasokonstriktion und Durstgefühl durch Angiotensin II sowie Freisetzung von Aldosteron und hierüber verstärkte Natrium- und Wasserretention.

1.6 Aldosteron

Die Erstbeschreibung des Aldosterons erfolgte 1953 durch Simpson und Tait [91]. Aldosteron ist ein natürliches, aus Cholesterin gebildetes Steroidhormon, dessen wesentlicher Syntheseschritt durch das Enzym Aldosteronsynthase katalysiert wird. Seine regulierende Wirkung auf den Flüssigkeits-, Salz- und Säure-Basen-Haushalt und somit auf die Blutdruckregulation ist für den menschlichen Körper essentiell [92]. Bildungsort dieses Mineralkortikoids ist die Zona glomerulosa der Nebennierenrinde [93-95]. Circa 30 – 50 Prozent des Aldosterons liegen in freier Form im Plasma vor, der Rest ist an Albumin und das Corticosteroid-binding-globulin (CBG) gebunden. Die Ausscheidung erfolgt über den Urin als Aldosteron-18-Glucuronid, Tetrahydroaldosteron-3-Glucuronid sowie zu einem Teil als freies Aldosteron. Seine Sekretion wird im Rahmen des RAAS durch die Wirkung von Angiotensin II gefördert, welches bei Hyponatriämie, Hypovolämie sowie reduzierter Nierendurchblutung vermehrt gebildet wird [95]. Hyperkaliämie führt direkt zu einer erhöhten

Aldosteronausschüttung [96-98], des Weiteren fördert ACTH die Aldosteronsekretion, während das atriale natriuretische Peptid (ANP) die Sekretion hemmt [99]. Seine Wirkung entfaltet Aldosteron insbesondere über die Stimulation von intrazellulären Mineralkortikoidrezeptoren (MR) in den Tubuluszellen der Nieren [100], welche in Struktur und Aktivierungsmechanismus stark den Glukokortikoidrezeptoren ähneln [101, 102]. Durch Binden von Aldosteron an den zytosolischen intrazellulären MR kommt es zur Translokation des Steroid-Rezeptor-Komplexes in den Nukleus, wo dieser regulatorisch auf die Transkription und Proteinsynthese wirkt. Hierdurch erfolgt die vermehrte Expression von luminalen Natrium- und Kaliumkanälen sowie von basolateralen Natrium-Kalium-ATPasen. Die Folge ist eine gesteigerte Rückresorption von Natrium und Wasser und eine erhöhte Ausscheidung von Kalium und Protonen. Jedoch werden MR ebenfalls in anderen Geweben wie Myokard, Endothel und glatten Muskelzellen in Gefäßen, Colon, epithelialen Geweben und im Gehirn exprimiert [92, 101, 103-105].

Die Effekte von Aldosteron werden in akut oder nicht-genomisch beziehungsweise in chronisch oder genomisch unterschieden. Während nicht-genomische Effekte ihre Wirkung bereits nach wenigen Minuten entfalten, dauert es bis zum Wirkungseintritt von genomischen Effekten über Transkription, Translation und Proteinexpression mindestens 0,5 Stunden. Die schnelle, nicht-genomische Wirkung zum Beispiel in Form einer Erhöhung des Gefäßwiderstands [106] wird über den klassischen MR vermittelt [105-107]. Darüber hinaus scheint es nicht-genomische Effekte, wie die negative Inotropie zu geben, die ihre Wirkung unabhängig von MR vermittelt [108]. Es ist bislang noch nicht im Einzelnen geklärt, welche Effekte des Aldosterons durch genomische und welche durch nicht-genomische zum Tragen kommen.

Ein chronischer Hyperaldosteronismus kann beim Menschen primär als sogenanntes Conn-Syndrom [109, 110], oder aber wesentlich häufiger als sekundärer Hyperaldosteronismus zum Beispiel im Rahmen von Herzinsuffizienz und Leberzirrhose auftreten und zu Alkalose, arteriellem Hypertonus und Fibrose von Herz und Nieren führen [111, 112]. Ursächlich für einen Hypoaldosteronismus können dagegen beispielsweise eine Nebenniereninsuffizienz im Rahmen eines Morbus Addison, das

adrenogenitale Syndrom, eine autonome Neuropathie sowie ein Untergang von juxtraglomerulären Zellen im Rahmen einer diabetischen Nephropathie sein.

Strukturelle Schädigung des Myokards im Rahmen von Myokardinfarkt oder Herzinsuffizienz, isolierte arterielle aber auch die Hypertonie ohne Endorganschädigung [113], führen gesteigerten myokardialen zu einer Aldosteronsynthese [95, 114-117] und zu insgesamt erhöhten Aldosteronspiegeln im Blutplasma [118, 119]. Umgekehrt geht eine gesteigerte Aktivierung des RAAS bei bestehender Herzinsuffizienz mit einer höheren Mortalität einher [120-122]. Dabei geht man inzwischen davon aus, dass manche Wirkungen des Angiotensins überhaupt erst durch das Mitwirken von Aldosteron auftreten, bzw. durch dieses verstärkt werden [123, 124].

Wie auch Angiotensin spielt Aldosteron eine maßgebliche Rolle bei der Entstehung von Herz-Kreislauferkrankungen. So legen zahlreiche Studien der letzten Jahre nahe, dass Aldosteron sowohl über direkte rezeptorvermittelte Wirkung, als auch indirekt via Modulation der Angiotensinrezeptoren zu einem Voranschreiten von kardialer Hypertrophie, Remodeling mit interstitieller Myokardfibrosierung und Störung der Gefäßfunktion führt. Diese Effekte wiederum münden langfristig in Pathologien wie verminderte ventrikuläre Relaxation, gestörte Erregungsleitung und inflammatorische Prozesse in Koronarien und sonstigen Gefäßen und bilden somit den Nährboden für Herzinsuffizienz und plötzlichen Herztod [125-136].

Interessanterweise führt eine medikamentöse Blockierung des Angiotensin-Converting-Enzyms nicht zu einer konsekutiven Verminderung der Aldosteron-Serum-Spiegel und zeigt somit isoliert keine suffiziente Reduktion der aldosteronbedingten Pathologien. Dieses als "Aldosteron-Escape" bezeichnete Phänomen führt zu der Annahme, dass eine Angiotensin-unabhängige Aldosteronsynthese existieren muss [137-143].

1.6.1 Aldosteronantagonisten

Aldosteronantagonisten wie Spironolacton und Eplerenon ähneln strukturell dem körpereigenen Mineralkortikoid. Ihre Wirkung kommt durch direkte Blockade des

intrazellulären Mineralkortikoid-Rezeptors zum Tragen. Zunächst fand diese Wirkstoffgruppe hauptsächlich Einsatz als kaliumsparendes Diuretikum. Inzwischen wurde jedoch für Patienten mit Herzinsuffizienz, arteriellem Bluthochdruck und systolischer Dysfunktion in verschiedenen Studien ein therapeutischer Benefit losgelöst von der renalen Wirkung nachgewiesen [144]. Hierbei wurde neben reduzierten Remodeling-Prozessen in den glatten Muskelzellen der Gefäße und den Myozyten auch eine verbesserte endotheliale Zellfunktion mit der Folge einer verbesserten vaskulären Compliance und verzögerten Endorganschäden festgestellt [145-147]. Eine alleinige Verwendung von ACE-Hemmern zeigte eine nicht suffiziente Reduktion der Aldosteronsynthese, was eine von AT II unabhängige Entstehung und Wirkung von Aldosteron [98] und die Rechtfertigung des Einsatzes von Aldosteronantagonisten neben einer geeigneten Basistherapie inklusive eines ACE-Hemmers nahelegt [140, 148]. In der Wirkstoffgruppe der Aldosteronantagonisten finden vorallem Spironolacton sowie das neuere Eplerenon Verwendung.

Spironolacton wurde in den 1950er Jahren entwickelt und ähnelt strukturmolekular dem Progesteronmolekül, was ursächlich für seine dosisabhängigen sexuellendokrinologischen Nebenwirkungen gesehen werden kann [149, 150]. Derartige Nebenwirkungen wie Gynäkomastie und Potenzstörungen beim Mann beziehungsweise Virilisierung und Zyklusstörungen bei der Frau gefährden die Compliance der Patienten in besonderem Maße. Nebenwirkung aller Aldosteronantagonisten ist die Hyperkaliämie, die dosisabhängig auftritt und insbesondere in Kombination mit ACE-Hemmern regelmäßige Elektrolytkontrollen notwendig macht [150-152].

Eplerenon ist ein kompetetiver Aldosteronantagonist mit hoher Spezifität für den MR [153]. Im Gegensatz zu Spironolacton treten aufgrund seiner Selektivität bei sehr guter Wirksamkeit keine unerwünschten progesteron- und antiandrogen-vermittelten Nebenwirkungen wie Gynäkomastie, Brustschmerzen und Impotenz beim Mann sowie Libidoverlust und Menstruationsbeschwerden bei der Frau auf [154-161]. Strukturchemisch unterscheidet sich Eplerenon von Spironolacton durch Einführen

einer 9α , 11α -Epoxid-Brücke und den Ersatz einer 17α -Thioazetyl-Gruppe durch eine Carbomethoxyl-Gruppe [154].

1.6.2 Hyperaldosteronismus der SPRED2-KO Tiere aufgrund einer gesteigerten Expression der Aldosteron-Synthase

Bei den SPRED2-KO-Mäusen wurden im Rahmen der von Ullrich et al. durchgeführten Untersuchungen im Vergleich zu den WT Mäusen im Jahr 2011 erhöhte Aldosteronspiegel im Serum festgestellt (365.6 ± 146.9 pg/ml (WT) vs. 600.1 ± 289.2 pg/ml (KO); n(WT/KO)=14; **p <0.01). Die Untersuchung der Angiotensin II Konzentration im Serum der Mäuse ergab eine Reduktion von über 50 Prozent bei den KO im Vergleich zu den WT Mäusen. Eine erhöhte Aldosteronsynthese aufgrund einer gesteigerten RAAS Aktivität konnte somit ausgeschlossen werde und es lag der Verdacht nahe, dass es sich um eine primäre Form des Hyperaldosteronismus handeln muss, dessen Ursprung direkt in der Nebennierenrinde zu finden ist. Gründe hierfür können Nebennierenadenome, Karzinome, Nebennierenrindenhyperplasie und hypertrophie sein. Eine Betrachtung des Verhältnisses des Nebennieren- zum Körpergewicht der Tiergruppen ergab signifikant ein erhöhtes relatives Nebennierengewicht bei den KO-Tieren.

Um genauere Ursachen finden zu können, wurden mit Aldosteron-Synthasespezifischen Antikörpern immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Während sich bei den Nebennierenrinden der WT-Tiere die Expression der Aldosteron-Synthase auf die Zona glomerulose beschränkt zeigte, konnte bei KO-Tieren eine deutlich erhöhte Aldosteron-Synthase-Expression sowie eine Verbreiterung der Expressionszone nachgewiesen werden. Somit könnte eine bilaterale Nebennierenrindenhyperplasie oder –hypertrophie ursächlich für den festgestellten Hyperaldosteronismus zu sein. Die Grundlage hierfür ist möglicherweise die bei SPRED2-KO-Tieren erhöhte Ras/ERK-MAPK-Signalweg-Aktivität sein [56].

1.7 Kollagen und Fibrosierung im Herzen

Kollagen macht einen Großteil der im Organismus vorhandenen Proteinmasse aus. Durch sein Vorkommen in unterschiedlichsten Bindegeweben wie Haut, Knorpel, Sehnen, Bändern, Blutgefäßen, sowie Knochen und Zähnen sorgt es für die notwendige Zugfestigkeit dieser Strukturen [162].

Als Fibrose bezeichnet man eine pathologische Bindegewebsvermehrung im Körper, der verschiedene Ursachen zugrunde liegen können. Fibrogen können hierbei diverse Noxen wirken, wie Ischämie, eine chronische Hyperglykämie oder Entzündungen. Darüber hinaus gibt es unterschiedliche Bindegewebserkrankungen, die als primäre Fibrosen zu einer übermäßigen Produktion von interstitiellem Bindegewebe führen können. Fibroblasten, eine bestimmte Form von Mesenchymzellen, bilden hierbei übermäßige Mengen an Extrazellulärmatrix, wie dies physiologisch auch bei der Narbenbildung der Fall ist. Fibroblasten erfüllen jedoch sowohl in physiologischem als auch pathologischem Kontext eine Vielzahl an Funktionen über die Produktion von Extrazellulärmatrix hinaus. So registrieren Fibroblasten Veränderungen in der direkten Umgebung und reagieren auf diese unter anderem mit der Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Des Weiteren erfolgt die Kommunikation und Interaktion mit Myozyten, Endothelzellen und anderen Fibroblasten, was beispielsweise parakrin Einfluss auf die Angiogenese hat [163, 164].

Fibrosierung ist in jedem Gewebe und Organsystem möglich. Klinisch häufige Beispiele sind die Fibrose des Leberparenchyms, zum Beispiel im Rahmen der äthyltoxischen Leberzirrhose oder chronischen Virushepatitis, die Lungenfibrose, der unterschiedliche interstitielle Lungenerkrankungen zugrunde liegen können, und die im Rahmen der Niereninsuffizienz entstehende Nierenfibrose. chronischen Eine vermehrte Kollagenablagerung ist hierbei initial bei einer Gewebeschädigung ein sinnvoller Prozess mit dem Ziel adaptiv auf eine Gewebsverletzung zu reagieren und zum Beispiel nach Ablauf eines Myokardinfarktes eine strukturelle Verstärkung im Bereich des zugrunde gegangenen Myokards zu gewährleisten. Jedoch kommt es neben einer konzentrierten Vermehrung des fibrillären Kollagens im Bereich der Gewebeschädigung auch zu einer diffusen Fibrose im ursprünglich nicht an dem Defekt

beteiligten Gewebe [165]. Eine über diese Maße fortschreitende Vermehrung der Kollagenfasern hinaus hat jedoch in jedem Organ die Beeinträchtigung dessen Funktion zur Folge.

Eine Fibrosierung des Herzens kann Folge nahezu aller kardialen Grunderkrankungen sein [166], jedoch ist die Zunahme von Kollagenfasern auch Bestandteil des physiologischen Alterungsprozesses [167]. Im Herzen führt die globale Vermehrung von Kollagen zu einer zunehmenden Steifheit und abnehmenden diastolischen Compliance und mündet langfristig in die Herzinsuffizienz [168, 169]. Durch vermehrte Einlagerung von Extrazellulärmatrix ist auch die elektromechanische Kopplung zunehmend gestört, was Herzrhythmusstörungen zur Folge haben kann [170, 171]. Kardiale Fibrosierung zeigt sich initial bei einer Herzerkrankung, beispielsweise bei einer gesteigerten ventrikulären Druckbelastung, häufig als reaktive Fibrose, welche noch nicht mit dem Verlust von Kardiomyozyten einhergeht. Dies kann als adaptive Maßnahme des Herzens, mit dem Ziel, die physiologische Auswurfleistung aufrecht zu erhalten, gewertet werden. Bei Fortbestehen und Progress der pathogenen Faktoren kommt es schließlich zu einer ersetzenden Fibrosierung, welche die Hypertrophie und Nekrose von Kardiomyozyten zur Folge hat [172].

1.8 Elektrophysiologie des Herzens

Das Arbeitsmyokard bildet den größten Anteil der Kardiomyozyten, die im Rahmen der Impulsweiterleitung mit Kontraktion reagieren. Die spezialisierten Zellen des Reizbildungs- und -weiterleitungssystems im Herzen bilden mit ihrer autonomen Reizgenerierung eine Besonderheit und unterscheiden sich von der sonstigen quergestreiften Muskulatur im Körper.

Im physiologischen Normalfall entsteht der elektrische Impuls im Sinusknoten, welcher nahe der Mündung der Vena cava superior im rechten Vorhof lokalisiert ist und als primärer Schrittmacher des Herzens fungiert. Er generiert beim in Ruhe befindlichen Menschen als primäres Schrittmacherzentrum eine Herzfrequenz von circa 70/Minute. Der Atrioventrikularknoten oder AV-Knoten, mit Lage im oberen interventrikulären Septum, dient als sekundärer Schrittmacher im Falle eines Sinusknotenausfalls oder im

Rahmen eines AV-Blocks. Hierbei erzeugt der AV-Knoten eine Frequenz von 40 – 50 Erregungen pro Minute. Vom AV-Knoten wird die Erregung zum His-Bündel weitergeleitet, welches mit einem Eigenrhythmus von 20 – 30 Erregungen pro Minute als tertiärer Schrittmacher des Herzens im Falle des Ausfalls der vorgeschaltenen Reizbildungszentren fungieren kann. Dieser eigentlich dem Erregungsleitungssystem zugehörige Zellenverbund liegt im membranösen Abschnitt des Kammerseptums und teilt sich in zwei linke und einen rechten Tawara-Schenkel auf. Von dort erfolgt die Weiterleitung in der Herzspitze über die Purkinje-Fasern auf das Arbeitsmyokard [173].

1.9 Kardiologische Untersuchungsmethoden

1.9.1 Das Elektrokardiogramm

Das EKG ermöglicht die nicht-invasive Darstellung der elektrischen Aktivität der Herzmuskelfasern und somit unterschiedlicher Parameter der Herzaktivität wie Herzschlagfrequenz, Rhythmus und elektrische Herzachse (Lagetyp). Darüber hinaus dient es der Detektion von Herzrhythmusstörungen und kardioischämischen Ereignissen und ist ein in der klinischen Praxis nicht wegzudenkendes wertvolles diagnostisches Werkzeug [174].

Grundlage der elektrokardiografischen Untersuchung ist die Weiterleitung von bei der Herzaktion entstehenden extrazellulären Spannungsschwankungen der Herzmuskelzellen an die Körperoberfläche. Diese Potentialänderungen können durch Anbringen von Elektroden in festgelegter Position in verschiedenen Ableitungen entlang einer Zeitachse aufgezeichnet werden und stellen in ihrer Summe eine relativ exakte Abbildung der Erregungsausbreitung im Herzen in Form von charakteristischen Kurven und Zacken dar.

Die im Zyklus der Herzaktivität erste messbare Abweichung von der Nulllinie, oder auch isoelektrische Linie, ist die P-Welle als Ausdruck der Vorhoferregung. Der sich anschließende isoelektrische Bereich entspricht der Fortleitung der Erregung zu AV-Knoten und His-Bündel als PQ-Strecke. Es folgt der QRS-Komplex, entsprechend der Ventrikelerregung. Je nach Ableitung beginnt dieser mit einem kleinen negativen

Auschlag, der Q-Zacke, was einer Richtungsänderung des Summationsvektors während der Kammererregung geschuldet ist. Die R-Zacke zeigt mit ihrem höchsten Ausschlag die Erregung der größten Masse an Herzmuskelzellen an. Es folgt eine Erregung von der Herzspitze ausgehend zur Basis des linken und rechten Ventrikels, dieser Vektor zeigt von der Herzspitze weg und führt zu einer negativen S-Zacke. Nach vollständiger Erregung beider Ventrikel kommt es zu keiner Potentialänderung und es zeigt sich eine isoelektrische Erregungsaufzeichnung, die ST-Strecke. Ausdruck der Repolarisation des Arbeitsmyokards ist die T-Welle, welche in aller Regel einem halbrunden positiven Ausschlag entspricht, bei negativem Hauptvektor jedoch auch negativ sein kann [175]. Man unterscheidet die unipolare Ableitung mit Darstellung der Spannung zwischen einer indifferenten und einer differenten Elektrode und die bipolare Ableitung mit Messung der Spannungsdifferenzen zwischen zwei Punkten an der Körperoberfläche. Ein vollständiges 12-Kanal-EKG beinhaltet drei bipolare Extremitätenableitungen nach Einthoven und drei unipolare Extremitätenableitungen nach Goldberger, sowie sechs unipolare Brustwandableitungen nach Wilson.

Im klinischen Alltag kommen je nach Fragestellung verschiedene EKG-Verfahren zum Einsatz. Das konventionelle Ruhe-EKG stellt das meist eingesetzte Elektrokardiogramm dar und wird am in körperlicher Ruhe befindlichen, meist liegenden Patienten durchgeführt.

Das Belastungs- oder Stress-EKG wird insbesondere in der Ischämiediagnostik eingesetzt und während einer dynamischen Belastung steigender Intensität angefertigt. Meist wird hierzu ein Fahrradergometer verwendet, auf welchem der Patient bei vorgegebener Drehzahl mit nach bestimmten Zeitintervallen steigenden Wattzahlen in die Pedale tritt. Ziel ist die Feststellung von belastungsinduzierten Ischämiezeichen im Elektrokardiogramm, wobei ST-Streckensenkungen oder – hebungen, massive Blutdruckanstiege oder subjektive Angina-Pectoris-Beschwerden Abbruchkriterien darstellen [176].

Zur elektrokardiografischen Überwachung über einen längeren Zeitraum (meist 24 Stunden) findet das Langzeit-EKG Verwendung. Es dient insbesondere der Aufdeckung

von paroxysmal auftretenden Herzrhythmusstörungen, die einer gewöhnlichen Ruhe-EKG-Aufzeichnung entgehen [177].

1.9.2 Die elektrophysiologische Untersuchung

Die elektrophysiologische Untersuchung ist ein in der Humanmedizin etabliertes Verfahren zur Feststellung und Lokalisation von Herzrhythmusstörungen und der Risikoklassifizierung dieser Arrhythmien. Mit Hilfe von über das venöse (bei Bedarf auch arterielle) System eingeführten Elektrodenkathetern kann nach Positionierung im Herzen sowohl eine Ableitung und Aufzeichnung als auch eine Stimulation der Reizbildung und –weiterleitung sowie gegebenenfalls die Analyse einer dadurch induzierten Herzrhythmusstörung erfolgen. Ferner ist bei bestehender Indikation während desselben Untersuchungsvorganges eine interventionelle Katheterablation als therapeutische Maßnahme möglich [178].

Auch im Rahmen der tierexperimentellen Forschung stellt sich die elektrophysiologische Untersuchung inzwischen als geeignete Methode zur Klärung kardiophysiologischer Fragestellungen dar [179]. Insbesondere bei der Untersuchung kardiologischer Phänotypen im Rahmen genetisch modifizierter Mausmodelle konnten in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte in der praktischen Anwendung der elektrophysiologischen Untersuchung gemacht werden [180-182]. Erste elektrophysiologische Untersuchungen in vivo wurden hierbei 1996 von Berul et al. zunächst in "open-chest"-Technik durchgeführt. Die dabei verwendeten Mäuse wiesen eine Mutation der Alpha-Myosin-Schwerketten auf, welche histologische und hämodynamische Merkmale der hypertrophen Kardiomyopathie zur Folge hatte. Während die WT-Tiere eine unauffällige Elektrophysiologie aufwiesen, konnten bei den KO-Tieren verschiedene Auffälligkeiten verlängerte wie Sinusknotenerholungszeiten und Repolarisationsintervalle nachgewiesen werden [183]. Seit 1999 ist es schließlich möglich, die EPU bei der Maus in "closed-chest"-Technik durchzuführen, also ähnlich der bei Menschen angewendeten endokardialen EPU [182].

1.10 Elektrokardiogramm der Maus

Das murine EKG unterscheidet sich deutlich vom humanen EKG, was nicht zuletzt einer erheblich höheren Herzfrequenz von durchschnittlich 400 – 600 Schlägen pro Minute geschuldet ist. Da im Rahmen der EKG-Durchführung jedoch eine Narkose erforderlich ist, kommt es in Abhängigkeit von dem verwendeten Anästhetikum aufgrund dessen kardiodepressiver Wirkung zu einer reduzierten Herzfrequenz.

Eine Erstbeschreibung des Elektrokardiogramms kleiner Säugetiere erfolgte 1952 und 1953 durch Lombard und Richards [184, 185]. Wie beim Menschen beginnt die elektrische Erregung im Sinne der Depolarisation über den Vorhöfen mit einer P-Welle, mit darauf folgendem isoelektrischen PQ-Intervall. Der sich anschließende QRS-Komplex ähnelt ebenfalls dem des humanen EKGs, jedoch zeigt das murine EKG im Normalfall eine deutliche J-Welle am Ende des QRS-Komplexes, als Ausdruck der frühen Repolarisationsphase. [186-188] Eine T-Welle ist im murinen EKG nur in einigen Ableitungen sichtbar, beziehungsweise folgt die T-Welle direkt auf die S-Zacke ohne Vorhandensein eines isoelektrischen ST-Segments [189]. Dies erschwert genauere Untersuchungen bezüglich der ventrikulären Repolarisation. Darüber hinaus zeigen sich beim Maus-EKG niedrigere Amplituden und kürzere PR- und QRS-Intervalle als Ausdruck der höheren Herzfrequenz. Das Aktionspotenzial in den Kardiomyozyten der Maus weist kein isoelektrisches Plateau auf, weswegen es zur Depolarisation in einem Bereich des Herzens kommt, während gleichzeitig die Repolarisation in einem anderen Bereich erfolgt. Der QRS-Komplex der Maus dauert im Mittel 20 Millisekunden und entspricht im Gegensatz zum Menschen nicht nur der Erregungsausbreitung über die Ventrikel, sondern auch der gleichzeitig erfolgenden frühen Phase der Erregungsrückbildung. Das Segment zwischen S und T sowie die T-Welle repräsentiert die späte Phase der Erregungsrückbildung [190-192].



Abbildung 8: Gegenüberstellung von physiologischem Maus- und Mensch-EKG

Vergleichende Gegenüberstellung jeweils eines Abschnitts über 4 Sekunden aus einem murinen und einem humanen EKG. Jeweils unterhalb des EKG-Abschnitts schematische Darstellung eines einzelnen Herzzyklus unter Markierung der einzelnen Abschnitte. Beim murinen EKG Fehlen eines isoelektrischen ST-Segments, abweichende T-Morphologie sowie verkürzte PQ- und QRS-Intervalle im Vergleich zum humanen EKG, des Weiteren niedrigere Amplituden.
1.11 Herzrhythmusstörungen

Der Herzrhythmus ist das Ergebnis einer regelmäßig wiederkehrenden Abfolge von elektrischer und daraus resultierender mechanischer Herzaktivität. Bei Mensch und Tier ist der physiologische Sinusrhythmus durch eine regelmäßige Herzfrequenz, weitestgehend konstant bleibende RR-Intervalle, stabile PQ-Dauer und auf jede P-Welle folgende QRS-Komplexe charakterisiert. Physiologische Schwankungen des Herzrhythmus im Rahmen der autonomen Regulation aufgrund verschiedener Erfordernisse werden als Herzfrequenzvariabilität bezeichnet, bei Abweichungen über Maße Herzrhythmusstörungen diese hinaus spricht man von [193]. Herzrhythmusstörungen sind zumeist multifaktorieller Genese, nur in seltenen Fällen treten sie isoliert als eigenständige Erkrankung auf [194]. Eine Einteilung der Herzrhythmusstörungen erfolgt nach verschiedenen Kriterien, wie Entstehungsort (atriale bzw. supraventrikuläre und ventrikuläre Rhythmusstörungen), resultierende Herzfrequenz (bradykarde und tachykarde Rhythmusstörungen), zugrundeliegende Erregungsbildungs-Pathologie (Störungen des und -leitungssystems, Elektrolytschwankungen, Erkrankungen des Myokards, ischämische Störungen), Herzrhythmusstörungen kongenitale und erworbene und der potenziellen Gefährlichkeit für den Patienten (gutartige oder bösartige Rhythmusstörungen) [195].

1.11.1 Bradykarde Herzrhythmusstörungen

Bradykardie wird beim erwachsenen Menschen durch eine Herzfrequenz unter 60 Schlägen pro Minute definiert. Ursächlich können Erkrankungen des Sinusknotens (chronotrope Inkompetenz), sinuatriale Überleitungsstörungen, Erkankungen des AV-Knotens, eine Bradyarrhythmia absoluta oder die Einnahme negativ chronotroper Medikamente wie Digitalis oder β-Blocker sein. Störung der Erregungsbildung und – leitung können des Weiteren das Ergebnis eines Myokardinfarkts sein, was insbesondere in der Akutphase einer schnellen therapeutischen Intervention bedarf [194].

Unter dem Begriff Sick-Sinus-Syndrom werden verschiedene Rhythmusstörungen zusammengefasst, deren Ätiologie in einer Funktionsstörung des Sinusknotens zu

finden ist. Während die Sinusbradykardie eine Ausschlussdiagnose darstellt, liegt dem sinuatrialen Block (SA-Block) eine temporäre oder dauerhafte Blockierung der Überleitung zwischen Sinusknoten und Vorhofmyokard zugrunde [196, 197].

Der SA-Block 1. Grades ist im EKG nicht erkennbar und stellt die ledigliche Verzögerung der Überleitung vom Sinusknoten auf das Vorhofmyokard dar. Beim SA-Block 2. Grades fällt die Funktion des Sinusknotens intermittierend aus. Es erfolgt eine weitergehende Einteilung in Typ 1 und 2. Typ 1 oder auch SA-Block vom Wenckebach-Typ zeigt eine zunehmende Verlängerung der Überleitung bis hin zum gänzlichen Ausfallen eines Herzschlags. Im EKG ist die zunehmende Verkürzung der PP-Abstände bis zum Ausfallen von P-Welle und QRS-Komplex erkennbar, im Anschluss erfolgt die Überleitung wieder regelrecht. Typ 2 oder auch SA-Block vom Typ Mobitz zeigt ebenfalls ausfallende P-Wellen und QRS-Komplexe, jedoch bei gleichbleibenden PP-Intervallen. Die daraus resultierenden Pausen sind mindestens so lang wie das PP-Intervall. Beim sinuatrialen Block 3. Grades fällt die Überleitung auf das Vorhofmyokard vollständig aus. Um den mechanischen Herzrhythmus aufrecht zu erhalten kommt es zum Ersatzrhythmus durch AV-Knoten oder das Kammermyokard, im EKG erkennbar an einer Bradykardie mit 40 – 50 Schlägen pro Minute [198].

Eine weitere Form des Sick-Sinus-Syndroms ist das Tachykardie-Bradykardie-Syndrom, bei dem sich supraventrikuläre Tachykardien und Bradykardien abwechseln, wobei den Bradykardien eine systolische Pause vorgeschaltet ist [197].

Beim AV-Block liegt eine gestörte Überleitung entweder im AV-Knoten selbst oder distal davon zwischen Vorhöfen und Ventrikeln vor. Traditionell erfolgt auch hier eine Unterteilung in 3 Grade. Der AV-Block 1. Grades bleibt meist asymptomatisch und zeigt sich im EKG lediglich an einer Verlängerung der PQ-Zeit über 200 ms. Beim AV-Block 2. Grades erfolgt analog zu den SA-Blöcken eine Aufteilung in den Wenckebach-Typ und den Typ Mobitz. Bei ersterem ist die Überleitungsstörung zumeist im AV-Knoten selbst lokalisiert. Im EKG zeigt sich eine zunehmend verlängernde PQ-Zeit, bis schließlich eine Vorhoferregung nicht übergeleitet wird und der Kammerkomplex einmalig ausfällt. Anschließend erfolgt die sogenannte Wenckebachperiodik erneut. Beim AV-Block Typ Mobitz liegt die Überleitungsstörung meist unterhalb des AV-Knotens, häufig im His-

Bündel. Charakteristisch für dieses Blockbild ist der plötzliche Ausfall der Kammererregung im EKG, ohne zuvorgehende Verlängerung des PQ-Intervalls. Häufig folgt die Blockierung einer bestimmten Periodik, so dass es zur Überleitung von jeder zweiten, dritten, oder vierten Vorhoferregung kommt (2:1-, 3:1-, 4:1-Block) [198]. Der AV-Block 3. Grades stellt schließlich den kompletten Ausfall der Überleitung zwischen Vorhof und Kammer dar. Die Ventrikel kontrahieren in einem vom Sinusknoten losgelösten Ersatzrhythmus, Vorhöfe und Kammern schlagen unkoordiniert und unabhängig voneinander [198].

Symptomatisch werden bradykarde Herzrhythmusstörungen durch Leistungsabfall, Synkopen und Herzinsuffizienz bis hin zum plötzlichen Herztod, der Patient kann sich jedoch auch völlig beschwerdefrei präsentieren. Bei symptomatischen Patienten stellt die Schrittmacherversorgung die Therapie der Wahl dar [199].

1.11.2 Tachykarde Herzrhythmusstörungen

Ab einer Herzfrequenz von 100 spricht man beim erwachsenen Menschen von Tachykardie. Wie auch bei bradykarden Rhythmusstörungen können die Ursachen mannigfaltig sein und reichen von Störungen des Erregungsleitungssystems wie dem Vorliegen von akzessorischen Leitungsbahnen, über hormonellen Dysbalancen wie Hyperthyreose bis hin zu ischämischen Erkrankungen des Myokards. Klinisch besonders relevant ist eine Einteilung nach der anatomischen Lokalisation der Arrythmieentstehung. So bezeichnet man Tachykardien, die ihren Ursprung oberhalb des His-Bündels nehmen als supraventrikuläre Tachykardien, zu welchen unter anderem das Vorhoflimmern und -flattern sowie die AV-Knoten-Reentrytachykardie gezählt werden [200]. Tachykarde Rhythmusstörungen mit Ursprung in den Herzkammern werden als ventrikuläre Tachyarrhythmien bezeichnet, ein im Generellen für den Patienten weitaus bedrohlicheres Krankheitsbild.

Vorhofflimmern ist eine häufige Herzrhythmusstörung, bei der es durch ungeordnete Vorhoferregung und -kontraktion im Rahmen von multiplen Reentry-Kreisläufen zu Vorhoffrequenzen zwischen 350 und 600 Schlägen/Minute kommt. Durch die Filterfunktion des AV-Knotens kommt es zu einer (häufig unregelmäßigen) tachykarden

Überleitung auf die Ventrikel und zu einer Herzfrequenz von 100 bis 160 pro Minute. Eine deutlich gesteigerte Mortalität und Morbidität der Patienten mit Vorhofflimmern ist insbesondere der erhöhten Gefahr für thrombembolische Ereignisse geschuldet [201, 202]. Nach dem zeitlichen Verlauf unterscheidet man paroxysmales, persistierendes und permanentes Vorhofflimmern, wobei mit den unterschiedlichen Formen auch verschiedene Prognosen vergesellschaftet sind [203]. Therapeutisch werden neben der Behandlung einer eventuell bestehenden Grunderkrankung antithrombotische, antiarrhythmische und frequenzkontrollierende Behandlungsstrategien verfolgt [204].

Beim Vorhofflattern handelt es sich um eine deutlich seltener auftretende Herzrhythmusstörung [205, 206]. Zugrunde liegt ein Reentry-Mechanismus, welcher regelmäßige atriale Frequenzen von 240 bis 340 Schlägen/min zur Folge hat. Dank der Leitungsverzögerung durch den AV-Knoten kommt es zu einer übergeleiteten Herzfrequenz von circa 130 – 150 Schlägen/min [207]. Lebensbedrohliche Tachykardien mit hämodynamischer Konsequenz können bei einer 1:1-Überleitung, verursacht unter anderem durch Hyperthyreose oder medikamentös bedingt, entstehen.[208] Auch hier besteht das Risiko der intrakardialen Thrombusbildung, jedoch ist dieses geringer ausgeprägt, als beim Vorhofflimmern. Therapeutisch bietet die Katheterablation heute ein sehr effektives und mit einer niedrigen Komplikationsquote behaftetes Verfahren [209].

Die AV-Knoten-Reentry-Tachykardie ist das Resultat einer akzessorischer Leitungsbahn zwischen Vorhof und Kammer, wobei hierbei meist eine langsame und eine schnelle Leitungsbahn zugrunde liegen [200].

Tachyarrhythmien, die ihren Ursprung im Ventrikel haben, werden je nach Frequenz in ventrikuläre Tachykardie, Kammerflattern oder Kammerflimmern eingeteilt. Ursächlich sind häufig sogenannte kreisende Erregungen. Im EKG präsentieren sich ventrikuläre Tachyarrhythmien typischerweise mit verbreiterten monomorphen oder polymorphen Kammerkomplexen > 120 ms [210].

Tachykarde Rhythmusstörungen können für den Patienten gänzlich asymptomatisch verlaufen, oder aber, insbesondere bei paroxysmalem Auftreten, vom Patienten

deutlich wahrgenommen werden und in diesem Rahmen Angstgefühle, Dyspnoe und Schwindel auslösen. Schwere Formen der ventrikulären Tachykardie können über ein Pumpversagen zum plötzlichen Herztod führen [207].

1.12 Plötzlicher Herztod

Unter plötzlichem Herztod versteht man den unerwarteten irreversiblen Herz-Kreislauf-Stillstand, der innerhalb von 1 Stunde nach Auftreten klinischer Symptome zum Tod des Patienten führt [211, 212]. Es handelt sich um eine der häufigsten Todesursachen der westlichen Welt. Meist liegt hierbei ein arrhythmogenes Geschehen zugrunde, in der Mehrzahl der Fälle ventrikulärer tachyarrhythmischer Art, welches nach einem Übergang in Kammerflimmern in die Asystolie mündet. Jedoch handelt es nach heutiger Ansicht beim plötzlichen Herztod um ein multifaktorielles Geschehen [213]. Des Weiteren bleibt es schwierig, im Einzelfall eines kardial bedingten Todesfalles zwischen arrhythmisch und nicht arrhythmisch ausgelöstem Herz-Kreislauf-Versagen zu unterscheiden [214]. Validierte Risikofaktoren stellen erworbene kardiale Vorerkrankungen dar, wie zum Beispiel Herzinsuffizienz mit linksventrikulärer Pumpfunktion, Schweregrad reduzierter deren zur Risikoquantifizierung dienen kann. Darüber hinaus können ischämische Herzerkrankungen über verschiedene Mechanismen in maligne Arrhythmieereignisse und letztendlich in den plötzlichen Herztod münden [211, 215, 216]. So können sowohl die im Rahmen eines akuten myokardialen Infarktereignisses neu aufgetretende Ischämie, als auch chronische Strukturveränderungen bei der Narbenbildung mit einhergehend veränderten elektrophysiologischen Bedingungen als Trigger für maligne Tachyarrhythmien dienen [215]. Die Hypothese, dass koronare Herzerkrankungen häufig die Ursache für den plötzlichen Herztod sind, wird auch von der Beobachtung gestützt, dass eine große Anzahl der reanimierten Patienten vor Kreislaufzusammenbruch über typische Angina pectoris-Beschwerden klagten [217]. Angeborene Ursachen für den plötzlichen Herztod wie das Long- und Short-QT-Syndrom, das WPW-Syndrom, Brugada-Syndrom, aber auch angeborene Kardiomyopathien stellen einen vergleichsweise geringen Anteil der Fälle dar [218].

Dennoch tritt der plötzliche Herztod bei einer Vielzahl an Patienten als Erstmanifestation einer kardialen Erkrankung auf. Eine suffiziente Risikostratifizierung erscheint vor diesem Hintergrund erschwert. Als Risikofaktoren in der Bevölkerung ohne kardiale Vorerkrankungen für den plötzlichen Herztod gelten letztlich dieselben, die auch an der Entstehung der koronaren Herzerkrankung beteiligt sind. Für Nikotinkonsum, chronische arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie sowie Diabetes mellitus wurde ein Zusammenhang mit kardial bedingten Todesfällen nachgewiesen [219-223]. Es bleibt jedoch unklar, ob diese Risikofaktoren als direkte Prädiktoren gesehen werden müssen, oder ob insbesondere die Vergesellschaftung mit koronaren Herzerkrankungen zu malignen Herzrhythmusstörungen führen. Die Identifikation von Risikopatienten beinhaltet verschiedene invasive und nichtinvasive Verfahren wie Langzeit-EKG, Herzechokardiografie und programmierte Ventrikelstimulation. Sie alle haben einen hohen negativen prädiktiven Wert gemein, sind also geeignet, Patienten mit guter Prognose zu identifizieren. Problematisch ist allerdings der geringe positive prädiktive Wert [211, 224]. Das Erkennen von Patienten, die von einer prophylaktischen Implantation eines Defibrillators profitieren würden, gestaltet sich aufgrund dessen schwierig.

1.13 Isoproterenol

Isoprenalin wirkt als nicht-selektives β -Sympathomimetikum an β -1- und β -2-Rezeptoren insbesondere auf das kardiopulmonale System. Hierüber bewirkt es eine Dilatation der Bronchial- und Gefäßmuskulatur und entfaltet am Herzen positiv chronotrope, inotrope, bathmotrope und dromotrope Effekte, darüber hinaus wirkt es tokolytisch. In der Humanmedizin ist der Einsatz des Isoprenalins bei bradykarden Herzrhythmusstörungen, Schock und Herzstillstand via i.v.-Gabe indiziert, nachdem es im Einsatz bei Asthma bronchiale durch die selektiven β -2-Sympathomimetika abgelöst wurde [225, 226].

1.14 Reduzierte Lebenserwartung der SPRED2-KO Mäuse

Wie bereits von Ullrich et. al im Rahmen von Kaplan-Meier-Überlebensanalysen festgestellt, zeigten die SPRED2-KO-Mäuse eine deutlich reduzierte Lebenserwartung. Dies ist vermutlich auf die Vielzahl phänotypischer Pathologien und den generell schlechten Gesundheitszustand der Tiere zurückzuführen. In den meisten Fällen blieb die genaue Todesursache jedoch unbekannt. Es wurden 20 SPRED2-KO- und WT-Mäuse von Geburt an über 18 Monate überwacht und deren Todeszeitpunkt dokumentiert. Mehr als 50 Prozent aller SPRED2-defizienten Tiere starben bereits innerhalb der ersten 5 Monate, weitere 25 Prozent innerhalb von 13 Monaten, so dass nur 25 Prozent am Ende der 18 Monate noch lebten. Es ergab sich so eine um 55 Prozent reduzierte Lebenserwartung zu den WT-Mäusen [56, 57].



Abbildung 9: Reduzierte Überlebenszeit der SPRED2-KO-Tiere

Nach einer Beobachtungszeit von 18 Monaten ab Geburt lebten von den WT-Tieren noch 80 %, während bei den SPRED2-KO-Mäusen nur noch 25 % der Mäuse überlebten. Dies ergibt eine reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit von 55 % (n(WT/KO)=20; p<0,001 ***). Nach Ullrich 2014.

1.15 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit stellt eines der Folgeprojekte der von Ullrich et al. durchgeführten Untersuchungen zur SPRED2-Defizienz in Mäusen dar, wobei hierbei die Frage nach der Funktion dieses Proteins im Herzen im Fokus der Untersuchungen stand. Nicht zuletzt das vorab festgestellte Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis (vgl. Abbildung 5) der KO-Mäuse legte den Verdacht nahe, dass der kardiale Phänotyp der Tiere zu der Überlebenswahrscheinlichkeit signifikant reduzierten der SPRED2-KO-Mäuse (Abbildung 9) führen könnte. So hatten vorab durchgeführte echokardiografische Untersuchungen eine erhöhte Wanddicke der linksventrikulären Hinterwand als Indikator für kardiale Hypertrophie ergeben. Des Weiteren zeigten invasive hämodynamische Untersuchungen unter anderem eine gesteigerte Ejektionsfraktion (siehe Abbildung 6) und erhöhte intraventrikuläre Druckspitzen bei den SPRED2-KO-Tieren [57].

Im Rahmen dieser Arbeit führten wir eine systematische Untersuchung der Herzleistung der SPRED2-KO-Mäuse durch. Zuerst erfolgte die Analyse der Ruhe- und Stress-EKGs. Das Augenmerk lag hierbei zunächst auf auch in der Humanmedizin verwendeten Parametern, welche bei Verlängerung oder Verkürzung bestimmter Intervalle Ausdruck einer gestörten Reizentstehung oder –weiterleitung sein können. Um ein verstärktes Auftreten von Arrhythmien nachweisen zu können, wurden dieselben EKG-Daten auf das Vorkommen von Herzrhythmusstörungen hin analysiert. Hierbei wurden sowohl die Ruhe-, als auch die unter pharmakologischen Stressbedingungen entstandenen EKGs untersucht, um auch eine gegebenenfalls unter sympathomimetischer Stimulation verstärkte Arrhythmieneigung detektieren zu können. Die auftretenden Arrhythmieereignisse wurden dann unter Anwendung eines Score-Systems nach klinischem Schweregrad mit Punkten bewertet und für die Gesamtbewertung der einzelnen Tiergruppen herangezogen. Zwecks weiterreichender Untersuchung der Anfälligkeit für Herzrhythmusstörung sowie der Erregungsleitung des Herzens wurden EPUs durchgeführt.

Da vor dem Hintergrund des bestehenden Hyperaldosteronismus bei den KO-Mäusen der Verdacht nahelag, dass es zur Fibrosierung verschiedener Organe kommen könnte,

wurden nach dem Tod der Tiere myokardiale Schnitte angefertigt und diese mittels PSR-Färbung auf ihren Kollagengehalt hin untersucht. Insbesondere im Falle einer verstärkten Arrhythmieneigung sollte somit die Frage geklärt werden, ob dies Ausdruck einer gestörten elektrischen Reizweiterleitung in Folge einer vermehrten myokardialen Fibrosierung sein könnte.

Zwecks Klärung, ob eine Behandlung des Hyperaldosteronismus den Phänotyp der Tiere günstig zu beeinflussen vermag, wurden alle Experimente an Mäusen, die mit einem Aldosteronantagonisten behandelt worden waren, wiederholt. Wir erhofften uns somit die Klärung der Frage, ob der kardiale Phänotyp der SPRED2-defizienten Tiere eine Folge des vorliegenden Hyperaldosteronismus ist, oder aber als eine direkte Folge dieses Genotyps angesehen werden muss.

2 Material und Methoden

2.1 Kollektivbeschreibung

Die Generierung der SPRED2-KO-Mäuse wurde in vorherigen Veröffentlichungen bereits ausführlich beschrieben [31, 43, 227].

Die embryologische Stammzelllinie XB228 wurde von BayGenomics (heute IGTC) gkauft. Diese Stammzellen stammen von 129P2/OlaHsd Mäusen und enthalten den pGT0-Gene-trap-Vektor inseriert zwischen Exon 4 und 5 im Spred2-Gen. XB228-Zellen mit modifiziertem Spred2 wurden in isolierte Blastozysten von super-ovulierten und befruchteten C57BL/6 Mäuseweibchen injiziert. Scheinschwangere Ammen-Mäuse, die zuvor mit vasektomierten männlichen Mäusen verpaart waren, wurden zur Reimplantation der Blastozysten verwendet. Zur Gründung der SPRED2-KO-Mauslinie wurden chimäre, männliche Nachkommen mit C57BL/6 WT-Mäusen verpaart um die Keimbahntransmission des mutierten Spred2-Gens zu überprüfen und erste SPRED2-HET-Mäuse zu generieren. Um alle Genotypen der SPRED2-Mauslinie zu erhalten wurde meist eine männliche SPRED2-HET-Maus mit zwei weiblichen SPRED2-HET-Mäusen verpaart. Um Inzuchteffekte möglichst gering zu halten, wurden Mäuse auf gemischtem 129P2/OlaHsd x C57BI/6 Hintergrund gezüchtet.

Die Mäuse wurden entweder einzeln oder in Gruppen von bis zu vier Tieren in standardisierten Plastikkäfigen gehalten. Die Haltung erfolgte unter konstantem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus, bei 25°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 %. Der Zugang zu Wasser und Standard-Mausfutter war permanent gewährleistet.

Die im Rahmen dieser Studie verwendeten Mäuse hatten ein Alter zwischen vier und 24 Monaten. Die im Ergebnisteil beschriebenen Mausgruppen beinhalteten stets eine Anzahl von mindestens sieben Tieren.

Alle durchgeführten Experimente waren von den lokalen Tierschutzbehörden genehmigt und erfolgten im Rahmen der einschlägigen europäischen Gesetze. (Regierung von Unterfranken: #95/11, #98/14)

2.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese [®] Gel 30 (37.5:1) (Aa/Bis)	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin-Sodium-Salz (Amp)	Roth
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O)	Merck Millipore
Essigsäure	Merck Millipore
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
GeneRulerTM DNA Ladder Mix	Thermo Scientific
Glutathion-Sepharose [™] 4 Fast Flow	GE Healthcare
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck Millipore
L-Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
Milchpulver, fettarm	AppliChem
Nancy-520	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Millipore
PageRuler [™] Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Protein G Sepharose [™] 4 Fast Flow	GE Healthcare
Salzsäure (HCl)	Merck Millipore
Tris	Roth
Trypsin/EDTA (0.05%/0.02%) in DPBS (1x)	PAA
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich

2.3 Antikörper

SPRED1	1:500	(Bundschu et al., 2005)
SPRED2	1:500	(Bundschu et al., 2005)
GAPDH	1:1000	Sigma-Aldrich
ERK	1:2000	Cell Signaling, Cat. No. 9102
P-ERK	1:1000	Cell Signaling, Cat. No. 9101

2.4 Verwendete Geräte

Beatmungsgerät UGO Basile 7025	Hugo Sachs Elektronik
EPU-Herzkatheter (1.1F Mouse Octapolar EP Catheter, FTS-1113A-0518)	Scisense, Kanada
Fluoreszenzmikroskop (Z1m Imager)	Zeiss
Heizplatte (24 V, 37 W)	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach
Kryotom CM 1850	Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland
Metallintubationskanüle	Hugo Sachs Elektronik
Mikroskop Nikon Eklipse ME 600	Nikon Instech Co., Ltd., Kawasaki, Japan
Objektträger Superfrost	Erie Scientific Company, Portsmouth, U.S.A.
Pipetten 10 μl, 100 μl, 200 μl, 1000 μl, 2500 μl,	Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Material und Methoden

Pipettenspitzen 10 μl, 200 μl, 1000 μl, 2500 μl,	Sarstedt AG & Co., Nürnberg Germany
PolytronTM Homogenizer PT 3100)	Polytron
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Temperatur-Kontrolle (TKM-0902)	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach
Vaporisator (Vapor 2000)	Dräger, Lübeck
Verstärker (Animal Bio Amplifier	ADInstruments, Australien
ML136)	
Vortex (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, USA

2.5 Software

Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, Delaware, USA
Chart 7 für Windows	ADInstruments, Australien
Dataquest A.R.T. Version 3.1	Data Sciences International, St. Paul, MN USA
ECG Auto Version 2.5.0.3	emka Technologies, Frankreich
Microsoft Excel/Powerpoint/Word	Microsoft Corporation, USA
Image J	National Institutes of Health, USA
ZEN lite 2011	Zeiss, D

2.6 Proteinanalyse

2.6.1 Proteingewinnung

Frisch entnommene oder noch gefrorene Mausherzen wurden in 1,5 ml Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 1) homogenisiert. Die Proben wurden anschließend 15 Minuten bei 17000 g zentrifugiert, der Überstand in frische Mikroreaktionsgefäße überführt. Nach photometrischer Bestimmung der enthaltenen Proteinmenge wurden mit 5x-Ladepuffer die Ladungsmenge über das geladene Volumen auf 1 μ g/ μ l angeglichen. Im Falle der nicht unmittelbaren Verwendung für Western Blots wurden die Proben bei – 80 °C gelagert.

2.6.2 SDS-PAGE und Western Blot

Durch SDS-PAGE wurden die mit 5x Ladepuffer versetzten Proben mit 100 V im 5 % Sammelgel und im 10 % Trenngel aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Polycrylamid-Gelen. Hierbei wurde ein 5 %iges Sammelgel und, je nach Anforderung, ein 10, 12 oder 15 %iges Trenngel verwendet. Pro Tasche wurden 30 µg Protein und zum Größenvergleich neben den Proben 10 µg Proteinmarker (PageRuler, Fermentas, SM0671) geladen. Die Gelelektrophorese erfolge für etwa 1,5 – 2 Stunden. anschließende Proteintransfer der aufgetrennten Der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde im Semidry-Blot-Verfahren in einer geeigneten Blotkammer unter Verwendung eines Transferpuffers für 1 Stunde bei 2,5 mA/cm² durchgeführt. Der Transfererfolg wurde mit Hilfe einer Ponceaufärbung (3 – 5 Minuten) der Nitrocellulosemembran überprüft. Nach Entfernen der überschüssigen Farbe durch Waschen mit destilliertem Wasser wurden die erkennbaren Banden fotografisch dokumentiert. Es folgte das Blocken in jeweils frisch zubereiteter 5 %iger Milch in PBS-T für mindestens eine Stunde. Die Membran wurde dann über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer und dem spezifischen primären Antikörper (siehe 2.3) inkubiert. Danach wurden sie dreimal mit PBS-0,05 %-Tween gewaschen und anschließend für 1 - 2 Stunden mit dem mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundär-Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS-Tween gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolge dann über ECL-Lösung in der Dunkelkammer mittels Röntgenfilm, je nach Signalstärke dauerte dies wenige Sekunden bis zu einigen Stunden oder über Nacht. Zur erneuten Detektion des Blots mit einem anderen Erstantikörper wurde der Blot durch einstündiges Inkubieren in Stripping Puffer bei 50 °C von Antikörpern befreit. Nach gründlichem Waschen mit Wasser und PBS-Tween wurde dann das Western Blot-Protokoll ab dem Schritt des Blockens erneut durchgeführt.

Lösung	Bestandteile		
Lysepuffer (10 ml)	2 ml 10 % SDS, 1 ml 10x PBS, 0,8 ml EDTA, 1 ml 10x		
	PhosSTOP, 5,2 ml H ₂ O destilliert		
5 % SDS-Ladepuffer	300 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % SDS, 50 % Glycerin, 0,005 %		
	Bromphenolblau		
Trenn-Gel (10 ml),	5,3 - 3,3 ml H ₂ O, 2 - 4 ml 30 % Acrylamid Mix		
in Abhangigkeit von der Konzentration (6 - 12%):	(Rotiphoprese®Gel 30, Roth, Cat. No. 3029.1), 2,5 ml 1.5 M		
· · · · ·	Tris (pH 8.8), 100 µl 10 % SDS, 100 µl 10 %		
	Ammoniumpersulfat (APS), 8 - 4 µl		
	Tetramethylethylendiamin (TEMED)		
Sammel-Gel (10 ml, 5%)	6,8 ml H ₂ O, 1,7 ml 30 % Acrylamid Mix, 1,25 ml 1.0 M Tris		
	(pH 6.8), 100 μl 10 % SDS, 100 μl 10 % APS, 10 μl TEMED)		
5 x Laemmli Puffer	(250 mM Tris pH 6.8, 10 % SDS, 40 % Glycerol, 0,05 %		
	Bromphenolblau, 5 % β-Mercaptoethanol)		
1 x SDS-PAGE Lauf-Puffer	25 mM Tris base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS		
1 x Western Blot Transfer Puffer	25 mM Tris base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 20 % Methanol		
Ponceau S Färbelösung	2 % Ponceau S, 30 % Trichloressigsäure acid, 30 % 5- Sulfosalicylsäure		
Waschlösung	0,05 % Tween 20 in PBS		
Blockpuffer/Antikörper Inkubationslösung	4 % fettarmes Milchpulver in 0,05 % PBS-Tween 20		

Tabelle 1: Zusammensetzung der Reagenzien für Proteinanalyse

2.7 Kardiologische Untersuchungen

2.7.1 Elektrokardiogramm (EKG)

Die Tiere wurden mit einer 2,5%igen Avertinlösung durch intraperitoneale Injektion in der Dosierung 100 µl pro 10 g Körpergewicht narkotisiert. Zur Herstellung von Avertin wurde eine 97 %ige 2,2,2-Tribromethanol-Lösung im Verhältnis 1 g : 1 ml mit 98 %igem Isoamylalkohol gemischt. Anschließend wurde die Mischung im Verhältnis von 1:40 mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt, um eine 2,5 %ige Avertinlösung zu erhalten. Die Lagerung des Avertins erfolgte lichtgeschützt bei 4°C. Unter diesen Narkosebedingungen erfolgt die Respiration spontan. Die Mäuse wurden dann mit Klebestreifen auf einer Heizplatte in Rückenlage fixiert, mittels Rektalsonde (Wärmeplatte mit Rektalsensor TKM 0902, Föhr) wurde eine Körpertemperatur bei 37°Celsius zwecks Vermeidung einer Hypothermie sichergestellt. Mit vier Wurzelkanalinstrumenten aus der Dentalchirurgie, welche subkutan eingeführt wurden, erfolgte die Extremitäten-Ableitung nach Einthoven I und II (PowerLab/ 4 SP, ADInstruments, Chart 7.3.7). Das Ruhe-EKG wurde über eine Dauer von je zwei Minuten pro Maus aufgezeichnet, die erhobenen Daten wurden mit dem Programm "Chart 7 für Windows" (ADInstruments) gespeichert.

Zusätzlich zu den Ruhe-EKGs erfolgte die Ableitung unter pharmakologisch induziertem Stress, um die Reaktion auf eine Katecholamin-Stimulation zu beurteilen. Im Anschluss an das Ruhe-EKG wurde hierzu den Tieren im Rahmen desselben Versuchsaufbaus Isoprenalin (Isoproteronol 16504, SIGMA), ein Sympathomimetikum, in einer Dosierung von 1,5 µg pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Über eine Dauer von fünf Minuten erfolgte dann eine Aufzeichnung des Elektrokardiogramms unter pharmakologischem Stress was eine gesamte Aufzeichnungszeit von sieben Minuten ergibt. Vor dem Hintergrund einer gewissen Anflutungsdauer und damit einhergehender Wirkungsverzögerung des Isoprenalins und um die Ergebnisse aus Ruhe- und Stress-EKGs vergleichbar zu machen, wurde aus den Stress-EKGs eine Zeitspanne von zwei Minuten zwischen Minute 4 und 6 der Aufzeichnung ausgewählt. Die Auswertung der hiermit gewonnenen Daten wurde mit dem Programm ECG Auto Version 2.5.0.3 (emka Technologies) durchgeführt. Manuell wurden aus den

aufgezeichneten EKGs einzelne Abschnitte mit eindeutiger Morphologie ausgewählt und mit den Punkten <P, >P, <Q, R, >S, <T, T und >T ausgezeichnet (siehe Abbildung 10). Tabelle 1 zeigt wie die jeweiligen EKG-Intervalle bestimmt wurden.

Je Tier wurden jeweils vor und nach Isoprenalin-Gabe mehrere solcher Muster-EKGs gewählt und hiermit anschließend eine "Library" erstellt, mit welcher die gesamte EKG-Aufzeichnung der entsprechenden Maus dann via Software verglichen wurde. Somit konnten die für uns interessanten Parameter mit der Software automatisch ausgewertet, die gewonnen Daten in einer externen Datei extrahiert und mit einer Tabellenkalkulation (Excel) geöffnet und weiter analysiert werden.



Abbildung 10: EKG-Ausschnitt unter Kennzeichnung der verschiedenen Intervalle

Abbildung eines EKG-Ausschnittes mit gut beurteilbarer Morphologie, in welchem manuell <P, >P, <Q, R, >S, <T, T und >T eingezeichnet wurden. Durch Kennzeichnung mehrerer solcher EKG-Abschnitte je Tier wurde dann eine "Library" erstellt und eine automatische Auswertung des gesamten EKGs konnte durchgeführt werden.

Tabelle 2: EKG-Parameter

Bestimmbare EKG Parameter unter Nennung des jeweiligen Messbereiches und der Einheit.

Parameter	Messbereich	Einheit
RR-Abstand	R bis R	ms
HR	60000/R bis R	Schläge/min
PQ-Intervall	Anfang P bis Q	ms
P-Dauer	Anfang P bis Ende P	ms
QRS	Q bis S	ms
QT	Q bis Ende T	ms
QT+	Q bis maximal T	ms
TP-Dauer	Ende T bis Anfang P	ms
P Area	Fläche P	Voltage*Zeit
QRS Area	Fläche QRS	Voltage*Zeit
T Area	Fläche T	Voltage*Zeit

2.7.2 Arrhythmie-Score

Da für uns das Auftreten von spontanen Arrhythmien und von Rhythmusstörungen unter Katecholamin-Stimulation von besonderem Interesse war, modifizierten wir in Ermangelung eines für unsere Versuchsreihe einschlägigen Score-Systems bereits bestehende Systeme [228] und ergänzten sie um weitere Arrhythmie-Ereignisse. Diesen Score verwendeten wir sowohl zur Auswertung der Ruhe- und Stress-EKGs als auch zur Beurteilung der elektrophysiologischen Untersuchungen. Hierbei wurden die auftretenden Auffälligkeiten mit Punkten von 0 – 5 (aufsteigend nach Schwere) bewertet (siehe Abbildung 11).

Scorepoints



Abbildung 11: Arrhythmiescore

Bewertung der Arrhythmieereignisse anhand des Schweregrades mit Punkten. O Punkte bei keinen Auffälligkeiten (Sinusrhythmus ohne Arrhythmieereignis), 5 Punkte bei klinisch schwerstem Ereignis mit Kammerflimmern.

Zur Quantifizierung der Arrhythmie-Ereignisse wurden zwei Auswertungsmöglichkeiten, jeweils unter Gegenüberstellung der WT- zu den KO-Tieren, gewählt:

- Lediglich das schwerwiegendste Ereignis (jenes mit der höchsten Punktzahl) wurde gezählt und für die Aufsummierung der Scorepoints pro Genotyp herangezogen.
- Bei mehrfachem Auftreten von Arrhythmie-Ereignissen wurden alle Punkte pro Tier aufsummiert, die Summe wurde dann für die Berechnung der Gesamtpunktzahl der jeweiligen Genotyp-Gruppe verwendet.

Dies ermöglichte die quantitative Beurteilung von auftretenden Herzrhythmusstörungen und den Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen untereinander.

2.7.3 Invasive Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)

Hierbei wurden die Mäuse mit einem 2,5%igem Isofluran-Sauerstoffgemisch narkotisiert und mit einer Metallintubationskanüle (1,2 mm, Hugo Sachs Elektronik) intubiert. Auch hier erfolgte nach ausreichender Anästhesierung eine Fixierung in Rückenlage auf einer Wärmeplatte unter Temperaturkontrolle mit einer Rektalsonde (mind. 36,5 °C). Die Sicherstellung der Respiration erfolgte durch Intubation über ein Beatmungsgerät (UGO Basile 7025, Hugo Sachs Electronic). Nach Lagekontrolle wurde der Tubus mit einem Klebestreifen fixiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde den Mäusen 1,5 % Isofluran (Isoflurane Vapor 2000, Dräger) bei einem Atemvolumen von 1 ml und einer Atemfrequenz von 120 Atemzügen pro Minute verabreicht. Zwecks Ableitung eines Oberflächen-EKGs wurden analog zum Versuchsaufbau der EKG-Aufzeichnung Elektroden subkutan in den Extremitäten platziert. Danach erfolgte die Präparation der rechten Vena jugularis. Hierbei wurde nach großzügiger Desinfektion mit einem Hautantiseptikum und der Rasur des Halsbereiches unter dem Operationsmikroskop (Auflichtmikroskop SZ 40, Olympus) auf Höhe des Larynx ein 10 bis 15 mm langer Hautschnitt durchgeführt. Es folgte die stumpfe Präparation der

rechten Vena jugularis mit einer Präparationsschere und das Setzen einer proximalen Ligatur. Nach Venotomie mittels Mikroschere folgte das Einführen des Katheters (Octopolar Catheter FT1131, SciSense), der vorsichtig über die Vena subclavia dextra zunächst in das rechte Atrium, anschließend in den rechten Ventrikel vorgeschoben wurde. Die korrekte Lage des Katheters wurde anhand des abgeleiteten Oberflächen-EKGs überprüft.

Der Katheter ermöglichte aufgrund seiner intrakardialen Platzierung sowohl die Aufzeichnung des Herzrhythmus als auch die Stimulierung des Herzens (1 ms-Puls, STG1001, Multi Channel Systems, MC Stimulus 2.1.2).

Für die Bestimmung physiologisch relevanter Parameter wurden etablierte Stimulationsprotokolle zur Arrhythmiediagnostik verwendet. Dabei werden über den Elektrodenkatheter an bestimmten Stellen im Herzen mit Hilfe von in diesem Protokoll definierten Intervallen elektrische Impulse abgegeben. Diese dienen zur differenzierten Diagnostik von Arrhythmien und ermöglichen im Falle eines Auftretens die Beurteilung der Arrhythmieform sowie ggf. den Ursprung und Mechanismus derselben. Am Beispiel des AFI-Protokolls soll dieser Stimulationsablauf verdeutlicht werden. Einzelne Impulse wurden hierbei stets mit 1000 mV und für eine Dauer von 500 µs durchgeführt. Das AFI-Protokoll besteht aus 6 Stimulationsblöcken, wovon jeder eine Dauer von 5 s hat. Zwischen den Blöcken liegen jeweils 30 s Pause. Die Impulse erfolgen im ersten Block mit einem Abstand von 50 ms und in den nachfolgenden Blöcken mit absteigenden Intervallen von 33 ms, 25 ms, 20 ms, 15 ms und 10 ms, was eine steigende Wiederholungszahl pro Block zur Folge hat.

Die Aufzeichnung wurde mit Chart 7 für Windows (ADInstruments) durchgeführt und die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms ECG Auto Version 2.5.0.3 (emka Technologies). Die einzelnen Blöcke wurden dabei u.a. nach induzierten Arrhythmien untersucht.

Nach Ableitung eines Ruhe-EKGs wurde gemäß Stimulationsprotokoll zunächst eine Stimulation im Vorhof durchgeführt zwecks Analyse der elektrophysiologischen Eigenschaften des Sinusknotens und des AV-Knotens. Hierbei wurde im ersten Schritt der Parameter Sinusknotenerholzeit (SNRT) erhoben (vgl. Abbildung 12). Dabei erfolgt

eine Stimulation mit einer leicht oberhalb der zuvor bestimmten Eigenfrequenz liegenden Impulsfrequenz. Das Stimulationsprotokoll bestand aus drei Blöcken mit einer jeweiligen Dauer von 10 s und 10 s Pause zwischen den Blöcken. Die Intervalldauer, also der Abstand zwischen zwei Stimuli, betrug 100 ms, 85 ms und 75 ms. Dies ergibt eine Stimulationsanzahl von 100, 118 und 133 Stimuli je Block (10 000 ms/Intervalldauer). Die SNRT wird definiert als Zeitintervall zwischen dem letzten Stimulus eines Stimulationsblockes und dem Wiedereinsetzen des Spontanrhythmus (Beginn der P-Welle).





Die Bestimmung des Wenckebach-Punktes dient der Analysierung der AV-Überleitung bzw. der Feststellung einer atrioventrikulären Überleitungsstörung (AV-Block). Hierzu findet die Stimulation erneut im Vorhof statt und erfolgt in steigender Frequenz bis zum erstmaligen Ausfall der atrioventrikulären Überleitung (AV-Block Typ Wenckebach). Gemäß Protokoll erfolgten die Stimulationen zunächst in einem Intervall von 100 ms. Nach 30 Stimuli wurde das Intervall jeweils um 2 ms verkürzt bis zum Erreichen einer Intervalldauer von 50 ms. Der Punkt an dem eine letztmalige Überleitung der Erregung auf den Ventrikel stattfand, wird als Wenckebach-Punkt bezeichnet (siehe Abbildung 13).





2.7.4 Gruppen für die kardiologischen Untersuchungen

Zur Übersichtlichkeit findet sich in der folgenden Grafik eine Zusammenstellung aller Tiergruppen, die für sämtliche kardiologischen Versuche verwendet wurden. Die EKG-Auswertung, Arrhythmie-Bestimmung aus den EKGs sowie die elektrophysiologische Untersuchung wurde zunächst mit unbehandelten WT- und KO-Tieren durchgeführt. Hierbei wurden die Messungen stets zunächst vor und anschließend nach Gabe von Isoproterenol vorgenommen. Sämtliche kardiologischen Untersuchungen wurden mit anderen WT- und KO-Mäusen, welche zunächst einer Behandlung mit Eplerenon unterzogen wurden, wiederholt.



Abbildung 14: Für kardiologische Untersuchungen eingesetzte Tiergruppen

Grafische Darstellung der für die EKG-Auswertung, Arrhythmie-Bestimmung und EPU verwendeten Tiergruppen. Zunächst Durchführung aller Versuche mit den basalen WT- und KO-Mäusen. Hierbei jeweils Messungen unter Ruhebedingungen (vor Gabe von Isoproterenol) und unter Stressbedingungen (nach Gabe von Isoproterenol). Anschließend Wiederholung des gesamten Untersuchungsaufbaues unter Verwendung von mit Eplerenon behandelten WT- und KO-Mäusen. Auch hier wieder Durchführung ohne und mit Isoproterenol.

2.8 Histologische Untersuchungen

2.8.1 PSR-Färbung

Die verwendeten Mausherzen wurden i. d. R. im Anschluss an die elektrophysiologische Untersuchung und Tötung der Tiere unter Narkose durch Sternotomie und Präparation des Herzens in toto gewonnen. Nach kurzem Eintauchen in isotonische NaCl-Lösung zur Entfernung des verbliebenen Blutes wurden die Herzen dann gewogen und für die weitere Verwendung präpariert. Die Herzen wurden mit einer Alkohol-Xylol-Reihe entwässert und in Paraffin eingebettet.

Zum Schneiden der Paraffinblöcke wurde ein Schlittenmikrotom verwendet. Zunächst wurden dickere Schichten geschnitten, um an die im Fokus des Interesses stehenden myokardialen Gewebeschichten zu gelangen, dann wurde eine Schichtdicke von 7 μ m eingestellt.

Mit einem feinen Pinsel wurden die passenden Schnitte dann vorsichtig in ein warmes Wasserbad (44 – 49 °C) gelegt. Anschließend wurden meist zwei Schnitte auf einem beschrifteten Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden schließlich zur Trocknung der Schnitte in einem Trockenschrank bei 70 °C gelagert.

Nach einer Trocknungszeit von im Mittel zwei Tagen wurden die Schnitte für die anschließende Färbung zunächst entparaffiniert. Die hierfür verwendete Vorgehensweise stellte sich wie folgt dar:

- 1. Rotistol a 5 Minuten
- 2. Rotistol b 5 Minuten
- 3. Xylol 5 Minuten
- 4. Xylol Ethanol 1:1 5 Minuten
- 5. Ethanol 96 % 5 Minuten
- 6. Ethanol 75 % 5 Minuten
- 7. Ethanol 50 % 5 Minuten
- 8. Destilliertes Wasser 2 3 mal eintauchen

Danach wurden die Schnitte für eine Dauer von 20 Minuten in ein Glasgefäß mit der PSR-Färbelösung gegeben. Nach Ablauf dieses Zeitraums wurden die Schnitte zum Entwässern erneut in festgeschriebener Reihenfolge und Dauer in 8 Glasgefäße gegeben.

1.	Destilliertes Wasser	je 2 – 3 mal eintauchen
2.	Ethanol 50 %	1 Minute
3.	Ethanol 75 %	1 Minute
4.	Ethanol 96 %	1 Minute
5.	Xylol / Ethanol 1:1	5 Minuten
6.	Xylol	5 Minuten
7.	Rothistol a	5 Minuten
8.	Rothistol b	5 Minuten

Anschließend wurden die Objektträger aus der Lösung entnommen und die Schnitte wurden nach kurzer Trocknung mit Entellan und herkömmlichen Deckgläschen eingedeckt. Nach einer eintägigen Trockenzeit unter dem Abzug waren die Schnitte fertig zur weiteren Beurteilung.

2.8.1.1 Kollagenbestimmung

Die PSR-Färbung ist eine Methode zur Darstellung von Kollagenfasern von in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten. Die anschließende planimetrische Bestimmung des interstitiellen Bindegewebes in den Herzschnitten basiert dabei auf den spezifischen Rot- und Grünfluoreszenzen, die von PSR-gefärbten Paraffinschnitten ausgeht [229]. Unter dem Lichtmikroskop erscheinen gefärbte Kollagenfasern rot, während normale vitale Zellen eine grüne Autofluoreszenz aufweisen. Diese Farben können mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Unter digitaler Bildaddition und -subtraktion durch einen semi-automatischen Software-Prozess wird die relative Fläche des reinen Kollagens und jene der vitalen Zellen in den Gewebeschnitten bestimmt. So kann der Kollagengehalt in verschiedenen Geweben wie Gefäßen, Lunge, Niere, Leber und Herz quantifiziert werden.

Mittels Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Z1m Imager) werden der Rot- und Grünkanal der Schnitte mit dem 20x Objektiv (Plan-Apochromat 20x/0.80 Ph 2 M27) aufgenommen. Dabei ist darauf zu achten, dass zuerst der Rot-, dann der Grünkanal aufgenommen wird, das Bild scharf eingestellt und gleichmäßig ausgeleuchtet ist und die Schnitte plan und ebenmäßig sind. Bei einer Expositionszeit für den Rot- und Grünkanal von 250 ms wurden die aufgenommenen Bilder anschließend im *zvi Format abgespeichert. Die quantitative Auswertung der Bilder wird schließlich mit Hilfe der Programme ZEN 2011 und Adobe Photoshop durchgeführt [229].

2.8.2 HE-Färbung

Zur Anfertigung von HE-Übersichtspräparaten erfolgte die Schnittanfertigung und die Entparaffinierung analog zu der PSR-Färbung, mit dem Unterschied, dass hier eine Schnittdicke von 5 µm gewählt wurde. Nachdem die Schnitte nach o. a. Schema entparaffiniert wurden, folgte die Färbung in Hämalaun für exakt 10 Minuten. Danach wurden die gefärbten Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach zweimaligem kurzem Abspülen mit destilliertem Wasser folgte die fünfminütige Färbung in Eosin. Im Anschluss wurden die Objektträger je kurz in zwei Gefäße mit destilliertem Wasser und drei Gefäße mit 96 % Ethanol getaucht. Im Weiteren wurde folgendes Vorgehen gewählt:

- 1. Xylol / Ethanol 1:1 5 Minuten
- 2. Xylol 5 Minuten
- 3. Rothistol a 5 Minuten
- 4. Rothistol b 5 Minuten

Abschließend wurden die Schnitte analog zu der PSR-Färbung mit Entellan eingedeckt.

2.8.3 X-Gal-Färbung

Zur Überprüfung der endogenen Promotoraktivität des Spred2-Gens wurden X-Gal Färbungen von KO-, HET- und – als Negativkontrolle – WT-Herzschnitten angefertigt. Nach Entnahme der Mausherzen wurden diese in ein Reaktionsgefäß mit 2-Methylbutan gelegt und anschließend rasch in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Organe wurden dann bei -80 °C gelagert. Mittels Kryomikrotom wurden 5 – 10 μ m dicke Schnitte angefertigt, die dann auf Superfrost-Objektträgern aufgenommen wurden. Direkt im Anschluss an die Anfertigung der Kryoschnitte wurden diese zunächst bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 15 Minuten in ein Glasgefäß mit Fixationspuffer gelegt. Danach wurde die Schnitte zweimal für 5 Minuten mit dem X-Gal Waschpuffer gewaschen und schließlich über Nacht in X-Gal Färbepuffer, welchem 2 – 4 Stunden vor Durchführung der Färbung die X-Gal Lösung in einer Konzentration von 1 mg/ml zugefügt worden war, bei 37 °C gefärbt. Die gefärbten Herzschnitte wurden dann zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 100 μ l Mowiol und Deckgläsern eingedeckelt. Der Färbeerfolg wurde mittels einem Eclipse E600 Mikroskop und Digitalkamera dokumentiert.

Lösung	Bestandteile
0,1 M Phosphat-Puffer	27 mM NaH ₂ PO ₄ , 73 mM Na ₂ HPO ₄
X-Gal-Fixationspuffer	0.1 M Phosphat Puffer versetzt mit 5 mM EGTA (pH 8), 2 mM
	MgCl ₂ und 0.2% Glutaraldehyd
X-Gal-Waschpuffer	0.1 M Phosphat-Puffer versetzt mit 2 mM $MgCl_2$
X-Gal-Stock-Lösung	500 mg X-Gal in 10 ml Dimethylformamid
(50 mg/ml)	
X-Gal-Färbepuffer	0.1 M Phosphat Puffer versetzt mit 2 mM MgCl ₂ , 5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ , 5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ und 1 mg/ml X-Gal

2.9 Statistik und Datenanalyse

Die Quantifizierung der Western Blots erfolgte mit ImageJ. Die statistische Auswertung sämtlicher Versuche wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardfehler (± SEM) angegeben. Vergleiche von Parametern zwischen den Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des Student's T-Tests auf Signifikanz überprüft, wobei ein *p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant, ein **p-Wert < 0,01 als statistisch hoch signifikant und ein ***p-Wert < 0,001 als statistisch höchst signifikant angesehen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 X-Gal-Färbung

Um die endogene Spred2-Promotoraktivität im Herzen als das im Mittelpunkt der Untersuchungen stehenden Organ veranschaulichen zu können, wurde die β-Galaktosidase-Expression anhand der X-Gal-Färbung von myokardialen Schnitten dargestellt.

Vorhergehende Untersuchungen lieferten bereits Hinweise auf die SPRED2-Expression im Herzen. Durch genauere Untersuchungen an myokardialen Schnitten adulter Tiere konnte die deutliche Promotoraktivität genauer untersucht und verifiziert werden.



Abbildung 15: Spred2-Promotoraktiviät in kardialen Gewebeschnitten

Darstellung der endogenen Spred2-Promotoraktivität in Gewebeschnitten aus den Herzen von WT-, heterozygoten (HT) und KO-Mäusen mit Hilfe von X-Gal-Färbungen.

3.2 Western Blot-Analysen

Bei der Durchführung von Western Blots wurden die murinen Herzlysate auf die Expression von P-ERK und ERK, GAPDH, P-Akt und Akt, P-p38 und p38 sowie SPRED1 und SPRED2 hin untersucht.

Die Untersuchung der Phosphorylisierung von ERK1/2 als Indikator für eine veränderte MAPK-Signalweg-Aktivität zeigte hierbei ein quantitativ erhöhtes Vorkommen von P-ERK (Mittelwerte WT: 0,05 zu KO: 0,57) bei den SPRED2-KO-Tieren. Die unphosphorylierte Form von ERK ergab bei den WT- und KO-Tieren einen gleichartigen Nachweis. Es ergab sich also eine erhöhte P-ERK/ERK-Ratio bei den SPRED2-KO-Mäusen (siehe Abbildung 16 A und B). Eine kompensatorisch gesteigerte SPRED1-Expression konnte nicht festgestellt werden. Bei der Untersuchung des Verhältnisses von P-Akt zu Akt ergab sich eine erhöhte P-Akt/Akt-Ratio bei der KO-Gruppe (Mittelwerte WT 0,19 zu KO 2,41). Demgegenüber zeigte sich eine erhöhte P-p38/p38-Ratio bei den WT-Tieren (WT 7,16 zu KO 1,97). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Zusammenfassend konnte bei den KO Mäusen infolge der fehlenden inhibitorischen Wirkung von SPRED2 eine Hochregulation des Ras/ERK-MAP-Kinase-Signalwegs festgestellt werden, wohingegen eine kompensatorische Hochregulation von SPRED1 nicht nachweisbar war. Die supprimierende Wirkung von SPRED2 auf den Ras/ERK-MAPK-Signalweg konnte somit bestätigt werden.



В



WΤ

KO

10

8

6

4

2 0

PERK/ERK-Ratio

Western Blot Analysen der aus Mäuseherzen gewonnen Lysate unter Verwendung von Anti-P-ERK-, Anti-ERK-, Anti-SPRED1- und Anti-GAPDH-Antikörpern ergaben eine gesteigerte Expression des Ras/ERK-MAP-Kinase-Signalwegs, wobei SPRED1 keine kompensatorische Hochregulation zeigte.

- A. Exemplarische Darstellung der Expression von P-ERK, ERK, SPRED1 und GAPDH aus der Western Blot-Analyse.
- B. Darstellung der quantitativen Auswertung der P-ERK/ERK-Ratio mit erhöhter Expression von P-ERK bei den SPRED2-KO-Mäusen.

3.3 EKG Auswertung

3.3.1 Auswertung der basalen Ruhe- und Stress-EKGs

Im Rahmen der Auswertung der Ruhe- und Stress-Elektrokardiogramme der basalen, also unbehandelten, Mäuse wurden die Daten von 17 WT und 18 KO Tieren miteinander verglichen.

Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte der Messungen für die einzelnen Intervalle mit Signifikanzniveau.

Tabelle 3: Ergebnisse der basalen WT- und KO-EKG-Messungen unter Ruhebedingungen

Parameter als Mittelwerte \pm SEM. Statistisch signifikanter Unterschied bei p<0,05 (*); statistisch hoch signifikanter Unterschied bei p<0,01 (**).

Ruhe EKG			
	Basale Gruppe		p-Werte
	WT	SPRED2-KO	
Anzahl der Tiere n	17	18	
RR-Intervall (ms)	151,95±3,23	143,21±4,08	0,11
HR (Schläge/Minute)	396,68±8,51	424,35±10,82	0,06
PQ-Intervall (ms)	38,57±1,2	38,96±0,85	0,78
P-Dauer (ms)	15,99±0,62	18,11±1,18	0,12
QRS-Dauer (ms)	14,41±0,33	16,34±0,33	0,0002**
QT-Intervall (ms)	64,17±1,41	62,76±1,56	0,51
QT+ (ms)	35,14±0,78	40,91±1,27	0,0007**
TP-Dauer (ms)	49,08±2,57	41,50±3,87	0,11
P Area (mV)	0,64±0,04	0,76±0,05	0,073
QRS-Amplitude (mV)	2,14±0,25	3,63±0,19	0,0000421231**
T Area (mV)	2,23±0,24	1,89±0,21	0,28

Die QRS-Dauer der SPRED2-KO Gruppe war gegenüber den Wildtypen verlängert, was Ausdruck einer ventrikulären Überleitungsstörung sein kann. (16,34±0,33 vs. 14,41±0,33 ms, p-Wert: 0,0002). Des Weiteren war QT+ verlängert und die QRS-Amplitude vergrößert. Die sonstigen Parameter zeigten bei der Ableitung der Ruhe-EKGs keine statistisch signifikanten Unterschiede. So zeigte sich die P-Dauer bei den KO-Mäusen tendenziell erhöht (15,99±0,62 vs. 18,11±1,18 ms) und die TP-Dauer bei der KO Gruppe reduziert (49,08±2,57 vs. 41,50±3,87 ms).

Im Folgenden sind in Tabelle 4 analog zu den Ruhe-EKGs die Ergebnisse der Stress-EKG-Auswertung darstellt.

Stress EKG			
	Basale Gruppe		p-Werte
	WT	SPRED2-KO	
Anzahl der Tiere n	17	18	
RR-Intervall (ms)	100,79±0,94	104,68±1,94	0,098
HR (Schläge/Minute)	597,28±5,41	578,53±14,11	0,095
PQ-Intervall (ms)	33,44±0,80	36,96±1,07	0,01*
P-Dauer (ms)	14,57±0,53	17,16±1,30	0,03*
QRS-Dauer (ms)	14,85±0,31	16,93±0,45	0,0007**
QT-Intervall (ms)	55,90±1,32	55,04±1,48	0,67
QT+ (ms)	32,68±1,14	28,61±1,52	0,03*
TP-Dauer (ms)	11,43±1,36	12,68±1,77	0,58
P Area (mV)	0,63±0,04	0,70±0,05	0,3
QRS-Amplitude (mV)	2,07±0,20	4,25±0,26	1,96802089E-07**
T Area (mV)	2,10±0,22	2,54±0,49	0,43

Tabelle 4: Ergebnisse der basalen WT- und KO-EKG-Messungen unter StressbedingungenParameter als Mittelwerte ± SEM. Statistisch signifikanter Unterschied bei p<0,05 (*); statistisch hoch</td>signifikanter Unterschied bei p<0,01 (**).</td>

Unter durch Isoproterenol induzierten pharmakologischen Stressbedingungen zeigten sich im Gegensatz zu den Ruhedaten die Werte für das PQ-Intervall bei den SPRED2-KO-Mäusen signifikant erhöht (33,44±0,80 vs. 36,96±1,07 ms, P-Wert: 0,01) und die P-Dauer verlängert (14,57±0,53 vs. 17,16±1,30 ms, P-Wert: 0,03). Eine verlängerte P-Dauer kann ein Hinweis auf eine verzögerte Reizweiterleitung über die Vorhöfe sein, während einer Verlängerung des PQ-Intervalls häufig eine atrioventrikuläre Leitungsverzögerung zugrunde liegt.

In folgenden Balkendiagrammen in Abbildung 17 sind die Ergebnisse ausgewählter EKG-Parameter in Ruhe- und Stress-EKG einander gegenüber gestellt.



Abbildung 17: Durchschnittliche Länge des PQ-Intervalls und der P-Dauer unter Ruhebedingungen und nach Isoproterenolgabe in Milisekunden

- A. Signifikante Verlängerung des PQ-Intervalls bei den Knockout-Tieren unter sympathomimetischer Stimulation durch Isoproterol.
- B. Signifikante Verlängerung der P-Dauer bei den Knockout-Tieren unter Isoproterenolgabe. Die Verlängerung unter Ruhebedingungen war nicht signifkant.

Ergebnisse

Auch hier waren das QRS-Intervall bei den KO-Tieren deutlich erhöht (14,85±0,31 vs. 16,93±0,45, P-Wert: 0,0007), QT+ nunmehr aber nicht mehr erhöht sondern im Vergleich mit den WT-Mäusen verringert (32,68±1,14 vs. 28,61±1,52, P-Wert: 0,03), wie Abbildung 18 B zeigt.





- A. Signifikante Verlängerung des QRS-Intervalls bei den Knockout-Tieren sowohl unter Ruhebedingungen als auch unter sympathomimetischer Stimulation durch Isoproterol.
- B. Signifikante Verlängerung der QT+ Zeit bei den KO-Tieren unter Ruhebedingungen, unter Isoproterenolgabe dem gegenüber Verkürzung von QT+.

Die intraperitoneale Gabe von Isoproterenol zeigte eine sympathomimetische Wirkung in Form eines Herzfrequenzanstiegs von im Mittel 200,6 Schlägen/Minute bei den WTund 154,2 Schlägen/Minute bei den KO-Tieren (siehe Abbildungen 19 und 20). Dies könnte Ausdruck der nur unzureichenden Fähigkeit der KO-Herzen sein, adäquat auf sympathomimetische Stimulation zu reagieren.


Abbildung 19: Durchschnittlicher Anstieg der Herzfrequenz und prozentualer Anstieg nach Isoproterenolgabe

- A. Durchschnittlicher Anstieg der Herzfrequenz in bpm nach sympathomimetischer
 Stimulation durch Isoproterenol führt bei den WT-Mäusen zu einem höheren Anstieg der HF.
- B. Prozentualer Herzfrequenzanstieg bei den WT-Tieren um circa 50 Prozent, bei den KO-Tieren um nur circa 35 Prozent.



Abbildung 20: Herzfrequenzanstieg mit Zeitachse

Entwicklung der Herzfrequenz im Zeitverlauf. Bei 2:00 Minuten Gabe von Isoproterenol, daraufhin Anstieg der HF. Stärkerer Anstieg bei den KO-Tieren mit 50,6 % der Ausgangsfrequenz, bei den KO-Mäusen lediglich Anstieg um 36,3 % der Ruhe-HF.

3.3.2 Auswertung der Ruhe- und Stress-EKGs der mit Eplerenon behandelten Tiergruppen

Jeweils 12 mit Eplerenon behandelte WT- und KO-Mäuse wurden entsprechend der basalen Tiergruppen im Ruhe- und Stress-EKG untersucht. Dies diente der Überprüfung, ob die basal veränderten EKG-Parameter durch die Behandlung mit dem Aldosteronantagonisten eine günstige Beeinflussung aufweisen. Tabelle 4 zeigt die daraus unter Ruhebedingungen gewonnen Daten.

Tabelle 5: Ergebnisse der WT- und KO-EKG-Messungen bei den mit Eplerenon behandelten Tiergruppen unter Ruhebedingungen

Parameter als Mittelwerte ± SEM. Statistisch signifikanter Unterschied bei p<0,05 (*); statistisch hoch signifikanter Unterschied bei p<0,01 (**).

Ruhe EKG				
	Behandelte Gru	рре	p-Werte	
	WT	SPRED2-KO		
Anzahl der Tiere n	12	12		
RR-Intervall (ms)	134,25±4,93	128,67±4,15	0,397	
HR (Schläge/Minute)	452,84±16,97	471,99±15,29	0,412	
PQ-Intervall (ms)	36,54±0,78	37,99±0,77	0,181	
P-Dauer (ms)	13,62±0,50	14,59±0,55	0,206	
QRS-Dauer (ms)	15,03±0,46	16,15±0,53	0,126	
QT-Intervall (ms)	54,78±2,43	50,18±2,63	0,213	
QT+ (ms)	43,70±2,57	39,28±2,00	0,192	
TP-Dauer (ms)	42,78±5,02	40,64±4,76	0,761	
P Area (mV)	0,38±0,02	0,54±0,04	0,0069**	
QRS-Amplitude (mV)	1,63±0,24	2,66±0,28	0,0112*	
T Area (mV)	1,41±0,21	0,88±0,10	0,0418*	

Lediglich die P Area, T Area und QRS-Amplitude wiesen unter Ruhebedingungen signifikante Unterschiede im Vergleich mit der WT-Gruppe auf.

Tabelle 6: Ergebnisse der WT- und KO-EKG-Messungen bei den mit Eplerenon behandeltenTiergruppen unter sympathomimetischer Stimulation durch Isoproterenol

Parameter als Mittelwerte ± SEM. Statistisch signifikanter Unterschied bei p<0,05 (*); statistisch hoch signifikanter Unterschied bei p<0,01 (**).

Stress EKG				
	Behandelte Gr	uppe	p-Werte	
	WT	SPRED2-KO		
Anzahl der Tiere n	12	12		
RR-Intervall (ms)	93,16±0,77	96,93±1,17	0,0151*	
HR (Schläge/Minute)	645,66±5,32	621,50±7,37	0,016*	
PQ-Intervall (ms)	33,92±0,80	34,13±0,76	0,869	
P-Duration (ms)	13,31±0,38	12,91±0,53	0,537	
QRS-Dauer (ms)	14,75±0,66	16,29±0,82	0,156	
QT-Intervall (ms)	48,48±1,92	47,02±1,3	0,533	
QT+ (ms)	36,41±1,31	33,37±1,46	0,134	
TP-Dauer (ms)	10,93±1,69	15,88±1,49	0,041*	
P Area (mV)	0,43±0,04	0,46±0,03	0,53	
QRS-Amplitude (mV)	1,77±0,23	3,00±0,42	0,021*	
T Area (mV)	1,23±0,02	1,71±0,44	0,334	

Die Mittelwerte der RR-Intervalle zeigten sich nach Gabe von Isoproterenol bei den KO-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren erhöht (93,16±0,77 vs. 96,93±1,17, P-Wert: 0,0151). Die Herzfrequenz lag im Stress-EKG in der WT-Gruppe im Mittel höher als bei der KO-Gruppe. Dies könnte erneut Hinweis darauf sein, dass die Herzen der WT-Tiere eher in der Lage sind, auf sympathomimetische Stimulation mit einem adäquaten Herzfrequenzanstieg zu reagieren, wobei folglich keine stärkere Beeinflussung dieser Beobachtung durch Eplerenon eingetreten ist.

Die in der basalen Gruppe vorhandenen Unterschiede bei der P-Dauer im Stress-EKG waren bei den mit Eplerenon behandelten Tieren nicht mehr nachweisbar.

Ergebnisse

Auch der Unterschied der basalen Gruppen bezüglich des QRS-Intervalls war sowohl vor als auch nach Isoproterenolgabe bei den behandelten Tieren nicht mehr vorhanden (siehe Abbildung 21 B).

Dagegen war beim TP-Intervall eine signifikante Erhöhung im Stress-EKG bei den KO-Tieren nachweisbar (10,93±1,69 vs. 15,88±1,49, P-Wert: 0,041). Die Länge des isoelektrischen TP-Intervalls, welches den Großteil der elektrischen Diastole des Herzens darstellt, hängt stark von der Herzfrequenz ab. Unter Tachykardie ist eine Verkürzung des TP-Segments physiologisch.



Abbildung 21: Durchschnittliche P-Dauer und Länge des QRS-Komplexes unter Ruhebedingungen und nach Isoproterenolgabe in Milisekunden

- A. Nach Eplerenon-Behandlung kein signifikanter Unterschied der P-Dauer von WT- und KO-Tieren.
- B. Nach Eplerenon-Behandlung kein signifikanter Unterschied der QRS-Dauer von WT- und KO-Tieren.

Neben der einzelnen Betrachtung der basalen und der behandelten Gruppe, war für uns von Interesse, ob sich durch die Behandlung mit einem Aldosteronantagonisten der kardiale Phänotyp der KO-Tiere positiv beeinflussen und dem der WT-Tiere annähern ließe.

Ergebnisse

Da nicht alle EKG-Parameter der basalen KO-Tiere Auffälligkeiten zeigten, machte hierbei insbesondere eine nähere Betrachtung jener Parameter Sinn, die solche statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren aufwiesen. So stellte sich das PQ-Intervall bei den basalen KO Tieren erhöht dar (33,44±0,80 vs. 36,96±1,07, P-Wert: 0,01). Dagegen waren bei den mit Eplerenon behandelten Gruppen keine solchen Unterschiede mehr nachweisbar (33,92±0,80 vs. 34,13±0,76, P-Wert: 0,87) (siehe Abbildung 22). Und auch im direkten Vergleich der basalen Wildtyp-Gruppe mit der behandelten KO-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (33,44±0,80 vs. 34,13±0,76, P-Wert: 0,51). Der Unterschied der PQ-Zeit von KO basal zu KO behandelt stellte sich demgegenüber signifikant dar (36,96±1,07 vs. 34,13±0,76, P-Wert: 0,03).



Abbildung 22: PQ-Intervall bei basalen WT- und KO-Tieren vs. behandelten KO-Tieren

Annäherung der Werte des PQ-Intervalls in der mit Eplerenon behandelten KO-Gruppe an die Werte der basalen WT-Gruppe, kein signifikanter Unterschied nachweisbar. Des Weiteren signifikanter Unterschied zwischen KO basal und KO behandelt (P-Wert 0,03), damit deutlicher Rückgang der PQ-Zeit bei den KO-Tieren unter Eplerenonbehandlung.

Bei der QRS-Dauer zeigten sich sowohl im Ruhe-EKG als auch im Stress-EKG signifikante

Ergebnisse

Unterschiede zwischen den unbehandelten WT- und KO-Tieren. Bei den behandelten Tieren zeigte sich im Ruhe-EKG (15,03±0,66 vs. 16,15±0,53, P-Wert: 0,12) und im Stress-EKG (14,75±0,66 vs. 16,29±0,82, P-Wert 0,16) zwar noch eine Erhöhung der KO-Werte, jedoch lagen diese unterhalb des Signifikanz-Niveaus. Im direkten Vergleich WT basal vs. KO behandelt fiel diese Erhöhung im Ruhe-EKG signifikant, im Stress-EKG dagegen nicht mehr signifikant aus (siehe Abbildungen 23 A und B).



Abbildung 23: QRS-Intervall bei basalen WT- und KO-Tieren vs. behandelten KO-Tieren vor und nach Isoproterenolgabe

- A. Annäherung der QRS-Dauer in Ruhe beim behandelten KO an den basalen WT, jedoch noch immer signifikanter Unterschied.
- B. Beim behandelten KO Annäherung der QRS-Dauer unter Stress an den basalen WT, kein signifikanter Unterschied mehr.

3.4 EKG Arrhythmieauswertung

3.4.1 Basale Arrhythmieauswertung

Es wurden die Ergebnisse von 20 basalen WT und 19 basalen KO Tieren mit Hilfe des in Abbildung 11 dargestellten Scoresystems miteinander verglichen.

Bei der Betrachtung des jeweils einfach gewerteten schwersten Ereignisses ergab sich eine durchschnittliche Scorepointanzahl von 0,35:1,16 (WT:KO).

	Scorepoints schwerstes Ereignis	
	WT	КО
Anzahl Tiere	20	19
Scorepoints	7	28
Av	0,35	1,47

Hierbei wurde keine Unterscheidung getroffen, ob ein Ereignis vor oder nach der Verabreichung von Isoproterenol aufgetreten ist.

Betrachtete man die Summe aller während der Messungen aufgetretenen Arrhythmieereignisse, ergab sich eine durchschnittliche Scorepunktzahl von 0,45:7,74 (WT:KO).

	Scorepoints gesamt	
	WT	КО
Anzahl Tiere	20	19
Scorepoints	9	147
Av	0,45	7,74

Dies war insbesondere der Tatsache geschuldet, dass es bei den KO-Tieren vermehrt zu einer Vielzahl von Ereignissen mit geringem klinischen Schweregrad kam, wie z.B. einmalige Sinusarrhythmien oder ventrikuläre Extrasystolen.



Abbildung 24: Durchschnittliche Arrhythmiepunkte unter einfacher Wichtung des jeweils schwersten Ereignisses und Aufsummierung aller Scorepunkte

Sowohl bei Betrachtung des jeweils schwerwiegendsten Arrhythmieereignisses (0,35:1,16 WT:KO), als auch unter Aufsummierung aller aufgetretenen Arrythmieereignisse (0,45:7,74) zeigte sich eine erhöhte Punktezahl bei den KO-Tieren.

Traf man eine Unterscheidung, zwischen den vor und nach Isoproterenolgabe eingetretenen Ereignissen, zeigten sich bei den KO-Tieren mehr arrhythmische Ereignisse nach sympathomimetischer Stimulation (siehe Abbildung 25).

	Scorepoints schwerstes Ereignis vor Iso	
	КО	
Anzahl Tiere	20	19
Scorepoints	4	12
Av	0,20	0,63

	Scorepoints schwerstes Ereignis nach Iso		
WT КО			
Anzahl Tiere	20	19	
Scorepoints	3	19	
Av	0,15	1,00	



Abbildung 25: Durchschnittliche Arrhythmiepunkte bei einfacher Wertung des jeweils schwerwiegendsten Ereignisses vor und nach Gabe von Isoproterenol

Deutlich erhöhte Scorepoints insbesondere nach sympathomimetischer Stimulation durch Isoproterenol (0,15:1,00 WT:KO).

3.4.2 Arrhythmieauswertung nach Eplerenon-Behandlung

Nachdem sich bei den basalen Tiergruppen ein signifikantes Mehrauftreten von Arrythmieereignissen bei den KO-Tieren gezeigt hatte, stellte sich nun die Frage, ob das Vorkommen von Arrhythmien bei der mit Eplerenon behandelten KO-Gruppe verringert werden konnte. Daher erfolgte eine Gegenüberstellung der basalen KO-Gruppe mit der mit Eplerenon behandelten KO-Gruppe unter Berücksichtigung der WT-Ergebnisse als physiologische Referenzwerte. Die Tiergruppen hatten eine Stärke von 12:12 Tieren (WT:KO).

Zunächst betrachteten wir erneut die jeweils einfach gewerteten schwersten Ereignisse unabhängig von Isoproterenolgabe.

	Scorepoints schwerstes Ereignis			
WT basal KO basal KO beh				
Anzahl Tiere	20	19	12	
Scorepoints	7	22	6	
Av	0,35	1,47	0,50	

Anschließend wurden die einzelnen Ereignisse je Tier aufsummiert betrachtet.

	Scorepoints gesamt			
	WT basal	KO basal	KO behandelt	
Anzahl Tiere	20	19	12	
Scorepoints	9	147	19	
Av	0,45	7,74	1,58	

Die bei der unbehandelten KO-Gruppe deutlich erhöhten Scorepunktewerte waren in der behandelten KO-Gruppe sowohl unter Berücksichtigung des jeweils schwerwiegendsten Ereignisses als auch unter Aufsummierung aller Ereignisse stark reduziert. Im Vergleich mit der basalen WT-Gruppe war kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar (siehe Abbildung 26). Die WT-Gruppe erfuhr durch die Behandlung mit Eplerenon keine bedeutsame Veränderung.



Abbildung 26: Durchschnittliche Scorepoints WT basal, KO basal und KO behandelt unter Berücksichtigung des jeweils schwerwiegendsten Ereignisses (A) und Aufsummierung aller Ereignisse (B)

Annäherung der durchschnittlichen Arrhythmiescorepunkte bei den behandelten KO-Tieren an jene der basalen WT-Tiergruppe.

	Scorepoints schwerstes Ereignis vor Iso			
WT basal KO basal KO beh				
Anzahl Tiere	20	19	12	
Scorepoints	4	12	4	
Av	0,20	0,63	0,33	

	Scorepoints schwerstes Ereignis nach Iso			
	WT basal	KO basal KO behandelt		
Anzahl Tiere	20	19	12	
Scorepoints	3	19	2	
Av	0,15	1,00	0,17	

Auch die isolierte Betrachtung der Scorepoints vor und nach Gabe von Isoproterenol ergab bei den KO-Mäusen die deutliche Reduktion der arrhythmischen Ereignisse nach Gabe von Eplerenon.

Durch die Behandlung mit dem Aldosteronantagonisten konnte somit ein sichtlicher Rückgang an Arrhythmien während der EKG-Aufzeichnungen verzeichnet werden.

3.5 EPU

3.5.1 Basale EPU-Ergebnisse

Es wurden die Daten von 10 WT- und 16 KO-Tieren miteinander verglichen.

Tabelle 7: Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchung an den unbehandelten TiergruppenParameter als Mittelwerte ± SEM. Statistisch signifikanter Unterschied bei p<0,05 (*); statistisch hoch</td>signifikanter Unterschied bei p<0,01 (**).</td>

	wт	КО	p-Werte
Anzahl n	10	16	
HR (bpm)	400,00±13,65	413,47±10,55	0,44
Zykluslänge (ms)	148,0 ±23,2	147,8±27,3	0,99
SNRT 100 (ms)	252,8±44,6	224,5±98,7	0,20
SNRT 85 (ms)	190,±42,8	190,0±58,8	0,98
SNRT 75 (ms)	132,5±7,1	145,4±36,5	0,54
Wenckebachpunkt	77,40±1,81	81,13±2,07	0,19
(ms)			

Bei der Auswertung der basalen Tiergruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zykluslänge, des Wenckebachpunktes sowie der verschiedenen Sinusknotenerholzeiten. Da diese Parameter die Eigenschaften des Sinusknotes sowie der atrioventrikulären Überleitung abbilden, konnte somit anhand der EPU keine Auffälligkeiten in diesem Bereich festgestellt werden.

Analog zu den Ruhe- und Stress-EKGs wurde auch im Rahmen der elektrophysiologischen Untersuchung eine quantitative und qualitative Analyse der aufgetretenen Arrhythmien durchgeführt.

Tabelle 8: Art und Anzahl der aufgetretenen Arrhythmieereignisse

Tabellarische Aufführung der Art und jeweiligen Gesamtzahl an Arrythmien, die unter Anwendung des Stimulationsprotokolls im Rahmen der elektrophysiologischen Untersuchungen bei den unterschiedlichen Tiergruppen aufgetreten sind. Bei der unbehandelten KO-Gruppe kam es vermehrt zu ventrikulären Extrasystolen und zu Vorhofflimmern. Auch in der basalen WT-Gruppe traten vereinzelt arrhythmische Ereignisse auf. Alles in allem zeigten sich bei der basalen KO-Gruppe jedoch deutlich mehr arrhythmische Ereignisse, wie sich auch bei der Anwendung des Arrhythmie-Scores bestätigte. Nach Anwendung einer Eplerenon-Therapie waren bei den KO-Tieren eine deutlich verminderte Anzahl an Extrasystolen und VHF sowie sonstiger Arrhythmie-Ereignisse feststellbar.

Art der Arrhythmie	WT basal	KO basal	WТ	КО
			behandelt	behandelt
Sinusarrhythmie	2	0	0	0
ES	11	44	18	8
Couplets	0	1	0	1
Triplets	0	0	0	0
Bigeminus	0	0	0	0
supraventrikuläre Tachykardie	0	0	0	0
AV-Block 2. Grades	0	2	0	1
AV-Block 3. Grades	1	0	0	0
SA-Block	0	0	1	0
anhaltende Sinusarrhythmie	3	2	1	0
Vorhofflimmern	3	8	0	4
ventrikuläre Tachykardie	0	0	1	1
Kammerflattern	0	1	0	0
Kammerflimmern	0	0	0	0

Unter Berücksichtigung des Scoresystems ergaben sich bei der Untersuchung der basalen Tiergruppen die im Folgenden angegebenen Punktewerte.

	Scorepoints schwerstes Ereignis		
	WT	КО	
Anzahl Tiere	10	16	
Scorepoints	27	70	
Av	2,7	4,4	

	Scorepoints gesamt	
	WT	КО
Anzahl Tiere	10	16
Scorepoints	47	184
Av	4,7	11,5

Aufgrund der unterschiedlichen Gruppenstärke war ein Vergleich lediglich anhand der Durchschnittwerte sinnvoll. Hierbei zeigten sich bei den nicht behandelten Mausgruppen sowohl bei der Betrachtung des jeweils schwersten Ereignisses je Maus (2,7 vs. 4,4), als auch bei der Aufsummierung aller eingetretenen Arrhythmieereignisse je Tier (4,7 vs. 11,5) eine höhere Punktzahl bei den Knockout-Tieren, wobei dieser Unterschied jedoch jeweils unterhalb des Signifikanzniveaus lag (siehe Abbildung 27). Bei der Betrachtung der Arten der Arrhythmieereignisse (siehe Tabelle 8) zeigte sich, dass dies insbesondere dem deutlich vermehrten Auftreten von ventrikulären Extrasystolen sowie paroxysmalen Vorhofflimmern geschuldet war.



Abbildung 27: Durchschnittliche Arrhythmiescorepoints unter einfacher Wertung des jeweils schwerwiegendsten Ereignisses sowie unter Aufsummierung aller aufgetretenen Arrhythmieereignisse bei den unbehandelten WT- und KO-Gruppen.

Die folgenden Grafiken (Abbildungen 28 bis 31) zeigen exemplarische Ausschnitte von bei den Mäusen aufgetretenen Arrhythmieereignissen, welche Gegenstand der Beurteilung mittels Arrhythmiescore waren.



Abbildung 28: Exemplarische Darstellung von Arrhythmien – Arrhythmia absoluta mit VHF

Beispielhafte Darstellung des Auftretens eines paroxysmalen Vorhofflimmerns im Rahmen der EPU bei einer Knockout-Maus. Das etwa 200 ms anhaltende Vorhofflimmern zeigte sich selbstlimitierend und kehrte spontan in einen normofrequenten Sinusrhythmus zurück.



Abbildung 29: Exemplarische Darstellung von Arrhythmien – Couplet (ventrikuläre Extrasystolen)

Spontanes Auftreten von zwei monomorphen ventrikulären Extrasystolen in Folge. Das gleichartige Erscheinungsbild der Extrasystolen im EKG lässt darauf schließen, dass sie demselben Erregungszentrum entspringen (monotop).



Abbildung 30: Exemplarische Darstellung von Arrhythmien - einzelne ventrikuläre Extrasystolen



Abbildung 31: Exemplarische Darstellung von Arrhythmien – Kammerflattern

Beispielhafte Darstellung des Auftretens eines paroxysmalen Kammerflatterns im Rahmen der EPU bei einer Knockout-Maus. Das etwa 300 ms anhaltende Kammerflattern zeigte sich selbstlimitierend und kehrte spontan in den Sinusrhythmus zurück.

3.5.2 EPU-Ergebnisse nach Eplerenon-Behandlung

Es wurden 12 Wildtyp- und 10 Knockout-Tiere nach Eplerenon-Behandlung untersucht.

Tabelle 9: Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchung an den unbehandelten Tiergruppen

Parameter als Mittelwerte \pm SEM. Statistisch signifikanter Unterschied bei p<0,05 (*); statistisch hoch signifikanter Unterschied bei p<0,01 (**).

	WT	КО	p-Werte
Anzahl n	12	10	
HR (bpm)	472,0±13,2	484,3±22,1	0,63
Zykluslänge (ms)	130,1±53,0	151,0±16,4	0,62
SNRT 100 (ms)	155,4±11,6	151,0±16,4	0,82
SNRT 85 (ms)	157,8±16,2	165,6±7,5	0,67
SNRT 75 (ms)	164,8±7,8	146,6±9,7	0,19
Wenckebachpunkt	72,9±1,3	74,8±1,9	0,42
(ms)			

Wie auch schon bei den basalen Tiergruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede bei den im Rahmen der elektrophysiologischen Untersuchung erhobenen Parametern feststellen.

	Scorepoints schwerstes Ereignis		
	WT	КО	
Anzahl Tiere	12	10	
Scorepoints	16	9	
Av	1,33	0,90	

	Scorepoints gesamt		
	WT	КО	
Anzahl Tiere	12	10	
Scorepoints	30	27	
Av	2,5	2,7	

	Scorepoints schwerstes Ereignis			
	WT basal	KO basal	KO behandelt	
Anzahl Tiere	10	16	10	
Scorepoints	27	70	9	
Av	2,7	4,4	0,9	

	Scorepoints gesamt			
	WT basal	KO basal	KO behandelt	
Anzahl Tiere	10	16	10	
Scorepoints	47	184	27	
Av	4,7	11,5	2,7	



Abbildung 32: Durchschnittliche Arrhythmiescorepoints unter einfacher Wertung des jeweils schwerwiegendsten Ereignisses sowie unter Aufsummierung aller aufgetretenen Arrhythmieereignisse



Abbildung 33: Gegenüberstellung der durchschnittlichen Arrhythmiescorepunktezahlen der basalen WT- und KO-Gruppe sowie der mit Eplerenon behandelten KO-Gruppe

Durchschnittliche Punktezahlen der Arryhthmieauswertung. Sowohl bei einzelner Betrachtung des jeweils schwersten Ereignisses je Tier als auch bei Aufsummierung aller Scorepoints je Tier traten bei den basalen KO-Mäusen vermehrt Arrhythmien auf als bei den basalen WT-Mäusen. In der mit Eplerenon behandelten Tiergruppe zeigten sich deutlich weniger Arrhythmien, sowohl bei Betrachtung des jeweils schwersten als auch bei Aufsummierung aller Ereignisse lagen die Scorepoints sogar unter jenen der basalen WT-Gruppe.

3.6 Kollagenbestimmung

Zur Verifizierung der Annahme, dass es bei den KO-Mäusen zu einer verstärkten myokardialen Fibrose kommen könnte, erfolgte die Bestimmung des relativen Kollagengehalts der Herzen. Bei der prozentualen Kollagenbestimmung der myokardialen Schnitte zeigte sich ein erhöhter Kollagengehalt bei den KO-Tieren der unbehandelten Gruppen (0,89±0,08 vs. 6,08±1,19). Nach der Behandlung mit Eplerenon war der mittlere Kollagengehalt der KO-Tiere im Vergleich zur unbehandelten Gruppe deutlich reduziert (1,60±0,30), wenn sich auch im Vergleich mit der basalen WT-Gruppe mit einem p-Wert von 0,03 noch ein signifikanter Unterschied zeigte. In Gegenüberstellung mit der behandelten WT-Gruppe ergaben sich jedoch angesichts der durch die Behandlung ebenfalls reduzierten Kollagenwerte bei den WT-Mäusen erhöhte Werte in der KO-Gruppe. Verglichen mit der basalen KO-Gruppe ist die Veränderung durch die Eplerenon-Behandlung bei den KO-Tieren höchst signifikant (p-Wert 0,0007). Es konnte also eine deutliche Verminderung des Kollagengehalts durch die Behandlung mit dem Aldosteronantagonisten Eplerenon nachgewiesen werden (siehe Tabelle 10 und Abbildung 35).

	WT	КО	WT behandelt	KO behandelt
	unbehandelt	unbehandelt		
Anzahl n	5	5	6	6
Kollagengehalt	0,89±0,08	6,08±1,19	0,35±0,04	1,60±0,30
Av (%)				
p-Werte	Zu KO basal:	Zu KO	Zu KO	Zu WT basal:
	0,0002***	behandelt:	behandelt:	0,03*
		0,0007***	0,0002***	

Tabelle 10: Ergebnisse der prozentualen Kollagenbestimmung in den myokardialen Schnitten von unbehandelten und behandelten WT- und KO-Tieren



Abbildung 34: Exemplarische Darstellung der PSR gefärbten Myokardschnitte zwecks Ermittlung des Kollagengehalts

Kollagenfasern in rot. Vitales Myokard in grün. Deutliche Reduktion des Kollagens bei myokardialen Schnitten von KO-Mäusen nach Eplerenon-Behandlung.



Abbildung 35: Erhöhter Kollagengehalt im Herzen der basalen KO-Gruppe und partielle Reduktion durch Eplerenon Behandlung

Mittels PSR-Färbung ermittelter Kollagengehalt im Myokard der Mäuse zeigte eine starke Erhöhung bei den basalen KO-Tieren. Diese konnte durch die Behandlung mit Eplerenon deutlich reduziert werden. So stellt sich der Unterschied zwischen der basalen WT- und der behandelten KO-Gruppe zwar noch signifikant, jedoch deutlich reduziert dar. Der Unterschied zwischen der basalen und der behandelten KO-Gruppe ist höchst signifikant.

4.1 Kardiologischer Phänotyp der SPRED2-KO-Mäuse und

Risikofaktoren für den plötzlichen Herztod

Ullrich et al. konnten mit ihren Untersuchungen zum Phänotyp der SPRED2-KO-Mäuse ein im Vergleich zu den Wildtypen frühzeitiges Versterben nachweisen. Trotz vielseitiger phänotypischer Auffälligkeiten und eines generell reduzierten Allgemeinzustands konnte die genaue Ursache für den vorzeitigen Tod nicht hinreichend geklärt werden. Jedoch konnten im Rahmen von echokardiografischen und hämodynamischen Untersuchungen Hinweise für eine myokardialen Hypertrophie (siehe Abbildung 5) sowie für ein erhöhtes kardiales Auswurfvolumen (siehe Abbildung 6) mit gesteigerten Druckspitzen gefunden werden [57]. Letzteres scheint zwar im Widerspruch zu der These der sich entwickelnden Herzinsuffizienz bei SPRED2-KO-Mäusen zu stehen, bei welcher man beim Auftreten einer systolischen Herzinsuffizienz eine eher reduzierte Ejektionsfraktion erwarten würde, könnte jedoch Ausdruck der initial noch kompensierten Auswurfverhältnisse sein, welche durch erhöhte intraventrikuläre aufrechterhalten Drücke werden (Heart Failure with Normal/Preserved Ejection Fraction) [230, 231]. Vor dem Hintergrund reduzierter endsystolischer und enddiastolischer Ventrikeldurchmesser, lässt sich jedoch das Vorliegen einer diastolischen Herzinsuffizienz in Betracht ziehen [232].

Somit lagen konkretere und systematische Untersuchungen des kardialen Phänotyps der SPRED2-KO-Tiere nahe. Interessant war hierbei insbesondere die Frage nach dem Vorhandensein von EKG-Auffälligkeiten und nach der Vulnerabilität für Arrhythmien. Des Weiteren erwies sich eine Untersuchung des myokardialen Kollagengehaltes als sinnvoll, da dieser bei pathologischer Erhöhung als ursächlich für Störungen der Reizbildung- und Weiterleitung im Herzen gesehen werden kann. Man spricht hierbei auch von elektrischem Remodeling [233]. Veränderungen der myokardialen Morphologie und Elektrophysiologie sind hierbei die Grundlage für die Entstehung von malignen ventrikulären Rhythmusstörungen. Solche Remodeling-Vorgänge, in deren

Rahmen es zu Dilatation, Hypertrophie und Fibrosierung kommen kann, sind häufig das Ergebnis ischämischer Ereignisse oder erhöhter mechanischer Belastung [233, 234]. Einige Auffälligkeiten im EKG gelten in der Humanmedizin als unabhängige Risikofaktoren für den plötzlichen Herztod. Zu diesen zählen die Verlängerung des QT-Intervalls, pathologische T-Wellen-Veränderungen, verbreiterte QRS-Komplexe sowie das spontane Auftreten von Rhythmusstörungen insbesondere ventrikulären Ursprungs im Langzeit-EKG [235-239]. Auch eine eingeschränkte Herzfrequenzvariabilität als Ausdruck eines geschädigten autonomen Nervensystems kann Hinweis auf ein erhöhtes Risiko für den plötzlichen Herztod sein [240, 241]. Ein weiterer Risikofaktor stellt die linksventrikuläre Dysfunktion mit eingeschränkter Ejektionsfraktion dar, deren Vorliegen sich am besten mit der Echokardiografie verifizieren lässt. Insbesondere das kombinierte Vorliegen dieser mit ventrikulären Arrhythmien zeigt bei Patienten mit abgelaufenem Myokardinfarkt eine besonders schlechte Prognose an [235, 242, 243].

4.2 Hyperaldosteronismus

Eine weitere Feststellung von Ullrich et al. war der signifikante Hyperaldosteronismus am ehesten primären Ursprungs mit nahezu verdoppelten Aldosteronwerten bei den SPRED2-KO-Mäusen. Diese Störung der hormonellen Homöostase scheint die Ursache der Hyperosmolalität, erhöhter NaCl-Serum-Spiegel und eines abnorm gesteigerten Wasserkonsums der Tiere zu sein. Erhöhte Aldosteronspiegel entfalten über eine Retention von Natrium und Wasser sowie die resultierende systemische Hypervolämie indirekte Wirkung auf das Herz.

Im Unterschied zum Hyperaldosteronismus beim Menschen, bei dem es häufig zu Hypokaliämie und arteriellem Hypertonus als Initialsymptome kommt, traten diese bei den SPRED2-KO-Mäusen nicht auf. Eine Erklärung hierfür könnte die pflanzliche Mauskost sein, welche im Gegensatz zu der des Menschen eher natriumarm und kaliumreich ist. Die beim Menschen typischen Konsequenzen des Hyperaldosteronismus wie Bluthochdruck und erhöhte Kaliumwerte könnten hierdurch unterdrückt werden.

Neben der regulierenden Wirkung des Aldosterons auf den Salz- und Wasserhaushalt ist inzwischen auch vieles bekannt über dessen Wirkung auf die Veränderungen in der Gewebestruktur insbesondere von Herz und Nieren. So führt Aldosteron bei erhöhten Werten über schnelle nicht-genomische Wirkung zu Gefäßschäden, Zellhypertrophie sowie einer Dysregulation von Proliferation und Apoptose, zu Fibrose und pathologischen Remodeling-Prozessen [244, 245]. In den Studien von Ullrich et al. konnten bei den SPRED2-KO-Mäusen bereits Nierenpathologien mit Hydronephrose festgestellt werden, welche Ausdruck dieser Gewebeschädigung sein könnten.

Dabei könnten diese Effekte nicht wie lange angenommen nur indirekt durch die volumen- und blutdrucksteigernde Wirkung des Aldosterons zustande kommen, sondern vielmehr einer direkten Wirkung des Mineralkortikoids geschuldet sein.

Lijnen und Petrov wiesen in ihren Untersuchungen ebenfalls die fibroseförderende Wirkung des Aldosterons im Herzen nach. Im Rahmen ihrer Versuche induzierten sie bei Ratten via kontinuierlicher intravenöser Aldosteron-Infusion einen Hyperaldosteronismus, des Weiteren wurden die Tiere einer natriumreichen Diät zugeführt. Interessanterweise kam man beim Vergleich mit einer weiteren Gruppe, in welcher die Tiere über die Nahrung eine begrenzte Natriumzufuhr erfuhren, zu der Erkenntnis, dass die Beeinflussung der kardialen Fibrosierung in Abhängigkeit zu den Natriumspiegeln im Serum steht. Bei den Ratten mit Aldosteron-Infusionen ohne salzreiche Diät konnte keine signifikante Zunahme der Fibrosierung nachgewiesen werden [245]. Auch bei unseren KO-Tieren waren erhöhte Serum-Natrium-Spiegel messbar [57]. Dass Natrium selbst eine direkte Wirkung in Form verstärkter zellulärer Hypertrophie und Fibrosierung im linken Ventrikel, Herzkranzgefäßen und Nieren aufweist, wurde bereits im Rahmen anderer Studien bestätigt [246, 247].

Auch bei der Entstehung der hypertrophen Kardiomyopathie, eine Erkrankung, die durch kardiale Hypertrophie, interstitielle Fibrose und myozytäres "Disarray" charakterisiert ist und die häufigste Ursache für den plötzlichen Herztod bei jungen Menschen darstellt, scheinen erhöhte Aldosteronspiegel eine Rolle zu spielen, wie Studien von Tsybouleva et. aus dem Jahr 2004 zeigten [248].

Generell scheinen kardiovaskuläre Erkrankungen durch die direkte Wirkung des Aldosterons mit verursacht zu werden. Klinische Studien von Milliez et. al. 2005 ergaben, dass Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus aufgrund eines unilateralen Nebennierenrindenadenoms oder einer bilateralen adrenalen Hyperplasie ein deutlich größeres Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen aufweisen als Patienten mit essentieller Hypertonie [249].

Weiterhin konnte in einer Vielzahl von klinischen Studien die aldosteronbedingte Begünstigung von endothelialer Dysfunktion [250], verstärkte Kontraktion in Widerstandsgefäßen [106], proinflammatorische Wirkung auf die Koronargefäße [251] und perivaskuläre Fibrose [251] sowie die Entstehung von ventrikulären Arrhythmien [252] nachgewiesen werden.

4.3 Elektrokardiogramm

Die Herzfrequenz in Ruhe zeigte sich bei den KO-Tieren zwar im Mittel um 27,7 Schläge/Minute erhöht, jedoch lag dies unterhalb des Signifikanzniveaus. Unter pharmakologischem Stress sank der Unterschied auf nur 18,8 Schläge/Minute, wobei bei dieser Untersuchung die mittlere Herzfrequenz der Wildtypen höher war. Bezüglich der Betrachtung von Herzfrequenz in Ruhe und unter Stress ergibt sich somit kein Hinweis auf eine Ungleichheit von hämodynamischer Relevanz. Jedoch zeigte sich bei der elektrokardiografischen Betrachtung der Herzfrequenz bei der KO-Gruppe eine geringere Schwankungsbreite als Antwort auf sympathomimetische Stimulation. Dies Hinweis auf eine eingeschränkte kardiale könnte als Adaptionsund Regulationsfähigkeit der KO-Tiere gewertet werden und lässt sich des Weiteren als Korrelat zu der aus der Humanmedizin bekannten chronotropen Inkompetenz interpretieren. Unter chronotroper Inkompetenz versteht man den inadäquaten Anstieg der Herzfrequenz unter Belastung. Diese auch als bradykarde Belastungsreaktion bezeichnete Insuffizienz kann sowohl bei symptomlosen Patienten als auch bei Patienten mit kardialen Vorerkrankungen als Risikofaktor für das Entstehen einer koronaren Herzerkrankung [253, 254] und einer erhöhten kardialen Mortalität [255-258] gewertet werden. Zugrunde liegt eine verminderte β-adrenerge

Reaktion, darüber hinaus wird sie als dem Sick-Sinus-Syndrom zugehörig diskutiert [259-261]. Zwecks Nachweis der chronotropen Inkompetenz existieren in der Humanmedizin unterschiedliche Formeln und Definitionen. Neben der Berechnung anhand der Herzfrequenz und Sauerstoffaufnahme unter Ruhe und unter Belastung (metabolisch-chronotrope Beziehung) [254, 262] existiert auch die Wertung eines Herzfrequenzanstiegs von unter 40 Prozent der Ruhefrequenz unter Belastung als chronotrope Inkompetenz [258]. Bei der EKG-Auswertung der basalen Tiergruppen zeigte sich unter Isoproterenolgabe ein mittlerer Frequenzanstieg von lediglich 36,3 % bei den KO- im Gegensatz zu 50,6 % bei den WT-Tieren.

Im Gegensatz zur Untersuchung in Ruhe ergaben die Messungen der P-Wellen-Dauer im Stress-EKG signifikante Verlängerungen bei den SPRED2-KO-Mäusen. Dies lässt sich als Hinweis auf eine atriale Leitungsverzögerung bei den KO-Tieren werten.

Auch die Länge des PQ-Intervalls zeigte lediglich unter Stressbedingungen eine signifikante Verlängerung bei den KO-Tieren. Dieser Abschnitt bildet die atrioventrikuläre Überleitungszeit ab. Eine Verlängerung in diesem Bereich wird bei Fehlen sonstiger Normabweichungen als AV-Block 1. Grades bezeichnet. In der Humanmedizin wird diesem keine relevante klinische Bedeutung beigemessen. Allerdings wurde der benigne Charakter des AV-Blocks 1. Grades in einer Studie aus dem Jahr 2009 in Frage gestellt, welche ein verlängertes PQ-Intervall in Zusammenhang stehend mit einem erhöhten Risiko für Vorhofflimmern, Schrittmacherimplantation und einer erhöhten Mortalität ergab [263].

Die QRS-Dauer war sowohl im Ruhe- als auch im Stress-EKG bei den KO-Mäusen im signifikanten Maße verlängert. Eine Verlängerung dieses Intervalls als Ausdruck der Ventrikelerregung wird in der Humanmedizin als u.a. als Schenkelblock gewertet und gilt als unabhängiger Prädiktor für den plötzlichen Herztod. Eine im Jahre 2008 in Chicago durchgeführte Studie mit 2962 Teilnehmern ergab, dass eine Verlängerung des QRS-Intervalls über das physiologische Maß hinaus bei Patienten mit Herzinsuffizienz eine signifikante Steigerung der Mortalität zur Folge hat [264]. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass sich die exakte Bestimmung des QRS-

Intervalls im Maus-EKG schwierig darstellt und gewissen Unsicherheiten unterworfen ist.

Die QT+-Dauer bei den KO-Mäusen zeigte sich in Ruhe hochsignifikant, unter Stress signifikant erhöht. Dem gegenüber steht jedoch keine Abweichung der QT-Intervalle. Die Aussagekraft dieser Divergenz erscheint somit fraglich, insbesondere da sich auch bei den frequenzkorrigierten Berechnungsmethoden der QT-Zeiten keine signifikanten Unterschiede ergaben. Im Generellen gilt eine verlängerte QT-Zeit als Risikofaktor für erhöhte Mortalität sowie für das Auftreten von malignen Arrhythmien und des plötzlichen Herztods [265, 266]. Das QT-Intervall entspricht der gesamten intraventrikulären Erregungsdauer. Physiologischerweise sinkt sie mit zunehmender Herzfrequenz. Eine präzise Bestimmung der QT-Dauer im murinen EKG bleibt jedoch komplex und weist ein gewisses Fehlerrisiko auf [192].

Verglich man nun diese veränderten Parameter der basalen Tiergruppen mit jenen der mit Eplerenon behandelten Tiere, ergab sich keine fortbestehende Divergenz zwischen den WT- und den KO-Tieren bezüglich der PQ-Zeit. Die Werte der behandelten KO-Mäuse glichen sich sogar denen der basalen WT-Tiere an. Gesetzt den Fall, dass die basalen Wildtypen den physiologischen Normalfall repräsentieren, kann man also von einer Korrektur der pathologischen PQ-Verlängerung bei den SPRED2-KO-Mäusen durch Behandlung mit einem Aldosteronantagonisten sprechen. Plausibel erscheint diese Feststellung vor dem Hintergrund, dass eine Vielzahl von erworbenen atrioventrikulären Überleitungsstörungen einer chronisch-degenerativen Veränderung der myokardialen Strukturen mit konsekutiver Fibrosierung geschuldet ist. Eplerenon, dessen positive Beeinflussung des kardialen Remodelings unter anderem über Verbesserung der Endothelfunktion und Förderung der Infarktheilung durch mehrere Studien gesichert wurde [267, 268], scheint durch Reduktion der kardialen Fibrose dieser Leitungsverzögerung entgegenzuwirken.

Ähnlich scheint es sich auch mit der ventrikulären Reizüberleitung zu verhalten. Zeigten sich bei den basalen EKG-Untersuchungen noch verlängerte QRS-Komplexe bei den KO-Tieren, waren diese Unterschiede bei den mit Eplerenon behandelten Tieren deutlich reduziert und fielen im Vergleich mit den behandelten Wildtypen sogar

unterhalb des Signifikanz-Niveaus. Der direkte Vergleich der behandelten KO-Werte mit den basalen Wildtypen als Referenzwert zeigte eine deutliche Annäherung der QRS-Dauern, wenn auch der Unterschied sich in Ruhe immer noch signifikant darstellte. Dass Fibrosierungsumbauten insbesondere auch zu einer ventrikulären Leitungsverzögerung und -störung führen können, erscheint hinreichend erwiesen [269, 270]. Auch hier lässt sich eine positive Beeinflussung derartiger struktureller Veränderung durch Eplerenon annehmen.

4.4 Arrhythmien im EKG

Mit der Modifikation eines Scoresystems wurde der Versuch unternommen, eine möglichst objektive Quantifizierung der Herzrhythmusstörungen zu ermöglichen. Bei beiden basalen Tiergruppen traten im Verlauf der elektrokardiografischen Untersuchungen Arrhythmieereignisse auf. Jedoch war dies sowohl bezüglich der Anzahl als auch des Schweregrads bei den Knockout-Mäusen ungleich häufiger der Fall. Hierbei waren sowohl supraventrikuläre als auch ventrikuläre Arrhythmien feststellbar. Ventrikuläre Extrasystolen machten hierbei einen großen Anteil aus, doch auch Vorhofflimmern und AV-Blockierungen konnten beobachtet werden. Interessant war der Vergleich mit der mit Eplerenon behandelten KO-Gruppe, da hierbei deutlich weniger arrhythmische Ereignisse auftraten, als bei der basalen KO-Gruppe. Die Scorepoints-Anzahl war nahezu vollständig an jene der basalen WT-Tiergruppe angepasst. Diese Beobachtung lässt zu dem Schluss kommen, dass die elektrophysiologischen Veränderungen die beim SPRED2-KO-Mausmodell zu einer deutlich erhöhten Vulnerabilität für Herzrhythmusstörungen führen, durch die Behandlung mit einem Aldosteronantagonisten günstig beeinflusst werden können.

Wenn auch der genaue Pathomechanismus bislang nicht gänzlich geklärt ist, scheint die Einflussnahme von Aldosteron auf die Entstehung von elektrischem Remodeling und damit von Herzrhythmusstörungen gesichert. So führt eine Überexpression des MR im Mausmodell zu bedrohlichen Arrhythmien [271] und in vitro konnte eine durch Aldosteron bedingte Verlängerung der Repolarisationsdauer in Kardiomyozyten beobachtet werden [272]. Auch beim Menschen konnte bei Patienten mit chronischer

Herzinsuffizienz eine Verbesserung von kardiologischen Parametern wie QT-Dispersion und Herzfrequenzvariabilität durch die Behandlung mit einem Aldosteronantagonisten festgestellt werden [273]. Derartige Parameter stehen in der Diskussion, bei pathologischer Veränderung als Indikatoren für das Auftreten von Herzrhythmusstörungen und plötzlichem Herztod dienen zu können [274, 275].

Der Zusammenhang zwischen kardialer (links-)ventrikulärer Hypertrophie und der Inzidenz von supraventrikulären und ventrikulären Herzrhythmusstörungen ist nicht zuletzt durch die Feststellung gesichert, dass solche Arrhythmien bei Hypertonikern mit Linksherzhypertrophie zehnmal häufiger auftreten [276]. Die Rolle der Fibrosierung bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen sowie die positive Beeinflussung dieser durch Aldosteronblockade ist sowohl am Menschen [277], als auch im Tiermodell[278] nachgewiesen. Schließlich sind es wie bereits in der Einleitung erläutert insbesondere chronische und akute Arrhythmieereignisse, welche – häufig auf dem Boden einer strukturellen Herzerkrankung - die häufigste Ursache für den plötzlichen Herztod darstellen [279, 280].

Es bleibt jedoch einzuräumen, dass sich die Erstellung eines möglichst objektiven Arrhythmie-Scores keineswegs einfach gestaltet. Schwierig erschien zum Beispiel die Gewichtung einzelner Arrhythmie-Typen nach ihrer tatsächlichen klinischen Bedeutung. Eine abschließende und einheitliche Beurteilung der Herzrhythmusstörungen in ihrer Rolle für das Überleben des Patienten sucht man in der Literatur vergebens. Angesichts des Zustandekommens der Score-Punktzahlen als Aufsummierung von Einzelereignissen, erschien auch das Anwenden einer statistischen Auswertung zur Bestimmung von Signifikanzen nicht sinnvoll.

Da die elektrokardiografische Untersuchung immer nur einen kurzen Überwachungszeitraum abbildet, welcher dann repräsentativ für einen längeren Zeitraum gesehen werden muss, könnte es sinnvoll sein, in Zukunft Langzeit-EKG-Untersuchungen via Telemetrie durchzuführen. So wäre eine umfassendere Detektion von intermittierenden Arrhythmie-Ereignissen auch unter physiologischen Ruhebedingungen gewährleistet.

4.5 Elektrophysiologie

Die EPU ist eine hervorragende invasive Methode zur Detektion einer besonderen Vulnerabilität für Herzrhythmusstörungen und zur Untersuchung der elektrischen Reizbildung- und -leitung im Herzen.

Parameter, welche eine Aussage über die Sinusknotenfunktion sowie die atrioventrikuläre Überleitung ermöglichen, fielen bei den Untersuchungen unauffällig aus. So zeigten sich die Sinusknotenerholzeiten unterschiedlicher Zykluslängen nicht verlängert und auch die Bestimmung des Wenckebachpunktes zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der WT- und KO-Gruppe. Es ergab sich bei dieser Untersuchung somit kein Anhalt für eine relevante Dysfunktion im Bereich von Sinusoder AV-Knoten.

Der zweite Teil der elektrophysiologischen Untersuchung stellt den Versuch dar, durch festgelegte Stimulationsprotokolle das Auftreten von Herzrhythmusstörungen zu provozieren. Die Auswertung erfolgte analog zur Arrhythmieauswertung bei der elektrokardiografischen Untersuchung mit Hilfe des modifizierten Scores. Hierbei ergaben sich wie auch bei den Ergebnissen im EKG deutlich erhöhte Score-Punktezahlen bei den basalen KO-Tieren. Ventrikuläre Extrasystolen stellten auch hier den Großteil der aufgetretenen arrhythmischen Ereignisse dar. Darüber hinaus traten AV-Blockierungen, intermittierende Sinusarrhythmien und Vorhofflimmern auf. Die mit Eplerenon behandelte SPRED2-KO-Tiergruppe zeigte zum Vergleich mit den basalen KO-Tieren deutlich weniger Arrhythmien und fiel bezüglich der Scorepoints sogar unter die Werte der basalen WT. Analog zu den bei der EKG-Auswertung gewonnenen Eindrücken lässt sich also die Vermutung aufstellen, dass Eplerenon eine günstige Beeinflussung der spontanen und induzierbaren Arrhythmieneigung aufweist. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen aus anderen Studien, die eine Reduktion der altersbedingten kardialen Fibrose und damit assoziierten Arrythmieneigung durch die medikamentöse Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bei der Maus [281] und eine Fibrose- und Arrhythmieverringerung bei hypertensiven Ratten durch Gabe eines ACE-Hemmers [282] nachweisen konnten.

4.6 Narkosebedingte Beeinflussung

Das Inhalationsnarkotikum Isofluran bietet als volatiles Anästhetikum aufgrund seiner geringen Löslichkeit die Vorteile eines raschen An- und Abflutens [283, 284]. Darüber hinaus unterliegt Isofluran nahezu keiner Metabolisierung [285, 286] und die Narkoseeinleitung gestaltet sich die für die Tiere deutlich stressfreier und unkomplizierter als die Injektionsnarkose. Es ist keine arrhythmogene oder kardiodepressive Wirkung des Isoflurans bekannt [283, 285]. Jedoch führt über es eine Vasodilatation dosisabhängig zum Blutdruckabfall und Herzfrequenzanstieg [287-292]. Aufgrund dieser Kompensation kommt es nicht zu einem reduzierten Herzzeitvolumen. Es ist nicht davon auszugehen, dass es durch die Narkotisierung der Versuchstiere mit Isofluran zu einer stärkeren Beeinflussung der erhobenen Parameter gekommen ist.

Die kardiodepressive Wirkung des intraperitoneal verabreichten Avertins (Tribromoethanol) im Rahmen der EKG-Untersuchungen ist ebenfalls begrenzt. Zwar führt die Verabreichung von Avertin zu einer gewissen Senkung des Blutdrucks und der Herzfrequenz [293, 294], jedoch liegt die Beeinflussung der Herz- Kreislaufparameter deutlich unter der anderer Narkotika wie zum Beispiel Pentobarbital oder Ketamin/Xylazin [295].

In Zukunft könnten vergleichende Untersuchungen mit unterschiedlichen Narkotika sinnvoll sein, um eine Beeinflussung der EKG-Parameter durch das jeweilige Narkosemedikament detektieren zu können.

4.7 Kollagenbestimmung

Zwecks Analyse des Kollagengehalts im Myokard wurde die Pikro-Sirius-Rot-Färbung als geeignete Methode zur Verwendung von Fluoreszenzmikroskopie zur Sichtbarmachung der kollagenen Matrix verwendet.

Während der Kollagengehalt im Myokard der KO-Tiere vor Behandlung mit Eplerenon im Vergleich mit den WT-Tieren noch signifikant erhöht war, war dieser Unterschied bei der behandelten Tiergruppe nahezu aufgehoben.

Bereits in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass eine medikamentöse Blockade des RAAS durch Gabe von Aldosteronantagonisten, ACE-Hemmern oder AT₁-Blockern eine die Fibrosierung antagonisierende Wirkung aufweist [281, 296-299].

So ergab eine von Brilla et al. durchgeführte Untersuchung an Patienten mit myokardialer Fibrose aufgrund einer hypertensiven Herzerkrankung einen Rückgang der Fibrose sowie eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion durch Behandlung mit dem ACE-Hemmer Lisinopril [296]. Die Behandlung mit Losartan führte in einer von Diez et al. durchgeführten Studie bei Patienten mit essentieller Hypertonie und myokardialer Versteifung auf dem Boden einer Fibrose zu einem Rückgang des myokardialen Kollagengehalts [298].

Doch auch in anderen Organen, wie Niere, und Leber konnte ein Zusammenhang zwischen einer Aktivierung des RAAS und der Entstehung beziehungsweise dem Fortschreiten von Fibrose gefunden werden. So zeigten experimentelle Studien von Mezzano et al. dass das Entstehen einer Nierenfibrose bei chronischen Nierenerkrankungen sehr effektiv durch eine medikamentöse Blockade des RAAS kontrolliert werden kann [300]. Eine mit Ratten durchgeführte australische Studie aus dem Jahr 2001 bestätigte die Wirksamkeit von Captopril bei Leberfibrose. Bei den Tieren wurde zunächst mittels Ligatur künstlich eine Cholestasesituation hergestellt, in deren Folge die Fibrosierung der Leber einsetzt. Das Fortschreiten der Fibrosierung konnte durch die Behandlung mit dem ACE-Hemmer deutlich reduziert werden [301]. Auch am Menschen konnte die Rolle von AT₂ und des RAAS bei der Entstehung von chronischen Lebererkrankungen mit konsekutiver Leberfibrosierung bestätigt werden [302].

4.8 Mausmodell

Feststellungen, die im Rahmen von Tierversuchen erhoben wurden, können immer nur unter Vorbehalt und in eingeschränkter Form auf den Menschen übertragen werden. Trotz der strukturellen und anatomischen Ähnlichkeiten der Herzen innerhalb der Gruppe der Säugetiere, gibt es morphologische Unterschiede zwischen murinem und menschlichem Herz, welche bei der Interpretation von am Mausmodell erhobenen

Ergebnissen nicht außer Acht gelassen werden sollten. Anatomische Unterschiede betreffen zum Beispiel die Vorhöfe und das venöse System des Herzens. So weist die Maus eine eigenständige Mündung der Vena cava superior sinistra in das rechte Atrium auf und in den linken Vorhof der Maus mündet im Gegensatz zum Menschen nur eine Pulmonalvene. Es besteht keine Ausbildung eines zweiten Vorhofseptums. Auch das Reizbildungs- und -leitungssystem weist Unterschiede zum Menschen auf. So weist der Sinusknoten eine leicht abweichende Lokalisation auf und ist bei der Maus in der Vena cava superior oberhalb deren Mündung in den rechten Vorhof zu finden. Die Anatomie der Koronararterien ähnelt bei der Maus dagegen der des Menschen stark [303, 304].

Auch mit elektrokardiografischen Untersuchungen erhobene Beobachtungen bedürfen einer differenzierten Interpretation. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, existieren zwischen dem menschlichen und dem murinen EKG gewisse morphologische Unterschiede, welche wiederum Verschiedenheiten in der Elektrophysiologie geschuldet sind. Dies kann zum Teil erhebliche Interpretationsschwierigkeiten bedingen. So kann eine Verlängerung des QRS-Intervalls bei der Maus sowohl Ausdruck einer verzögerten Reizweiterleitung als auch einer verlangsamten Erregungsrückbildung sein. Im Gegensatz hierzu ist die Erregungsausbreitung über die Ventrikel beim Menschen klar dem QRS-Intervall zugerechnet, während es im Rahmen der Repolarisation in den Herzkammern zur Entstehung der T-Welle kommt. Des Weiteren ist eine genaue Abgrenzung der verschiedenen EKG-Abschnitte im murinen EKG nicht trivial. Wo genau Anfang und wo Ende einer T-Welle zu finden sind, ist im Einzelnen nicht immer leicht zu sagen.

Es ist zu vermuten, dass das Ausschalten lediglich eines SPRED-Gens zur Kompensation des Phänotyps durch die anderen SPRED-Isoformen führt. Vor diesem Hintergrund erscheint das Generieren von SPRED1/2-Doppel-Knockout- oder sogar SPRED1/2/3-Triple-KO-Modellen sinnvoll, um die vollständigen physiologischen Funktionen von SPRED erforschen zu können. Jedoch präsentierten sich die von Taniguchi et al. 2007 generierten Doppel-KO-Mäuse mit Spred1- und Spred2-Deletion embryoletal [305] womit diese Tiere nicht lange genug leben, um entsprechende Untersuchungen

durchführen zu können. Interessant wäre in diesem Kontext die Verwendung von konditionalen KO-Mäusen, bei welchen die Induktion der Defizienz eines Gens in zeitlicher und lokaler Begrenzung möglich ist. Ein Phänotyp, der primär embryonale Letalität aufweist, kann hierüber der Analyse an der adulten Maus zugeführt werden.

4.9 Gesamtbewertung

Der Verdacht, dass SPRED2-Defizienz den kardialen Phänotyp bei Mäusen beeinflusst, ließ sich in unseren Versuchen und in Zusammenschau der mit im Rahmen der vorherigen Untersuchungen gewonnen Daten erhärten. Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Auswirkungen der SPRED2-Defizienz auf die Herzfunktion durch eine Behandlung mit Eplerenon nur partiell kompensiert werden konnte. Während insbesondere die Arrhythmieneigung sowohl in EKG als auch EPU, sowie der Kollagengehalt mittels PSR-Färbung nach Eplerenonbehandlung deutlich reduziert waren, zeigten einige in der basalen Gruppe auffälligen EKG-Parameter keine oder nur schwache Beeinflussung durch die Behandlung mit Eplerenon (siehe Abbildung 36).

Interessant wäre nun noch die Bestimmung der Überlebenszeit der mit Eplerenon behandelten SPRED2-KO-Mäuse mit der Fragestellung, ob diese im Vergleich mit der basalen KO-Tiergruppe signifikant verlängert ist und die Behandlung mit dem Aldosteronantagonisten somit einen positiven Effekt auf die Mortalität aufweist.

Studien in der Humanmedizin ergaben, dass eine medikamentöse Beeinflussung des RAAS bei kardialer Vorerkrankung einen Benefit für die Patienten hinsichtlich des Überlebens erbringt. So wurde im Rahmen der RALES-Studie (Randomized Aldactone Evaluation Study) belegt, dass eine zusätzlich zur Basisbehandlung durchgeführte Therapie mit niedrigdosiertem Spironolacton bei Herzinsuffizienz zu einer signifikant geringeren Sterblichkeit führt [306]. Die EPHESUS-Studie zeigte eine signifikante Reduktion der Mortalität durch Gabe von Eplerenon im Vergleich mit der Placebogruppe bei Patienten mit linksventrikulärer Funktionseinschränkung nach Myokardinfarkt [307]. Darüber hinaus wurde bereits Anfang der 1990er Jahre mit Veröffentlichung der CONSENSUS- und SOLVD-Studien der therapeutische Nutzen

einer Suppression von Angiotensin II durch Einsatz von ACE-Hemmer bei Herzinsuffizienz deutlich [120, 308].

Forschung am Tier im Rahmen der Grundlagenforschung wird immer mit dem Ziel durchgeführt, die gewonnenen Ergebnisse langfristig auf den Menschen übertragen zu können, um somit Krankheiten besser verstehen und geeignete Therapien schaffen zu können. So wurde die Mutation des SPRED1-Gens im Menschen als Ursache für das Legius-Syndrom festgestellt und es liegt der Verdacht nahe, dass auch Mutationen des humanen SPRED2-Gens zu Rasopathie-ähnlichen Erkrankungen führen. Bisherige genetische Untersuchungen von Patienten mit typischer Rasopathie-ähnlicher Klinik ergaben bislang keinen Hinweis auf eine SPRED2-Defizienz. Die Kooperation mit humangenetischen Zentren sollte weiterhin angestrebt werden, um die Untersuchung größerer Fallzahlen und damit eine Klärung der Rolle von SPRED2 für den Menschen verwirklichen zu können.



Abbildung 36: Zusammenfassung der Ergebnisse

Darstellung der signifikant unterschiedlichen Ergebnisse ohne Behandlung und der jeweiligen Ergebnisse nach Behandlung mit Eplerenon. Basal signifikant unterschiedliche Ergebnisse ergaben sich bei den EKG-Untersuchungen bezüglich Ruhe-QRS, Ruhe-QT sowie Stress-PQ, Stress-PDur und Stress-QRS, die im EKG und in der EPU aufgetretenen Arrhythmien, sowie die Bestimmung des Kollagengehalts. Diese Unterschiede konnten durch die Behandlung mit Eplerenon bei der PQ-Zeit unter Stress, der im EKG und der EPU bestimmten Arrhythmieschwere und beim Kollagengehalt aufgehoben oder unter Signifikanzniveau gesenkt werden. (Rot = signifikanter Unterschied, grün = kein signifikanter Unterschied)
5 Zusammenfassung

SPRED2 ist ein Inhibitor des Ras/ERK-MAPK-Signalwegs. Um die Folgen einer SPRED2-Defizienz zu erforschen, wurden im Rahmen vorheriger von Ullrich et al. durchgeführter Untersuchungen mittels Gene-Trap-Methode bereits mannigfaltige Auffälligkeiten im Phänotyp der SPRED2-Mäuse festgestellt. So zeigten die Tiere einen Hypochondroplasie-ähnlichen Zwergenwuchs, Verhaltensauffälligkeiten, einen krankhaft gesteigerten Wasserkonsum und nicht zuletzt eine deutlich reduzierte Lebenserwartung im Vergleich mit den WT-Tieren. Des Weiteren fielen erhöhte Aldosteronspiegel auf, die bei näheren Untersuchungen nicht einer erhöhten Aktivität des RAAS geschuldet zu sein schienen. Vielmehr zeigte sich eine deutlich erhöhte Aldosteron-Synthase-Expression in der Nebennierenrinde. Erste Hinweise darauf, dass die SPRED2-Defizienz auch Auswirkungen auf den kardiologischen Phänotyp haben könnte, ergaben sich bereits bei initialen Untersuchungen von Ullrich et al. So konnte bei den SPRED2-KO-Tieren neben hämodynamischer Auffälligkeiten eine gesteigerte Herz-Körpergewicht-Ratio festgestellt werden.

Die im Rahmen dieses Folgeprojekts durchgeführten Untersuchungen sollten die Frage klären, ob die Defizienz des SPRED2-Gens Auswirkungen auf die Herzleistung hat und hierüber die verkürzte Lebenserwartung der KO-Tiere verschulden könnte. Hierfür wurden zunächst Untersuchungen der elektrischen kardialen Aktivität mittels EKG und Elektrophysiologischer Untersuchung durchgeführt. Die Ermittlung von Herzrhythmusstörung und die Quantifizierung derselben spielte hierbei eine besondere Rolle. Des Weiteren sollte mit der Durchführung von PSR-Färbungen zur Bestimmung des kardialen Kollagengehaltes histologischen Fragestellungen Rechnung getragen werden.

Aufgrund des bereits aus den vorherigen Studien bekannten Hyperaldosteronismus der KO-Tiere stellte sich darüber hinaus die Frage, ob die im Rahmen der Studie feststellbaren kardiologischen Auffälligkeiten als Konsequenz der gesteigerten Aldosteronwerte, oder aber als direkte Folge des Genotyps gewertet werden müssen. Aus diesem Grund wurden alle oben genannten Untersuchungen mit Tieren, welche

Zusammenfassung

einer Behandlung mit dem Aldosteronantagonisten Eplerenon zugeführt worden waren, wiederholt.

Bei der Auswertung der basalen Ruhe- und Stress-EKGs zeigten sich einige Parameter bei den KO-Tieren pathologisch verändert. So war das QRS-Intervall, als Korrelat zur intraventrikulären Überleitungszeit, bei den KO-Mäusen verlängert, im Stress-EKG waren darüber hinaus sowohl die Dauer der P-Welle als auch des PQ-Intervalls erhöht. Durch die Behandlung mit Aldosteron waren diese Unterschiede zwischen WT- und KO-Gruppe teilweise nicht mehr feststellbar. Das die atrioventrikuläre Überleitungszeit abbildende PQ-Intervall war sowohl im Vergleich mit dem behandelten WT, als auch mit dem unbehandelten WT nicht mehr signifikant erhöht. Auch die Länge des QRS-Komplexes näherte sich unter Eplerenon-Behandlung dem der unbehandelten WT-Tiere an und sank bei der Stress-EKG-Auswertung sogar unterhalb des Signifkanzniveaus.

Bei der EKG-Analyse in Bezug auf Arrhythmien ergab sich bei Gegenüberstellung der basalen WT- und KO-Gruppe eine deutlich gesteigerte Vulnerabilität für Herzrhythmusstörungen bei den KO-Tieren. Durch die Behandlung mit Eplerenon konnte hierbei ein deutlicher Erfolg erzielt werden mit signifikanter Reduktion der Arrhythmieereignisse.

Die elektrophysiologische Untersuchung ergab neben unauffälligen Parametern der Funktion des Sinusknotens und der AV-Überleitung ebenfalls Hinweise für eine gesteigerte Empfindlichkeit für Arrhythmien. Die durch EPU induzierten Arrhythmien zeigten sich durch Eplerenon-Behandlung gleichermaßen rückgängig.

Mittels Kollagenfärbung konnte der initiale Verdacht, dass die SPRED2-KO-Tiere zu einer vermehrten kardialen Fibrosierung neigen, bestätigt werden. Dabei zeigte sich durch die Behandlung mit Eplerenon eine deutliche Beeinflussung und Reduktion des kardialen Kollagengehaltes.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die mannigfaltigen phänotypischen Effekte, die die SPRED2-Defizienz bedingt, nur teilweise dem Hyperaldosteronismus der Tiere geschuldet sind und durch therapeutische Einflussnahme auf diesen auch nur partiell kompensiert werden können.

6 Literaturverzeichnis

1. Plotnikov, A., et al., The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(9): p. 1619-33.

2. Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb, Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3100-12.

3. Chang, L. and M. Karin, Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.

4. Yang, S.H., A.D. Sharrocks, and A.J. Whitmarsh, MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. Gene, 2013. **513**(1): p. 1-13.

5. Coulombe, P. and S. Meloche, Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1376-87.

6. Seger, R. and E.G. Krebs, The MAPK signaling cascade. Faseb J, 1995. **9**(9): p. 726-35.

7. Garnett, M.J. and R. Marais, Guilty as charged. Cancer Cell. **6**(4): p. 313-319.

8. Santarpia, L., S.M. Lippman, and A.K. El-Naggar, Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. Expert Opin Ther Targets, 2012. **16**(1): p. 103-19.

Schlessinger, J., Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell, 2000. 103(2): p. 211-225.

10. Alberts B, J.A., Lewis J, et al., Signaling through Enzyme-Linked Cell-Surface Receptors. 4 ed. Molecular Biology of the Cell. 2002, New York: Garland Science.

Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, Cell signaling by receptor tyrosine kinases.
 Cell, 2010. 141(7): p. 1117-34.

12. Ullrich, A. and J. Schlessinger, Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell, 1990. **61**(2): p. 203-12.

13. Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn, Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv Cancer Res, 1998. **74**: p. 49-139.

14. Davies, H., et al., Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature, 2002.417(6892): p. 949-54.

15. Dhillon, A.S., et al., MAP kinase signalling pathways in cancer. Oncogene, 2007.26(22): p. 3279-90.

16. Hilger, R.A., M.E. Scheulen, and D. Strumberg, The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. Onkologie, 2002. **25**(6): p. 511-8.

17. Malumbres, M. and M. Barbacid, RAS oncogenes: the first 30 years. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 459-65.

18. Montagut, C. and J. Settleman, Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. Cancer Lett, 2009. **283**(2): p. 125-34.

19. Zenker, M., Clinical manifestations of mutations in RAS and related intracellular signal transduction factors. Current opinion in pediatrics, 2011. **23**(4): p. 443-451.

20. Shaw, A.C., et al., The natural history of Noonan syndrome: a long-term followup study. Arch Dis Child, 2007. **92**(2): p. 128-32.

21. Binder, G., Noonan syndrome, the Ras–MAPK signalling pathway and short stature. Hormone Research in Paediatrics, 2009. **71**(Suppl. 2): p. 64-70.

22. Tartaglia, M., B.D. Gelb, and M. Zenker, Noonan syndrome and clinically related disorders. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 2011. **25**(1): p. 161-179.

23. Hennekam, R.C., Costello syndrome: an overview. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2003. **117C**(1): p. 42-8.

24. Tidyman, W.E. and K.A. Rauen, The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. Curr Opin Genet Dev, 2009. **19**(3): p. 230-6.

25. Arteaga, C.L., The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. J Clin Oncol, 2001. **19**(18 Suppl): p. 32S-40S.

26. Ciardiello, F., et al., Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 2053-63.

27. Bundschu, K., U. Walter, and K. Schuh, Getting a first clue about SPRED functions. Bioessays, 2007. **29**(9): p. 897-907.

28. Wakioka, T., et al., Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. Nature, 2001. **412**(6847): p. 647-51.

29. Kato, R., et al., Molecular cloning of mammalian Spred-3 which suppresses tyrosine kinase-mediated Erk activation. Biochemical and biophysical research communications, 2003. **302**(4): p. 767-772.

30. Sivak, J.M., L.F. Petersen, and E. Amaya, FGF signal interpretation is directed by Sprouty and Spred proteins during mesoderm formation. Developmental cell, 2005. **8**(5): p. 689-701.

31. Bundschu, K., Generation and Characterization of Spred-2 Knockout Mice. 2005, Julius-Maximilians-Unuversitaet: Wuerzburg.

32. Ball, L.J., et al., EVH1 domains: structure, function and interactions. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 45-52.

33. King, J.A., et al., Distinct requirements for the Sprouty domain for functional activity of Spred proteins. Biochem J, 2005. **388**(Pt 2): p. 445-54.

34. Kato, R., et al., Molecular cloning of mammalian Spred-3 which suppresses tyrosine kinase-mediated Erk activation. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(4): p. 767-72.

35. de Maximy, A.A., et al., Cloning and expression pattern of a mouse homologue of drosophila sprouty in the mouse embryo. Mech Dev, 1999. **81**(1-2): p. 213-6.

36. Casci, T., J. Vinos, and M. Freeman, Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. Cell, 1999. **96**(5): p. 655-65.

37. Nobuhisa, I., et al., Spred-2 suppresses aorta-gonad-mesonephros hematopoiesis by inhibiting MAP kinase activation. J Exp Med, 2004. **199**(5): p. 737-42.

38. Sasaki, A., et al., Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p. 427-32.

39. Tuduce, I.L., K. Schuh, and K. Bundschu, Spred2 expression during mouse development. Dev Dyn, 2010. **239**(11): p. 3072-85.

40. Engelhardt, C.M., Identification and Characterization of the SPRED Protein Family. 2004, Julius-Maximilians-Universitaet: Wuerzburg.

41. Bundschu, K., et al., Tissue-specific Spred-2 promoter activity characterized by a gene trap approach. Gene Expr Patterns, 2006. **6**(3): p. 247-55.

42. Engelhardt, C.M., et al., Expression and subcellular localization of Spred proteins in mouse and human tissues. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(6): p. 527-38.

43. Bundschu, K., et al., Gene disruption of Spred-2 causes dwarfism. J Biol Chem,2005. 280(31): p. 28572-80.

44. Nonami, A., et al., Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in hematopoietic cells. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52543-51.

45. Inoue, H., et al., Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness. The Journal of experimental medicine, 2005. **201**(1): p. 73-82.

46. Phoenix, T.N. and S. Temple, Spred1, a negative regulator of Ras-MAPK-ERK, is enriched in CNS germinal zones, dampens NSC proliferation, and maintains ventricular zone structure. Genes Dev, 2010. **24**(1): p. 45-56.

47. Miyoshi, K., et al., The Sprouty-related protein, Spred, inhibits cell motility, metastasis, and Rho-mediated actin reorganization. Oncogene, 2004. **23**(33): p. 5567-5576.

48. Fong, C.W., et al., Sprouty 2, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma. Cancer research, 2006. **66**(4): p. 2048-2058.

49. Kwabi-Addo, B., M. Ozen, and M. Ittmann, The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. Endocrine-related cancer, 2004. **11**(4): p. 709-724.

50. Lo, T.L., et al., The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer. Cancer research, 2004. **64**(17): p. 6127-6136.

51. McKie, A.B., et al., Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer. Oncogene, 2005. **24**(13): p. 2166-2174.

52. Tsavachidou, D., et al., SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signalregulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant. Cancer research, 2004. **64**(16): p. 5556-5559.

53. Wang, J., et al., Sprouty4, a suppressor of tumor cell motility, is downregulated by DNA methylation in human prostate cancer. The Prostate, 2006. **66**(6): p. 613-624.

54. Brems, H., et al., Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. Nat Genet, 2007. **39**(9): p. 1120-6.

55. Yoshida, T., et al., Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. Oncogene, 2006. **25**(45): p. 6056-6066.

56. Ullrich, M., et al., Identification of SPRED2 (Sprouty-related Protein with EVH1 Domain 2) as a Negative Regulator of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. J Biol Chem, 2011. **286**(11): p. 9477-88.

57. Ullrich, M., Identification of SPRED2 as a Novel Regulator of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity and of Body Homeostasis, in Physiologisches Institut. 2014, Julius-Maximilians-Universität Würzburg: Würzburg. p. 225.

58. Lander, E.S., et al., Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.

59. Venter, J.C., et al., The sequence of the human genome. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304.

60. Waterston, R.H., E.S. Lander, and J.E. Sulston, On the sequencing of the human genome. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3712-6.

61. Waterston, R.H., et al., Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature, 2002. **420**(6915): p. 520-62.

62. Doetschman, T., et al., Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. Nature, 1987. **330**(6148): p. 576-8.

63. Thomas, K.R. and M.R. Capecchi, Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell, 1987. **51**(3): p. 503-12.

64. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.

65. Martin, G.R., Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7634-8.

66. Chen, W.V., et al., Identification and validation of PDGF transcriptional targets by microarray-coupled gene-trap mutagenesis. Nature genetics, 2004. **36**(3): p. 304-312.

67. Skarnes, W.C., et al., A public gene trap resource for mouse functional genomics. Nature genetics, 2004. **36**(6): p. 543.

68. Stanford, W.L., J.B. Cohn, and S.P. Cordes, Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. Nature reviews genetics, 2001. **2**(10): p. 756-768.

69. Zambrowicz, B.P., et al., Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(24): p. 14109-14114.

70. Ullrich, M. and K. Schuh, Gene trap: knockout on the fast lane, in Transgenesis Techniques. 2009, Springer. p. 145-159.

71. White, P.C., Mechanisms of Disease - Disorders of Aldosterone Biosynthesis and Action. New England Journal of Medicine, 1994. **331**(4): p. 250-258.

72. Blaine, E.H. and J.O. Davis, Evidence for a renal vascular mechanism in renin release: new observations with graded stimulation by aortic constriction. Circ Res, 1971. **28**(5): p. Suppl 2:118-26.

73. Blaine, E.H., J.O. Davis, and R.L. Prewitt, Evidence for a renal vascular receptor in control of renin secretion. Am J Physiol, 1971. **220**(6): p. 1593-7.

74. Skott, O. and R. Taugner, Effects of extracellular osmolality on renin release and on the ultrastructure of the juxtaglomerular epithelioid cell granules. Cell Tissue Res, 1987. **249**(2): p. 325-9.

75. Gordon, R.D., et al., Role of the sympathetic nervous system in regulating renin and aldosterone production in man. J Clin Invest, 1967. **46**(4): p. 599-605.

76. Vander, A.J., Effect of catecholamines and the renal nerves on renin secretion in anesthetized dogs. Am J Physiol, 1965. **209**(3): p. 659-62.

77. Boivin, V., et al., Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney. Kidney Int, 2001. **59**(2): p. 515-31.

78. Hackenthal, E., et al., Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. Physiol Rev, 1990. **70**(4): p. 1067-116.

79. Holmer, S.R., et al., Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. J Hypertens, 1997. **15**(12 Pt 1): p. 1471-9.

80. Schweda, F. and A. Kurtz, Cellular mechanism of renin release. Acta Physiol Scand, 2004. **181**(4): p. 383-90.

81. Galen, F.X., et al., Renin biosynthesis by human tumoral juxtaglomerular cells. Evidences for a renin precursor. J Clin Invest, 1984. **73**(4): p. 1144-55.

82. Tobian, L., Relationship of juxtaglomerular apparatus to renin and angiotensin. Circulation, 1962. **25**: p. 189-92.

83. Nasjetti, A. and G.M. Masson, Hepatic origin of renin substrate. Can J Physiol Pharmacol, 1971. **49**(10): p. 931-2.

84. Basso, N. and N.A. Terragno, History about the discovery of the reninangiotensin system. Hypertension, 2001. **38**(6): p. 1246-9.

85. Davalos, M., et al., Effect of exogenous and endogenous angiotensin II in the isolated perfused rat kidney. Am J Physiol, 1978. **235**(6): p. F605-10.

86. Heyeraas, K.J. and K. Aukland, Interlobular arterial resistance: influence of renal arterial pressure and angiotensin II. Kidney Int, 1987. **31**(6): p. 1291-8.

87. Silbernagl S., D.A., Taschenatlas der Physiologie. Vol. 6. 2003, Stuttgart: Thieme Verlag 149-185.

88. Davis, J.O. and R.H. Freeman, Mechanisms regulating renin release. Physiol Rev, 1976. **56**(1): p. 1-56.

89. Offermanns, S., Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), in Pharmakologie & Toxikologie. 2012, Springer. p. 342-357.

90. Castrop, H., et al., Physiology of kidney renin. Physiol Rev, 2010. 90(2): p. 607-73.

91. Simpson, S.A. and J. Tait, Physicochemical methods of detection of a previously unidentified adrenal hormone. Mem Soc Endocrinol, 1953. **2**: p. 9-24.

92. Lombes, M., et al., Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. Circ Res, 1992. **71**(3): p. 503-10.

93. Dyrenfurth, I., C.J. Giroud, and E.H. Venning, Aldosterone excretion in healthy persons. J Clin Endocrinol Metab, 1956. **16**(10): p. 1326-32.

94. Giroud, C.J., J. Stachenko, and E.H. Venning, Secretion of aldosterone by the zona glomerulosa of rat adrenal glands incubated in vitro. Proc Soc Exp Biol Med, 1956. **92**(1): p. 154-8.

95. Williams, G.H., Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. Heart Fail Rev, 2005. **10**(1): p. 7-13.

96. Young, D.B., Analysis of long-term potassium regulation. Endocr Rev, 1985. 6(1):p. 24-44.

97. Young, D.B., et al., Multiplicative interaction between angiotensin II and K concentration in stimulation of aldosterone. Am J Physiol, 1984. **247**(3 Pt 1): p. E328-35.

98. Okubo, S., et al., Angiotensin-independent mechanism for aldosterone synthesis during chronic extracellular fluid volume depletion. J Clin Invest, 1997. **99**(5): p. 855-60.

99. Laragh, J.H., Atrial natriuretic hormone, the renin-aldosterone axis, and blood pressure-electrolyte homeostasis. N Engl J Med, 1985. **313**(21): p. 1330-40.

100. Funder, J.W., D. Feldman, and I.S. Edelman, Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid. J Steroid Biochem, 1972. **3**(2): p. 209-18.

101. Arriza, J.L., et al., Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary
DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. Science, 1987.
237(4812): p. 268-75.

102. Fejes-Toth, G., D. Pearce, and A. Naray-Fejes-Toth, Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 2973-8.

103. Lakkis, J., W.X. Lu, and M.R. Weir, RAAS escape: a real clinical entity that may be important in the progression of cardiovascular and renal disease. Curr Hypertens Rep, 2003. **5**(5): p. 408-17.

Slight, S.H., et al., Extra-adrenal mineralocorticoids and cardiovascular tissue. JMol Cell Cardiol, 1999. **31**(6): p. 1175-84.

105. Funder, J.W., Mineralocorticoid receptors and hypertension. J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. **53**(1-6): p. 53-5.

106. Romagni, P., et al., Aldosterone induces contraction of the resistance arteries in man. Atherosclerosis, 2003. **166**(2): p. 345-9.

107. Mihailidou, A.S. and J.W. Funder, Nongenomic effects of mineralocorticoid receptor activation in the cardiovascular system. Steroids, 2005. **70**(5-7): p. 347-51.

108. Chai, W., et al., Nongenomic effects of aldosterone in the human heart: interaction with angiotensin II. Hypertension, 2005. **46**(4): p. 701-6.

109. Conn, J.W., R.F. Knopf, and R.M. Nesbit, Clinical Characteristics of Primary Aldosteronism from an Analysis of 145 Cases. Am J Surg, 1964. **107**: p. 159-72.

110. Conn, J.W. and L.H. Louis, Primary aldosteronism, a new clinical entity. Ann Intern Med, 1956. **44**(1): p. 1-15.

Brem, A.S., The Janus effect: two faces of aldosterone. Kidney International,
 2009. 75(2): p. 137-U15.

112. Rossi, G.P., et al., Excess Idosterone Is Associated With Alterations of Myocardial Texture in Primary Aldosteronism. Hypertension, 2002. **40**(1): p. 23-27.

113. Yamamoto, N., et al., Aldosterone is produced from ventricles in patients with essential hypertension. Hypertension, 2002. **39**(5): p. 958-962.

114. Mizuno, Y., et al., Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. Circulation, 2001. **103**(1): p. 72-7.

115. Silvestre, J.S., et al., Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. Circulation, 1999. **99**(20): p. 2694-701.

116. White, P.C., Aldosterone: direct effects on and production by the heart. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2376-83.

117. Yoshimura, M., et al., Expression of aldosterone synthase gene in failing human heart: quantitative analysis using modified real-time polymerase chain reaction. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(8): p. 3936-40.

118. Fraccarollo, D., et al., Cardioprotection by long-term ET(A) receptor blockade and ACE inhibition in rats with congestive heart failure: mono- versus combination therapy. Cardiovasc Res, 2002. **54**(1): p. 85-94.

119. Sanders, L.L. and J.C. Melby, Aldosterone and the Edema of Congestive Heart Failure. Arch Intern Med, 1964. **113**: p. 331-41.

120. Swedberg, K., et al., Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. Circulation, 1990. **82**(5): p. 1730-6.

121. Latini, R., et al., The comparative prognostic value of plasma neurohormones at baseline in patients with heart failure enrolled in Val-HeFT. European Heart Journal, 2004. **25**(4): p. 292-299.

122. Vantrimpont, P., et al., Two-year time course and significance of neurohumoral activation in the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) Study. Eur Heart J, 1998. **19**(10): p. 1552-63.

123. Sun, Y., et al., Angiotensin-converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat receiving angiotensin II or aldosterone. J Lab Clin Med, 1993. **122**(4): p. 395-403.

124. Xiao, F., J.R. Puddefoot, and G.P. Vinson, Aldosterone mediates angiotensin IIstimulated rat vascular smooth muscle cell proliferation. Journal of Endocrinology, 2000. **165**(2): p. 533-536.

125. Barr, C.S., et al., Effects of adding spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. The American journal of cardiology, 1995. **76**(17): p. 1259-1265.

126. Bauersachs, J., et al., Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression. Journal of the American College of Cardiology, 2002. **39**(2): p. 351-358.

127. Brilla, C.G., L.S. Matsubara, and K.T. Weber, Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. Journal of molecular and cellular cardiology, 1993. **25**(5): p. 563-575.

128. Fiebeler, A., et al., Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factorκB activation in angiotensin II–induced cardiac injury. Hypertension, 2001. **37**(2): p. 787-793.

129. Korkmaz, M.E., et al., Effects of spironolactone on heart rate variability and left ventricular systolic function in severe ischemic heart failure. The American journal of cardiology, 2000. **86**(6): p. 649-653.

130. Robert, V., et al., Angiotensin AT1 Receptor Subtype as a Cardiac Target of Aldosterone Role in Aldosterone-Salt–Induced Fibrosis. Hypertension, 1999. **33**(4): p. 981-986.

131. Rocha, R., et al., Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2002.
283(5): p. H1802-H1810.

132. Suzuki, G., et al., Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. Circulation, 2002. **106**(23): p. 2967-2972.

133. Takeda, Y., et al., Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. Hypertension, 2000. **36**(4): p. 495-500.

134. Takeda, Y., et al., Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy. Circulation, 2002. **105**(6): p. 677-679.

135. Zannad, F., B. Dousset, and F. Alla, Treatment of congestive heart failure interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship. Hypertension, 2001. **38**(5): p. 1227-1232.

136. Zhang, Z.-H., et al., The renin-angiotensin-aldosterone system excites hypothalamic paraventricular nucleus neurons in heart failure. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2002. **283**(1): p. H423-H433.

137. Cicoira, M., et al., Relation of aldosterone "escape" despite angiotensinconverting enzyme inhibitor administration to impaired exercise capacity in chronic congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. The American journal of cardiology, 2002. **89**(4): p. 403-407.

138. Jorde, U.P., et al., Elevated plasma aldosterone levels despite complete inhibition of the vascular angiotensin-converting enzyme in chronic heart failure. Circulation, 2002. **106**(9): p. 1055-1057.

139. Lee, A.F., R.J. MacFadyen, and A.D. Struthers, Neurohormonal reactivation in heart failure patients on chronic ACE inhibitor therapy: a longitudinal study. European journal of heart failure, 1999. **1**(4): p. 401-406.

140. MacFadyen, R.J., C.S. Barr, and A.D. Struthers, Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. Cardiovascular research, 1997. **35**(1): p. 30-34.

141. Pitt, B., "Escape" of aldosterone production in patients with left ventricular dysfunction treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor: implications for therapy. Cardiovascular drugs and therapy, 1995. **9**(1): p. 145-149.

142. Sato, A. and T. Saruta, Aldosterone escape during angiotensinconverting enzyme inhibitor therapy in essential hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. Journal of International Medical Research, 2001. **29**(1): p. 13-21.

143. Struthers, A., Aldosterone escape during ACE inhibitor therapy in chronic heart failure. European heart journal, 1995. **16**: p. 103-106.

144. Struthers, A., H. Krum, and G.H. Williams, A comparison of the aldosteroneblocking agents eplerenone and spironolactone. Clin Cardiol, 2008. **31**(4): p. 153-8.

145. Nappi, J.M. and A. Sieg, Aldosterone and aldosterone receptor antagonists in patients with chronic heart failure. Vasc Health Risk Manag, 2011. **7**: p. 353-63.

146. Ovaert, P., et al., Aldosterone receptor antagonists--how cardiovascular actions may explain their beneficial effects in heart failure. J Vet Pharmacol Ther, 2010. **33**(2): p. 109-17.

147. Guglin, M., et al., Aldosterone antagonists in heart failure. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. **16**(2): p. 150-9.

148. Heart Failure Society of, A., et al., HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline. J Card Fail, 2010. **16**(6): p. e1-194.

149. de Gasparo, M., et al., Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro. J Pharmacol Exp Ther, 1987. **240**(2): p. 650-6.

150. Jeunemaitre, X., et al., Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension. Am J Cardiol, 1987. **60**(10): p. 820-5.

151. Sica, D.A., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mineralocorticoid blocking agents and their effects on potassium homeostasis. Heart Fail Rev, 2005. **10**(1): p. 23-9.

152. Weinberger, M.H., et al., Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in mildto-moderate hypertension. Am J Hypertens, 2002. **15**(8): p. 709-16.

153. Garthwaite, S.M. and E.G. McMahon, The evolution of aldosterone antagonists.Mol Cell Endocrinol, 2004. 217(1-2): p. 27-31.

154. Brown, N.J., Eplerenone: cardiovascular protection. Circulation, 2003. 107(19):p. 2512-8.

155. Flack, J.M., et al., Efficacy and tolerability of eplerenone and losartan in hypertensive black and white patients. Journal of the American College of Cardiology, 2003. **41**(7): p. 1148-1155.

156. Krum, H., et al., Efficacy of eplerenone added to renin-angiotensin blockade in hypertensive patients. Hypertension, 2002. **40**(2): p. 117-123.

157. Liew, D. and H. Krum, The role of aldosterone receptor blockade in the management of cardiovascular disease. Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000), 2002. **3**(10): p. 1468-1473.

158. Weber, M.A., Clinical implications of aldosterone blockade. American heart journal, 2002. **144**(5): p. S12-S18.

159. White, W.B., et al., Effects of the selective aldosterone blocker eplerenone versus the calcium antagonist amlodipine in systolic hypertension. Hypertension, 2003. **41**(5): p. 1021-1026.

160. Williams, G.H., et al., Efficacy of eplerenone versus enalapril as monotherapy in systemic hypertension. The American journal of cardiology, 2004. **93**(8): p. 990-996.

161. Stanek, B., Kardioprotektion durch selektive Aldosteronblockade. Journal für Kardiologie-Austrian Journal of Cardiology, 2005. **12**(7): p. 215-220.

162. Fratzl, P., Collagen: structure and mechanics, an introduction. 2008: Springer.

163. Villaschi, S. and R.F. Nicosia, Paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells in a serum-free coculture model. Modulation of angiogenesis and collagen gel contraction. Lab Invest, 1994. **71**(2): p. 291-9.

164. Souders, C.A., S.L. Bowers, and T.A. Baudino, Cardiac fibroblast: the renaissance cell. Circ Res, 2009. **105**(12): p. 1164-76.

165. Sun, Y., et al., Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 2000. **135**(4): p. 316-323.

166. Krenning, G., E.M. Zeisberg, and R. Kalluri, The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. J Cell Physiol, 2010. **225**(3): p. 631-7.

167. de Souza, R.R., Aging of myocardial collagen. Biogerontology, 2002. 3(6): p. 325-35.

168. Chaturvedi, R.R., et al., Passive stiffness of myocardium from congenital heart disease and implications for diastole. Circulation, 2010. **121**(8): p. 979-88.

169. Weber, K.T., Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. Journal of the American College of Cardiology, 1989. **13**(7): p. 1637-1652.

170. de Bakker, J.M., et al., Fractionated electrograms in dilated cardiomyopathy: origin and relation to abnormal conduction. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(5): p. 1071-8.

171. Spach, M.S. and J.P. Boineau, Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. Pacing Clin Electrophysiol, 1997. **20**(2 Pt 2): p. 397-413.

172. Anderson, K.R., M.G. Sutton, and J.T. Lie, Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. J Pathol, 1979. **128**(2): p. 79-85.

173. Koch, W., Die Orte der Reizbildung und Reizleitung im menschlichen Herzen. Zeitschrift für die experimentelle Pathologie und Therapie, 1914. **16**(1): p. 1-9.

174. Trappe, H.-J., Das Elektrokardiogramm 100 Jahre nach Einthoven. Notfall+ Rettungsmedizin, 2009. **12**(8): p. 635-648.

175. Trappe, H.-J. and H.-P. Schuster, EKG-Kurs für Isabel. 2013: Georg Thieme Verlag.

176. Demming, T. and H. Bonnemeier, Die Interpretation des Belastungs-EKG. DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift, 2011. **136**(06): p. 265-270.

177. Kramme, D.-I.R., Kardiologische Basisdiagnostik (Ruhe-EKG, Langzeit-EKG, Belastungs-EKG), in Medizintechnik. 2011, Springer. p. 113-130.

178. Block, M., et al., Richtlinien für die Durchführung invasiver elektrophysiologischer Untersuchungen. Z Kardiol, 1998. **87**: p. 502-512.

179. Schneider, C., Das EPU-Labor-Einführung in die invasive elektrophysiologische Untersuchung, ch. Katheterablation. Steinkopff-Verlag, 2004.

180. Berul, C.I., et al., In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse. Circulation, 1996. **94**(10): p. 2641-8.

181. Saba, S., P.J. Wang, and N.A. Estes, 3rd, Invasive cardiac electrophysiology in the mouse: techniques and applications. Trends Cardiovasc Med, 2000. 10(3): p. 122-32.

182. VanderBrink, B.A., et al., Assessment of atrioventricular nodal physiology in the mouse. J Interv Card Electrophysiol, 1999. **3**(3): p. 207-12.

183. Berul, C.I., et al., Electrophysiological abnormalities and arrhythmias in alpha MHC mutant familial hypertrophic cardiomyopathy mice. Journal of Clinical Investigation, 1997. **99**(4): p. 570.

184. Lombard, E.A., Electrocardiograms of small mammals. Am J Physiol, 1952.171(1): p. 189-93.

185. Richards, A.G., E. Simonson, and M.G. Visscher, Electrocardiogram and phonogram of adult and newborn mice in normal conditions and under the effect of cooling, hypoxia and potassium. Am J Physiol, 1953. **174**(2): p. 293-8.

186. Liu, G., et al., In vivo temporal and spatial distribution of depolarization and repolarization and the illusive murine T wave. The Journal of physiology, 2004. **555**(1): p. 267-279.

187. Kaese, S. and S. Verheule, Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. Transgenic models of cardiac arrhythmias and sudden death, 2013: p. 103.

188. Boukens, B.J., et al., Misinterpretation of the mouse ECG: 'musing the waves of Mus musculus'. The Journal of physiology, 2014. **592**(21): p. 4613-4626.

189. Sabir, I.N., et al., Ventricular arrhythmogenesis: insights from murine models. Progress in biophysics and molecular biology, 2008. **98**(2): p. 208-218.

190. Goldbarg, A.N., et al., Electrocardiogram of the normal mouse, Mus musculus: general considerations and genetic aspects. Cardiovasc Res, 1968. **2**(1): p. 93-99.

191. London, B., Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. Journal of cardiovascular electrophysiology, 2001. **12**(9): p. 1089-1091.

192. Wehrens, X.H., S. Kirchhoff, and P.A. Doevendans, Mouse electrocardiography: an interval of thirty years. Cardiovasc Res, 2000. **45**(1): p. 231-7.

193. Gertsch, M., Das EKG: auf einen Blick und im Detail. 2008: Springer-Verlag.

194. Priori, S.G., et al., Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. Eur Heart J, 2001. **22**(16): p. 1374-450.

195. Steffel, J. and T. Luscher, Herz-Kreislauf. 2014: Springer-Verlag.

196. Bleifeld, W., et al., Syndrom des kranken Sinusknotens (» Sick-Sinus «-Syndrom)*. DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1974. **99**(16): p. 795-802.

197. Kollmeier, P.-D.D.W., Pathophysiologie und Klinik des Sick-Sinus-Syndroms, in Autonome Innervation des Herzens. 1982, Springer. p. 87-96.

198. Herold, G., Innere Medizin-Ausgabe 2013. 2006.

199. Lüderitz, B., 64. Indikationen zur Herzschrittmacher-Behandlung. Langenbecks Archiv für Chirurgie, 1980. **352**(1): p. 259-264.

200. Trappe, H.-J., Supraventrikuläre Tachykardien. Der Kardiologe, 2008. **2**(2): p. 127-141.

201. Erath, J., M. Vámos, and S.H. Hohnloser, Vorhofflimmern: orale Antikoagulation. CardioVasc, 2015. **15**(4): p. 52-56.

202. Hennersdorf, M.G. and B.E. Strauer, [Atrial fibrillation]. Internist (Berl), 2006.47(10): p. 990, 992-5, 997-1000.

203. Keating, R.J., et al., Effect of atrial fibrillation pattern on survival in a community-based cohort. Am J Cardiol, 2005. **96**(10): p. 1420-4.

204. Hammwöhner, M. and A. Goette, [Heart rhythm disturbances and their treatment according to recent recommendations]. Deutsche medizinische Wochenschrift (1946), 2010. **135**(49): p. 2461-76; quiz 2477-80.

205. Waldo, A., Clinical evaluation in therapy of patients with atrial fibrillation or flutter. Cardiology clinics, 1990. **8**(3): p. 479-490.

206. Wit, A.L. and M.R. Rosen, Cellular electrophysiological mechanisms of cardiac arrhythmias. Comprehensive electrocardiology, theory and practice in health and disease, 1989. **2**: p. 801-841.

207. Trappe, H.-J., Herzrhythmusstörungen, in Die Intensivmedizin. 2008, Springer. p. 429-443.

208. Erdmann, E., Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. 2005: Springer-Verlag.

209. Lee, G., P. Sanders, and J.M. Kalman, Catheter ablation of atrial arrhythmias: state of the art. The Lancet, 2012. **380**(9852): p. 1509-1519.

210. Lewalter, P.D.T., J. Schwab, and G. Nickenig, Ventrikuläre Tachykardien. Der Internist, 2006. **47**(10): p. 1001-1012.

211. Andresen, D., Epidemiologie des plötzlichen Herztodes. Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2007. **44**(4): p. 188-193.

212. Zipes, D.P. and M. Rubart, Neural modulation of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. Heart Rhythm, 2006. **3**(1): p. 108-13.

213. Trappe, H.-J., Plötzlicher Herztod. Der Kardiologe, 2007. 1(4): p. 261-271.

214. Greene, H.L., Sudden arrhythmic cardiac death--mechanisms, resuscitation and classification: the Seattle perspective. Am J Cardiol, 1990. **65**(4): p. 4B-12B.

215. Davies, M.J., Anatomic features in victims of sudden coronary death. Coronary artery pathology. Circulation, 1992. **85**(1 Suppl): p. I19-24.

216. Gorgels, A.P., et al., Out-of-hospital cardiac arrest-the relevance of heart failure. The Maastricht Circulatory Arrest Registry. European heart journal, 2003. **24**(13): p. 1204-1209.

217. Müller, D., R. Agrawal, and H.-R. Arntz, How sudden is sudden cardiac death? Circulation, 2006. **114**(11): p. 1146-1150.

218. SARKOZY, A. and P. BRUGADA, Sudden cardiac death and inherited arrhythmia syndromes. Journal of cardiovascular electrophysiology, 2005. **16**(s1): p. S8-S20.

219. Cupples, L., D. Gagnon, and W. Kannel, Long-and short-term risk of sudden coronary death. Circulation, 1992. **85**(1 Suppl): p. I11-8.

220. Jouven, X., et al., Predicting Sudden Death in the Population The Paris Prospective Study I. Circulation, 1999. **99**(15): p. 1978-1983.

221. Kannel, W.B., et al., Hypertension, antihypertensive treatment, and sudden coronary death. The Framingham Study. Hypertension, 1988. **11**(3 Pt 2): p. II45-50.

222. Kannel, W.B. and A. Schatzkin, Sudden death: lessons from subsets in population studies. Journal of the American College of Cardiology, 1985. **5**(6s1): p. 141B-149B.

223. Wannamethee, G., et al., Risk factors for sudden cardiac death in middle-aged British men. Circulation, 1995. **91**(6): p. 1749-56.

224. Andresen, D., T. Brüggemann, and C. Ehlers, Risikostratifikation nach Myokardinfarkt. Herzschrittmachertherapie und Elektrophysiologie, 1998. **9**(2): p. S79-84.

225. Affolter, H., et al., Zur Schocktherapie mit Isoprenalin. DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1969. **94**(15): p. 774-778.

226. Demiroglu, C., [The effects of isoprenalin on ECG]. Istanbul Tip Fak Mecmuasi, 1962. **25**: p. 10-22.

227. Ullrich, M. and K. Schuh, Gene trap: knockout on the fast lane. Methods Mol Biol, 2009. **561**: p. 145-59.

228. Wu, Y., et al., Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. Circulation, 2002. **106**(10): p. 1288-1293.

229. Vogel, B., et al., Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. MethodsX, 2015. **2**: p. 124-34.

230. Oldenburg, P.D.O., et al., Herzinsuffizienz. Somnologie-Schlafforschung und Schlafmedizin, 2014. **18**(1): p. 19-25.

231. McMurray, J.J., et al., ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur Heart J, 2012. **33**(14): p. 1787-847.

232. Pieske, B., Diastolische Herzinsuffizienz. Kardiologie up2date, 2006. 2(01): p. 2745.

233. Nattel, S., Defining "culprit mechanisms" in arrhythmogenic cardiac remodeling. Circulation research, 2004. **94**(11): p. 1403-1405.

234. Myerburg, R.J., Scientific gaps in the prediction and prevention of sudden cardiac death. Journal of cardiovascular electrophysiology, 2002. **13**(7): p. 709-723.

235. Bigger, J., et al., The relationships among ventricular arrhythmias, left ventricular dysfunction, and mortality in the 2 years after myocardial infarction. Circulation, 1984. **69**(2): p. 250-258.

236. Kuchar, D.L., C.W. Thorburn, and N.L. Sammel, Prediction of serious arrhythmic events after myocardial infarction: signal-averaged electrocardiogram, Holter monitoring and radionuclide ventriculography. Journal of the American College of Cardiology, 1987. **9**(3): p. 531-538.

237. Murkofsky, R.L., et al., A prolonged QRS duration on surface electrocardiogram is a specific indicator of left ventricular dysfunction. Journal of the American College of Cardiology, 1998. **32**(2): p. 476-482.

238. Silverman, M.E., et al., Prognostic value of the signal-averaged electrocardiogram and a prolonged QRS in ischemic ana nonischemic cardiomyopathy. The American journal of cardiology, 1995. **75**(7): p. 460-464.

239. Iuliano, S., et al., QRS duration and mortality in patients with congestive heart failure. American heart journal, 2002. **143**(6): p. 1085-1091.

240. EL-SHERIF, N. and G. Turitto, Risk Stratification and Management of sudden cardiac death. Journal of cardiovascular electrophysiology, 2003. **14**(10): p. 1113-1119.

241. Löllgen, H., Herzfrequenzvariabilität. Deutsches Aerzteblatt Köln, 1999. **96**: p. 1602-1605.

242. Mukharji, J., et al., Risk factors for sudden death after acute myocardial infarction: two-year follow-up. The American journal of cardiology, 1984. **54**(1): p. 31-36.

243. Andresen, D., et al., Importance of quantitative analysis of ventricular arrhythmias for predicting the prognosis in low-risk postmyocardial infarction patients. European heart journal, 1990. **11**(6): p. 529-536.

244. Dooley, R., B.J. Harvey, and W. Thomas, Non-genomic actions of aldosterone: from receptors and signals to membrane targets. Molecular and cellular endocrinology, 2012. **350**(2): p. 223-234.

245. Lijnen, P. and V. Petrov, Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. Journal of molecular and cellular cardiology, 2000. **32**(6): p. 865-879.

246. Brilla, C.G. and K.T. Weber, Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. The Journal of laboratory and clinical medicine, 1992. **120**(6): p. 893-901.

247. Gu, J.-W., et al., Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. Hypertension, 1998. **31**(5): p. 1083-1087.

248. Tsybouleva, N., et al., Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. Circulation, 2004. **109**(10): p. 1284-1291.

249. Milliez, P., et al., Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. Journal of the American College of Cardiology, 2005. **45**(8): p. 1243-1248.

250. FARQUHARSON, C.A. and A.D. STRUTHERS, Aldosterone induces acute endothelial dysfunction in vivo in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy. Clinical Science, 2002. **103**(4): p. 425-431.

251. Sun, Y., The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Vascular Remodeling. Congestive Heart Failure, 2002. **8**(1): p. 11-16.

252. Cittadini, A., et al., Aldosterone receptor blockade improves left ventricular remodeling and increases ventricular fibrillation threshold in experimental heart failure. Cardiovascular research, 2003. **58**(3): p. 555-564.

253. Camm, A.J. and L. Fei, Chronotropic incompetence—part II: clinical implications.Clinical cardiology, 1996. 19(6): p. 503-508.

254. Wilkoff, B.L. and R.E. Miller, Exercise testing for chronotropic assessment. Cardiology clinics, 1992. **10**(4): p. 705-717.

255. Hinkle, L.E., S.T. Carver, and A. Plakun, Slow heart rates and increased risk of cardiac death in middle-aged men. Archives of internal medicine, 1972. **129**(5): p. 732-748.

256. Lauer, M.S., et al., Association of chronotropic incompetence with echocardiographic ischemia and prognosis. Journal of the American College of Cardiology, 1998. **32**(5): p. 1280-1286.

257. Lauer, M.S., et al., Impaired heart rate response to graded exercise prognostic implications of chronotropic incompetence in the Framingham Heart Study. Circulation, 1996. **93**(8): p. 1520-1526.

258. Sandvik, L., et al., Heart rate increase and maximal heart rate during exercise as predictors of cardiovascular mortality: a 16-year follow-up study of 1960 healthy men. Coronary artery disease, 1995. **6**(8): p. 667-680.

259. Ellestad, M.H., Chronotropic Incompetence The Implications of Heart Rate Response to Exercise (Compensatory Parasympathetic Hyperactivity?). Circulation, 1996. **93**(8): p. 1485-1487.

260. Fei, L., et al., Decreased heart rate variability in patients with congestive heart failure and chronotropic incompetence. Pacing and Clinical Electrophysiology, 1996. **19**(4): p. 477-483.

261. Alagona Jr, P., Advances in pacing for the patient with sick sinus syndrome. Current opinion in cardiology, 1997. **12**(1): p. 3-11.

262. John Camm, A. and L. Fei, Chronotropic incompetence—part I: normal regulation of the heart rate. Clinical cardiology, 1996. **19**(5): p. 424-428.

263. Cheng, S., et al., Long-term outcomes in individuals with prolonged PR interval or first-degree atrioventricular block. JAMA, 2009. **301**(24): p. 2571-7.

264. Wang, N.C., et al., Clinical implications of QRS duration in patients hospitalized with worsening heart failure and reduced left ventricular ejection fraction. JAMA, 2008. **299**(22): p. 2656-66.

265. Moss, A.J., Measurement of the QT interval and the risk associated with QTc interval prolongation: a review. Am J Cardiol, 1993. **72**(6): p. 23B-25B.

266. Schwartz, P.J. and S. Wolf, QT interval prolongation as predictor of sudden death in patients with myocardial infarction. Circulation, 1978. **57**(6): p. 1074-7.

267. Fraccarollo, D., et al., Additive improvement of left ventricular remodeling and neurohormonal activation by aldosterone receptor blockade with eplerenone and ACE inhibition in rats with myocardial infarction. Journal of the American College of Cardiology, 2003. **42**(9): p. 1666-1673.

268. Fraccarollo, D., et al., Immediate mineralocorticoid receptor blockade improves myocardial infarct healing by modulation of the inflammatory response. Hypertension, 2008. **51**(4): p. 905-914.

269. Take, Y. and H. Morita, Fragmented QRS: What is the meaning? Indian pacing and electrophysiology journal, 2012. **12**(5): p. 213.

270. Das, M.K., et al., Fragmented Wide QRS on a 12-Lead ECG A Sign of Myocardial Scar and Poor Prognosis. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology, 2008. **1**(4): p. 258-268.

271. Ouvrard-Pascaud, A., et al., Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. Circulation, 2005. **111**(23): p. 3025-3033.

272. Bénitah, J.P., et al., Effects of aldosterone on transient outward K+ current density in rat ventricular myocytes. The Journal of physiology, 2001. **537**(1): p. 151-160.

273. Yee, K.-M., S.D. Pringle, and A.D. Struthers, Circadian variation in the effects of aldosterone blockade on heart rate variability and QT dispersion in congestive heart failure. Journal of the American College of Cardiology, 2001. **37**(7): p. 1800-1807.

274. Schneider, C., F. Baer, and E. Erdmann, QT-Dispersion-Bestimmung und prognostische Bedeutung. DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1999. **124**(13): p. 396-402.

275. Walter, T., et al., QT-Dispersion im Oberflchen-EKG und QT-Dynamik im Langzeit-EKG bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung im chronischen

Postinfarktstadium mit und ohne ventrikulre Tachyarrhythmien Korrelationen mit anderen Risikoparametern. Clinical Research in Cardiology, 1997. **3**(86).

276. Perings, C., et al., Das Arrhythmierisiko bei linksventrikulärer Hypertrophie. Zeitschrift für Kardiologie, 2000. **89**(3): p. 36-43.

277. McLenachan, J.M. and H.J. Dargie, Ventricular Arrhythmias in Hypertensive Left Ventricular Hypertrophy Relationship to Coronary Artery Disease, Left Ventricular Dysfunction, and Myocardial Fibrosis. American journal of hypertension, 1990. **3**(10 Pt 1): p. 735-740.

278. Pahor, M., et al., Enalapril prevents cardiac fibrosis and arrhythmias in hypertensive rats. Hypertension, 1991. **18**(2): p. 148-157.

279. Huikuri, H.V., A. Castellanos, and R.J. Myerburg, Sudden death due to cardiac arrhythmias. N Engl J Med, 2001. **345**(20): p. 1473-82.

280. Olshausen, K., et al., Plötzlicher Herztod im Langzeit-EKG. DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1985. **110**(31/32): p. 1195-1201.

281. Stein, M., et al., Reduction of fibrosis-related arrhythmias by chronic reninangiotensin-aldosterone system inhibitors in an aged mouse model. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(2): p. H310-21.

282. Pahor, M., et al., Enalapril prevents cardiac fibrosis and arrhythmias in hypertensive rats. Hypertension, 1991. **18**(2): p. 148-57.

283. Eger 2nd, E., The pharmacology of isoflurane. British journal of anaesthesia, 1983. **56**: p. 71S-99S.

284. Kayaba, K. and S. Shimosato, [Isoflurane (Forane), a new inhalation anesthetic agent]. Masui. The Japanese journal of anesthesiology, 1985. **34**(6): p. 746-753.

285. Dale, O. and B.R. Brown Jr, Clinical pharmacokinetics of the inhalational anaesthetics. Clinical pharmacokinetics, 1987. **12**(3): p. 145-167.

286. Hedenqvist, P. and L.J. Hellebrekers, Laboratory animal analgesia, anesthesia, and euthanasia. Handbook of Laboratory Animal Science. Volume 1: Essential Principles and Practices, 2003: p. 413-456.

287. Eger 2nd, E., Isoflurane: a review. Anesthesiology, 1981. 55(5): p. 559.

288. Fish, R., et al., Anesthesia and analgesia in laboratory animals. 2011: Academic press.

289. Haskins, S.C., Inhalational anesthetics. The Veterinary clinics of North America. Small animal practice, 1992. **22**(2): p. 297-307.

290. Dalal, P.G., et al., Comparison of the cardiovascular effects of isoflurane and sevoflurane as measured by magnetic resonance imaging in children with congenital heart disease. Journal of clinical anesthesia, 2008. **20**(1): p. 40-44.

291. Davies, L., et al., Concentration-dependent inotropic effects of halothane, isoflurane and sevoflurane on rat ventricular myocytes. British journal of anaesthesia, 1999. **82**(5): p. 723-730.

292. Skeehan, T.M., H.G. Schuler, and J.L. Riley, Comparison of the alteration of cardiac function by sevoflurane, isoflurane, and halothane in the isolated working rat heart. Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia, 1995. **9**(6): p. 706-712.

293. Parsons, F., Some Pharmacological Aspects of Avertin. British medical journal, 1929. **2**(3589): p. 709.

294. Lorenz, J.N., A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2002. **282**(6): p. R1565-R1582.

295. Hart, C.Y., J.C. Burnett, and M.M. Redfield, Effects of avertin versus xylazineketamine anesthesia on cardiac function in normal mice. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2001. **281**(5): p. H1938-H1945.

296. Brilla, C.G., R.C. Funck, and H. Rupp, Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease. Circulation, 2000. **102**(12): p. 1388-93.

297. De Mello, W.C., Beneficial effect of eplerenone on cardiac remodelling and electrical properties of the failing heart. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2006. **7**(1): p. 40-6.

298. Diez, J., et al., Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. Circulation, 2002. **105**(21): p. 2512-7.

299. Izawa, H., et al., Mineralocorticoid receptor antagonism ameliorates left ventricular diastolic dysfunction and myocardial fibrosis in mildly symptomatic patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: a pilot study. Circulation, 2005. **112**(19): p. 2940-5.

300. Mezzano, S.A., M. Ruiz-Ortega, and J. Egido, Angiotensin II and renal fibrosis. Hypertension, 2001. **38**(3): p. 635-638.

301. Jonsson, J.R., et al., Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. Gastroenterology, 2001. **121**(1): p. 148-155.

302. Kisseleva, T. and D.A. Brenner, Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. Journal of gastroenterology and hepatology, 2007. **22**(s1): p. S73-S78.

303. Doevendans, P.A., et al., Cardiovascular phenotyping in mice. Cardiovascular research, 1998. **39**(1): p. 34-49.

304. Webb, S., N.A. Brown, and R.H. Anderson, The structure of the mouse heart in late fetal stages. Anatomy and embryology, 1996. **194**(1): p. 37-47.

305. Taniguchi, K., et al., Spreds are essential for embryonic lymphangiogenesis by regulating vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. Mol Cell Biol, 2007. **27**(12): p. 4541-50.

306. Pitt, B., et al., The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 709-17.

307. Pitt, B., et al., Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.

308. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. N Engl J Med, 1991. **325**(5): p. 293-302.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ras/ERK-MAPK-Signalweg2
Abbildung 2: SPRED2-Proteinstruktur und korrespondierende genomische Exon/Intron-
Organisation6
Abbildung 3: SPRED als Inhibitor des Ras/ERK/MAPK-Signalsweges
Abbildung 4: Ergebnisse der Blutdruckmessung von Ullrich et al
Abbildung 5: HW/BW-Ratio12
Abbildung 6: Ergebnisse aus Hämodynamik von Ullrich et al
Abbildung 7: Vereinfachtes Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems 16
Abbildung 8: Gegenüberstellung von physiologischem Maus- und Mensch-EKG 27
Abbildung 9: Reduzierte Überlebenszeit der SPRED2-KO-Tiere
Abbildung 10: EKG-Ausschnitt unter Kennzeichnung der verschiedenen Intervalle 44
Abbildung 11: Arrhythmiescore 46
Abbildung 12: Darstellung der SNRT anhand Screenshot aus Chart-Software
Abbildung 13: Darstellung der Bestimmung des Wenckebach-Punktes
Abbildung 14: Für kardiologische Untersuchungen eingesetzte Tiergruppen
Abbildung 15: Spred2-Promotoraktiviät in kardialen Gewebeschnitten
Abbildung 16: P-ERK-, ERK-, SPRED1- und GAPDH-Expression in Mausherzlysaten der
WT- und KO-Tiere
Abbildung 17: Durchschnittliche Länge des PQ-Intervalls und der P-Dauer unter
Ruhebedingungen und nach Isoproterenolgabe in Milisekunden
Abbildung 18: Durchschnittliche Länge des QRS-Intervalls und der QT+ Zeit unter
Ruhebedingungen und nach Isoproterenolgabe in Milisekunden
Abbildung 19: Durchschnittlicher Anstieg der Herzfrequenz und prozentualer Anstieg
nach Isoproterenolgabe 64
Abbildung 20: Herzfrequenzanstieg mit Zeitachse65
Abbildung 21: Durchschnittliche P-Dauer und Länge des QRS-Komplexes unter
Ruhebedingungen und nach Isoproterenolgabe in Milisekunden

Abbildung 22: PQ-Intervall bei basalen WT- und KO-Tieren vs. behandelten KO-Tieren
Abbildung 23: QRS-Intervall bei basalen WT- und KO-Tieren vs. behandelten KO-Tieren
vor und nach Isoproterenolgabe70
Abbildung 24: Durchschnittliche Arrhythmiepunkte unter einfacher Wichtung des
jeweils schwersten Ereignisses und Aufsummierung aller Scorepunkte
Abbildung 25: Durchschnittliche Arrhythmiepunkte bei einfacher Wertung des jeweils
schwerwiegendsten Ereignisses vor und nach Gabe von Isoproterenol
Abbildung 26: Durchschnittliche Scorepoints WT basal, KO basal und KO behandelt
unter Berücksichtigung des jeweils schwerwiegendsten Ereignisses (A) und
Aufsummierung aller Ereignisse (B)75
Abbildung 27: Durchschnittliche Arrhythmiescorepoints unter einfacher Wertung des
jeweils schwerwiegendsten Ereignisses sowie unter Aufsummierung aller
aufgetretenen Arrhythmieereignisse bei den unbehandelten WT- und KO-Gruppen 79
Abbildung 28: Exemplarische Darstellung von Arrhythmien – Arrhythmia absoluta mit
VHF
Abbildung 29: Exemplarische Darstellung von Arrhythmien – Couplet (ventrikuläre
Extrasystolen) 79
Abbildung 30: Exemplarische Darstellung von Arrhythmien - einzelne ventrikuläre
Extrasystolen 80
Abbildung 31: Exemplarische Darstellung von Arrhythmien – Arrhythmia absoluta mit
VHF
Abbildung 32: Durchschnittliche Arrhythmiescorepoints unter einfacher Wertung des
jeweils schwerwiegendsten Ereignisses sowie unter Aufsummierung aller
aufgetretenen Arrhythmieereignisse
Abbildung 33: Gegenüberstellung der durchschnittlichen
Arrhythmiescorepunktezahlen der basalen WT- und KO-Gruppe sowie der mit
Eplerenon behandelten KO-Gruppe 82
Abbildung 34: Exemplarische Darstellung der PSR gefärbten Myokardschnitte zwecks
Ermittlung des Kollagengehalts

Abbildung 35: Erhöhter Kollagengehalt im Herzen der basalen KO-Gruppe und partiel	le
Reduktion durch Eplerenon Behandlung	84
Abbildung 36: Zusammenfassung der Ergebnisse	99

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Reagenzien f ür Proteinanalyse
Tabelle 2: EKG-Parameter 45
Tabelle 3: Ergebnisse der basalen WT- und KO-EKG-Messungen unter
Ruhebedingungen
Tabelle 4: Ergebnisse der basalen WT- und KO-EKG-Messungen unter
Stressbedingungen 61
Tabelle 5: Ergebnisse der WT- und KO-EKG-Messungen bei den mit Eplerenon
behandelten Tiergruppen unter Ruhebedingungen66
Tabelle 6: : Ergebnisse der WT- und KO-EKG-Messungen bei den mit Eplerenon
behandelten Tiergruppen unter sympathomimetischer Stimulation durch Isoproterenol
Danksagung

An dieser Stelle gilt es all jenen Menschen meinen Dank auszusprechen, die mir diese Arbeit direkt oder indirekt erst ermöglicht haben.

Vielen Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Kai Schuh, für die freundliche Aufnahme und das Vertrauen, dass Du mir mit der Zuteilung dieses Themas entgegen gebracht hast. Danke auch für die erstklassige Betreuung und dass Du zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich hattest.

Liebe Frau Dr. Melanie Ullrich, vielen Dank für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für Deine Geduld und Deine Unterstützung, Deine konstruktive Kritik und Deine umfassende Expertise waren mir immer eine große Hilfe.

Marco Abeßer, Du warst mir in der Anfangszeit oft der erste Ansprechpartner, hast mich stets tatkräftig unterstützt und mich direkt ins Team integriert. Du bist mir darüber hinaus in den letzten Jahren ein sehr guter Freund geworden und ich möchte Dich nicht mehr missen. Danke für alles.

Ich möchte mich des Weiteren bei allen anderen Mitgliedern der AG Schuh, AG Friebe und AG Kuhn bedanken, die mich so herzlich in Ihrem Institut aufnahmen. So einige von Euch sind mir in den letzten Jahren sehr ans Herz gewachsen und aus Kollegen sind Freunde geworden.

Ich danke auch meiner Familie - meinen Eltern und meinem Bruder. Danke für Eure Liebe und Eure Unterstützung.

Andreas. Dir angemessen zu danken würde den hier verfügbaren Rahmen sprengen. Ich danke Dir für deine Geduld und deine unermüdliche Motivation. Du hast mit mir inzwischen so viele Höhen und Tiefen durchgestanden, und ich möchte keine einzige gemeinsame Sekunde mit Dir missen.

Ich danke ferner einer ganzen Reihe von wundervollen Menschen, die das Medizinstudium in Würzburg zu einer unvergesslichen Zeit gemacht haben, auf die ich immer wieder gerne zurückblicken werde.

Mein herzlicher Dank gilt ferner der Deutschen Herzstiftung, die mir mit der Gewährung des Kaltenbach-Doktoradenstipendiums eine noch intensivere Beschäftigung mit diesem Thema ermöglicht hat.