

Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie  
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)  
im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Einfluss von Pravastatin auf die Kontraktion und auf die PI3K-Akt-Signal-  
Kaskade in isoliertem Kaninchen- und isoliertem insuffizienten  
Humanmyokard

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Shila Pazahr

aus

Teheran/Iran

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Pieske

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Lutz

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2013

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Herzinsuffizienz.....	1
1.1.1 Definition der Herzinsuffizienz.....	1
1.1.2 Epidemiologie der Herzinsuffizienz .....	1
1.2 Elektromechanische Kopplung und intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Homöostase in Kardiomyozyten .....	1
1.3 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine).....	4
1.3.1 Pharmakokinetik von Pravastatin .....	4
1.3.2 Pharmakodynamik und pleiotrope Effekte der Statine .....	4
1.4 PI3K-Akt-Protein-Kaskade .....	7
1.5 Ziele dieser Arbeit .....	10
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1 Untersuchtes Herzgewebe.....	13
2.1.1 Kaninchen-Myokard .....	13
2.1.2 Menschliches Vorhofgewebe .....	13
2.1.3 Menschliches Ventrikelgewebe .....	13
2.2 Muskelphysiologische Untersuchungen.....	15
2.2.1 Materialien und Geräte.....	15
2.2.1.1 Chemikalien.....	15
2.2.1.2 Technische Geräte .....	15
2.2.2 Transport und Präparation .....	15
2.2.2.1 Tyrodelösung.....	15
2.2.2.2 Kardioplegie .....	16
2.2.2.3 Transport.....	16
2.2.2.4 Präparation.....	17
2.2.3 Versuchsaufbau .....	17
2.2.4 Versuchsdurchführung .....	18
2.2.5 Auswertung .....	20
2.3. Molekularbiologische Untersuchungen .....	20
2.3.1 Materialien und Geräte .....	20

---

2.3.1.1	Chemikalien.....	20
2.3.1.2	Markerproteine, Kits .....	21
2.3.1.3	Antikörper .....	21
2.3.1.4	Technische Geräte .....	22
2.3.2	Homogenisierung der Trabekel.....	22
2.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	23
2.3.4	Vorbereitung der Proben.....	23
2.3.5	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese .....	24
2.3.6	Transfer der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen.....	25
2.3.7	Immundetektion .....	27
2.3.8	Auswertung der Western-Immunoblots.....	28
2.4	Zellkulturen .....	28
2.5	Messung der NO-Synthese/-Freisetzung in isolierten Kardiomyozyten mit dem NO-sensitiven Farbstoff DAF-FM.....	29
2.6	Statistische Auswertung.....	30
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
3.1	Wirkung von Pravastatin auf die kontraktile Parameter.....	32
3.1.1	Dosisabhängige Wirkung von Pravastatin auf das Kontraktionsverhalten isolierter ventrikulärer Muskelstreifen aus insuffizienten Humanherzen.....	32
3.1.2	Dosisabhängige Wirkung von Pravastatin auf das Kontraktionsverhalten isolierter atrialer Muskelstreifen aus humanem Herzgewebe.....	34
3.1.3	Mittelfristiger Einfluss von Pravastatin auf die kontraktile Parameter isolierter Muskelstreifen aus insuffizienten Humanherzen .....	35
3.2	Effekte von Pravastatin auf die PI3K-Akt-Signalkaskade .....	37
3.2.1	Die Akt-GSK3 $\beta$ -Signalkaskade-Aktivität in terminal insuffizientem menschlichen Myokard .....	37
3.2.2	Effekte von Pravastatin auf die Aktivität der PI3K-Akt-Signalkaskade in isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten.....	39
3.3	Einfluss von Pravastatin auf die NO-Synthese/-Freisetzung in adulten Kardiomyozyten .....	42
3.4	Einfluss von Pravastatin auf die SERCA-Expression.....	43

---

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>45</b>
4.1	Methodische Aspekte .....	45
4.2	Pravastatin .....	46
4.3	Funktionelle Effekte von Pravastatin auf das Kontraktionsverhalten humaner Myokardpräparate .....	47
4.3.1	Kurzfristige dosisabhängige Effekte von Pravastatin auf die kontraktile Parameter .....	48
4.3.2	Mittelfristige Effekte von Pravastatin auf die kontraktile Parameter .....	49
4.4	Biomolekulare Effekte von Pravastatin in Kardiomyozyten .....	50
4.4.1	Einfluss von Pravastatin auf die PI3K-Akt-GSK3 $\beta$ -Signalkaskade .....	52
4.4.2	Einfluss von Pravastatin auf die NO-Synthese/-Freisetzung .....	54
4.4.3	Einfluss von Pravastatin auf die SERCA2a-Expression .....	56
4.5	Potentielle klinische Konsequenzen .....	57
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>59</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ACE-H	Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer
Akt	Proteinkinase B
AT <sub>1</sub> A	Angiotensin-1-Antagonist
BB	Betarezeptorenblocker
BDM	2,3-Butandion-Monoxim
BSA	Bovines Serumalbumin
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Kalziumkonzentration
Ca <sup>2+</sup> A	Kalzium-Antagonist
CI	Cardiac Index
DCM	dilatative Kardiomyopathie (dilated cardiomyopathy)
Dig	Digitalis
Diu	Diuretika
D. m.	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF	Ejektionsfraktion
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
F	„failing“
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK3 $\beta$	Glycogen-Synthase-Kinase-3-Beta
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HMG-CoA-R	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HRST	Herzrhythmusstörungen
HypCho	Hypercholesterinämie
HypLip	Hyperlipidämie
ICCD	intensified charge-coupled device
ICM	ischämische Kardiomyopathie (ischemic cardiomyopathy)
IGF-1	insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (insulin-like growth factor 1)
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
I/R	Ischämie und anschließende Reperfusion
k. A.	keine Angabe
KHK	koronare Herzerkrankung

---

Lmax	Muskellänge mit maximaler systolischer Kraftentwicklung
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NF	„non-failing“
Nitr.	Nitrate
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PCW	pulmonalkapillärer Verschlussdruck
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
upm	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization

# **1 Einleitung**

## **1.1 Herzinsuffizienz**

### **1.1.1 Definition der Herzinsuffizienz**

Das klinische Syndrom Herzinsuffizienz wird von der WHO (1995) in zweifacher Weise definiert: *Pathophysiologisch* besteht bei der Herzinsuffizienz ein Missverhältnis zwischen dem Bedarf der zu versorgenden Gewebe und dem vom Herzen geförderten Herzzeitvolumen. *Klinisch* liegt dann eine Herzinsuffizienz vor, wenn typische Symptome (Dyspnoe, Müdigkeit, Flüssigkeitsretention) bestehen, denen ursächlich eine kardiale Dysfunktion zugrunde liegt. Diese Dysfunktion kann durch Erkrankungen des Herzens selbst oder durch extrakardiale Störungen bedingt sein (WHO 1995, McMurray 1996, Hoppe und Erdmann 2001).

### **1.1.2 Epidemiologie der Herzinsuffizienz**

Die Herzinsuffizienz stellt eine der weltweit am häufigsten diagnostizierten Erkrankungen dar. Das Risiko, im Laufe des Lebens eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, liegt bei etwa 20% (Lloyd-Jones et al. 2002). In den westlichen Ländern treten bezogen auf die Gesamtpopulation jährlich 1-4/1000 Neuerkrankungen auf (McMurray und Stewart 2000). Die Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz steigt deutlich mit zunehmendem Alter. Während bei den 45-55-Jährigen weniger als 1% an einer Herzinsuffizienz erkrankt ist, leiden 2-5% der 65-75-Jährigen an dieser. Im Alter von über 80 Jahren sind in der Bevölkerung fast 10% betroffen (Hoppe und Erdmann 2001). Männer erkranken insgesamt häufiger als Frauen (Cowie et al. 1999).

## **1.2 Elektromechanische Kopplung und intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Homöostase in Kardiomyozyten**

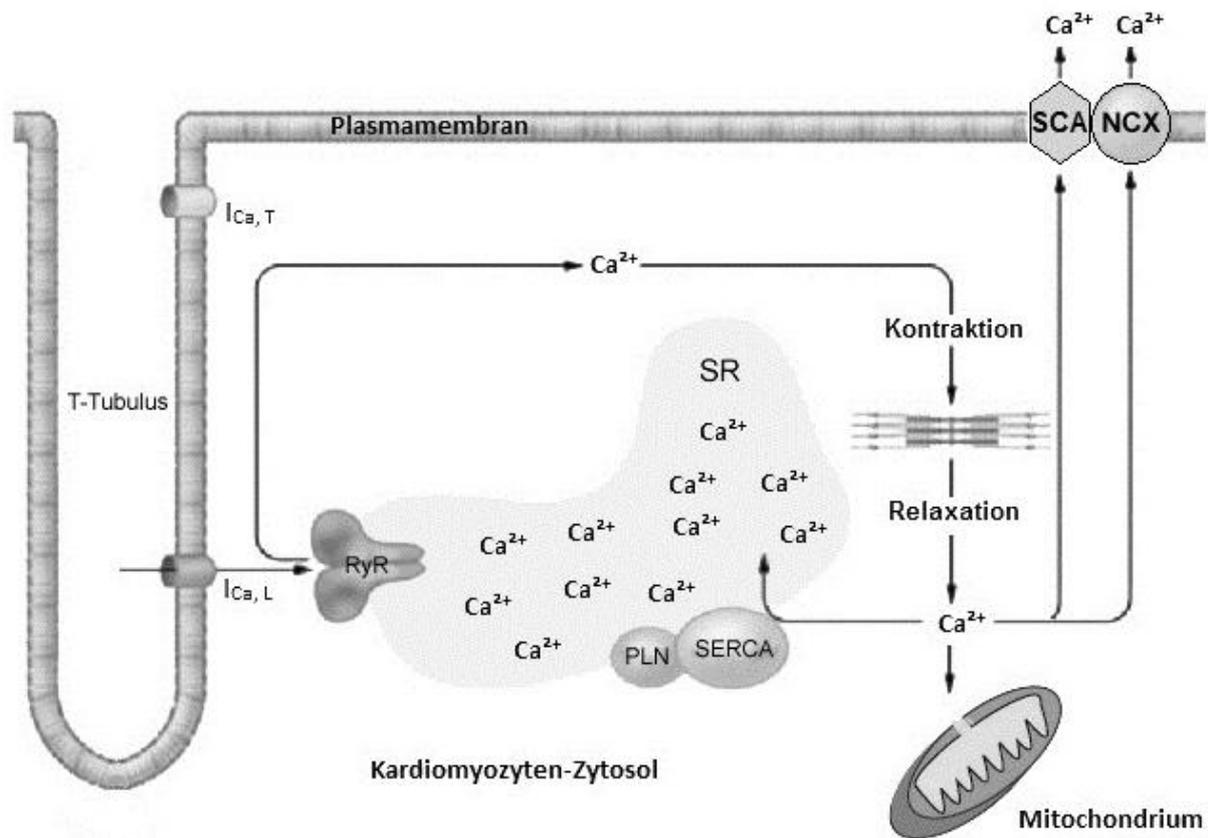
Die elektromechanische Kopplung bezeichnet die Prozesse in Herzzellen, die eine elektrische Erregung in eine Kontraktion als mechanische Antwort umsetzen. Hierbei sind Ca<sup>2+</sup>-Ionen essentiell. Sie dienen als „second messenger“ und haben eine zentrale Schlüsselfunktion (Ringer 1882, Bers 2002).

Durch ein fortgeleitetes Aktionspotential kommt es zur Membrandepolarisation der Kardiomyozyten. Die Depolarisation hat unter anderem zur Folge, dass

spannungsabhängige Kalzium-Kanäle (L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle = Dihydropyridin-sensitive Kalzium-Kanäle) geöffnet werden. Dadurch wird ein schwacher, dem Konzentrationsgradienten folgender  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle ermöglicht (Hess et al. 1986). Dieser Kalziumionen-Einstrom entspricht der Plateauphase des Aktionspotentials.

Die L-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die an der Membran der transversalen Tubuli (T-Tubuli) der Myozyten lokalisiert sind, befinden sich hier in enger räumlicher Beziehung zu den terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), welches einen wichtigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher der Zellen darstellt. An der Membran des SRs existieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle, die Ryanodin-Rezeptoren (RyR) (Bers und Stiffel 1993, Fruen et al. 1994). Während eines Aktionspotentials werden diese Kanäle durch einströmende  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktiviert und es resultiert eine massive  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, dem Konzentrationsgradienten folgend, aus dem SR in das Zytosol (Kalzium-induzierte Kalzium-Freisetzung) (Fabiatio 1983 und 1985; siehe auch Abb. 1.1).

Die freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen liegen nun im Sarkoplasma in Konzentrationen über dem Ruhewert von  $10^{-7}$  mol/L vor und binden an das Troponin C, was zu einer Konformationsänderung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes führt. Dadurch wird die Blockade der Bindungsstelle durch Tropomyosin aufgehoben und es kommt durch zyklische Querbrückenbildung unter ATP-Verbrauch zur Interaktion von Aktinfilamenten und Myosinköpfchen. Daraus resultiert eine Kontraktion bzw. Kraftentwicklung (Tobacman 1996, Kobayashi und Solaro 2005, Gordon et al. 2000). Für die folgende Relaxation müssen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vom kontraktilem Apparat dissoziieren und die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wieder gesenkt werden. Hierzu werden zum einen durch die sarkoplasmatische-Retikulum- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA)  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen unter ATP-Verbrauch zurück in das SR gepumpt (Martonosi und Feretos 1964). Zum anderen werden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Zytosol in den Extrazellulär-Raum über den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und über die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eliminiert. Zusätzlich wird Kalzium zu einem geringen Teil auch in Mitochondrien gespeichert (Bers et al. 1990, Bers und Bridge 1989).



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der Kalzium-Homöostase und der elektromechanischen Kopplung eines Kardiomyozyten: Kalzium strömt während des Aktionspotenzials über spannungsabhängige L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (I<sub>Ca,L</sub>) und den Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX) in die Zelle und induziert die Freisetzung einer größeren Kalzium-Menge aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) via Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Dieses Kalzium aktiviert die Myofilamente. Zur Relaxation wird Kalzium transsarkolemmal durch den Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauscher und die sarkolemmale Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SCA) eliminiert, über die Phospholamban-gesteuerte (PLN) SERCA ins SR transportiert und auch in Mitochondrien aufgenommen. Die transsarkolemmale Kalzium-Elimination via SCA und die mitochondriale Kalzium-Aufnahme sind für den Kalzium-Transport von Kontraktion zu Kontraktion von untergeordneter Rolle.

Eine zunehmende Anzahl von Untersuchungen in Tiermodellen und an insuffizientem menschlichen Myokard konnte in den letzten Jahren zeigen, dass Störungen der elektromechanischen Kopplung und der intrazellulären Kalzium-Homöostase einen zentralen Pathomechanismus für die Entstehung und Progression der diastolischen und systolischen Dysfunktion im Rahmen der Herzinsuffizienz darstellen. Übereinstimmend wurde bei der Herzinsuffizienz eine verminderte SR-Ca<sup>2+</sup>-Wiederaufnahme gefunden. Dies kann mit dem Befund einer verminderten Expression und Aktivität der SR-Ca<sup>2+</sup>-Pumpe, SERCA2a, erklärt werden (Meyer et al. 1995). Einerseits führt dies über eine verminderte Kalzium-Beladung des SR zu einer

geringeren systolischen Kalzium-Freisetzung und damit zu einer Abnahme der Kontraktilität (negativ inotroper Effekt). Andererseits resultiert daraus auch eine verzögerte Abnahme der diastolischen intrazellulären Kalzium-Konzentration, wodurch die Relaxation behindert wird (negativ lusitroper Effekt) (Lompré et al. 2011).

### **1.3 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine)**

Statine sind HMG-CoA-Reduktase-Hemmer, mit denen erstmalig 1987 mit der Einführung von Lovastatin die Gesamt- und LDL-Cholesterinkonzentration im Plasma sehr effektiv gesenkt werden konnte (Krukemyer und Talbert 1987).

#### **1.3.1 Pharmakokinetik von Pravastatin**

Statine besitzen ein sogenanntes HMG-Modul, das dem 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl strukturell sehr ähnelt. Bei Simvastatin liegt es beispielsweise als inaktives lipophiles Lacton vor und wird während des hepatischen „First-Pass“ zu einer Hydroxysäure hydrolysiert und so in seine aktive Wirkform überführt. Dieses Lacton kann aber auch nach Resorption durch unspezifische Esterasen zur aktiven  $\beta$ -Hydroxysäure hydrolysiert werden. Pravastatin dagegen liegt bereits als Natriumsalz in seiner aktiven Form der  $\beta$ -Hydroxysäure vor und ist damit hydrophil (Pan 1991, Kai et al. 2008).

Pravastatin wird als Einzeldosis zwischen 10-40 mg abends verordnet. Der LDL-senkende Effekt beträgt dabei in der Tagesmaximaldosis ca. 30-35 %. Dabei sinken die Triglyceride um 10-25%, während der HDL-Anteil um 10-25 % ansteigt. Nach oraler Einnahme wird es bis zu 34 % absorbiert und es hat eine orale Bioverfügbarkeit von 17 % (Pan 1991).

Pravastatin findet sich im Vergleich zu andere Statinen in der Leber in niedrigerer Konzentration, während die Konzentration in extrahepatischem Gewebe dagegen über der der anderen Statine liegt. Die Elimination erfolgt zu 70 % über die Fäzes und 20 % über die Niere (Aktories et al. 2005).

#### **1.3.2 Pharmakodynamik und pleiotrope Effekte der Statine**

Diese Substanzklasse hemmt kompetitiv die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymA-Reductase (HMG-CoA-R), das Schlüsselenzym der endogenen Cholesterinbiosynthese, sodass die Reduktion von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA

zu Mevalonsäure blockiert wird. Kompensatorisch kommt es allerdings zu einer erhöhten Cholesterinaufnahme aus dem Blut. Dies wird durch eine erhöhte Transkription des LDL-Rezeptor-Gens und damit der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche der Hepatozyten erreicht (Holmes und Kritchevsky 1985).

Die dosisabhängige Reduktion von Gesamt- und LDL-Cholesterin im Blutplasma um bis zu 50% sowie die Reduktion von Triglyceriden um bis zu 25% sind entscheidende Effekte der Statine (Lennernäs und Fager 1997). Zusätzlich haben einige große klinische Studien gezeigt, dass Statine die Morbidität und Mortalität bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung deutlich senken können (The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group 1998, Scandinavian Simvastatin Survival Study 1994, Sacks et al. 1996).

Darüber hinaus konnten durch zahlreiche Studien eine Reihe weiterer Wirkungen nachgewiesen werden, die als pleiotrope Effekte bezeichnet werden und die im Einzelnen hinsichtlich des Wirkmechanismus noch nicht im Detail aufgeklärt sind (Nakao et al. 2007, Liu et al. 2009). Hierzu gehören Effekte wie Antioxidation, Immunmodulation, Neuroprotektion und antithrombotische sowie vaskuloprotektive Eigenschaften. Diese Wirkungen werden unter anderem auf eine Verbesserung der Endothelfunktion (Landmesser et al. 2005, Fichtlscherer et al. 2006), eine Stabilisierung von arteriosklerotischen Plaques sowie auf eine gesteigerte Angiogenese zurückgeführt (Mathur et al. 2008, Lefer et al. 2001). Auch die Verbesserung der kardialen Funktion sowie des linksventrikulären Remodeling nach einem Myokardinfarkt oder im Rahmen einer ischämischen Herzinsuffizienz-Erkrankung sind postulierte positive Eigenschaften der Statine, die als unabhängig von der Lipidsenkung beschrieben wurden (Ichihara S et al. 2006, Bauersachs et al. 2001, Horwich et al. 2004). Andere Untersuchungen sprechen für eine Verbesserung der kardialen Funktion durch Statine auch bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (Node et al. 2003). Weitere Studienergebnisse untermauern nicht-kardiovaskuläre Statin-Effekte, die ebenfalls unabhängig von der Cholesterinsenkenenden Wirkung sind. Beispielsweise sprechen Ergebnisse, die eine Reduktion der Aktivität der rheumatischen Arthritis oder eine Abnahme der Häufigkeit von Schüben einer Multiplen Sklerose durch Statine beschreiben, für immunmodulierende und antiinflammatorische Effekte der Statine (McCarey et al. 2004, Sena et al. 2003, Vollmer et al. 2004).

Bekannt ist, dass Statine durch die Inhibition von HMG-CoA gleichzeitig die Synthese von Isoprenoiden, wie Farnesylpyrophosphat (FPP) oder Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) hemmen. Es handelt sich dabei um intrazelluläre Lipide, die zu der post-translationalen Modifikation von Proteinen, wie Ras, Rho oder anderen Signalmolekülen aus der Familie der kleinen GTPasen, dienen und sie dadurch aktivieren können (Laufs und Liao 1998, Laufs et al. 2000, Liao 2002). Diese von Isoprenoiden abhängigen Proteine machen etwa 2 % der intrazellulären Proteine aus und sind an diversen Signalkaskaden beteiligt (Sawada et al. 2001, Wang CY et al. 2008). Sie sind wichtige Regulatoren von diversen intrazellulären Signalkaskaden und haben damit einen regulierenden Einfluss unter anderem auf Wachstum, Zellmigration, Zytokinsynthese, Gentranskription und intrazellulären Molekültransport (Bishop und Hall 2000, Burridge und Wennerberg 2004). Statine könnten also durch Hemmung der Isoprenylation in diese wichtigen Zellprozesse eingreifen und pleiotrope Effekte, unabhängig von der lipidsenkenden Wirkung, hervorrufen (Liao 2002).

In der Tat gelingt es, in aktuellen Studien immer neue pleiotrope Effekte der Statine zu charakterisieren, die häufig mit der Inhibition der Isoprenoidfunktion in Zellen unterschiedlichen Gewebes assoziiert sind und mit einer Veränderung der Aktivität der nachgeschalteten Signalkaskaden einhergehen (Liu et al. 2009, Wang CY et al. 2008, Liao et al. 2009, Beltowski et al. 2009). Beispiele hierfür sind, wie oben genannt, die Signalkaskaden, an denen die kleinen GTPasen der Rho- oder Ras-Familie beteiligt sind.

Rho reguliert über nachgeschaltete Proteine eine Reihe von Zellprozessen, wie die Produktion von Zytokinen, die Formation und Erhaltung des Aktin-Zytoskeletts und dadurch den intrazellulären Molekültransport und die Gentranskription. Die Rho-assoziierte-Protein-Kinase (ROCK) ist eine der von Rho regulierten Kinasen. Sie kann beispielsweise die Myosin-Leichtkette-Phosphatase phosphorylieren und dadurch hemmen, was zu einer Erhöhung der Kalziumsensitivität der Myofilamente der glatten Muskelzellen führt (Uehata et al. 1997, Liao et al. 2009). In-vitro-Experimente implizieren, dass Statine über diesen Mechanismus die Kontraktion der glatten Muskulatur der Gefäße reduzieren und dadurch einer Hypertension entgegen wirken könnten (Ito et al. 2006, Laufs et al. 2000).

Außerdem wurden an transgenen Kaninchen, bei denen die Expression der  $\beta$ -Myosin-Heavy-Chain ( $\beta$ -MHC) gentechnisch moduliert wird, und die als Modell einer

hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) dienen, pleiotrope Effekte von Simvastatin charakterisiert. Die Ergebnisse sprechen für eine Regression der kardialen Hypertrophie und Fibrose, die als Hauptursachen für die Mortalität der HCM gelten (Patel et al. 2001). Diese Ergebnisse bestätigen andere Studien, die ebenfalls einen positiven Effekt von Simvastatin auf die kardiale Hypertrophie-Entwicklung beschreiben (Luo et al. 1999, Oi et al. 1999). Zwar konnte für den HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Pravastatin kein signifikanter Benefit für die linksventrikuläre Hypertrophie oder den Bluthochdruck in Dahl-Salz-sensitiven Ratten gezeigt werden. Jedoch fand sich bei Tieren, die zusätzlich mit einer hohen Pravastatindosis (100 mg/Kg/Tag) behandelt wurden, im Vergleich zu den nur mit 8%iger NaCl-Diät gefütterten Ratten unter anderem eine Verbesserung der diastolischen und systolischen Funktion, eine höhere Überlebensrate, eine signifikante Hemmung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose sowie eine Reduktion der Translokation der kleinen GTPasen Rac1, H-Ras und RhoA in die Zellmembran (Ichihara S et al. 2006).

Deshalb ist es denkbar, dass Pravastatin über pleiotrope Effekte in wichtige Signalkaskaden der Kardiomyozyten eingreift und darüber einen positiven Einfluss auf die Pathogenese der Herzinsuffizienz vermittelt.

#### **1.4 PI3K-Akt-Protein-Kaskade**

Neben der beschriebenen Hemmung pro-hypertropher Signaltransduktionswege ist es interessant zu spekulieren, ob Statine, im Besonderen Pravastatin, ihre Wirkung zusätzlich über eine Aktivierung von sogenannten „cell-survival-pathways“ entfalten können. Eine Schlüsselrolle nimmt dabei die PI3K-Akt-Signalkaskade ein.

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) produzieren nach Aktivierung durch Phosphorylierung der Phosphoinositiden an der 3-D-Position intrazelluläre „Second-messenger“. Diese beeinflussen eine Vielzahl von nachgeschalteten Signalkaskaden, die eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler biologischer Schlüsselfunktionen spielen, wie beispielsweise bei der Zellproliferation, -migration, -differenzierung oder –apoptose.

Eines dieser nachgeschalteten regulierenden Proteine ist die Protein-Kinase B (PKB) oder auch Akt genannt, die unter anderem am Schutz der Zelle vor Apoptose

beteiligt ist und eine adaptive Hypertrophie zu induzieren vermag (Downward 1995, Franke et al. 1995, Franke et al. 1997).

Akt kann das N-terminale Ende der Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3 $\beta$ ) phosphorylieren und damit ihre Aktivität maßgeblich reduzieren. In vivo führt eine Aktivierung von Akt, die ihrerseits durch PI3K aktiviert wurde, tatsächlich zu einer Phosphorylierung von GSK3 $\beta$ , wodurch ihre Aktivität gehemmt wird. Mittels dieser Signalkaskade induziert beispielweise Insulin, als PI3K-Aktivator, eine intrazelluläre Glykogen-Synthese (Cross et al. 1995).

Über eine Inhibition, d.h. vermehrte Phosphorylierung, spielt die GSK3 $\beta$  im Herzen unter anderem eine Rolle bei dem post-natalen Wachstum und der Induktion der physiologischen Hypertrophie der Kardiomyozyten (Hardt und Sadoshima 2002, Michael et al. 2004). Auch auf die Gentranskription, die Proteintranslation, die Zelldifferenzierung sowie den Zellzyklus hat diese Kinase regulierenden Einfluss (Hardt and Sadoshima 2002). Der GSK3 $\beta$  sind nachweislich verschiedene Transkriptionsfaktoren (CREB, NF- $\kappa$ B,  $\beta$ -Catenin) nachgeschaltet, die unter anderem einen Einfluss auf die Apoptose haben. Dabei ist wiederum wichtig zu bemerken, dass die GSK3 $\beta$  letztgenannte Effekte nur in ihrem aktiven, d.h. dephosphorylierten Zustand, vermittelt (Cross et al. 1995, Hardt und Sadoshima 2002).

Die HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (Statine) zeigen, wie bereits oben genannt, eine ganze Reihe von kardiovaskulär-protectiven, pleiotropen Effekten. Neuere Studien implizieren, dass zumindest ein Teil dieser Effekte über die Aktivierung der antiapoptotischen PI3K-Akt-Signalkaskade vermittelt werden (Kureishi et al. 2000, Nakao et al. 2007, Sanada et al. 2004, Verma et al. 2004). Diese Ergebnisse werden zum einen dadurch untermauert, dass Statine, wie oben beschrieben, einen hemmenden Einfluss auf die Rho/ROCK-Signalkaskade haben, wobei ROCK über eine Hemmung der Akt-Aktivität die Zellapoptose reguliert (Chang et al. 2006). Zum anderen deutet eine Reihe an Untersuchungen an, dass Statine die PI3K-Akt-Signalkaskade in Endothelzellen aktivieren können (Kureishi et al. 2000, Ming et al. 2002, Nakao et al. 2007, Li et al. 2009, Li und Xu 2009, Wang J et al. 2005).

Ob Statine die antiapoptotische PI3K-Akt-Signalkaskade auch in adulten Kardiomyozyten aktivieren können, ist noch nicht eindeutig geklärt. Bergmann und Kollegen konnten an isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten zeigen, dass Statine eine durch Wortmannin (PI3K-Hemmer) blockierbare Akt-Aktivierung

bewirken. Über diese Signalkaskade kann möglicherweise eine Inaktivierung von GSK3 $\beta$  durch Phosphorylierung erreicht werden. Dies wiederum führt zu einer Abnahme von Hypoxie-induzierter Apoptose in isolierten Ratten-Kardiomyozyten. Ferner konnte auch in vivo bei Ratten, die intravenös mit Pravastatin behandelt wurden, eine akute Erhöhung der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung und Reduktion der GSK3 $\beta$ -Aktivität gemessen werden (Bergmann et al. 2004).

Ob Statine über diese Signalkaskade auch einen Einfluss auf die Expression von SERCA ausüben, ist bisher noch nicht geklärt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Simvastatin sowohl die Gen- als auch die Proteinexpression von SERCA in Zellkulturen aus neonatalen Ratten-Kardiomyozyten erhöht (Zheng und Hu 2005). Ferner konnte unsere eigene Arbeitsgruppe zeigen, dass Ausdauertraining zu einer Akt-vermittelten Steigerung der SERCA-Expression führt (Schmidt et al. 2009). Zusätzlich wurde von Michael et al. durch Untersuchungen an Ratten GSK3 $\beta$  als Regulator der SERCA2a-Expression im Herzen identifiziert (Michael et al. 2004).

Eine Aktivierung von Akt führt ferner zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase). Die eNOS ist für die Produktion von endotheliale NO verantwortlich (Ming et al. 2002). Bei einer Endothel-Dysfunktion im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen sind die eNOS-Aktivität und dadurch gleichzeitig auch die Synthese sowie Freisetzung von endotheliale NO deutlich reduziert (Förstermann und Münzel 2006). Aktuelle Studien deuten auf kardiovaskulär-protective Eigenschaften der verschiedenen, sowohl hydrophilen als auch lipophilen Statine hin, die zumindest anteilig über eine Aktivierung von eNOS durch eine Erhöhung von dessen Phosphorylierungsgrad erklärt werden könnten (Manickavasagam et al. 2007, Matsuda et al. 2006, Ohkita et al. 2006, Urbich und Dimmeler 2005). Beispielsweise implizieren in-vitro-Untersuchungen mit Endothel-Zellkulturen, dass es durch Pitavastatin zu einer PI3K-Akt-vermittelten eNOS Aktivierung kommt, wodurch die NO-Produktion erhöht wurde (Wang J et al. 2005, Wang J et al. 2008). Auch nach einer Inkubation von Endothelzellen mit Simvastatin (10  $\mu$ M/L, 2 h) konnte eine signifikante Erhöhung der eNOS-Aktivität assoziiert mit einer erhöhten Phosphorylierung von Akt verzeichnet werden (Li et al. 2009). In vitro löste Pravastatin (10  $\mu$ M) in isolierten Endothelzellen aus der Aorta von Rindern eine akute, durch Wortmannin (PI3K-Inhibitor) supprimierbare Erhöhung der

Phosphorylierung von eNOS und Akt aus, die mit einer vorübergehend messbaren Erhöhung der NO-Freisetzung verbunden war (Harris et al. 2004). Zu ähnlichen Aussagen kommt auch eine japanische Arbeitsgruppe, die zeigen konnte, dass bei Salz-sensitiven Ratten durch längerfristige Behandlung mit Pravastatin eine pathophysiologisch reduzierte eNOS-Aktivität signifikant verbessert wurde, was mit einer vermehrten Akt-Phosphorylierung assoziiert war (Yamamoto et al. 2007).

Ob diese Effekte der Statine auch in Herzzellen stattfinden, ist bisher noch nicht geklärt. In-vivo-Untersuchungen mit Simvastatin deuten auf eine akute Erhöhung der eNOS-Aktivität über die PI3K-Akt-Signalkaskade in einem Ischämie-Reperusionsmodell in Ratten hin (Wolfrum et al. 2004). Andere aktuelle Untersuchungen konnten zeigen, dass es in isolierten Ratten-Herzen nach einer provozierten Ischämie und anschließenden Reperfusion durch pharmakologische Suppression von ROCK zu einer PI3K-Akt-eNOS abhängigen akuten Reduktion der Infarktgröße kam (Hamid et al. 2007). Unabhängig davon haben Verma et al. zeigen können, dass Pravastatin in einem Modell für Hypoxie und Reoxygenierung in isolierten humanen rechtsventrikulären Kardiomyozyten (wodurch eine Überlagerung mit Effekten aus Endothelzellen weitgehend ausgeschlossen ist) protektive Eigenschaften gegenüber Zellapoptose besitzt. Die Daten demonstrieren dabei eine durch Pravastatin induzierte Erhöhung von NO unter akuter Hypoxie und anschließender Reoxygenierung sowie eine signifikante Abschwächung der durch NOS-Blockade induzierten Kardiomyozytenschädigung. Diese Effekte waren mit einer statistisch signifikanten Erhöhung der Akt-Aktivität assoziiert (Verma et al. 2004). Daher ist es denkbar, dass Statine eine Akt-Aktivierung auslösen und dadurch unter anderem die Phosphorylierung der kardialen eNOS beeinflussen.

### **1.5 Ziele dieser Arbeit**

3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Inhibitoren (HMG-CoA-RI), die in den Cholesterinstoffwechsel eingreifen und lipidsenkend wirken, sind feste Bestandteile einer Therapie, die Morbidität und Mortalität der koronar-arteriellen Erkrankungen reduzieren. Aktuelle Studien lassen zudem die Vermutung zu, dass Statine über die cholesterinsenkende Wirkung hinaus einen günstigen Einfluss auf den Verlauf einer nicht-ischämischen Herzinsuffizienz haben. Eine Reihe von nicht-kardialen pleiotropen Effekten wurde mittlerweile beschrieben, die dafür verantwortlich sein könnten. Allerdings gibt es bisher wenige Informationen zu der

Frage, welche direkten Effekte Statine auf adulte Kardiomyozyten und insbesondere auf humane Herzmuskelzellen haben. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass Statine in vitro akut bzw. subakut die antiapoptotisch wirkende Signalkaskade PI3K/Akt aktivieren können (Kureishi et al. 2000, Bell und Yellon 2003). Diese ist im aktiven Zustand in der Lage, GSK3 $\beta$  in Kardiomyozyten zu phosphorylieren (Bergmann et al. 2004). GSK3 $\beta$  wiederum ist an der Regulation der SERCA-Expression beteiligt (Michael et al. 2004). Unklar ist, ob Statine diese Signalkaskade langfristig aktivieren und damit einen Einfluss auf die SERCA-Expression haben. SERCA, als wichtiges Enzym des intrazellulären Kalziumstoffwechsels, spielt eine entscheidende Rolle bei der Herzinsuffizienz.

Eine Reihe an Studien, wie oben im Detail beschrieben, konnte zeigen, dass Statine die Endothelfunktion durch die Aktivierung der PI3K-Akt-eNOS-Kaskade in Endothelzellen signifikant verbessern. Ob Statine auch in Kardiomyozyten über Beeinflussung der eNOS-Aktivität die Freisetzung von NO erhöhen, ist bisher nicht nachgewiesen.

Aus diesen Überlegungen heraus lassen sich zwei Hypothesen stellen:

Hypothese I: Pravastatin beeinflusst akut oder mittelfristig die Kontraktilität von humanem Vorhof- oder Ventrikelmyokard.

Hypothese II: Pravastatin beeinflusst die Zell-protective Akt-GSK3-Signalkaskade in adulten Kardiomyozyten.

Ziele dieser Arbeit waren daher:

1. Die Charakterisierung des direkten Effekts von Pravastatin auf das Kontraktionsverhalten in isolierten Trabekeln aus insuffizientem und nicht-insuffizientem Humanmyokard.
2. Die Charakterisierung der mittel- bzw. langfristigen Wirkung von Pravastatin auf die Aktivität der PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ -Signalkaskade in isolierten Trabekeln aus insuffizientem Humanmyokard und isolierten adulten Kardiomyozyten aus Kaninchenmyokard.

3. Die Beantwortung der Frage, ob Pravastatin die eNOS-Aktivität bzw. NO-Freisetzung in adulten isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten beeinflusst.
4. Die Charakterisierung des Einflusses von Pravastatin auf die SERCA-Expression in isolierten Trabekeln aus insuffizientem Humanmyokard und isolierten Kardiomyozyten aus Kaninchenmyokard.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Untersuchtes Herzgewebe**

Die Versuche dieser Arbeit wurden an gesunden Kaninchen-Kardiomyozytenzellkulturen, an isolierten humanen Vorhoftrabekeln sowie an terminal insuffizientem Human-Myokard durchgeführt.

#### **2.1.1 Kaninchen-Myokard**

Für die Zellkulturexperimente eingesetzte Kaninchen-Vorhofmyozyten wurden aus Chinchilla-Bastard-Kaninchen aus der Tierhaltung des Universitätsklinikums Göttingen gewonnen. Die Isolation dieser primären Zellkultur wurde durch enzymatische Dissoziation gemäß einem etablierten Standard-Protokoll in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Hasenfuß durchgeführt und freundlicherweise zur Verwendung für wissenschaftliche Zwecke im Rahmen dieser Arbeit bereitgestellt (Schillinger et al. 2000, Wagner et al. 2003).

#### **2.1.2 Menschliches Vorhofgewebe**

Das Vorhofgewebe stammte von 5 Patienten der Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Herzzentrums der Universitätsklinik Göttingen, die sich einer Bypass-Operation und/oder einer Herzklappenersatz-Operation unterziehen mussten (siehe Tab. 2.1 Patient 1-5). Das Gewebe wurde intraoperativ, noch vor der Kardioplegie, bei der Kanülierung zum Anschluss des Patientenherzens an die Herz-Lungen-Maschine aus dem rechten Herzohr gewonnen.

#### **2.1.3 Menschliches Ventrikelgewebe**

Das Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen in Bad Oeynhausen sowie die Abteilung Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Georg-August-Universität Göttingen stellten die explantierten Herzorgane von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz im Stadium NYHA III/IV bzw. die Organspenderherzen, die aus technischen Gründen nicht implantiert werden konnten, zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Ergebnisse aus insgesamt 30 Ventrikel-Muskelstreifen (Trabeculae carneae) aus der rechten und linken Herzkammer von 15 Patienten untersucht. Patientendaten, präoperative hämodynamische Parameter sowie Medikation sind, soweit bekannt, in Tabelle 2.1 wiedergegeben (Patient 6-20). Für die Western-Blot-Analysen stammt das „non-failing“ Herzventrikelgewebe aus den Patienten 21-27.

Patient	♀ / ♂	Alter	Erkrankung	EF (%)	PCW (mmHg)	CI (l/mm <sup>2</sup> )	Medikation
1	w	75	KHK, D.m.	k.A.	k.A.	k.A.	Diu, BB, Ca <sup>+</sup> A
2	m	54	KHK, HypLip, HRST	k.A.	k.A.	k.A.	BB, ST
3	w	77	KHK, HRST, D.m.	k.A.	k.A.	k.A.	BB,Diu,
4	m	78	KHK, HRST, D.m.	65	k.A.	k.A.	Dig,Diu,BB,ACEH,Ca <sup>+</sup> A,ST
5	w	54	KHK, HypCho	50	k.A.	k.A.	BB, ACE-H, AT <sub>1</sub> A, Nitr.,ST
6	m	53	DCM	19	19	1,7	BB, ACE-H, Dig, Diu, Nitr.
7	m	61	DCM	30	20	2,51	BB, ACE-H, Dig, Diu, ST
8	m	62	DCM	31	18	2,5	Diu, BB, ST
9	m	70	KHK, HypCho, D.m.	15	k.A.	k.A.	BB, Diu, ACE-H
10	w	47	DCM	21	21	1,7	Dig, ACE-H, BB
11	m	58	ICM	35	25	1,33	Diu, ACE-H, BB, Ca <sup>+</sup> A
12	m	66	KHK, HypLip	24	5	2,22	Diu, ACE-H, BB
13	w	66	DCM, D.m.	30	k.A.	1,8	Diu, Dig, ACE-H, ST
14	m	38	DCM	44	24	1,94	Diu, BB
15	m	53	DCM	20	12	1,71	Diu, BB, Nitr.
16	m	53	DCM	24	24	1,18	AT <sub>1</sub> A,Diu,Dig,ACE-H,BB
17	m	63	KHK	25	k.A.	k.A.	Diu, Dig, ACE-H
18	m	64	ICM	10	k.A.	k.A.	ACE-H, BB, Diu,
19	w	69	DCM	27	22	1,64	Dig, Diu, ACE-H, BB, Nitr.
20	m	54	DCM	15	27	1,8	Diu, BB
21	m	18	NF	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
22	m	26	NF	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
23	w	55	NF	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
24	w	57	NF	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
25	m	34	NF	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
26	w	58	NF	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
27	w	k.A.	NF	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
28	w	k.A.	NF	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

**Tab. 2.1:** Patientendaten zu den untersuchten Humanherzen. Angabe der präoperativen hämodynamischen Parameter und Medikation;

**Abkürzungen:** ACE-H: ACE-Hemmer, AT<sub>1</sub>A: Angiotensin-Antagonist, BB: Betablocker, Ca<sup>+</sup>A: Calciumantagonist, CI: Cardiac Index = Herzminutenvolumen/Körperoberfläche (l/min/m<sup>2</sup>), DCM: dilatative Kardiomyopathie, Diu: Diuretika, Dig: Digitalisglykoside, D. m.: Diabetes mellitus, EF: Ejektionsfraktion (%), ICM: ischämische Kardiomyopathie, HRST: Herzrhythmusstörung, HypCho: Hypercholesterinämie, HypLip: Hyperlipidämie, k.A.: keine Angabe, KHK: koronare Herzerkrankung, NF: nicht-insuffiziente Herzen, Nitr.: Nitrate, PCW: pulmonal kapillärer Verschlussdruck (mmHg).

Alle Patienten gaben vorher ihre Einwilligung zur Entnahme und Verwendung von Myokardproben für wissenschaftliche Zwecke. Sowohl die Untersuchungen am menschlichen Myokard als auch die Versuche an den Tierherzen wurden von der Ethikkommission der Georg-August-Universität Göttingen geprüft und genehmigt (AZ 31/9/00 und 21/10/00).

## 2.2 Muskelphysiologische Untersuchungen

### 2.2.1 Materialien und Geräte

#### 2.2.1.1 Chemikalien

2,3-Butandion-Monoxim (BDM)	Sigma, München
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
H-Insulin (Altinsulin)	Hoechst AG
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Riedel-de Haën, Seelze
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck, Darmstadt

#### 2.2.1.2 Technische Geräte

4-Kanal-Thermoschreiber Linearcorder WR 3320	Graphtec, Irvine, USA
Mikrometerschraube	Mituyo, Japan
Peristaltische Rollenpumpe Ismatec MS-CA	Ismatec, Zürich
Kraftaufnehmer und Verstärker	Scientific Instruments, Heidelberg
Stereomikroskop SD30	Olympus, Taiwan
Stimulationseinheit	Scientific Instruments, Heidelberg
Thermometer Digi-sense	Cole-Parmer, VernonHills, USA
Umwälzthermostat Haake K 15	Haake, Karlsruhe

### 2.2.2 Transport und Präparation

#### 2.2.2.1 Tyrodelösung

Die für Transport, Aufbewahrung und Präparation des Gewebes verwendete Lösung ist eine modifizierte Krebs-Henseleit-Pufferlösung (kurz: Tyrode) und setzt sich wie folgt zusammen:

Tyrodellösung:

NaCl	127 mM
KCl	2,3 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,2 mM
Glucose	11,2 mM
Altinsulin	5 I.E./l

Zur Oxygenierung und pH-Wert-Einstellung auf einen pH von 7,4 wurde die Tyrodellösung stets mit Carbogengas (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast. Außerdem wurde die Lösung bis zum Versuchsbeginn mit 30 mM 2,3-Butandion-Monoxim (BDM) versetzt und eisgekühlt (Pieske et al. 1999).

**2.2.2.2 Kardioplegie**

Durch lange Transportzeiten kann eine Energiedepletion der Kardiomyozyten eintreten. Ferner kann es durch eine präparationsbedingte Traumatisierung zu einer Kalziumfreisetzung und –überladung mit nachfolgender Kontraktur kommen.

Durch den Zusatz von 30 mM 2,3-Butandion-Monoxim (BDM) in der Tyrodellösung wird die Depletion der Energievorräte minimiert. Außerdem schützt die Phosphatase BDM vor einer Kontraktur, da sie eine Desensitivierung der kontraktilen Proteine für Kalzium (Mulieri et al. 1989) sowie eine reversible Hemmung der Querbrückeninteraktionen zwischen Aktin und Myosin bewirkt (Blanchard et al. 1984, Mulieri und Alpert 1984, Blanchard et al. 1988). Diese kardioplegischen Effekte von BDM sind durch Ausspülen vollständig reversibel (Fryer et al. 1988).

**2.2.2.3 Transport**

Unmittelbar nach der Entnahme bzw. nach der Explantation des Empfängerherzens wurde das Gewebe in die kardioplege, BDM-haltige und mit Carbogen begaste Tyrodellösung überführt. In dieser Lösung wurde das Herzgewebe transportiert und präpariert. Die Transportdauer von Bad Oeynhausen in das Labor für Molekulare Kardiologie des Universitätsklinikums Göttingen betrug ca. vier Stunden bzw. 5-10 Minuten aus dem Operationssaal des eigenen Hauses. Das explantierte Herz wurde

während des Transports eisgekühlt und bei einer Temperatur von etwa 4 °C in das Labor gebracht. Die Tyrodelösung wurde alle 4 Stunden erneuert.

#### **2.2.2.4 Präparation**

Die Präparation von Vorhof- und Ventrikelmyokard erfolgte mit Hilfe eines Stereomikroskops mit zehnfacher Vergrößerung und mikrochirurgischen Scheren und Pinzetten. Es wurden möglichst lange Trabekel mit einer Querschnittsfläche < 0,8 mm<sup>2</sup> aus der Vorhof- bzw. Ventrikelwand heraus präpariert. Bei einer größeren Querschnittsfläche besteht die Gefahr, dass die Trabekel im Inneren hypoxisch werden (Koch-Weser und Blinks 1963, Paradise et al. 1981). Außerdem wurde versucht, T-förmige Endstücke („meat-end“) zu dissezieren, die als Widerlager bei der Installation („Einhängen“) im Organbad dienten. Für die Messungen mit Vorhofgewebe wurden möglichst dünne, unverzweigte Trabekel aus dem Herzohrgewebe herausgeschnitten (durchschnittliche Querschnittsfläche: 0,6±0,05 mm<sup>2</sup>). Sichtbar stark fibrosierte Trabekel wurden vermieden. Nach der Präparation verblieben die Trabekel mindestens für 10 Minuten in der Kardioplegie-Lösung (Erholung von einer möglichen Traumatisierung unter BDM-Protektion).

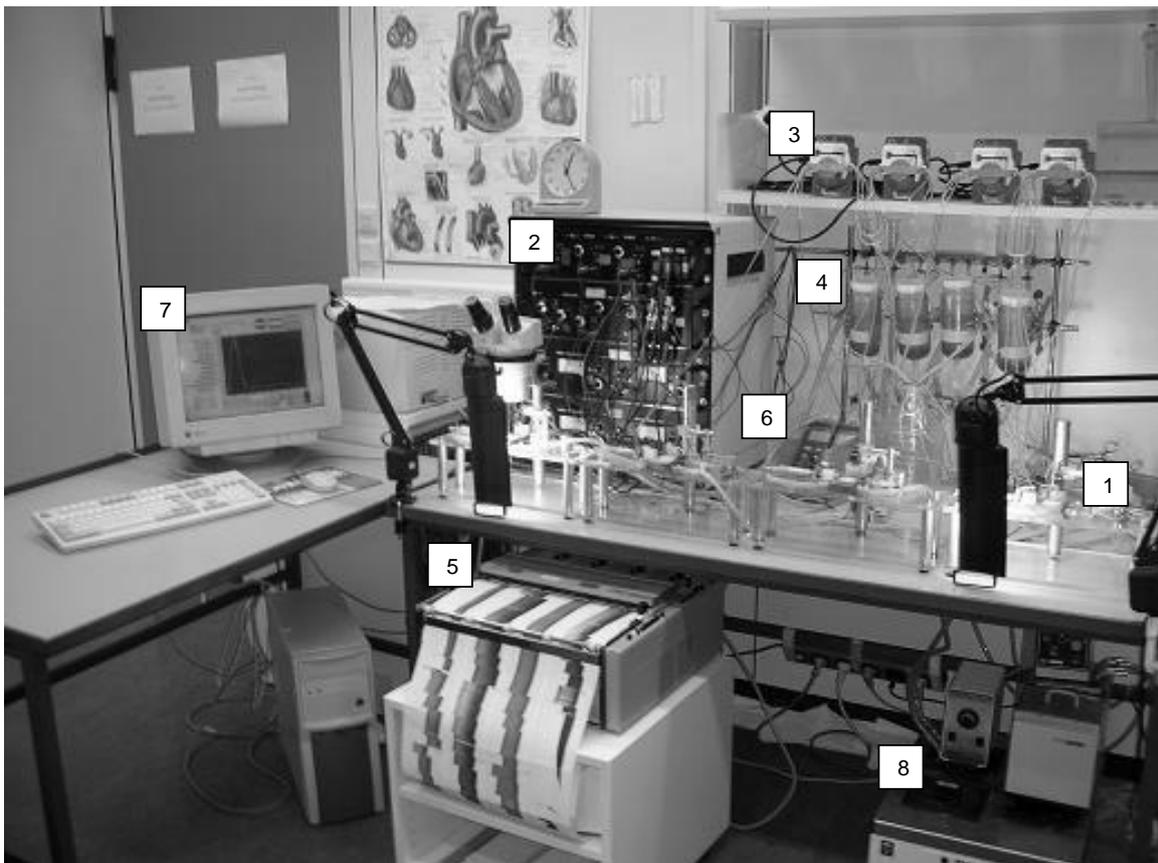
#### **2.2.3 Versuchsaufbau**

Die wichtigsten Komponenten der Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktion zeigt die Abbildung 2.1. Die Anlage ermöglicht die simultane Messung von vier Herzmuskelstreifen. Zentrales Element der Versuchsanordnung ist das Teflon-Organbad (Nr. 1 in der Abb. 2.1) mit folgenden Maßen: Länge von 21 mm x Breite von 8 mm x Höhe von 3 mm. Durch eine peristaltische Rollenpumpe angetrieben, wird über zuführende Schläuche die begaste Tyrodelösung von einem Vorratsgefäß zum Organbad und von dort wieder über den Abflussschlauch in das Reservoirgefäß zurückgepumpt. Die Förderleistung der Pumpe wurde auf 5,7 ml/min eingestellt. Damit wurde das Badvolumen (0,504 ml) ca. alle 5 s erneuert. Sowohl die Schläuche als auch das Vorratsgefäß sind doppelwandig und werden im äußeren Lumen im Gegenstromprinzip mit Wasser auf 37°C erwärmt.

Links neben dem Organbad ist eine Mikrometerschraube und rechts ein optomechanischer Kraftaufnehmer installiert. Dieser Kraftaufnehmer mündet im Niveau des Organbeckens in einem hakenförmig gekrümmten Platindraht. Die Mikrometerschleife endet auf der Gegenseite ebenfalls in einem spitzen Haken.

Platindraht und Haken waren mit der Stimulationseinheit elektrisch verbunden und bildeten zusammen die Elektroden zur Stimulation der Trabekel. Die verstärkten Signale, ausgehend von dem Kraftaufnehmer, wurden sowohl auf einem 4-Kanal-Thermoschreiber als auch auf einem Personal Computer mit dem dafür entwickelten Modul der Software Labview® erfasst und ausgewertet.

Alle Versuche wurden bei einer konstanten Temperatur von 37°C durchgeführt. Die Temperatur wurde mit einer im Organbad eingetauchten Messsonde kontrolliert.



**Abb. 2.1:** Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktionen: (1) Organbäder, (2) Stimulationseinheit, (3) Rollenpumpen, (4) Reservoirgefäße, (5) Thermoschreiber, (6) Thermometer, (7) Personal Computer, (8) Heizung und Thermostat.

### 2.2.4 Versuchsdurchführung

In die auf 37°C erwärmten Reservoirgefäße wurden 140 ml Tyrodelösung gefüllt und begast. Mit Hilfe der Pumpen liess man die Tyrodelösung solange durch die Schläuche und das Organbad zirkuliert, bis diese entlüftet waren und im Organbad eine Temperatur von 37°C herrschte. Anschließend wurden bei unterbrochener Tyrode-Zirkulation die Trabekel mit ca. 1 ml BDM-Tyrodelösung in das Organbad

pipettiert. Unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops und mikrochirurgischer Pinzetten wurden die Trabekel an ihren Enden (wenn vorhanden an dem „meat-end“) auf den dünnen Platinhaken möglichst spannungsfrei („slack length“) befestigt. Das eingehende Signal des Kraftaufnehmers wurde am Signalverstärker und am Thermoschreiber als diastolischer Nullpunkt der mechanischen Spannung definiert und eingestellt („zero-adjust“). Nach Einschalten der Pumpen wurden die ersten 40 ml der Tyrodelösung verworfen, um die im Organbad befindliche BDM-haltige Tyrodelösung auszuspülen. Ausgehend von einer basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,2 mM erfolgte in drei Schritten ein Kalziumaufbau bis 2,5 mM durch Zugabe entsprechender Mengen 1-M-Kalziumlösung. Zwischen den Schritten wurde eine mechanische Stabilisierung („steady-state“) der Trabekel abgewartet. Dann wurde mit der elektrischen Stimulation begonnen. Dabei wurde mit einem Signal von 5 ms und einer Frequenz von 1 Hz die elektrische Spannung solange gesteigert, bis der Muskelstreifen erstmalig sichtbar kontrahierte (ca. 2-5 V). Dann wurde die Spannung nochmals um etwa 20% dieser Schwellenspannung erhöht und für den gesamten Versuchablauf bei diesem Wert belassen. Danach wurde mit der schrittweise durchgeführten Vordehnung des Trabekels bis zum Maximum der dehnungsabhängigen Zunahme der Kontraktionsamplitude ( $L_{\text{max}}$ ) begonnen (siehe auch Abb. 3.1 A).

Nach jedem Dehnungsschritt wurde auch hier die mechanische Stabilisierung abgewartet. Nach Erreichen von  $L_{\text{max}}$  wurde mit den Messungen und der Substanzzugabe begonnen.

Für die Langzeitmessungen (6 h) wurden von jeder Gruppe jeweils ein Trabekel mit Pravastatin (100  $\mu\text{M}$  in Tyrodelösung gelöst), ein Trabekel mit Pravastatin und Wortmannin 100 nM (PI3K-Inhibitor) sowie ein Kontrollmuskelstreifen gemessen. Wortmannin wurde aus einer vorher angelegten  $10^{-2}$ -M-Stammlösung (in DMSO=Dimethylsulfoxid gelöst) verwendet. Für Pravastatin wurde eine  $10^{-3}$ -M-Stammlösung mit Tyrodelösung angelegt.

Nach Ablauf der funktionellen Messungen wurden die Trabekel aus der Apparatur vorsichtig entnommen, in ein gefrorenes Eppendorf-Cup überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.2.5 Auswertung

Bei der Auswertung wurden folgende Parameter einer Kontraktion untersucht:

F	Amplitude der Kontraktionskraft (entwickelte Kraft)	[mN/mm <sup>2</sup> ]
DT	Diastolische Spannung	[mN/mm <sup>2</sup> ]
ST	Systolische Spannung	[mN/mm <sup>2</sup> ]
TPT	Zeitdauer bis zur maximal entwickelten Kraftamplitude	[ms]
RT <sub>50</sub>	Zeit vom Kraftmaximum bis zur 50%igen Relaxation	[ms]
+dF/dt <sub>max</sub>	Maximale Kontraktionsanstiegsgeschwindigkeit	[mN/mm <sup>2</sup> /s]
-dF/dt <sub>max</sub>	Maximale Relaxationsgeschwindigkeit	[mN/mm <sup>2</sup> /s]

Zur besseren Vergleichbarkeit von Trabekeln wurden alle Daten der Kraft auf die Querschnittsfläche bezogen ([mN/mm<sup>2</sup>], [mN/mm<sup>2</sup>/s]).

## 2.3. Molekularbiologische Untersuchungen

### 2.3.1 Materialien und Geräte

#### 2.3.1.1 Chemikalien

Acryl-, Bisacrylamid Lösung	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Steinheim
Aprotinin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Steinheim
Ethylenglykol-bis(β-aminoethyl)-tetraacetat (EGTA)	Sigma, Steinheim
β-Glyzerophosphat	Sigma, Steinheim
Glyzerol	Sigma, Steinheim
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma, Steinheim
Magermilchpulver (MP)	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt

Natriumchlorid (NaCl)	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid (NaF)	Sigma, Steinheim
Natriumorthovanadat	Sigma, Steinheim
Natriumpyrophosphat	Sigma, Steinheim
NP 40 (IGEPAL CA-630)	Sigma, Steinheim
Pepstatin A	Sigma, Steinheim
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma, Steinheim
Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20)	Bio-Rad, München
Röntgen-Entwickler LX 24	Kodak, Paris, Frankreich
Röntgen-Fixierlösung	Tetenal, Norderstedt
Temed	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl) aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe

### 2.3.1.2 Markerproteine, Kits

BCA Protein Assay Kit	PIERCE, Rockford, USA
Precision Plus Protein™ Standards	Bio-Rad, München
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Beverly, USA
SuperSignal® West Pico	PIERCE, Rockford, USA
Chemolumineszenz Substrat	

### 2.3.1.3 Antikörper

#### Primärantikörper:

Polyklonaler Phosphor-Akt-Antikörper (Kaninchen)	Cell Signaling, Beverly, USA
Polyklonaler Akt-Antikörper (Kaninchen)	Cell Signaling, Beverly, USA
Polyklonaler Phospho-GSK3 $\alpha/\beta$ (Kaninchen)	Cell Signaling, Beverly, USA
Polyklonaler GSK3 $\beta$ (Maus)	Cell Signaling, Beverly, USA
Monoklonaler SERCA2a-Antikörper (Maus)	ABR, Golden, USA
Monoklonaler GAPDH-Antikörper (Maus)	Cell Signaling, Beverly, USA

#### Sekundärantikörper:

HPR-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper	Amersham, Freiburg
HPR-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper	Amersham, Freiburg

### 2.3.1.4 Technische Geräte

Zentrifuge	Sigma, Steinheim
Chemilmager™400, Low Light Imaging System	Alpha Innotach Corp., San Leandro, USA
0,2 ml Mikro-Gewebe-Handhomogenisator	Wheaton, Millville, USA
Tischschüttler Polymax 1040	Heidolph, Kelheim
Gelgießapparatur	Bio-Rad, München
Gelelektrophoreseapparatur	Bio-Rad, München
Transferkammer	Bio-Rad, München
Transformator Power Pac 300	Bio-Rad, München
Hyperfilm™ ECL™	Amersham, Freiburg
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel

### 2.3.2 Homogenisierung der Trabekel

Der zur Gewebekomogenisierung verwendete Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

#### Homogenisierungspuffer:

NP40 (IPEGAL CA-630)	1 %
Glyzerol	10 %
Natriumchlorid	137 mM
Tris-HCl	20 mM
Natriumfluorid	20 mM
Natriumorthovanadat	1 mM
Natriumpyrophosphat	1 mM
β-Glyzerophosphat	50 mM
EDTA, pH 8	10 mM
EGTA, pH 7	1 mM
Aprotinin	4 µg/ml
Leupeptin	4 µg/ml
Pepstatin A	4 µg/ml
PMSF	1 mM

In einem Glashomogenisator wurden 50 µl des Homogenisierungspuffers vorgelegt. Dann wurde die in flüssigem Stickstoff gekühlte Trabekel dazugegeben und das

Gewebe manuell mit einem Pistill zerkleinert, bis keine makroskopisch erkennbaren Teilchen verblieben. Zur Gewinnung des Proteinhomogenates wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Durch Zugabe des Homogenisierungspuffers wurde die Proteinkonzentration bei Bedarf auf 2-3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt. Von dem Homogenat wurden 10  $\mu\text{l}$  für die Proteinbestimmung in einen Eppendorf-Cup überführt und bis zur Weiterverarbeitung schockgefroren.

### 2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit Bicinchoninsäure(BCA)-Assay. Der Wirkmechanismus beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen, die in alkalischen Lösungen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert werden, mit Proteinen einen Komplex bilden. Bei dem BCA-Assay bilden die  $\text{Cu}^+$ -Ionen mit Bicinchoninsäure einen violetten wasserlöslichen Komplex, dessen Extinktion bei 562 nm direkt proportional (linear) zu der Proteinkonzentration ist. Es wurde mit einem kommerziellen  $\text{Cu}^{2+}$ /BCA-Kit gearbeitet und nach Herstellervorschriften vorgegangen.

Zunächst wurde mit bovinem Serumalbumin (BSA), gelöst in dem Homogenisierungspuffer, eine Proteinkonzentrationsreihe von 0,5 bis 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in 0,5- $\mu\text{g}$ -Schritten angefertigt und deren photometrische Absorption bei 562 nm gemessen, wobei die Pufferlösung als Leerwert diente. Diese Extinktionswerte der BSA bildeten die Eichgerade, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) der Probenhomogenate, deren Extinktionswerte auch gegen den Leerwert gemessen wurden, bestimmt werden konnte.

### 2.3.4 Vorbereitung der Proben

Zum Nachweis der Proteine waren geeignete Proteinmengen (Akt und GSK3: 20-30  $\mu\text{g}$ ; SERCA: 6  $\mu\text{g}$ ) notwendig. Daher wurde je nach Proteinkonzentration die Menge an Probenhomogenat verwendet, die zum Nachweis der entsprechenden Proteine benötigt wurde. Um alle Proben auf das gleiche Gesamtvolumen zu bringen, wurden die Unterschiede mit Homogenisierungspuffer ausgeglichen. Zu jeder Gewebeprobe wurde 1/3 des Gesamtvolumens an Laemmli-Puffer hinzugefügt. Anschließend wurden alle Proben bei 95°C für 10 min erhitzt, dann zentrifugiert und bis zum Auftragen auf Eis gestellt.

Der Laemmli-Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

Laemmli-Puffer:

EGTA	16 mM
SDS	4 % (w/v)
Tris-HCl (pH 6,8)	40 mM
DTT	16 mM
Glyzerol	47 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

**2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese**

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) wurden Tris/SDS-gepufferte Trenngele mit einer Konzentration von 10% Polyacrylamid sowie Sammelgele angefertigt.

Das Tris/SDS-gepufferte Gradientengel setzte sich wie folgt zusammen:

Trenngel 10%:

Acryl-/Bisacrylamid	7,5 ml
4x Tris/SDS pH 8,8	5,63 ml
10 % APS	75 µl
Temed	15 µl
H <sub>2</sub> O	9,38 ml

Sammelgel:

Acryl-/Bisacrylamid	1 ml
4x Tris/SDS pH 6,8	1,88 ml
10 % APS	37,5 µl
Temed	15 µl
H <sub>2</sub> O	4,62 ml

Entsprechend der unterschiedlichen Proteingrößen (Akt MW= 60 kDa, GSK3 $\beta$  MW= 49 kDa, SERCA2a MW= 110 kDa) wurden verschiedene Markerproteine verwendet. Diese wurden gemäß Herstellerangaben vor dem Auftragen für 10 min bei 95°C denaturiert.

Um die Ergebnisse verschiedener Blots miteinander vergleichen zu können, wurde auf jedes Gel die Konzentrationsreihe eines Kontrollhomogenates aufgetragen. Das Kontrollhomogenat wurde aus verschiedenen Myokardproben (humanes Herzgewebe für die Humanproben bzw. Kaninchenherzgewebe für die Zellkulturproben) hergestellt und stand für alle Blots in ausreichender Menge zur Verfügung. Die Konzentrationsreihe dieses Kontrollhomogenates, bestehend aus 3 Proben, richtete sich nach der entsprechenden Menge an Protein, die untersucht wurde. Bei einem Gel mit 10 Taschen verblieben somit 6 Taschen zur Probenmessung.

Die Gelelektrophoreseapparatur wurde dann nach Herstellerangaben zusammengesetzt und mit Elektrophoresepuffer (SDS-Laufpuffer) folgender Zusammensetzung aufgefüllt:

SDS-Laufpuffer, pH 8,3:

Tris-Base	6,04	% (w/v)
Glyzin	2,88	% (w/v)
SDS	2,00	% (w/v)

Auf eine weitere pH-Wert-Einstellung des Laufpuffers durch HCl-Zugabe wurde verzichtet, da Cl<sup>-</sup>-Ionen das Ionensystem stören können und zu unscharfen Banden führen würden. Danach folgte das Auftragen des Proteinmarkers, der Konzentrationsreihe des Kontrollhomogenates sowie der Proben von links nach rechts auf das Gel.

Die Elektrophorese wurde bei dem Durchlaufen der Proben durch das Sammelgel konstant bei 70 V Gleichspannung durchgeführt. Anschließend wurde die Spannung bei dem Durchlaufen des Trenngels auf 120 V erhöht, bis die Bromphenolblaubande begann in den Laufpuffer überzutreten und die Elektrophorese beendet wurde.

### **2.3.6 Transfer der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen**

Für den Transfer der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen wurde ein Transferpuffer folgender Zusammensetzung verwendet:

Transferpuffer:

Tris-Base	0,788 % (w/v)
Glycine	2,88 % (w/v)
Methanol	20,0 % (w/v)

Während der Elektrophorese wurden die Nitrozellulose-Membranen in Transferpuffer eingeweicht, wobei die Proteinbindungsstellen durch das Methanol aktiviert wurden.

Die Transferkammer wurde zusammengesetzt und mit Laufpuffer aufgefüllt. Anschließend wurde das „transfer-sandwich“ wie folgt zusammengefügt: Faserschwamm, zwei Lagen Filterpapier, eingeweichte Nitrozellulose-Membran, Polyacrylamidgel, zwei weitere Lagen Filterpapier und ein weiterer Faserschwamm (Anordnung von Anode nach Kathode). Dabei war es wichtig, keine Luftblasen zwischen den Grenzschichten (vor allem zwischen Membran und Gel) einzufangen, um den Transfer nicht zu beeinträchtigen. Dann wurde der „transfer-sandwich“, der von einer Kassette zusammen gehalten wurde, in die Kammer hineingelegt und anschließend der Transfer bei konstant 150 mA über Nacht durchgeführt (blotting). Am nächsten Tag wurden die Membranen entnommen und für einige Minuten in Ponceaulösung eingetaucht. Hierbei wurden die Proteine, durch die in der Lösung enthaltene Trichloressigsäure, an der Membran fixiert und gleichzeitig wurden die Proteinbanden zur Kontrolle sichtbar gemacht. Diese Färbung ist reversibel und beeinträchtigt die anschließende Immundetektion der Proteine nicht.

Nach dem Ausspülen der Ponceaufärbung wurde die Nitrozellulose-Membran in 5 % (w/v) Magermilchpulver, in TBST-Puffer gelöst, für mindestens 2 Stunden im Kühlraum (4-6 °C) zur Absättigung aller Proteinbindungsstellen der Membran geblockt.

Der TBST-Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

TBST-Puffer, pH 7,5:

NaCl	19,82 % (w/v)
Tris-Base	2,42 % (w/v)
TWEEN-20 (0,1%)	10ml/L

### 2.3.7 Immundetektion

Alle Schritte der Inkubation der Nitrozellulose-Membran in Antikörper-Lösungen, sowie weitere Wasch- oder Blockschritte wurden mit TBST-Puffer obiger Zusammensetzung und auf einem Tischschüttler durchgeführt. Wobei dem Puffer zur Inkubation teilweise 0,5 % (w/v) Magermilchpulver zugesetzt wurde, während für die Waschvorgänge reine TBST-Lösung verwendet wurde.

Zunächst wurden die Membranen für 2x10 min mit der Blocklösung gewaschen. Anschließend wurden sie über Nacht (ca. 14 Stunden) im Kühlraum mit dem jeweiligen Phosphorprimärantikörper bzw. mit SERCA2a inkubiert. Nachstehende Verdünnungen wurden für die Primärantikörper gewählt:

#### Verdünnungen der Primärantikörper:

pAKT	1:1000	in TBST gelöst
pGSK3 $\beta$	1:1000	in 0,5 % (w/v) Magermilchpulver-TBST-Lösung
SERCA2a	1:20.000	in 0,5 % (w/v) Magermilchpulver-TBST-Lösung

Danach schlossen sich, zum Auswaschen der ungebundenen Antikörper, 3 Waschschritte mit TBST-Puffer für jeweils 10 min an. Im Anschluss daran wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

#### Verdünnung der Sekundärantikörper:

HPR Anti-rabbit-Antikörper 1:3000 in 0,5 % (w/v) Magermilchpulver-TBST-Lösung  
HPR Anti-mouse-Antikörper 1:10.000 in 0,5 % (w/v) Magermilchpulver-TBST-Lösung

Es folgten erneut Waschschritte (4x10 min) zur Entfernung der überschüssigen Sekundärantikörper. Da die Sekundärantikörper mit Meerrettich-Peroxidase markiert sind, kann durch anschließende Inkubation der Membranen für 5 min mit ECL-Lösung (Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:1 gemischt) eine Chemilumineszenz, durch die Oxidation der Peroxidase, ausgelöst werden. Das dabei entstandene Licht wurde dann, nachdem die Membran in einer lichtdurchlässigen Plastikfolie blasenfrei eingeschweißt wurde, durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Nun wurden alle bis dahin gebundenen Antikörper der Membranen für Akt und GSK3 $\beta$  durch Waschen mit 0,2 M NaOH-Lösung für 8 min entfernt („stripping“) und

die Membranen erneut für 2 Stunden in 5 % (w/v) Magermilchpulver geblockt. Anschließend erfolgte nach dem oben genannten Verfahren die Protein-Antikörperfärbung.

### 2.3.8 Auswertung der Western-Immunoblots

Die sichtbaren dunklen Signale der Proteinbanden auf dem Röntgenfilm wurden mit der Kamera des „Chemilmager®“-Systems eingelesen und mit Hilfe der entsprechenden Software densitometrisch quantifiziert. Die interne Normalisierung der Werte erfolgte mit dem Signal des Referenzproteins GAPDH, das unter den experimentellen Bedingungen nicht reguliert wird.

Mit Hilfe der Konzentrationsreihe des Kontrollhomogenates wurde eine lineare Regression erstellt und die aufgetragenen Proben auf dieser Regressionsgerade normalisiert, damit verschiedene Blots untereinander vergleichbar wurden.

Nach dieser externen Normalisierung wurde schließlich der Quotient aus phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein gebildet, um Änderungen im Phosphorylierungsgrad in Abhängigkeit von der Expression des Proteins ermitteln zu können. Der Quotient aus phosphoryliertem Protein zu dem Gesamtprotein der Kontrollmuskeln wurde gleich 100% gesetzt und die Änderungen nach Substanzgabe (Pravastatin oder IGF-1 bzw. Wortmannin) in Prozent, bezogen auf den Kontrollmuskel, angegeben.

## 2.4 Zellkulturen

Die Kaninchen-Kardiomyozyten wurden in einer Dichte von etwa 500 000 Zellen pro Schale (10 cm Durchmesser) ausplattiert. Ihre Kultivierung erfolgte in 5 ml M199 Medium von der Firma Sigma. Dieses wurde mit folgenden Zusätzen ergänzt:

### M199 (500 ml):

Taurine	321,5 mg
Carnitine	500 mg
Penicillin	1 % (50.000 IE/ml)
Streptomycin	50 µg/ml
L-Glutamin	5 ml einer 200 mM-Lösung

Die Zellen wurden parallel für 24 und 48 h mit Pravastatin (10  $\mu\text{M}$ ) jeweils mit und ohne Zusatz des PI3-Kinase-Inhibitors Wortmannin (100 nM), sowie als unbehandelte Kontrollgruppe inkubiert. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Zellen mit dem Zellschaber geerntet. Alle Arbeitsschritte wurden an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt, die Hilfsgeräte autoklaviert oder kommerziell steril verpackt verwendet. Die Lösungen wurden autoklaviert oder steril filtriert. Mit Hilfe eines Lysepuffers sowie durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen wurde die Zellmembran der Myozyten aufgeschlossen, ohne dabei die Proteine zu denaturieren. Der dabei verwendete Lysepuffer setzt sich wie folgt zusammen:

Lysepuffer, pH 7,4:

Tris-Base	10 mM
NaCl	140 mM
Trilonx100	0,1 %
PMSF	400 $\mu\text{g/ml}$
Leupeptin	20 $\mu\text{g/ml}$
Pepstatin	0,5 $\mu\text{g/ml}$
Aproteinin	10 $\mu\text{g/ml}$

Anschließend wurden die Proben wiederholt durch eine 27-G-Kanüle geleitet. Schließlich wurden die Proben zentrifugiert (5000 upm für 10 min bei 4 °C). Mit dem Überstand wurde die Proteinbestimmung nach dem oben genannten Verfahren für die molekularbiologische Untersuchung durchgeführt.

**2.5 Messung der NO-Synthese/-Freisetzung in isolierten Kardiomyozyten mit dem NO-sensitiven Farbstoff DAF-FM**

Isolierte Kaninchen-Vorhofmyozyten wurden mit dem NO-sensitiven Farbstoff DAF-FM diacetate (5  $\mu\text{M}$ ) beladen und für 30 min in einer HEPES-Tyrode-Pufferlösung inkubiert. Diese setzt sich wie folgt zusammen:

HEPES-Tyrode-Pufferlösung, pH 7.4:

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM

MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Hepes	10 mM
Glukose	10 mM
L-Arginin	0,1 mM

Die Zellen wurden auf den Tisch eines Konfokalmikroskops (Nipkow-Scheiben-Konfokalmikroskopie) (Kockskämper et al. 2001) gebracht und mit extrazellulären Platinelektroden stimuliert (0.7 Hz). DAF-FM wurde mit Hilfe eines Argonionen-Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde bei Wellenlängen >505 nm mit einer ICCD-Kamera registriert. Die Fluoreszenz wurde über die gesamte Zelle gemittelt. Nach Hintergrund-Korrektur wurden normalisierte Fluoreszenzwerte ( $F/F_0$ ) berechnet. Dabei bezeichnet  $F_0$  die Fluoreszenz zu Beginn der Messung, d.h. vor Gabe von Pravastatin. Diese Messungen wurden in Kooperation mit Frau Dr. Stefanie Walther und Herr Prof. Jens Kockskämper durchgeführt.

## 2.6 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Normaverteilung aller gemessenen Daten wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests geprüft.

Zur Analyse der Ergebnisse der muskelphysiologischen Untersuchung wurden die Veränderungen der jeweiligen kontraktile Parameter als Prozent im Vergleich zum Ausgangswert (100%) angegeben und auf signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen (Kontrolle, Pravastatin und Wortmannin + Pravastatin) mit dem verbundenen t-Test für ungepaarte Stichproben untersucht. Vergleiche zwischen verschiedenen Gruppen erfolgten mit Hilfe der Varianz-Analyse und der Student-Newman-Keuls Prozedur. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gesehen.

Die gruppierten Daten der Phosphorylierungsgrade der einzelnen Kinasen in Abhängigkeit von der basalen Proteinexpression wurden zur Varianzanalyse dem Einwege-ANOVA unterzogen. Für den post-hoc-Test wurde bei normalverteilten

Daten der Student-Newmans-Keuls-Test verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

Zur Auswertung der gemessenen Fluoreszenzwerte an der Konfokalmikroskopie wurden die Veränderungen über die Zeit als Prozent im Vergleich zum Ausgangswert (0 min) angegeben und mit Hilfe des gepaarten Student-t-Tests auf signifikante Fluoreszenzveränderungen untersucht. Auch hier wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

### 3. Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit wurden die akuten sowie mittelfristigen Effekte von Pravastatin auf die Kinetik der Kontraktion in humanem Myokard untersucht. Danach wurden der Einfluss und die damit verbundenen Effekte von Pravastatin auf die antiapoptotische PI3K-Akt-Signalkaskade charakterisiert.

#### 3.1 Wirkung von Pravastatin auf die kontraktilen Parameter

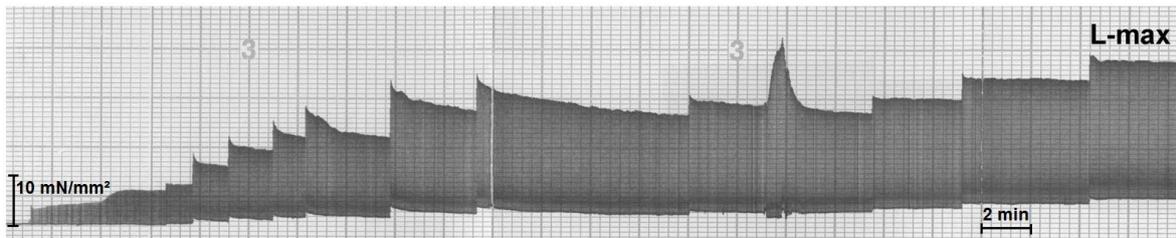
##### 3.1.1 Dosisabhängige Wirkung von Pravastatin auf das Kontraktionsverhalten isolierter ventrikulärer Muskelstreifen aus insuffizienten Humanherzen

Um die Auswirkung von Pravastatin auf die Kraftentwicklung sowie auf andere wichtige kontraktile Parameter, wie die diastolische Spannung, die Verkürzungs- und Relaxationsrate sowie die Zeitintervalle zur maximalen Kraftentwicklung und zur 50%igen Relaxation zu untersuchen, wurden humane Muskelstreifen aus dem linken sowie aus dem rechten Ventrikel verschiedener Empfängerherzen im Organbad (37 °C) untersucht.

Nach dem Einhängen der präparierten Trabekel in der Stimulationseinheit wurden alle Muskelstreifen unter Stimulation (1 Hz) stets bis zum Erreichen von  $L_{max}$  (Maximum der dehnungsabhängigen Kontraktionskraftzunahme) vorgedehnt. Anschließend konnte, nachdem die mechanische Stabilisierung abgewartet wurde, mit den jeweiligen Messreihen begonnen werden, da somit ein vergleichbarer Ausgangszustand für die Muskeltrabekel erreicht wurde.

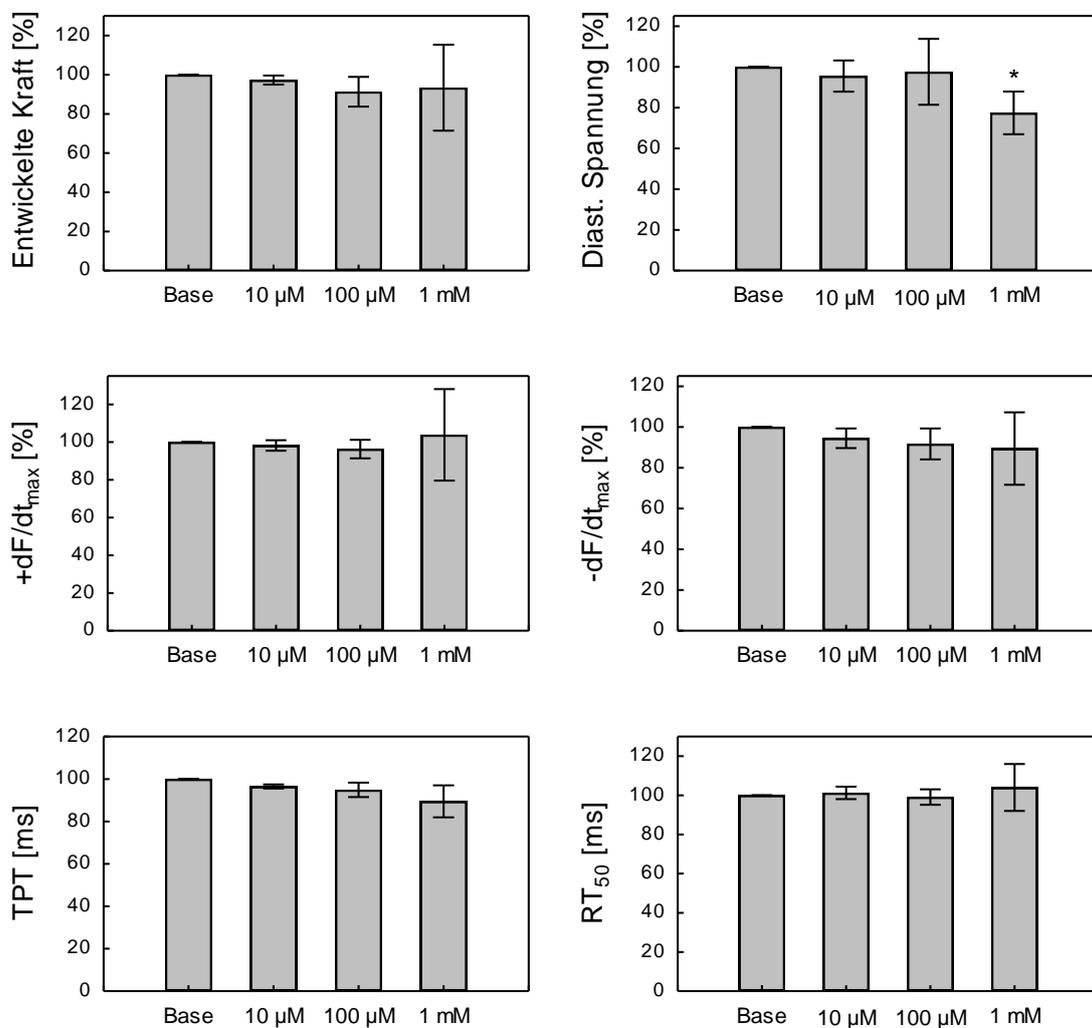
In der im Organbad zirkulierenden Tyrodelösung (100 ml) wurde jeweils die Menge Pravastatin von der zuvor vorbereiteten  $10^{-3}$  M Pravastatin-Lösung in das Gefäßreservoir hinzugegeben, wie nötig war, um jeweils die entsprechend gewünschten Konzentrationen (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M bzw. 1 mM) zu erreichen. Die Muskelstreifen wurden nach den Messungen aus den Organbädern vorsichtig entnommen und für molekularbiologische Untersuchungen schockgefroren.

Abbildung 3.1 A zeigt exemplarisch eine Originalregistrierung der Vordehnung der Muskelpräparate bis zu  $L_{max}$ .



**Abb. 3.1 A:** Repräsentative Originalregistrierung der Vordehnungsschritte eines isolierten Muskelstreifens bis auf die Länge L<sub>max</sub>.

In Abbildung 3.1 B sind die Daten von 7 Ventrikel-Trabekeln aus 6 insuffizienten Herzen (Patient 6-11 aus der Tab. 2.1) zusammengefasst, in denen die dosisabhängige Wirkung von Pravastatin unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen untersucht wurde.



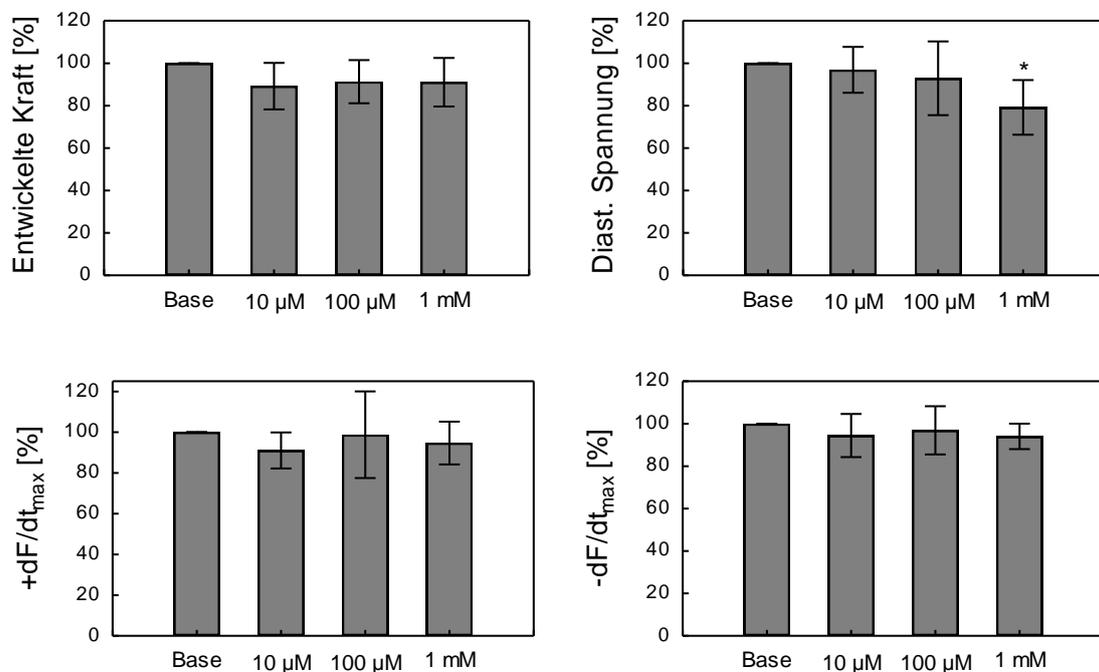
**Abb. 3.1 B:** Dosisabhängiger Einfluss von Pravastatin auf die kontraktile Parameter (entwickelte Kraft, diastolische Spannung,  $+dF/dt_{max}$  = maximale Kontraktionsanstiegsgeschwindigkeit,  $-dF/dt_{max}$  = maximale Relaxationsgeschwindigkeit, TPT= Zeitdauer bis zur maximal entwickelten Kraftamplitude, RT<sub>50</sub>= Zeit bis zur 50-%igen Relaxation der Ventrikeltrabekel); \* p < 0,01 vs. Ausgangswert (Base).

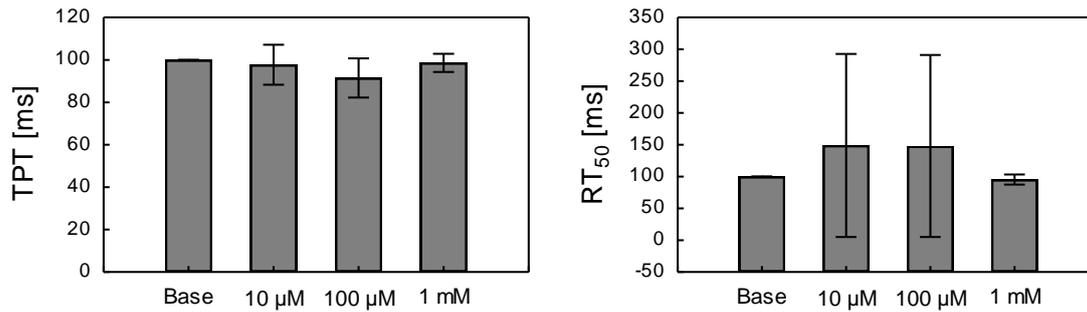
In mikromolarer Konzentration konnte kein signifikanter Effekt auf die kontraktile Parameter verzeichnet werden. Bei einer Pravastatin-Konzentration von 1 mM ließ sich ein isolierter signifikanter Abfall der diastolischen Spannung auf  $77,4 \pm 5,2$  % des Ausgangswertes verzeichnen.

### 3.1.2 Dosisabhängige Wirkung von Pravastatin auf das Kontraktionsverhalten isolierter atrialer Muskelstreifen aus humanem Herzgewebe

Um eine spezifische Wirkung von Pravastatin auf die kontraktile Parameter im menschlichen Vorhofgewebe zu untersuchen, wurden Vorhoftrabekel aus dem rechtem Herzohr verwendet. Unter isometrischer Kontraktion (1 Hz) bei  $37^\circ\text{C}$  und ausgehend von  $L_{\text{max}}$  wurde Pravastatin in unterschiedlichen Konzentrationen in die zirkulierende Tyrodelösung des Organbades gegeben und dabei die kontraktile Parameter der Vorhoftrabekel gemessen.

In Abbildung 3.2 sind die Daten von 7 Vorhof-Trabekeln aus 5 Patienten zusammengefasst (Patient 1-5 aus Tab. 2.1), bei denen nach dem hier beschriebenen Protokoll, die dosisabhängige Wirkung von Pravastatin untersucht wurde.





**Abb. 3.2:** Dosisabhängiger Einfluss von Pravastatin auf die kontraktile Parameter (entwickelte Kraft, diastolische Spannung,  $+dF/dt_{\max}$  = maximale Kontraktionsanstiegsgeschwindigkeit,  $-dF/dt_{\max}$  = maximale Relaxationsgeschwindigkeit, TPT= Zeitdauer bis zur maximal entwickelten Kraftamplitude, RT<sub>50</sub>= Zeit bis zur 50-%igen Relaxation); \*  $p < 0,01$  vs. Ausgangswert (Base).

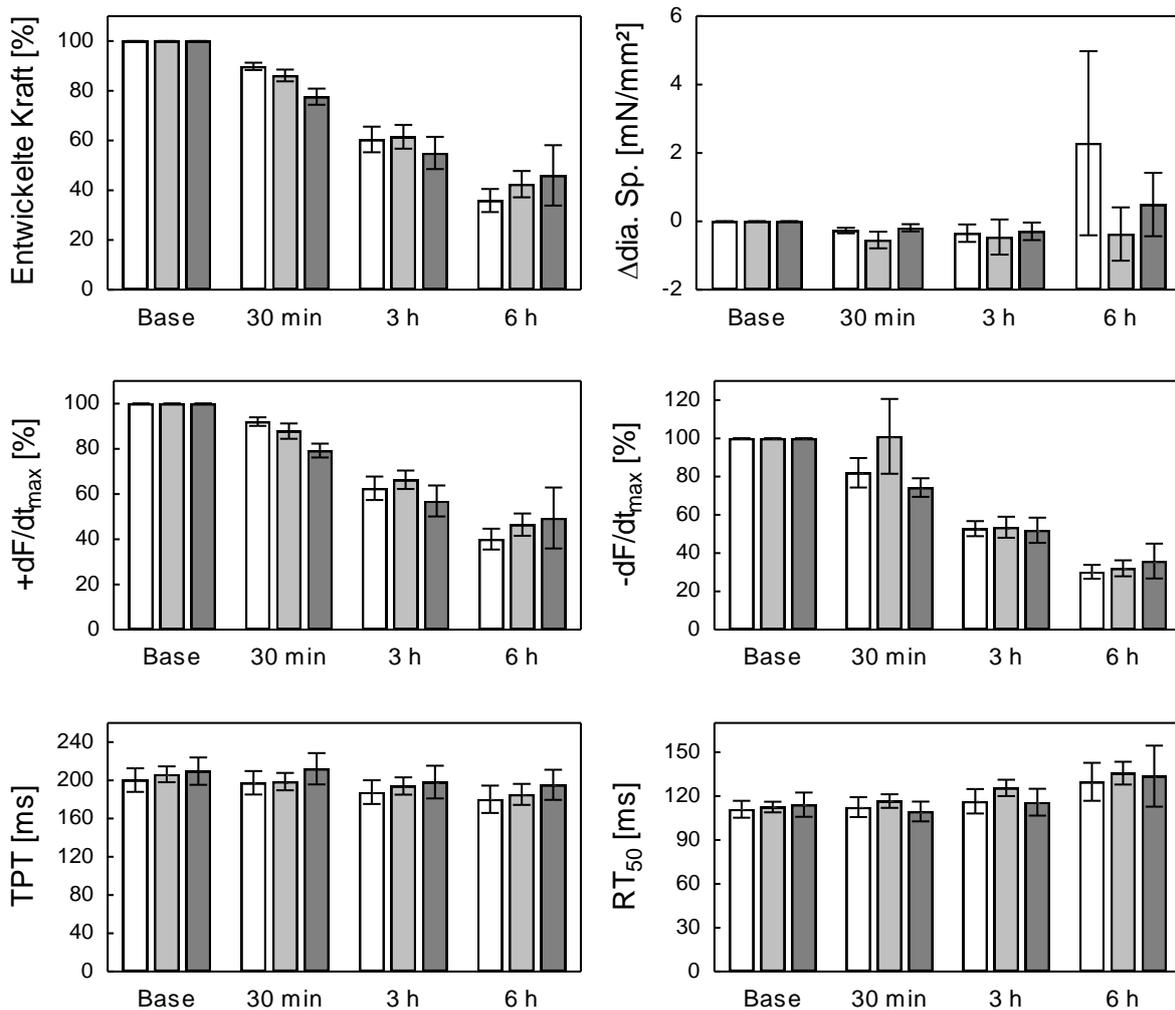
Ähnliche Effekte wie bei den humanen Ventrikeltrabekeln wurden bei den Messungen mit humanen Vorhoftrabekeln gemessen. Vergleichbar mit den oben beschriebenen Daten für die Ventrikel-Muskelstreifen, fiel bei den Vorhoftrabekeln die diastolische Spannung bei 1 mM Pravastatinkonzentration signifikant auf  $79,2 \pm 5,8$  % des Ausgangswertes ab.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den oben beschriebenen Untersuchungsbedingungen Pravastatin in therapeutisch relevanten Konzentrationen keine akuten funktionellen Effekte auf die Kontraktilität von humanem Vorhof- oder Ventrikelmyokard zeigte. Im millimolaren Bereich wurde sowohl in Vorhof als auch Ventrikelmyokard ein sign. Effekt auf die diastolische Muskelspannung beobachtet.

### 3.1.3 Mittelfristiger Einfluss von Pravastatin auf die kontraktile Parameter isolierter Muskelstreifen aus insuffizienten Humanherzen

Wie oben beschrieben zeigte Pravastatin in therapeutisch relevanten Konzentrationen keine akuten Effekte hinsichtlich des Kontraktionsverhaltens. Um die mittelfristige Auswirkung von Pravastatin auf die kontraktile Parameter zu untersuchen, wurden humane Ventrikel-Muskelstreifen im Organbad bei 37°C unter isometrischer Kontraktion über die Zeitdauer von 6 Stunden untersucht. Die Messungen begannen auch hier nach Erreichen von  $L_{\max}$  durch die Vordehnung. Die Muskelstreifen der Gruppe Pravastatin wurden mit 100 µM Pravastatin in der zirkulierenden Tyrodelösung im Organbad umspült. Zu jedem Muskelstreifen dieser Pravastatin-Gruppe wurde von dem gleichen Empfängerherzen ein Muskelstreifen ohne Zusatz von Pravastatin, auch 6 Stunden unter den gleichen

Versuchsbedingungen als Kontrollgruppe gemessen. Eine dritte Gruppe wurde mit 100 nM Wortmannin, ein PI3K-Inhibitor, 30 min vor der Gabe von Pravastatin (100  $\mu$ M) behandelt. Diese letzte Gruppe (Wortmannin + Pravastatin) wurde gemessen, um zu Überprüfen, ob die eventuellen Auswirkungen von Pravastatin PI3K-vermittelt sind und durch Wortmannin antagonisiert werden können. Die Daten aus diesen Messungen sind in Abbildung 3.3 für insgesamt 25 Muskelstreifen aus 9 verschiedenen Empfängerherzen (Patient 12-20 aus der Tab. 2.1) zusammengefasst.



**Abb.3.3:** Langzeitmessungen zur Untersuchung der Auswirkung von 100  $\mu$ M Pravastatin auf die kontraktile Parameter in isolierten humanen Ventrikel-Muskelstreifen. Untersuchte Parameter: entwickelte Kraft,  $\Delta$ diastolische Spannung = Änderungen der diastolischen Spannung im Vergleich zu dem Ausgangswert (= 0 mN/mm<sup>2</sup>), +dF/dt<sub>max</sub> = maximale Kontraktionsanstiegsgeschwindigkeit, -dF/dt<sub>max</sub> = maximale Relaxationsgeschwindigkeit, TPT= Zeitdauer bis zur maximal entwickelten Kraftamplitude, RT<sub>50</sub>= Zeit bis zur 50-%igen Relaxation. Angaben als Prozentsatz im Vergleich zum Ausgangswert (Base = 100%) bzw. in Millisekunden. □ Kontrolle (n=9)    ▒ Pravastatin (n=10)    ■ Wortmannin + Pravastatin (n=6)

Dargestellt sind die Werte zu den untersuchten Parametern für jeweils 30 min, 3 Stunden sowie 6 Stunden nach Substanzgabe bzw. nach dem Erreichen von  $L_{\max}$  (im Falle der Kontrollgruppe). Wie man anhand der Balkendiagramme erkennen kann, waren die zeitabhängigen Veränderungen in allen drei Gruppen qualitativ ähnlich und unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Tendenziell stieg die diastolische Spannung in der unbehandelten Kontrollgruppe nach 6 Stunden an, während dies für die mit Pravastatin behandelten Muskelstreifen nicht der Fall war. Durch Wortmannin wurde dieser fehlende Anstieg zumindest teilweise wieder aufgehoben. Allerdings erreichten die beobachteten Veränderungen keine statistische Signifikanz.

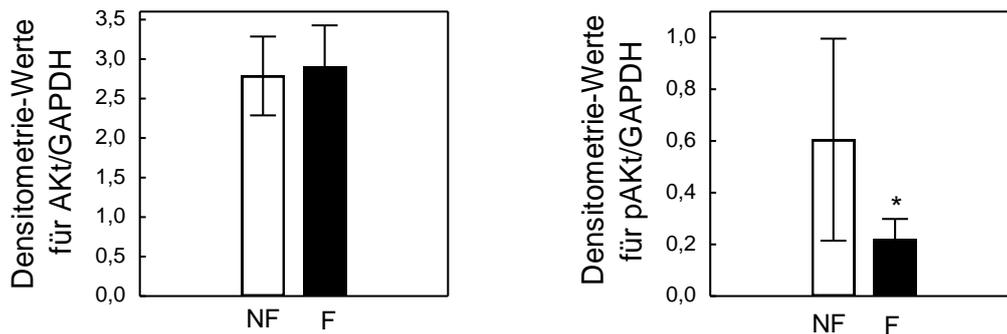
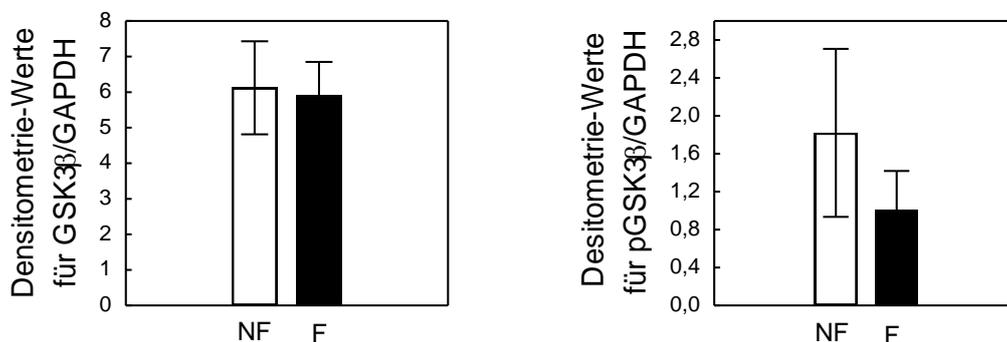
Somit lässt sich auch über dem Zeitraum von 6 Stunden kein messbar signifikanter Einfluss von Pravastatin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  auf die kontraktile Parameter der untersuchten humanen Ventrikel-Muskelstreifen verzeichnen.

### **3.2 Effekte von Pravastatin auf die PI3K-Akt-Signalkaskade**

#### **3.2.1 Die Akt-GSK3 $\beta$ -Signalkaskade-Aktivität in terminal insuffizientem menschlichen Myokard**

Die Akt-GSK3 $\beta$ -Signalkaskade hat eine zentrale physiologische sowie pathophysiologische Bedeutung bei der Regulierung der Zellapoptose und der Hypertrophie-Induktion. Ihre Aktivierung wirkt antiapoptotisch und pro-hypertroph.

Zur Charakterisierung der Protein-Expression sowie des Phosphorylierungsgrades der in dieser Signalkaskade beteiligten Kinasen Akt und GSK3 $\beta$  wurden Western-Blot-Analysen an humanem Ventrikelmyokard von terminal insuffizienten Herzen und von nicht-insuffizienten Spenderherzen durchgeführt. Die densitometrisch ermittelten Werte wurden auf das Protein GAPDH („housekeeping gene“) normiert. Die gemittelten Daten von insgesamt 14 Patienten sind in Abbildung 3.4 A (Akt und pAkt) und B (GSK3 $\beta$  und pGSK3 $\beta$ ) dargestellt („non-failing“ Herzgewebe, siehe Tabelle 2.1, Patienten 21-27 und „failing“ Myokard aus 7 explantierten Herzen von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz unterschiedlicher Genese).

**A****B**

**Abb.3.4:** Expression bzw. Phosphorylierungsgrad von Akt (**A**) und von GSK3β (**B**) in humanem Myokard von insuffizienten (■ „failing“) vs. nicht-insuffizienten Herzen (□ „non-failing“); jeweils (n=7); \* p< 0,05;

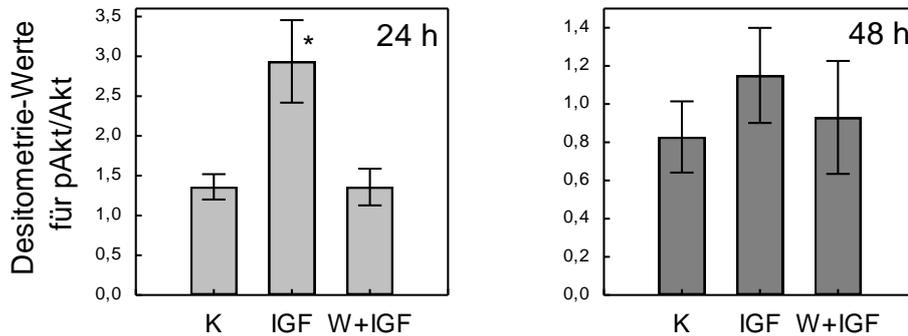
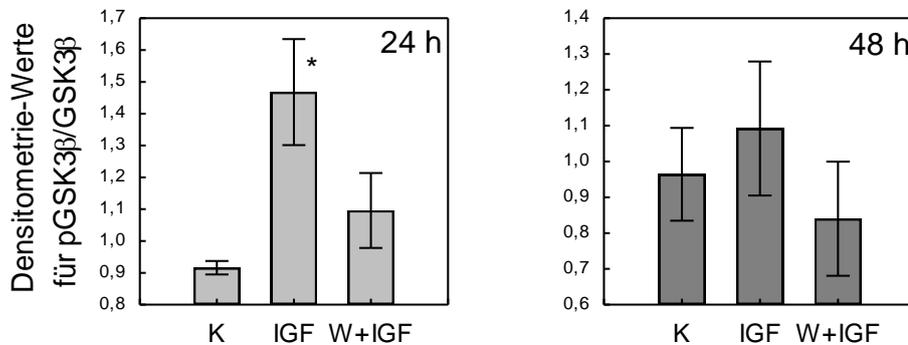
Die Proteinexpression von Akt und GSK3β war in humanem insuffizienten Myokard (Akt:  $2,87 \pm 0,45$ ; GSK3β:  $5,93 \pm 0,78$ ) im Vergleich zum nicht-insuffizienten Spendermyokard (Akt:  $2,79 \pm 0,43$ ; GSK3β:  $6,12 \pm 1,16$ ) nicht signifikant unterschiedlich. Allerdings war der Phosphorylierungsgrad der Proteine (pAkt und pGSK3β) in terminal insuffizienten Myokardproben deutlich vermindert. Dabei war die Abnahme von phospho-Akt in terminal insuffizientem menschlichen Herzgewebe ( $0,22 \pm 0,07$ ) im Vergleich zum „non-failing“ Kontrollmyokard ( $0,61 \pm 0,38$ ) im Mittel statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Für die phosphorylierte GSK3β, welche unter anderem von Akt reguliert wird, war in dem untersuchten insuffizienten Herzgewebe ebenfalls eine deutliche Tendenz für eine Abnahme ( $1,01 \pm 0,39$ ) im Vergleich zum „non-failing“ Gewebe ( $1,82 \pm 0,86$ ) zu erkennen, die jedoch statistisch nicht signifikant war ( $p = 0,059$ ).

Diese Daten zeigen, dass die Akt/GSK-Signalkaskade in der schweren Herzinsuffizienz im Vergleich zum Normalherz vermindert aktiviert wird.

### **3.2.2 Effekte von Pravastatin auf die Aktivität der PI3K-Akt-Signalkaskade in isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten**

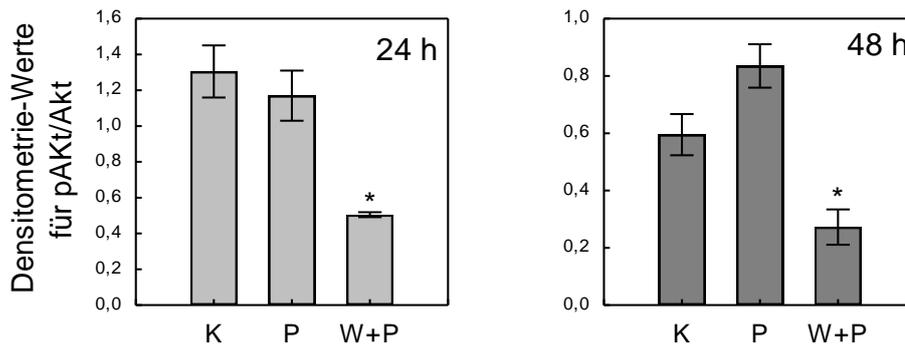
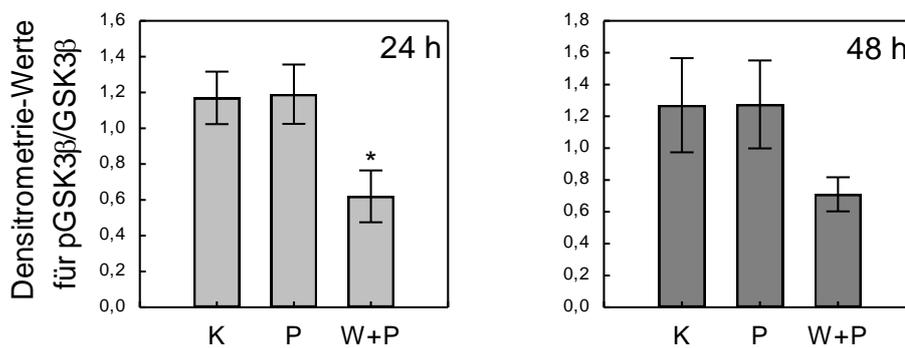
Bei schwerer Herzinsuffizienz ist die Aktivität der zellprotektiven PI3K-Akt-Signalkaskade im Vergleich zu funktionell unbeeinträchtigtem Herzgewebe reduziert, womit unter anderem eine erhöhte Zellapoptoserate erklärt werden kann. Die pharmakologische Aktivierung dieser Kaskade durch PI3-Kinase-Aktivatoren bei der Herzinsuffizienz könnte diesem pathophysiologischen Prozess entgegen wirken. Ein etablierter PI3-Kinase-Aktivator ist der Wachstumsfaktor IGF-1. Um die Effekte dieses Wachstumsfaktors auf den Phosphorylierungsgrad von Akt und GSK3 $\beta$  zu charakterisieren, wurden Zellkulturen aus isolierten adulten Kaninchen angelegt. Die Zellen wurden für jeweils 24 bzw. 48 Stunden mit IGF-1 (100 ng/ml) inkubiert. Zu jeder Zellversuchsreihe (n=5) wurden jeweils unbehandelte Kontrollgruppen sowie eine Wortmannin-Gruppe bei den gleichen Versuchsbedingungen inkubiert. Der PI3-K-Inhibitor Wortmannin, gelöst in DMSO, wurde in einer Konzentration von 100 nM 30 Minuten vor IGF-1-Gabe gegeben, um die Wirkung des IGF-1 auf die Signalkaskade zu antagonisieren. Mit Hilfe von Western-Blot-Untersuchungen wurden anschließend die Expression der Proteine Akt und GSK3 $\beta$  sowie deren Phosphorylierungsgrad in den isolierten Kardiomyozyten bestimmt. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 3.5 A und B dargestellt.

Wie man erkennen kann, steigt unter dem Einfluss von IGF-1 das Verhältnis pAkt zu Akt auf  $254,36 \pm 158,23$  % sowie pGSK3 $\beta$  zu GSK3 $\beta$  auf  $161,70 \pm 43,48$  % nach 24 Stunden Inkubation im Vergleich zu der Kontrollgruppe (100%) signifikant an. Diese Effekte sind unter der PI3-K-hemmenden Wirkung von Wortmannin nicht mehr nachweisbar. Nach 48 Stunden war dieser IGF-1-Effekt auf den Phosphorylierungsgrad der untersuchten Proteine rückläufig, jedoch tendenziell noch zu erkennen.

**A****B**

**Abb. 3.5:** Densitometrisch ermittelte Werte für pAkt/Akt (**A**) sowie für pGSK3β/GSK3β (**B**) in Zellkulturen von Kaninchen-Kardiomyozyten nach jeweils 24 bzw. 48 h Inkubation mit IGF-1 oder mit Wortmannin und IGF-1 (W+IGF); (n=5); \* p < 0,05

Um den Einfluss von Pravastatin auf die PI3K-Akt-Signalkaskade zu Charakterisieren, wurden analog zu den IGF-1-Messungen Zellkulturen von Kaninchen-Kardiomyozyten angelegt. Die Inkubationszeiten wurden auch hier für 24 und 48 Stunden gewählt. Die Pravastatingruppe (P) wurde mit Pravastatin in einer Konzentration von 10 μM inkubiert. In der Wortmanningruppe (W+P) wurden, 30 min vor Pravastatingabe, 100 nM Wortmannin gegeben, während die Kontrollgruppe unbehandelt blieb. Zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades wurden Western-Blot-Analysen für die beteiligten Proteine durchgeführt. Die dabei densitometrisch ermittelten Werte der Verhältnisse pAkt/Akt und pGSK3β/GSK3β aus 4 Zellreihen sind in der Abbildung 3.6 dargestellt.

**A****B**

**Abb. 3.6:** Densitometrisch ermittelte Werte für pAkt/Akt (**A**) sowie für pGSK3β/GSK3β (**B**) in Zellkulturen von Kaninchen-Kardiomyozyten nach jeweils 24 bzw. 48 h Inkubation mit Pravastatin 10 µM (P) oder mit Wortmannin (300 ng) und Pravastatin (W+P); K= Kontrollgruppe; (n=4); \* p < 0,05

Die ermittelten Daten deuten auf eine durch Pravastatin induzierte Aktivierung von Akt in den adulten Kaninchen-Kardiomyozyten nach 48 Stunden Inkubation hin. Die Werte erreichen zwar keine statistische Signifikanz, liegen aber bei einem densitometrisch ermittelten Durchschnittswert für das Verhältnis phosphoryliertes Akt zu Akt von  $0,84 \pm 0,07$ , während der für die Kontrollgruppe gemessene Durchschnittswert hierzu bei  $0,6 \pm 0,07$  liegt. Das ist eine durch Pravastatin induzierte Zunahme des phosphorylierten Akt um 40 % (1,4 Fach). Auf den Phosphorylierungsgrad von GSK3β konnte kein nachweisbarer Einfluss von Pravastatin in der hier verwendeten Konzentration gezeigt werden.

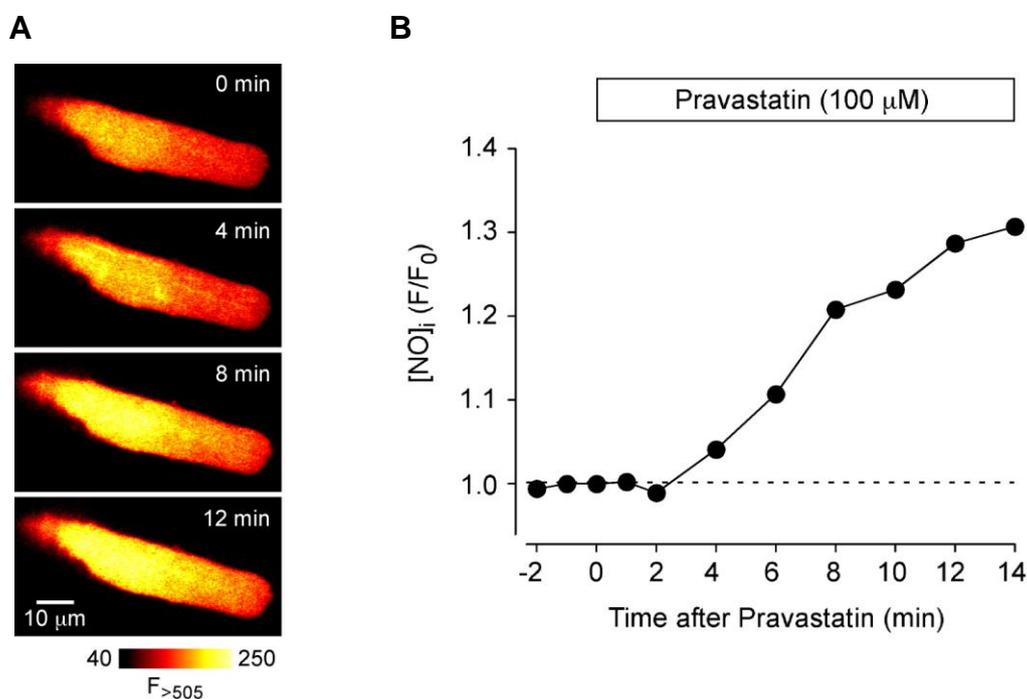
Interessanterweise weichen die Phosphorylierungsverhältnisse in der Wortmanningruppe zu Gunsten des nicht-phosphorylierten Proteins signifikant von der Kontrollgruppe ab. Bei Akt trifft dies sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden zu. Für GSK3β ist die Abweichung nur nach 24 h signifikant, was möglicherweise darauf hindeutet, dass unter den Bedingungen der Zellkultur bereits eine hohe

basale PI3-Kinase-Aktivität vorliegen muss und deshalb eine zusätzliche Induktion durch Pravastatin nur schwer zu erfassen ist.

### 3.3 Einfluss von Pravastatin auf die NO-Synthese/-Freisetzung in adulten Kardiomyozyten

Da Akt unter anderem die Aktivität von eNOS reguliert, wurde mit Hilfe der Konfokalmikroskopie der Einfluss von Pravastatin auf die NO-Synthese bzw. Freisetzung untersucht. Hierzu wurden isolierte Kaninchen-Vorhofmyozyten mit dem NO-sensitiven Farbstoff DAF-FM diacetate ( $5 \mu\text{M}$ ) beladen und mittels Konfokalmikroskopie die in Abhängigkeit von der NO-Konzentration emittierte Fluoreszenz gemessen. Untersucht wurde der Einfluss von Pravastatin in einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$ .

Abbildung 3.7 A veranschaulicht die Veränderung der Fluoreszenz eines Kardiomyozyten über die Zeit nach Pravastatingabe. Die dabei berechneten und normalisierten Fluoreszenzwerte ( $F/F_0$ ) sind in der Abbildung rechts als Kurvendiagramm aufgetragen, wobei  $F_0$  der Ausgangs-Fluoreszenz zu Beginn der Messung vor Pravastatingabe entspricht.

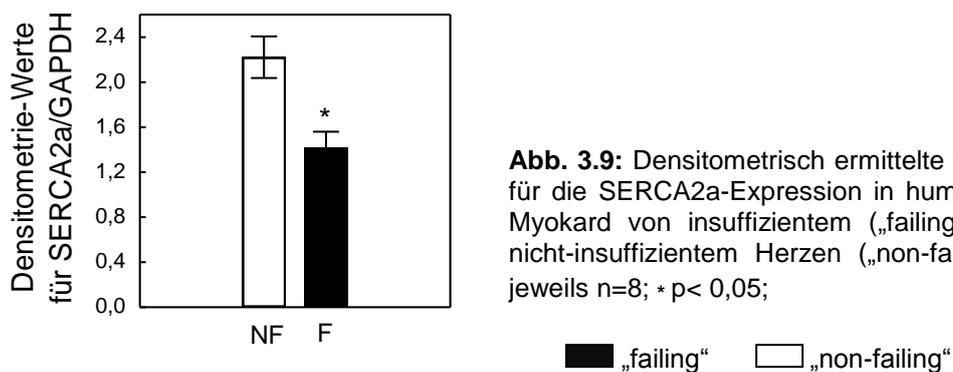


**Abb. 3.7:** (A): Exemplarische Abbildung des zeitabhängigen Anstiegs der NO-Freisetzung nach Pravastatingabe mittels Konfokalmikroskopie und des Fluoreszenz-Indikators DAF-FM.. (B): Auftragung der dazu gehörigen normierten Fluoreszenzwerte über die Zeit.

Wie man in der Abbildung deutlich erkennen kann, steigt bereits ab 2 Minuten nach Pravastatingabe die Fluoreszenz des Farbstoffs durch Erhöhung der intrazellulären NO-Konzentration nahezu linear an. Nach 14 Minuten wurde ein durchschnittlicher Zuwachs um 1/3 des  $F_0$ -Werts registriert. Dieser Effekt trat in 5 von 8 Messungen auf. Dabei betrug der Anstieg der normalisierten Fluoreszenz ( $F/F_0$ ) nach 14 min Pravastatineinwirkung  $21 \pm 5$  % vom Ausgangswert (= 0 min) ( $p < 0,05$ ). Damit konnte gezeigt werden, dass Pravastatin in einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  zu einem signifikanten, zeitabhängigen Anstieg des zytosolischen NO in adulten isolierten Vorhofkardiomyozyten führt.

### 3.4 Einfluss von Pravastatin auf die SERCA-Expression

Die SERCA2a-Expression in humanem terminal insuffizientem Herzgewebe wurde mittels Western-Blot-Messungen quantifiziert und mit „non-failing“ Myokardgewebe von herzgesunden Spenderherzen verglichen. Abbildung 3.9 fasst die Mittelwerte der SERCA-Proteinexpression (normalisiert auf GAPDH) für insgesamt 16 Patienten zusammen („non-failing“ Herzgewebe von den Pat. 21-28 aus der Tab. 2.1 und „failing“ Myokard aus 8 explantierten Herzen von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz unterschiedlicher Genese).

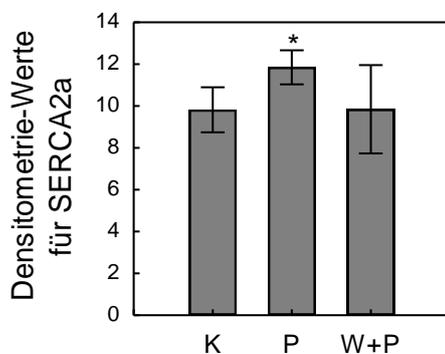


**Abb. 3.9:** Densitometrisch ermittelte Werte für die SERCA2a-Expression in humanem Myokard von insuffizientem („failing“) vs. nicht-insuffizientem Herzen („non-failing“); jeweils  $n=8$ ;  $* p < 0,05$ ;

Die Daten zeigen, dass bei schwerer Herzinsuffizienz im Myokardgewebe eine signifikant reduzierte Expression der SR-Kalzium-ATPase, SERCA2a, vorliegt.

Um den potentiellen Einfluss von Pravastatin auf die Expression dieses Proteins zu charakterisieren, wurden ebenfalls Western-Blot-Analysen an adulten Zellkulturen von Kaninchen-Kardiomyozyten, die mit  $10 \mu\text{M}$  Pravastatin für 24 h inkubiert wurden, durchgeführt. Die densitometrisch ermittelten SERCA-Expressions-Werte wurden

parallel mit den jeweils unbehandelten Zellkulturen aus dem gleichen Herzen verglichen. Das Ergebnis ist in der Abbildung 3.10 zusammengefasst. Neben der unbehandelten Kontrolle wurde eine dritte Gruppe sowohl mit Pravastatin als auch mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin (100 nM) co-inkubiert. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der SERCA2a-Expression in der Pravastatin-Gruppe ( $123,13 \pm 8$  %,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-Zellkultur (100%). Dieser Effekt wurde durch Wortmannin aufgehoben. Allerdings verliert dieser Unterschied seine statistische Signifikanz nach GAPDH-Normalisierung ( $p = 0,09$ ), was auf eine erhöhte Variabilität der GAPDH-Werte in dieser Messreihe zurückzuführen ist.



**Abb. 3.10:** Densitometrisch ermittelte Werte für die SERCA2a-Expression in Zellkulturen aus adulten Kaninchen-Kardiomyozyten nach 24 h Inkubation mit Pravastatin 10  $\mu$ M (P) oder mit Wortmannin (100 nM) mit Pravastatin (W+P); K= Kontrollgruppe; (n=4); \*  $p < 0,05$

## 4. Diskussion

Statine (HMG-CoA-Reduktase-Hemmer) sind effektive Medikamente zur Senkung des Cholesterinspiegels im Blut. Sie werden außerdem zur primären und sekundären Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt. Eine Vielzahl von Studien haben zusätzliche positive Effekte der Statine zeigen können, die nicht im Zusammenhang mit der Lipidsenkung stehen (Kureishi et al. 2000, Laufs et al. 2000, Laufs 2003, Laufs und Liao 2000, Banach et al. 2005, Nakao et al. 2007, Yamamoto et al. 2007). Viele aktuelle Studien befassen sich mit dem Nachweis dieser pleiotropen Effekte sowie der Aufklärung der jeweiligen zugrundeliegenden Mechanismen, um neue klinisch-therapeutische Ansätze und mögliche weitere Indikationen für Statine aufzudecken. Die direkten Effekte der Statine auf das Myokard sind weitgehend unbekannt. Einige wenige Studien an Tiermodellen oder an isolierten Tierherzen haben bisher interessante Ergebnisse gezeigt, die eine kardioprotektive Wirkung der Statine vermuten lassen. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals auch an isoliertem adulten menschlichen Herzgewebe die Wirkung des HMG-CoA-Reduktase-Hemmers Pravastatin untersucht. Dabei wurden zum einen mögliche Effekte auf kontraktile Parameter charakterisiert, zum anderen wurde auf molekularer Ebene der Einfluss von Pravastatin auf die Akt/ GSK3 $\beta$ -Signalkaskade sowie auf 2 nachgeschaltete „downstream“ Effektoren, die NO-Synthese und die SERCA2a-Expression, bestimmt.

### 4.1 Methodische Aspekte

Für die Charakterisierung der speziellen Wirkung von Pravastatin auf das Myokard wurden in der vorliegenden Arbeit isolierte humane Trabekel aus dem Ventrikel explantierter Herzen bzw. isolierte adulte Kaninchen-Kardiomyozyten verwendet. Dadurch konnte ein durch Endothelzellen vermittelter kardioprotektiver Effekt von Pravastatin (Harris et al. 2004, Yamamoto et al. 2007) aus unserer Untersuchung weitgehend ausgeschlossen werden.

Im Vergleich zu in-vivo-Experimenten erlauben Versuche mit isolierten humanen Trabekelpräparaten, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, bestmöglich kontrollierte Versuchsbedingungen mit einer definierten Vordehnung (Länge  $L_{max}$ ), bei der die maximale isometrische Kontraktionskraft entwickelt wird. Die Stimulationsfrequenz (1 Hz) sowie die Temperatur der physiologischen

Tyrodellösung im Organbad wurden konstant gehalten (37 °C). Systemische neurohumorale Einflüsse entfallen bei diesem Versuchsaufbau. Die Frage nach der Übertragbarkeit von tierexperimentellen Daten auf das menschliche Myokard entfällt.

Um längerfristige Effekte (24-48 h) untersuchen zu können, wurden Zellkulturen von isolierten adulten Kaninchen-Kardiomyozyten angelegt.

In der vorliegenden Arbeit wird das Expressionsniveau eines Proteins mit Hilfe der semiquantitativen Western-Blot-Methode durch Vergleich der zu untersuchenden Probe mit einer erstellten Referenzprobe ermittelt, ohne dabei die absoluten Gewebekonzentrationen zu bestimmen (vgl. 2.3.8). Im Gegensatz zum qualitativen Western-Blot erfolgt hier nicht der Nachweis eines bestimmten Proteins, sondern die Messung von dessen Gewebekonzentration im Vergleich zu einem Referenzprotein, das unter den Versuchsbedingungen nicht reguliert wird.

## **4.2 Pravastatin**

Die HMG-CoA-Reduktase-Hemmer unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Pharmakodynamik und Pharmakokinetik. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Versuche Pravastatin ausgewählt. Dieses Statin hat den Vorteil, dass es bereits in aktiver Form vorliegt und nicht erst durch Metabolisierung im Organismus aktiviert werden muss, wie das zum Beispiel bei Simvastatin der Fall ist (Pan 1991).

Darüber hinaus ist die Konzentration von Pravastatin in extrahepatischem Gewebe im Vergleich zu den anderen Statinen höher (Aktories et al. 2005), was möglicherweise die Relevanz der pleiotropen Effekte dieses Statins außerhalb der Leber erhöht.

Obwohl Pravastatin als hydrophiles Natriumsalz vorliegt und es deshalb denkbar ist, dass es nicht oder nur erschwert die lipophile Zellmembran der Kardiomyozyten passieren kann (Aso et al. 2007), haben einige Studien eine Wirkung dieses Statins auf isolierte Kardiomyozyten zeigen können (Verma et al. 2004, Bergmann et al. 2004, Moiseeva et al. 2007). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten wir akute Effekte von Pravastatin in isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten nachweisen. Somit kann indirekt von einer Aufnahme von Pravastatin in die Zellen ausgegangen werden (vgl. 3.3).

Zudem ist bekannt, dass Pravastatin zumindest in Hepatozyten aktiv über spezielle Membrantransporter, die Natrium-unabhängigen-Gallensäure-Transporter OATP1B1 (organic anion transporting polypeptide 1B1), aufgenommen wird. Diese Membrantransporter wurden auch in der Zellmembran anderer Gewebearten nachgewiesen (Zhang et al. 2007, Monks et al. 2007). Daher ist es denkbar, dass Pravastatin auch in die Kardiomyozyten über diese Transporter aufgenommen wird. Hierzu gibt es bisher jedoch noch keine Studien, die dies definitiv belegen können.

#### **4.3 Funktionelle Effekte von Pravastatin auf das Kontraktionsverhalten humaner Myokardpräparate**

Eine Reihe von Studien an verschiedenen Tiermodellen bzw. an isolierten Kardiomyozyten deuten darauf, dass Statine über pleiotrope Effekte einer kardialen Hypertrophie sowie Fibrosierung entgegen wirken und die kardiale Funktion verbessern können (Oi et al. 1999, Patel et al. 2001, Luo et al. 1999, Ichhara et al. 2006, Moiseeva et al. 2007, Yu et al. 2004). Zum Beispiel konnten Bauersachs und Kollegen in einem Tiermodell für ischämisch-bedingte chronische Herzinsuffizienz zeigen, dass Cerivastatin die linksventrikuläre Funktion und das Remodeling signifikant verbessert und damit möglicherweise das Fortschreiten der chronischen Herzinsuffizienz verzögern kann (Bauersachs et al. 2001). Die Autoren einiger Studien postulieren, dass die durch Statine induzierte Verbesserung der kardialen Funktion einer Verbesserung der Endothelfunktion und damit einer gesteigerten Koronarperfusion zuzuschreiben ist (Laufs 2003, Abe et al. 2006, Lefer et al. 2001, Landmesser et al. 2004, Landmesser et al. 2005). Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Studien einen positiven Effekt der Statine auf die Hämodynamik belegen. Horwich und Kollegen konnten ferner zeigen, dass sich durch die Einnahme von Statinen bei Patienten mit schwerer ischämischer sowie interessanterweise auch nicht-ischämischer Herzinsuffizienz die Prognose gebessert hatte und dass die Notwendigkeit zur sofortigen Herztransplantation durch Verbesserung der kardialen Funktion verzögert wurde (Horwich et al. 2004). Hervorzuheben ist, dass Statine auch bei idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (DCM), wo pleiotrope Effekte auf das Endothel oder auf arteriosklerotische Plaques pathophysiologisch bisher eine untergeordnete Rolle spielten, einen positiven Effekt auf die kardiale Funktion und die Symptomatik der DCM zeigten (Node et al. 2003, Yamada et al. 2006). Daraus

leiteten wir für die vorliegende Arbeit die Hypothese ab, dass Pravastatin direkt die Kontraktilität von humanem Myokard beeinflusst.

#### **4.3.1 Kurzfristige dosisabhängige Effekte von Pravastatin auf die kontraktile Parameter**

Um die Effekte von Pravastatin auf die Kontraktilität im humanen Myokard zu charakterisieren, führten wir Experimente sowohl an isolierten Ventrikel- als auch an Vorhoftrabekeln durch. Untersucht wurden die Effekte von Pravastatin in unterschiedlichen Konzentrationen (10 und 100  $\mu\text{M}$  sowie 1 mM). In mikromolarer Konzentration konnte dabei kein signifikanter Effekt von Pravastatin auf sämtliche Kontraktilitätsparameter der untersuchten ventrikulären Muskelstreifen festgestellt werden (vgl. Abb. 3.1 B). Qualitativ ähnliche Ergebnisse wurden auch für die humanen Vorhofpräparate aus dem rechten Herzohr gemessen. Interessanterweise zeigte sich sowohl bei den Ventrikel- als auch bei den Vorhoftrabekeln bei einer Konzentration von 1 mM ein signifikanter Abfall der diastolischen Spannung. Dieses moderate Absenken der diastolischen Spannung könnte von pathophysiologischer Bedeutung sein (vgl. 4.4.2).

Allerdings ist zu bedenken, dass die AUC (area under the curve) für Pravastatin in der Tagesmaximaldosis von 40 mg p. o., gemessen über 24 h an gesunden jungen Menschen, im Bereich von  $\text{ng equiv} \times \text{ml}^{-1}$  ( $189 \pm 13$  bzw.  $111,8 \pm 68,1$ ) liegt (Pan 1991, Lilja et al. 1999). Es ist deshalb anzunehmen, dass die physiologisch erreichbaren Konzentrationen für Pravastatin sehr niedrig sind und dadurch die in unserer Studie erhobenen funktionellen Daten im milimolaren Pravastatin-Konzentrationsbereich für die klinische Behandlung mit Pravastatin von geringer Relevanz sind.

Die Schlussfolgerung aus diesen Daten der vorliegenden Arbeit lautet daher, dass Pravastatin keinen relevanten akuten Effekt auf das Kontraktionsverhalten in humanem insuffizientem Myokard hat. Es stellte sich jedoch die Frage, ob Pravastatin dennoch einen mittelfristigen Einfluss auf die Kontraktilität ausübt, weil der zugrundeliegende Mechanismus beispielsweise eine längere Wirkdauer benötigt, um messbare Veränderungen zu bewirken. So wurde z.B. in vaskulären glatten Muskelzellen eine Schwächung der Kalziumsensitivität über eine Veränderung der Phosphorylierung der Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase durch Pravastatin-assoziierte Änderungen in der Rho/ROCK-Signalkaskade beobachtet (Uehata et al.

1997, Liao et al. 2009, Laufs et al. 2000). Ein anderer denkbarer Wirkmechanismus könnte die Beeinflussung der Aktivität der PI3K-Akt-Signalkaskade sein (Bergmann et al. 2004), die in einer rezenten Arbeit als Regulator der SERCA2a, einem Schlüsselprotein der intrazellulären Kalziumhomöostase in Kardiomyozyten, identifiziert wurde (Michael et al. 2004).

#### **4.3.2 Mittelfristige Effekte von Pravastatin auf die kontraktile Parameter**

Nachdem wir keine messbaren akuten Effekte von Pravastatin auf humanes insuffizientes Myokard beobachten konnten, untersuchten wir den Einfluss von Pravastatin auf die Kontraktilität während einer längeren Messdauer von 6 Stunden. Hierzu wählten wir ventrikuläre Streifenpräparate aus terminal insuffizienten Humanherzen. Ventrikelpreparate sind im Vergleich zu Vorhofpreparaten stabiler und eignen sich dadurch besser für Untersuchungen mit längerer Messdauer. Pravastatin (100 µM) zeigte jedoch auch mittelfristig, d.h. über einen Zeitraum von 6 h, keinen signifikanten Einfluss auf die Kontraktilität in isoliertem insuffizientem humanem Ventrikelmuskel (vgl. Abb. 3.3). Diese Daten sind mit den Ergebnissen aus einer aktuellen Studie vereinbar. Smetanina und Kollegen konnten bei Patienten mit ischämischer, systolischer Herzinsuffizienz und koronarer Herzkrankung (KHK) durch die Einnahme von Simvastatin über 4 Monate keinen Effekt auf die linksventrikuläre Funktion des Herzens nachweisen (Smetanina et al. 2006).

Andere Studien konnten jedoch zeigen, dass die akute Verabreichung von Statinen direkt nach einer Ischämiephase mit anschließender Reperfusion (I/R) die Entstehung und das Ausmaß einer kardialen Dysfunktion günstig beeinflussen kann. Eine dauerhafte Statin-Behandlung zeigte hierbei jedoch keinen zusätzlichen protektiven Effekt (Szárszoi et al. 2008, Lefer et al. 2001).

Eine akute Ischämie mit anschließender Reperfusion führt zu zahlreichen Veränderungen im Myokard. Es kommt zu einer erhöhten Apoptoserate der Kardiomyozyten durch I/R induzierte Schädigung sowie zu einer inkompletten Erholung der kontraktile Myokardfunktion, also zu einem Stunning-Phänomen (einer reversiblen kontraktile Dysfunktion) (Braunwald 1991, Kang et al. 2000). Ferner führt die I/R zu einer Aktivierung der Akt-Aktivität in Kardiomyozyten (Verma et al. 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir terminal insuffizientes Myokard verwendet, das eher einer chronischen als akuten Ischämie ausgesetzt war, sodass

in unserem Versuchsaufbau der adäquate Stimulus der durch eine I/R im Myokard ausgelöst wird und für die Entfaltung der protektiven Wirkungen der Statine entscheidend zu sein scheint, fehlt. Zudem stammt das von uns verwendete Herzgewebe aus einem heterogenen Patientenkollektiv mit unterschiedlichen Ursachen für eine terminale Herzinsuffizienz (überwiegend ischämische und dilatative Kardiomyopathie).

Andere Studien deuten auf protektive Eigenschaften nach I/R auch durch eine andauernde Statinbehandlung (Bauersachs et al. 2001) hin. Abe und Kollegen haben die chronischen Effekte von Pravastatin an Ratten nach einem akuten Myokardinfarkt untersucht. Hierbei konnte eine Verbesserung der kardialen Funktion mittels Echokardiographie festgestellt werden (Abe et al. 2006). Diese Ergebnisse werden durch weitere Arbeiten unterstützt (Nahrendorf et al. 2002, Hayashidani et al. 2002).

Interessanterweise weisen die Daten einer Studie von Satoh und Kollegen auf eine potentiell unterschiedliche Wirksamkeit von hydro- u. lipophilen Statinen hin, womit die oben genannten kontroversen Ergebnisse hinsichtlich einer dauerhaften Statinbehandlung möglicherweise erklärt werden könnten. Die Verabreichung von lipophilen Statinen war sogar mit einer Verschlechterung der kontraktiven Funktion während des myokardialen Stunnings assoziiert, während hydrophile Statine keinen messbaren Effekt zeigten (Satoh et al. 2008).

Zusammenfassend kann aus unseren funktionellen Daten geschlossen werden, dass Pravastatin weder akut noch mittelfristig in isoliertem insuffizienten humanem Myokard einen nachweisbaren Einfluss auf die Kontraktilität hat. Ob ein langfristiger Effekt, beispielweise über eine Erhöhung der SERCA-Expression existiert, lässt sich mit diesen Untersuchungen jedoch nicht ausschließen.

#### **4.4 Biomolekulare Effekte von Pravastatin in Kardiomyozyten**

Die PI3K-Akt-Signalkaskade reguliert über eine Vielzahl von nachgeschalteten Enzymen wichtige Zellprozesse. Über diese Signalkaskade wird auch die Aktivität der GSK3 $\beta$  reguliert, die selbst über andere Enzyme und Transkriptionsfaktoren zahlreiche wichtige Zellfunktionen beeinflusst, wie die Gentranskription, die

Proteintranslation, die Zelldifferenzierung, den Zellzyklus und die Apoptose (Cross et al. 1995, Franke et al. 1997, Hardt und Sadoshima 2002).

Viele Studien konnten zeigen, dass Statine einen kardiovaskulär-protectiven Effekt unabhängig von der cholesterinsenkenden Wirkung in Endothelzellen haben, der zum Teil über eine Aktivierung der antiapoptotischen PI3K-Akt-Signalkaskade zustande kommt (Kureishi et al. 2000, Ming et al. 2002, Nakao et al. 2007, Li et al. 2009, Li und Xu 2009, Wang J et al. 2005, Bell und Yellon 2003, Sanada et al. 2004).

Auch in anderen Zellenarten wurde für Statine ein protektiver Effekt über eine Aktivierung der PI3K-Akt-Signalkaskade nachgewiesen, wie zum Beispiel in retinalen Ganglion-Zellen (Kretz et al. 2006), in hippocampalen Neuronen (Wu et al. 2008), in glomerulären Podozyten (Bussolati et al. 2005) sowie in mesenchymalen Stammzellen (Xu et al. 2008) und glatten Muskelzellen der Aorta (Son et al. 2007). Ob Statine auch die Fähigkeit besitzen, diese Signalkaskade in Kardiomyozyten zu aktivieren und dadurch protektive Eigenschaften zu entfalten, ist weitgehend ungeklärt. Bergmann und Kollegen konnten an isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigen, dass Statine eine durch Wortmannin (PI3K-Hemmer) blockierbare Akt-Aktivierung und über diese Signalkaskade eine Inaktivierung von GSK3 $\beta$  erreichen und damit auch einen schützenden Effekt gegenüber der Apoptose von Kardiomyozyten nach Hypoxiephasen erzielen. Bei Ratten, die intravenös mit Pravastatin behandelt wurden, konnte die gleiche Arbeitsgruppe in vivo eine akute Erhöhung der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung und damit Reduktion der GSK3 $\beta$ -Aktivität messen (Bergmann et al. 2004). Ebenfalls bei Ratten gelang es Wolfrum und Kollegen eine akute Aktivierung der kardialen PI3K-Akt-Signalkaskade durch Simvastatin nach I/R nachzuweisen (Wolfrum et al. 2004). Verma und Kollegen ist es gelungen in isolierten humanen Kardiomyozyten, die aus rechtsventrikulären Gewebeproben im Rahmen von Herzoperation bei Kindern mit Fallot-Tetralogie stammten, eine durch Pravastatin induzierte zusätzliche Akt-Aktivierung nach simulierter Hypoxie- und Reoxygenierungsphase nachzuweisen. Dies war mit einem kardioprotektiven Effekt vergesellschaftet (Verma et al. 2004).

Basierend auf diesen Studienergebnissen stellten wir die Hypothese auf, dass Pravastatin die Zell-protective Akt-GSK3 $\beta$ -Signalkaskade in adulten linksventrikulären Kardiomyozyten beeinflusst.

#### 4.4.1 Einfluss von Pravastatin auf die PI3K-Akt-GSK3 $\beta$ -Signalkaskade

Wir untersuchten zunächst in humanem Ventrikelmyokard die Proteinexpression sowie den Phosphorylierungsgrad von Akt und GSK3 $\beta$ . Dabei wurde terminal insuffizientes Myokard, welches im Rahmen von Herztransplantationen verfügbar war, mit funktionell gesundem Herzventrikelgewebe, welches aus Organspenderherzen stammte, das aus technischen Gründen nicht transplantiert werden konnte, verglichen. Während Akt und GSK3 $\beta$  auf Protein-Expressionsebenen in beiden Gruppen ähnliche Werte zeigten, stellten wir eine signifikante Erniedrigung von phosphoryliertem Akt (pAkt) im „failing“ Gewebe im Vergleich zum „non-failing“ Kontroll-Myokard fest. Auch pGSK3 $\beta$  war, obwohl keine statistische Signifikanz erreicht wurde, deutlich vermindert phosphoryliert. Unsere Studie ist erstmalig in der Lage eine deutliche „Down-Regulation“ der antiapoptotischen Akt-GSK3 $\beta$ -Signalkaskade bei schwerer Herzinsuffizienz in humanem Myokardgewebe nachzuweisen. Diese Ergebnisse bestätigen dabei tierexperimentelle Studien, die ebenfalls eine verminderte Induktion dieses „Cell-survival-Pathway“ in terminal insuffizienten Mäuseherzen und im Skelettmuskel von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz finden (Toth et al. 2011).

Demgegenüber berichtet die Arbeitsgruppe von Haq und Kollegen von einer Erhöhung der Akt- sowie einer Abnahme der GSK3 $\beta$ -Aktivität bei Herzinsuffizienz (Haq et al. 2001). Somit sind unsere Daten hierzu kontrovers. Die Gründe hierfür sind mannigfaltig. Bereits früher gab es kontroverse Ergebnisse hinsichtlich der Aktivität dieser Signalkaskade in humanem Herzgewebe (Razeghi et al. 2003, Baba et al. 2003, Razeghi und Taegtmeyer 2004). Außerdem spielt hierbei auch das untersuchte Patientenkollektiv eine Rolle. Die Dauer und die zugrundeliegende Ätiologie der Herzinsuffizienz, sowie die Medikation und zusätzliche Erkrankungen der Patienten wie zum Beispiel Diabetes mellitus gehören auch zu den Faktoren, die die Aktivität der untersuchten Signalkaskade beeinflussen können (Razeghi et al. 2002, Razeghi und Taegtmeyer 2004). In unserer Studie hatten wir Zugriff auf eine relativ große und gut charakterisierte Patienten- und Kontrollgruppe. Ferner wurden alle Proben unter standardisierten Bedingungen entnommen und weiterverarbeitet. Insbesondere die Gewebeproben der Kontrollgruppe stellen bezüglich Verfügbarkeit und Entnahmebedingungen ein Problem dar. So mussten Haq und Kollegen hierfür z. B. auf post-mortem-Gewebeproben zurückgreifen, was per se eine relative

Abnahme der Phosphorylierung im Vergleich zur Herzinsuffizienzgruppe erklären könnte.

Unsere Daten deuten eindeutig auf eine reduzierte Aktivität der PI3K-Akt-GSK3 $\beta$ -Signalkaskade bei der schweren Herzinsuffizienz hin. Diese Signalkaskade könnte als therapeutischer Ansatz genutzt werden, beispielsweise durch eine Aktivierung mittels Statine, um auf die Prognose und Symptome der Herzinsuffizienz positiv einzuwirken.

Um die langfristige Wirkung von Pravastatin auf diese Signalkaskade in adulten Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurden Zellkulturen aus isolierten ventrikulären Kaninchen-Kardiomyozyten angelegt. Zunächst einmal demonstrierten wir in den angelegten Zellkulturen den Effekt von IGF-1, einem etablierten PI3K-Aktivator, auf diese Signalkaskade. IGF-1 erhöhte, wie erwartet, die Phosphorylierung sowohl von Akt als auch von GSK3 $\beta$  signifikant nach 24-stündiger Inkubation. Dieser Effekt war durch Wortmannin, einem PI3K-Inhibitor, supprimierbar (vgl. Abb. 3.5).

Hiermit konnten wir zeigen, dass diese Methode zur Charakterisierung der Wirkung von Pravastatin auf die untersuchte Signalkaskade geeignet ist.

Für die anschließenden Experimente wurde Pravastatin den Zellkulturen in einer Konzentration von 10  $\mu$ M hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden zeigte sich eine deutliche, wenn auch statistisch nicht signifikante Erhöhung des Phosphorylierungsgrades von Akt. Für GSK3 $\beta$  war auch nach 48 Stunden kein Effekt auf den Phosphorylierungsgrad erkennbar. Allerdings führte Wortmannin zu einer deutlichen Abnahme der Phosphorylierung von Akt und GSK3 $\beta$ . Möglicherweise ist unter den gewählten Bedingungen die basale Phosphorylierung schon so hoch, dass eine weitere Zunahme durch Pravastatin nur schwer zu erzielen ist. Interessanterweise waren auch in anderen Studien die Einflüsse von Pravastatin auf die Akt-/GSK3 $\beta$ -Signalkaskade nur unter hypoxischen Bedingungen offensichtlich (Venardos et al. 2007, Verma et al. 2004).

Eine weitere Variable, die die Ergebnisse signifikant beeinflussen kann, ist der Zeitfaktor. Bergmann und Kollegen konnten eine Akt-Aktivierung durch Pravastatin und Mevastatin in embryonalen und neonatalen Kardiomyozyten von Ratten zeigen. Dieser Effekt scheint akut zu sein und erreicht sein Maximum bei 15 min nach der Substanzgabe und ist bereits nach 60 min nicht mehr nachweisbar (Bergmann et al.

2004). Eine vergleichbar starke Akt-Aktivierung (1,4 Fach) haben wir in adulten Kaninchen-Kardiomyozyten bei gleicher Pravastatinkonzentration (10  $\mu\text{M}$ ) nachweisen können. Dies jedoch nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Eine mögliche Erklärung für diese offensichtlichen Unterschiede kann neben den unterschiedlichen Spezies (Ratten vs. Kaninchen) auch die Tatsache sein, dass sich embryonale und neonatale Zellen von adulten ausdifferenzierten Kardiomyozyten hinsichtlich ihres Stoffwechsels sowie ihrer Genexpression unterscheiden und daher auch auf Reize von Außen unterschiedlich reagieren können.

Bergmann und seine Kollegen präsentieren außerdem einen Anstieg von pGSK3 $\beta$  in Zellkulturen unter Mevastatineinfluss. Mevastatin ist ein lipophiles Statin. Dass lipophile und hydrophile Statine unterschiedliche Effekte im Myokard haben können, wurde bereits beschrieben (Ichihara K et al. 1999, Oi et al. 1999, Satoh et al. 2008) (vgl. S.48). Dennoch vermuten wir, dass auch Pravastatin im Myokard die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  erhöht, da diese von Akt reguliert wird (Cross et al. 1995, Markou et al. 2008). Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von Bergmann und Kollegen bestärkt, die an Mäusen in vivo eine Erhöhung der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung sowie eine gleichzeitige Reduktion der GSK3 $\beta$ -Aktivität 3 Stunden nach intravenöser Gabe von Pravastatin zeigen konnten.

Zusammenfassend unterstützen unsere Daten die Hypothese, dass Pravastatin, analog zu IGF-1, zu einer spezifischen PI3-Kinase vermittelten Aktivierung der kardialen Zell-protectiven Akt-GSK3 $\beta$ -Kaskade führt. Die Aktivität dieser Signalkaskade ist bei der schweren Herzinsuffizienz deutlich erniedrigt.

#### **4.4.2 Einfluss von Pravastatin auf die NO-Synthese/-Freisetzung**

Nachdem keine signifikante akute Wirkung von Pravastatin auf die kardiale Kontraktilität nachweisbar war, stellte sich die Frage, ob eine Akt-Aktivierung andere mögliche funktionelle Effekte nach sich ziehen könnte. Hierzu wurde mit Hilfe der Konfokalmikroskopie der akute Einfluss von Pravastatin auf die NO-Synthese bzw. Freisetzung, die unter anderem über die Aktivität von Akt reguliert wird, untersucht. Hierbei gelang es uns zu zeigen, dass Pravastatin (100  $\mu\text{M}$ ) zu einem signifikanten, zeitabhängigen Anstieg des zytosolischen NO in adulten isolierten Vorhofkardiomyozyten führt. Die gemessene Erhöhung der intrazellulären NO-Konzentration beruht wahrscheinlich auf einer, durch Pravastatin verursachten,

Erhöhung der NO-Produktion durch Phosphorylierung der eNOS. Auch wenn wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit die eNOS-Aktivität nicht direkt gemessen haben, so sprechen aktuelle Studienergebnisse dafür, dass Statine die Phosphorylierung, nicht jedoch die eNOS-Expression, beeinflussen (Wolfrum et al. 2004, Wang J et al. 2005, Li et al. 2009). Auch die Schnelligkeit, mit der die NO-Erhöhung aufgetreten ist, schließt weitgehend aus, dass dieser Effekt durch Änderungen der Expression zustande kommt. So konnte an Endothelzellen gezeigt werden, dass die Wirkung der Statine auf die Stabilisierung der eNOS-mRNA mehrere Stunden Einwirkzeit benötigt (Laufs und Liao 1998), während die Wirkung auf die eNOS-Phosphorylierung über eine PI3K-Akt-Signalkaskaden-Aktivierung innerhalb von Minuten messbar ist (Kureishi et al. 2000, Wang J et al. 2005, Rikitake und Liao 2005).

Eine Erhöhung des Phosphorylierungsgrades der eNOS (peNOS) führt zu einer gesteigerten eNOS-Aktivität und damit höheren NO-Produktion. Höhere NO-Konzentrationen, die auf eine erhöhte eNOS-Aktivität zurückgeführt werden können, haben in Kardiomyozyten, im Gegensatz zu einer Akkumulation von NO durch iNOS, eine antiapoptotische Wirkung (Razavi et al. 2005). Statine könnten also möglicherweise über diesen Effekt der höheren Apoptoserate von Kardiomyozyten bei der Herzinsuffizienz entgegen wirken.

Ferner führt in Kardiomyozyten ein NO-Synthese-Anstieg durch erhöhte Aktivität der eNOS zu einer Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase. Daraus resultiert unter anderem eine gesteigerte intrazelluläre Produktion des zyklischen Guanodinmonophosphates, was unter anderem eine Aktivierung der Proteinkinase G zur Folge hat (Maisson et al. 2003). Diese Kinase wiederum kann eine Phosphorylierung von Troponin I induzieren und führt so zu einer Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Myofilamente und somit zu einer Dissoziation des  $\text{Ca}^{2+}$  von Troponin C. Daraus resultiert eine Verbesserung der Relaxation (Layland et al. 2002, Hare 2003). Möglicherweise ist der im Rahmen dieser Arbeit bei den muskelphysiologischen Untersuchungen gemessene signifikante Abfall der diastolischen Spannung bei einer Pravastatin-Konzentration von 1 mM auf diesen Mechanismus zurückzuführen (vgl. 4.3.1).

#### 4.4.3 Einfluss von Pravastatin auf die SERCA2a-Expression

In-vitro-Experimente implizieren, dass eine erhöhte GSK-3 $\beta$ -Aktivität (z.B. bei verminderter Akt-Aktivität) zu einer verminderten SERCA2a-Expression führt. Eine verminderte Expression dieses Kalzium-regulierenden Schlüsselproteins ist von zentraler pathophysiologischer Bedeutung für das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz (Pieske et al. 2002). Unsere Hypothese lautete deshalb, dass eine Aktivierung von Akt durch Pravastatin mittelfristig via GSK-3 $\beta$ -Inhibition zu einer Präservierung oder sogar Steigerung der SERCA2a-Expression führen wird. Wir untersuchten auch hier zunächst die SERCA2a-Expression in terminal insuffizientem Myokard und in funktionell unbeeinträchtigtem Myokard. Dabei ergeben die Daten eine signifikant niedrigere Expression von SERCA2a im insuffizienten humanen Ventrikelgewebe (vgl. Abb.3.9). Diese Daten sind passend zu der o. g. Reduzierung der Akt-GSK3 $\beta$ -Signalkaskade-Aktivität bei schwerer Herzinsuffizienz (Vgl. 4.4.1) und zu Studienergebnissen, die auch eine verminderte Expression und Aktivität von SERCA2a bei Herzinsuffizienz gemessen haben (Endoh 2001, Periasamy und Kalyanasundaram 2007).

Anschließend untersuchten wir in den mit Pravastatin inkubierten isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten mit Hilfe von Western-Blot-Analysen die SERCA2a-Expression. Die Daten hierzu sind in Abb. 3.10 dargestellt. Pravastatin führt dabei zu einer durch Wortmannin antagonisierbaren Steigerung der Expression von SERCA. Dies bestätigt die Ergebnisse einer chinesischen Arbeitsgruppe, die an isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten eine durch Simvastatin vermittelte Erhöhung der SERCA-Proteinexpression beobachtete (Zheng und Hu 2005). Die aktuellsten Studien an verschiedenen Tiermodellen deuten, in Übereinstimmung mit unseren Schlussfolgerungen, auf eine Normalisierung bzw. Erhöhung der SERCA2a-Expression und -Aktivität durch verschiedene andere Statine bei kardialen Krankheitsbildern, die mit einer verminderten SERCA2a-Expression vergesellschaftet sind, hin (Yang et al. 2009, Yao et al. 2009). Dennoch sind hierzu weitere Untersuchungen zur eindeutigen Abklärung anzustreben. Da nicht alleine das Expressionsniveau von SERCA für die kontraktile Funktion entscheidend ist, sondern auch die Expressionsmuster der einzelnen Kalzium-regulierenden Proteine (Natrium-Kalzium-Austauscher, Phospholamban, etc.) eine Rolle spielen, sollten diese bei zukünftigen Untersuchungen mitberücksichtigt werden (Mørk et al. 2007, Mishra et al. 2005).

#### 4.5 Potentielle klinische Konsequenzen

Aus den Ergebnissen der vorgestellten Arbeit können im Bezug auf das Krankheitsbild der terminalen Herzinsuffizienz folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Pravastatin zeigt in therapeutischen Dosen keine akute oder mittelfristige Wirkung auf die Kontraktilität von insuffizientem humanen Myokard. Längerfristige Effekte können jedoch nicht ausgeschlossen werden.
2. Die Aktivierung der Akt-GSK3 $\beta$ -Signalkaskade ist bei schwerer Herzinsuffizienz im Vergleich zu nicht-insuffizientem Herzgewebe deutlich vermindert. Pravastatin scheint die Aktivität dieser Signalkaskade über eine Aktivierung der PI3K zu erhöhen.
3. Pravastatin induziert - möglicherweise über eine Steigerung der eNOS-Phosphorylierung - die NO-Produktion in der Herzmuskelzelle. Es erscheint gerechtfertigt zu spekulieren, dass dies Auswirkungen auf Apoptose und myokardiale Funktion haben könnte.
4. Eine Pravastatin-Behandlung ist in vitro mit einer Erhöhung der SERCA2a-Expression assoziiert. Dies könnte einer im Rahmen der schweren Herzinsuffizienz verminderten Expression und Aktivität dieses Schlüsselenzyms entgegenwirken und dadurch die Kontraktilität und Relaxation verbessern.

Pravastatin vermittelt somit potentiell akute und chronische kardioprotektive Effekte, die durch direkte Wirkung auf das Myokard zustande kommen und bei der Herzinsuffizienz von therapeutischem Nutzen sein könnten.

## 5. Zusammenfassung

Statine besitzen neben der lipidsenkenden Wirkung eine Reihe von pleiotropen Effekten, die von zusätzlichem therapeutischen Nutzen sein könnten. In der vorliegenden Arbeit wurden direkte Wirkungen von Pravastatin auf das Myokard untersucht, die bei der Herzinsuffizienz von therapeutischer Relevanz sein könnten. Die Experimente wurden an isolierten insuffizienten humanen Trabekelpräparaten oder an isolierten adulten Kaninchen-Kardiomyozyten durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen für Pravastatin in therapeutischer Konzentration keinen akuten oder mittelfristig messbaren Einfluss auf die Kontraktilität in isolierten humanen Herzmuskelstreifen. Ein längerfristiger Effekt kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen haben wir die kardiale, antiapoptotische Akt-GSK3 $\beta$ -Signalkaskade in insuffizientem Myokard sowie den Einfluss von Pravastatin auf diesen „Cell-survival-pathway“ untersucht. Dabei wurden das Expressionsniveau und der Phosphorylierungsgrad von Akt und GSK3 $\beta$  bestimmt. Unsere Daten deuten auf eine verminderte Aktivierung dieser Signalkaskade in terminal insuffizientem humanen Herzventrikelgewebe im Vergleich zu nicht-insuffizienten Kontrollherzen hin. Pravastatin aktiviert die Akt-GSK3 $\beta$ -Signalkaskade über die PI3-Kinase in humanen insuffizienten Ventrikelpräparaten sowie in isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten, was der erhöhten Apoptoserate im Rahmen einer Herzinsuffizienz entgegenwirken könnte.

Die erhöhte Aktivität dieser Signalkaskade zieht möglicherweise auch eine Induktion der SERCA2a-Expression nach sich, die bei der Herzinsuffizienz charakteristisch erniedrigt ist. Zur Klärung der klinischen Relevanz dieses Effektes sind weiterführende Untersuchungen erforderlich.

Als weiterer Effekt einer Pravastatin-vermittelten Aktivierung der PI3K-Akt-Signalkaskade konnte mittels Konfokalmikroskopie ein akuter Anstieg der zytosolischen NO-Produktion in Kardiomyozyten nachgewiesen werden.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass Pravastatin direkte Einflüsse auf das Myokard besitzt, die möglicherweise akute sowie chronische kardioprotektive Eigenschaften bewirken und bei der Herzinsuffizienz von therapeutischem Nutzen sein könnten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abe Y, Izumi T, Urabe A, Nagai M, Taniguchi I, Ikewaki K, Mochizuki S (2006): Pravastatin Prevents Myocardium from Ischemia-Induced Fibrosis by Protecting Vascular Endothelial Cells Exposed to Oxidative Stress *Cardiovasc. Drugs Ther* 20, 273-280
- Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage; Urban und Fischer Verlag, München 2005
- Aso S, Ise H, Takahashi M, Kobayashi S, Morimoto H, Izawa A, Goto M, Ikeda U (2007): Effective uptake of N-acetylglucosamine-conjugated liposomes by cardiomyocytes in vitro. *J Control Release* 122, 189-98
- Baba HA, Stypmann J, Grabellus F, Kirchhof P, Sokoll A, Schäfers M, Takeda A, Wilhelm MJ, Scheld HH, Takeda N (2003): Dynamic regulation of MEK/Erks and Akt/GSK-3b in human endstage heart failure after left ventricular mechanical support: myocardial mechanotransduction-sensitivity as a possible molecular mechanism. *Cardiovasc Res* 59, 390-399
- Banach M, Drożdż J, Okonski P, Rysz J (2005): Immunological Aspects of the Statins' Function in Patients with Heart Failure: A Report from the Annual Conference of ESC – Heart Failure. *Cell Mol Immunol* 2, 433-437
- Bauersachs J, Galuppo P, Fraccarollo D, Christ M, Ertl G (2001): Improvement of left ventricular remodeling and function by hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibition with cerivastatin in rats with heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 104, 982-5
- Bell RM, Yellon DM (2003): Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J Am Coll Cardiol* 41, 508-515
- Bełtowski J, Wójcicka G, Jamroz-Wiśniewska A (2009): Adverse Effects of Statins - Mechanisms and Consequences. *Curr Drug Saf* 4, 209-28
- Bergmann MW, Rechner C, Freund C, Baurand A, Jamali AL, Dietz R (2004): Statins inhibit reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis: role for glycogen synthase kinase 3beta and transcription factor beta-catenin. *J Mol Cell Cardiol* 37, 681-90
- Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205

- Bers DM, Bridge JH (1989): Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium pump. Ryanodine and voltage sensitivity. *Circ Res* 65, 334-342
- Bers DM, Lederer WJ, Berlin JR (1990): Intracellular Ca transients in rat cardiac myocytes: role of Na-Ca exchange in excitation-contraction coupling. *Am J Physiol* 258, C944-954
- Bers DM, Stiffel VM (1993): Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *Am J Physiol* 264, C1587-1593
- Bishop AL, Hall A (2000): Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348, 241-255
- Blanchard EM, Mulieri LA, Alpert NR (1984): The effect of 2,3-Butanedione Monoxime on the relation between initial heat and mechanical output of rabbit papillary muscle. *Biophys J* 45, 48a
- Blanchard EM, Alpert NR, Allen DG, Smith GL (1988): The effect of 2,3-Butanedione Monoxime on the initial heat-tension-time integral relation and aequorin output from ferret papillary muscle. *Biophys J* 53, 605a
- Braunwald E (1991): Stunning of the myocardium: an update. *Cardiovasc Drugs Ther* 5, 849-51
- Burridge K, Wennerberg K (2004): Rho and Rac Take Center Stage. *Cell* 116, 167-179
- Bussolati B, Deregibus MC, Fonsato V, Doublier S, Spatola T, Procida S, Di Carlo F, Camussi G (2005): Statins prevent oxidized LDL-induced injury of glomerular podocytes by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-signaling pathway. *J Am Soc Nephrol* 16, 1936-47
- Chang J, Xie M, Shah VR, Schneider MD, Entman ML, Wei L, Schwartz RJ (2006): Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14495-14500
- Cowie MR, Wood DA, Coats AJS, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, Sutton GC (1999): Incidence and aetiology of heart failure. *Eur Heart J* 20, 421-428

- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789
- Downward J (1995): A target of PI(3) kinase. *Nature* 376, 553-554
- Endoh M (2001): Altered regulation of cardiac contraction and relaxation by Ca<sup>2+</sup> in heart failure. *Clin Calcium* 11, 702-6
- Fabiato A (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 243, C1-14
- Fabiato A (1985): Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85, 247-289
- Fichtlscherer S, Schmidt-Lucke C, Bojunga S, Rössig L, Heeschen C, Dimmeler S, Zeiher AM (2006): Differential effects of short-term lipid lowering with ezetimibe and statins on endothelial function in patients with CAD: clinical evidence for 'pleiotropic' functions of statin therapy. *Eur Heart J* 27, 1182-1190
- Förstermann U, Münzel T (2006): Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation* 113, 1708-1714
- Franke TF, Yang S, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR and Tsichlis PN (1995): The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, 727-36
- Franke TF, Kaplan D, Cantley LC (1997): PI3K: Downstream AKTion Blocks Apoptosis. *Cell* 88, 435-437
- Fruen BR, Mickelson JR, Shomer NH, Roghair TJ, Louis CF (1994): Regulation of the Sarcoplasmic Reticulum Ryanodine Receptor by Inorganic Phosphate. *J Biol Chem* 265, 192-198
- Fryer MW, Neering IR, Stephenson DG (1988): Effects of 2,3-butanedione monoxime on the contractile activation properties of fast- and slow-twitch rat muscle fibres. *J Physiol* 407, 53-75
- Gordon AM, Homsher E, Regnier M (2000): Regulation of Contraction in Triated Muscle. *Physiol Rev* 80, 853-924
- Hamid SA, Bower HS, Baxter GF (2007): Rho kinase activation plays a major role as a mediator of irreversible injury in reperfused myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H2598-H2606

- Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J, Grazette L, Michael A, Hajjar R, Force T (2001): Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* 103, 670-7
- Hardt SE, Sadoshima J (2002): Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ : A Novel Regulator of Cardiac Hypertrophy and Development. *Circ Res* 90, 1055-1063
- Hare JM (2003): Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol* 35, 719-729
- Harris MB, Blackstone MA, Sood SG, Li C, Goolsby JM, Venema VJ, Kemp BE, Venema RC (2004): Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H560-H566
- Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Suematsu N, Kinugawa S, Die T, Wen J, Takeshita A (2002): Fluvastatin, a 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitor, Attenuates Left Ventricular Remodeling and Failure After Experimental Myocardial Infarction. *Circulation* 105, 868-873
- Hess P, Lansmann JB, Nilius B, Tsien RW (1986): Calcium channel types in cardiac myocytes: modulation by dihydropyridines and beta-adrenergic stimulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 8, 11-21
- Holmes L, Kritchevsky D (1985): Drugs Inhibiting HMG-CoA Reductase. *Pharmacol Ther* 31, 257-267
- Hoppe UC, Erdmann E (2001): Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz Herausgegeben vom Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung Bearbeitet im Auftrag der Kommission für Klinische Kardiologie in Zusammenarbeit mit der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft. *Z Kardiol* 90, 218-237
- Horwich TB, MacLellan WR, Fonarow GC (2004): Statin therapy is associated with improved survival in ischemic and non-ischemic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 43, 642-8
- Ichihara K, Satoh K, Yamamoto A, Hoshi K (1999): Are all HMG-CoA reductase inhibitors protective against ischemic heart disease? *Nippon Yakurigaku Zasshi* 114, 142-149
- Ichihara S, Noda A, Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara G, Oikawa S, Kawanishi S, Yamada Y, Yokota M (2006): Pravastatin increases survival and suppresses an

- increase in myocardial matrix metalloproteinase activity in a rat model of heart failure. *Cardiovasc Res* 69, 726-735
- Ito S, Kume H, Oguma T, Ito Y, Kondo M, Shimokata K, Suki B, Naruse K (2006): Roles of stretch-activated cation channel and Rho-kinase in the spontaneous contraction of airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 552, 135-142
- Kai T, Arima S, Taniyama Y, Nakabou M, Kanamasa K. (2008): Comparison of the effect of lipophilic and hydrophilic statins on serum adiponectin levels in patients with mild hypertension and dyslipidemia: Kinki Adiponectin Interventional (KAI) Study. *Clin Exp Hypertens* 30, 530-40
- Kang PM, Haunstetter A, Aoki H, Usheva A and Izumo S (2000): Morphological and Molecular Characterization of Adult Cardiomyocyte Apoptosis During Hypoxia and Reoxygenation. *Circ Res* 87, 118-125
- Kobayashi T, Solaro RJ (2005): Calcium, Thin Filaments, and the Integrative Biology of Cardiac Contractility. *Ann Rev Physiol* 67, 39-67
- Koch-Weser J, Blinks JR (1963): The influence of the interval between beats on myocardial contractility. *Pharmacol Rev* 15, 601-652
- Kockskämper J, Sheehan KA, Bare DJ, Lipsius SL, Mignery GA, Blatter LA (2001): Activation and propagation of Ca(2+) release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *Biophys J* 81, 2590-2605
- Kretz A, Schmeer C, Tausch S, Isenmann S (2006): Simvastatin promotes heat shock protein 27 expression and Akt activation in the rat retina and protects axotomized retinal ganglion cells in vivo. *Neurobiol Dis* 21, 421-30
- Krukemyer JJ, Talbert RL (1987): Lovastatin: a new cholesterol-lowering agent. *Pharmacotherapy* 7, 198-210
- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lafer DJ, Serssa WC, Walsh K (2000): The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 6, 1004-10
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, Spiekermann S, Hilfiker-Kleiner D, Templin C, Kotlarz D (2004): Statin-Induced Improvement of Endothelial Progenitor Cell Mobilization, Myocardial Neovascularization, Left Ventricular Function, and Survival After Experimental

- Myocardial Infarction Requires Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* 110, 1933-1939
- Landmesser U, Bahlmann FH, Mueller M, Spiekermann S, Kirchhoff N, Schulz S, Manes C, Fischer D, Groot K, Fliser D (2005): Simvastatin Versus Ezetimibe Pleiotropic and Lipid-Lowering Effects on Endothelial Function in Humans. *Circulation* 111, 2356-2363
- Laufs U (2003): Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol* 58, 719-731
- Laufs U, Liao JK (1998): Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 273, 24266-71
- Laufs U, Liao JK (2000): Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Cardiovasc Med* 10, 143-8
- Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz M, Nickenig G, Liao JK, Böhm M (2000): Suppression of Endothelial Nitric Oxide Production After Withdrawal of Statin Treatment Is Mediated by Negative Feedback Regulation of Rho GTPase Gene Transcription. *Circulation* 102, 3104-3110
- Layland J, Li JM, Shah AM (2002): Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol* 540, 457-467
- Lefer AM, Scalia R, Lefer DJ (2001): Vascular effects of HMG CoA-reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 49, 281-287
- Lefer AM, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Hayward R, Lefer DJ (2007): Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. *Circulation* 100, 178-84
- Lennernas H, Fager G (1997): Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clin Pharmacokinet* 32, 403-25
- Li X, Wang P, Xu X, Wang Y, Xia Y, Wang D (2009): Simvastatin Increases the Activity of Endothelial Nitric Oxide Synthase via Enhancing Phosphorylation. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 29, 286-90
- Li X, Xu B (2009): HMG-CoA reductase inhibitor regulates endothelial progenitor function through the phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signal transduction pathway. *Appl Biochem Biotechnol* 157, 545-53

- Liao JK (2002): Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest* 110, 285-288
- Liao JK, Seto M, Noma K (2009): Rho Kinase (ROCK) Inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 50, 17-24
- Lilja JJ, Kivistö KT, Neuvonen PJ (1999): Grapefruit juice increases serum concentrations of atorvastatin and has no effect on pravastatin. *Clin Pharmacol Ther* 66, 118-27
- Liu PY, Liu YW, Lin LJ, Chen JH, Liao JK (2009): Evidence for Statin Pleiotropy in Humans: Differential Effects of Statins and Ezetimibe on Rho-Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase Activity, Endothelial Function, and Inflammation. *Circulation* 119, 131-138
- Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser a, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy S (2002): Lifetime Risk for Developing Congestive Heart Failure: The Framingham Heart Study. *Circulation* 106, 3068-3072
- Lompré AM, Hajjar RJ, Harding SE, Kranias EG, Lohse MJ, Marks AR (2010): Ca<sup>2+</sup>-cycling and new therapeutic approaches for heart failure. *Circulation* 121, 822-30
- Luo JD, Zhang WW, Zhang GP, Liu XH, Guan JX (1999): Effects of simvastatin on left ventricular hypertrophy and function in rats with aortic stenosis. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 20, 345-8
- Maisson PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL (2003): Nitric oxide and cardiac function, ten years after, and continuing. *Circ Res* 93, 388-398
- Manickavasagam S, Ye Y, Lin Y, Perez-Polo RJ, Huang MH, Lui CY, Hughes MG, McAdoo DJ, Uretsky BF, Birnbaum Y (2007): The cardioprotective effect of a statin and cilostazol combination: relationship to Akt and endothelial nitric oxide synthase activation. *Cardiovasc Drugs Ther* 21, 321-30
- Markou T, Cullingford TE, Giraldo A, Weiss SC, Alsafi A, Fuller SJ, Clerk A, Sugden PH (2008): Glycogen synthase kinases 3alpha and 3beta in cardiac myocytes: regulation and consequences of their inhibition. *Cell Signal* 20, 206-18
- Martonosi A, Feretos R (1964): Sarcoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 239, 659-668
- Mathur N, Ramasubbu K, Mann DL (2008): Spectrum of Pleiotropic Effects of Statins in Heart Failure. *Heart Fail Clin* 4, 153-161

- Matsuda N, Hayashi Y, Takahashi Y, Hattori Y (2006): Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase is diminished in mesenteric arteries from septic rabbits depending on the altered phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: reversal effect of fluvastatin therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 319, 1348-54
- McCarey DW, McInnes IB, Madhok R, Hampson R, Scherbakov O, Ford I, Capell HA, Sattar N (2004): Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 363, 2015-21
- McMurray J. (1996): Concise Guide to the Management of Heart Failure - World Health Organization/Council on Geriatric Cardiology Task Force on Heart Failure Education. *Am J Geriatr Cardiol* 5, 13-30
- McMurray JJ, Stewart S (2000): Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83, 596-602
- Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92, 778-784
- Michael A, Haq S, Chen X, Hsich E, Cui L, Walters B, Shao Z, Bhattacharya K, Kilter H, Huggins G (2004): Glycogen synthase kinase-3beta regulates growth, calcium homeostasis, and diastolic function in the heart. *J Biol Chem* 279, 21383-93
- Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, Yang Z (2002): Rho GTPase/Rho Kinase Negatively Regulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation through the Inhibition of Protein Kinase B/Akt in Human Endothelial Cells. *Mol Cell Biol* 22, 8467-77
- Mishra S, Sabbah HN, Rastogi S, Imai M, Gupta RC (2005): Reduced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake and increased Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger expression in left ventricle myocardium of dogs with progression of heart failure. *Heart Vessels* 20, 23-32
- Monks NR, Liu S, Xu Y, Yu H, Bendelow AS, Moscow JA (2007): Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. *Mol Cancer Ther* 6, 587-98
- Moiseeva OM, Semyonova EG, Plevaya EV, Pinayev GP (2007): Effect of Pravastatin on Phenotypical Transformation of Fibroblasts and Hypertrophy of Cardiomyocytes in Culture. *Bul Exp Biol Med* 143, 54-57

- Mulieri LA, Alpert NR (1984): Differential effects of 2,3-Butanedione Monoxime (BDM) on activation and contraction. *Biophys J* 45, 47a
- Mulieri LA, Hasenfuss G, Littleman F, Blanchard EM, Alpert NR (1989): Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* 65, 1441-1449
- Nahrendorf M, Hu K, Hiller KH, Galuppo P, Fraccarollo D, Schweizer G, Haase A, Ertl G, Bauer WR, Bauersachs J (2002): Impact of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction: an experimental serial cardiac magnetic resonance imaging study. *J Am Coll Cardiol* 40, 1695-700
- Nakao T, Shiota M, Tatemoto Y, Izumi Y, Iwao H (2007): Pravastatine Induces Rat Aortic Endothelial Cell Proliferation und Migration via Activation of PI3K/Akt/mTOR/p70 S6 Kinase Signaling. *J Pharmacol Sci* 105, 334-341
- Node K, Fujita M, Kitakaze M, Hori M, Liao JK (2003): Short-Term Statin Therapy Improves Cardiac Function and Symptoms in Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 108, 839-843
- Ohkita M, Sugii M, Ka Y, Kitamura A, Mori T, Hayashi T, Takaoka M, Matsumura Y (2006): Differential effects of different statins on endothelin-1 gene expression and endothelial NOS phosphorylation in porcine aortic endothelial cells. *Exp Biol Med* 231, 772-6
- Oi S, Haneda T, Osaki J, Kashiwagi Y, Nakamura Y, Kawabe J, Kikuchi K (1999): Lovastatin prevents angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in cultured neonatal rat heart cells. *Eur J Pharmacol* 376, 139-48
- Pan HY (1991): Clinical pharmacology of pravastatin, a selective inhibitor of HMG-CoA reductase. *Eur J Clin Pharmacol* 40, 15-8
- Paradise NF, Schmitter JL, Surmits JM (1981): Criteria for adequate oxygenation of isometric kitten papillary muscle. *Am J Physiol* 241, H348-353
- Patel R, Nagueh SF, Tsybouleva N, Abdellatif M, Lutucuta S, Kopelen HA, Quinones MA, Zoghbi WA, Entman ML, Roberts R (2001): Simvastatin Induces Regression of Cardiac Hypertrophy and Fibrosis and Improves Cardiac Function in a Transgenic Rabbit Model of Human Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 104, 317-324
- Periasamy M, Kalyanasundaram A (2007): SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 35, 430-42

- Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuß G (1999): Ca<sup>2+</sup> handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 85, 38-46
- Pieske B, Maier LS, Schmidt-Schweda S (2002): Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> load in human heart failure. *Basic Res Cardiol* 97, 63-71
- Razavi HM, Hamilton JA, Feng Q (2005): Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacol Ther* 106, 147-62
- Razeghi P, Taegtmeyer H (2004): Activity of the Akt/GSK-3 $\beta$  pathway in the failing human heart before and after left ventricular assist device support. *Cardiovasc Res* 61, 196-197
- Razeghi P, Young ME, Cockrill TC, Frazier OH, Taegtmeyer H (2002): Downregulation of Myocardial Myocyte Enhancer Factor 2C and Myocyte Enhancer Factor 2C-Regulated Gene Expression in Diabetic Patients With Nonischemic Heart Failure. *Circulation* 106, 407-411
- Razeghi P, Bruckner BA, Sharma S, Youker KA, Frazier OH, Taegtmeyer H (2003): Mechanical Unloading of the Failing Human Heart Fails to Activate the Protein Kinase B/Akt/Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Survival Pathway. *Cardiology* 100, 17-22
- Rikitake Y, Liao JK (2005): Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* 97, 1232-5
- Ringer S (1882): Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *J Physiol* 2, 380-393
- Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JMO, Wun C (1996): The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med* 335, 1001-1009
- Sanada S, Asanuma H, Minamino T, Node K, Takashima S, Okuda H, Shinozaki Y, Ogai A, Fujita M, Hirata A (2004): Optimal Endpoints of Statin Use for Immediate Infarct Limitation: 5'-Nucleotidase as Another Downstream Molecule of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Circulation* 110, 2143-2149
- Satoh K, Takaguri A, Itagaki M, Kano S, Ichihara K (2008): Effects of Rosuvastatin and Pitavastatin on Ischemia-Induced Myocardial Stunning in Dogs. *J Pharmacol Sci* 106, 593-599

- Sawada N, Itoh H, Nakao K (2001): Novel actions of HMG-CoA reductase inhibitors (statins)--vascular and cerebral protection through inhibition of small GTPase Rho. *Nippon Rinsho* 59, 2470-5
- Scandinavian Simvastatin Survival Study (1994): Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344, 1383-1389
- Schillinger W, Janssen PM, Emami S, Henderson SA, Ross RS, Teucher N, Zeitz O, Philipson KD, Prestle J, Hasenfuss G (2000): Impaired contractile performance of cultured rabbit ventricular myocytes after adenoviral gene transfer of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Circ Res* 87, 581-7
- Schmidt A, Wagner K, Pieske B (2009): Cellular mechanisms of cardioprotective exercise training in heart failure. *Eur Heart J* 30 (Abstract Supplement), 289
- Sena A, Pedrosa R, Morais MG (2003): Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. *J Neurol* 250, 754-755
- Smetanina IN, Vaulin NA, Masenko VP, Gratsianskiĭ NA (2006): Short term simvastatin use in patients with heart failure of ischemic origin. Changes of blood lipids, markers of inflammation and left ventricular function. *Kardiologija* 46, 44-9
- Son BK, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Nakano T, Akishita M, Ouchi Y (2007): Gas6/Axl-PI3K/Akt pathway plays a central role in the effect of statins on inorganic phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 556, 1-8
- Szárszoi O, Malý J, Ostáda P, Netuka I, Bešík J, Kolár F, Ošadal B (2008): Effect of Acute and Chronic Simvastatin Treatment on Post-Ischemic Contractile Dysfunction in Isolated Rat Heart. *Physiol Res* 57, 793-796
- The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group (1998): Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and broad range in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med* 339, 1349-1357
- Tobacman LS (1996): Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu Rev Physiol* 58, 447-481
- Toth MJ, Ward K, van der Velden J, Miller MS, Vanburen P, Lewinter MM, Ades PA

- (2011): Chronic heart failure reduces Akt phosphorylation in human skeletal muscle: relationship to muscle size and function. *J Appl Physiol* 110, 892-900
- Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M (1997): Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389, 990-994
- Urbich C, Dimmeler S. (2005): Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney Int* 67, 1672-6
- Venardos KM, Perkins A, Headrick J, Kaye DM (2007): Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. *Curr Med Chem* 14, 1539-49
- Verma S, Rao V, Weisel RD, Li SH, Fedak PW, Miriuka S, Li RK (2004): Novel cardioprotective effects of pravastatin in human ventricular cardiomyocytes subjected to hypoxia and reoxygenation: beneficial effects of statins independent of endothelial cells. *J Surg Res* 119, 66-71
- Vollmer T, Key L, Durkalski V, Tyor W, Corboy J, Markovic-Plese S, Preiningerova J, Rizzo M, Singh I (2004): Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 363, 1607-8
- Wagner S, Seidler T, Picht E, Maier LS, Kazanski V, Teucher N, Schillinger W, Pieske B, Isenberg G, Hasenfuss G, Kögler H (2003): Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger overexpression predisposes to reactive oxygen species-induced injury. *Cardiovasc Res* 60, 404-12
- Wang CY, Liu PY, Liao JK (2008): Pleiotropic effect of statin therapy: molecular mechanism and clinical results. *Trends Mol Med* 14, 37-44
- Wang J, Tokoro T, Matsui K, Higa S, Kitajima I (2005): Pitavastatin at low dose activates endothelial nitric oxide synthase through PI3K-AKT pathway in endothelial cells. *Life Sci* 76, 2257-68
- Wang J, Xu Z, Kitajima I, Wang Z (2008): Effects of different statins on endothelial nitric oxide synthase and AKT phosphorylation in endothelial cells. *Int J Cardiol* 127, 33-9
- WHO (1995): Physician Guidelines (for GPs) designed to be translated and distributed worldwide to primary care physicians.

- Wolfrum S, Dendorfer A, Schutt M, Weidtmann B, Heep A, Tempel K, Klein HH, Dominiak P, Richardt G (2004): Simvastatin Acutely Reduces Myocardial Reperfusion Injury In Vivo by Activating the Phosphatidylinositide 3-Kinase/Akt Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 44, 348–355
- Wu H, Lu D, Jiang H, Xiong Y, Qu C, Li B, Mahmood A, Zhou D, Chopp M (2008): Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 25, 130-9
- Xu RX, Chen X, Hu SS, Chen JH, Liu XW, Liu XB, Shi LH, Cong XF (2008): Lovastatin protects mesenchymal stem cells against hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis through activation of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 36, 685-90
- Yamada T, Node K, Mine T, Morita T, Kioka H, Tamaki S, Tsukamoto Y, Masuda M, Okuda K, Fukunami M (2006): Atorvastatin therapy associated with improvement in left ventricular remodeling in a case of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med Sci* 332, 361-3
- Yamamoto E, Yamashita T, Tanaka T, Kataoka K, Tokutomi Y, Lai ZF, Dong YF, Matsuba S, Ogawa H and Kim-Mitsuyama S (2007): Pravastatin Enhances Beneficial Effects of Olmesartan on Vascular Injury of Salt-Sensitive Hypertensive Rats, via Pleiotropic Effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 556-563
- Yang Y, Mou Y, Hu SJ, Fu M (2009): Beneficial effect of rosuvastatin on cardiac dysfunction is associated with alterations in calcium-regulatory proteins. *Eur J Heart Fail* 11, 6-13
- Yao L, Chen GP, Lu X, Zheng LR, Mou Y, Hu SJ (2009): Effects of atorvastatin on calciumregulating proteins: a possible mechanism to repair cardiac dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Basic Res Cardiol* 104, 258-268
- Zhang W, Chen BL, Ozdemir V, He YJ, Zhou G, Peng DD, Deng S, Xie QY, Xie W, Xu LY (2007): SLCO1B1 521T-->C functional genetic polymorphism and lipid-lowering efficacy of multiple-dose pravastatin in Chinese coronary heart disease patients. *Br J Clin Pharmacol* 64, 346-52
- Zheng X, Hu SJ (2005): Effects of simvastatin on cardiac performance and expression of sarcoplasmic reticular calcium regulatory proteins in rat heart. *Acta Pharmacol Sin* 26, 696-704

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Burkert Pieske danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des Dissertationsthemas.

Herrn Dr. Albrecht Schmidt danke ich von Herzen für die sehr gute Betreuung meiner Arbeit, die permanente Unterstützung und Motivation sowie die tatkräftige Unterstützung in allen fachlichen und methodischen Fragen.

Frau Dr. Stefanie Walther und Herrn Prof. Jens Kockskämper gilt mein besonderer Dank für ihre Unterstützung bei der Konfokalmikroskopie und den intrazellulären NO-Messungen sowie für die zahlreichen Ratschläge.

Mein herzliches Dankeschön gilt auch meinen Mitdoktoranden/Innen für die harmonische Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit im Labor. Sie haben das Gelingen meiner Arbeit sehr gefördert. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Mounir Khafaga und Herrn Andreas Elgner für die Einweisung an den muskelphysiologischen Versuchsanlagen.

Auch bei den MTAs Frau Brigitte Korff und Frau Esther Maria Messerschmidt möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Sie standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie danken, die mir Studium und Promotion ermöglicht hat und immer für mich da ist.