

Aus dem Institut für Klinische Chemie
(Prof. Dr. med. A. Fischer)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Rolle von ERK1/2 im Prozess des kardialen Remodelings während chronischer Volumenbelastung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Svenja Laura Jochmann

aus

Wilhelmshaven

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: PD Dr. med. Dr. M. Schnelle

Ko-Betreuerin: Prof. Dr. med. D. Katschinski

Prüfungskommission

Referent: PD Dr. Dr. M. Schnelle

Ko-Referentin: Prof. Dr. Dörthe Katschinski

Datum der mündlichen Prüfung: 07.12.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Die Rolle von ERK1/2 im Prozess des kardialen Remodelings während chronischer Volumenbelastung“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Jochmann S, Elkenani M, Mohamed BA, Buchholz E, Lbik D, Binder L, Lorenz K, Shah AM, Hasenfuß G, Toischer K, Schnelle M (2019): Assessing the role of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in volume overload-induced cardiac remodelling. *ESC Heart Fail* 6, 1015–1026

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Chronische Herzinsuffizienz	1
1.1.1 Epidemiologie der chronischen Herzinsuffizienz	1
1.1.2 Klassifikation der chronischen Herzinsuffizienz.....	2
1.1.3 Klinik der chronischen Herzinsuffizienz.....	4
1.1.4 Ätiologie der Herzinsuffizienz	4
1.2 Kardiales Remodeling.....	5
1.2.1 Pathologisches und physiologisches Remodeling	5
1.2.2 Physiologische Grundlagen des kardialen Remodelings	6
1.2.3 Hypertrophie durch hämodynamische Belastung.....	7
1.2.4 Reaktivierung des fetalen Genprogrammes	9
1.2.5 Signalwege des kardialen Remodelings	11
1.3 MAP-Kinasen und MAPK-Kaskaden.....	12
1.3.1 Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2).....	14
1.3.2 JNK und p38.....	15
1.4 Bedeutung von ERK1/2 beim kardialen Remodeling	15
1.5 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterial	21
2.2 Tiere.....	22
2.2.1 Mauslinien.....	22
2.2.2 Aorto-kavale Shunt-Operation.....	22
2.2.3 Organentnahme	24
2.2.4 Echokardiographie	25
2.3 Molekulare Analyse	27
2.3.1 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung.....	27
2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	29
2.3.3 Western Blot	29
2.3.4 RNA-Isolation	31
2.3.5 cDNA-Synthese.....	32
2.3.6 qPCR	33
2.4 Histologische und immunhistochemische Analyse.....	34
2.4.1 Paraffineinbettung, Entwachsen, Rehydratation.....	34
2.4.2 Wheat germ Agglutinin (WGA)-Färbung.....	35
2.4.3 Pikro-Siriusrot-Färbung.....	36
2.4.4 Apoptose-Färbung	36

2.4.5	Immunhistofärbung ANP.....	37
2.5	Statistische Auswertung und Verschriftlichung.....	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Kardiale Veränderung bei WT C57Bl/6-Mäusen nach zweiwöchiger Volumenbelastung.....	39
3.1.1	Echokardiographischer und morphometrischer Nachweis der exzentrischen Hypertrophie nach zweiwöchiger Volumenbelastung.....	39
3.1.2	Reduzierte Aktivierung von ERK1/2 durch volumenbelastungsinduzierte exzentrische Hypertrophie.....	40
3.1.3	Keine Aktivitätsveränderung anderer MAP-Kinasen nach zweiwöchiger Volumenbelastung.....	42
3.2	Basalcharakterisierung von kardiomyozytenspezifischen ERK2 transgenen Mäusen...43	
3.2.1	Nachweis der ERK2-Überexpression auf Proteinebene.....	43
3.2.2	ERK2-Überexpression hat keinen Einfluss auf die echokardiographisch erhobene linksventrikuläre Funktion und Geometrie.....	44
3.2.3	ERK2-Überexpression hat keinen Einfluss auf die linksventrikuläre Masse.....	46
3.2.4	ERK2-Überexpression ist mit einer Erhöhung von ANP auf Gen- und Proteinniveau verbunden.....	46
3.3	Einfluss der kardiomyozytenspezifischen ERK2-Überexpression auf das kardiale Remodeling nach Volumenbelastung.....	49
3.3.1	ERK2-Überexpression hat keinen Einfluss auf das Remodeling der linksventrikulären Geometrie und Funktion nach Volumenbelastung	49
3.3.2	ERK2-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Fibrose, die Kardiomyozytengröße sowie die Apoptose.....	52
3.3.3	Reaktivierung des fetalen Genprogramms unter Volumenbelastung	54
3.3.4	ERK1/2 zeigt auch bei ERK2-Überexpression reduzierte Phosphorylierungslevel unter Volumenbelastung	55
3.3.5	Keine Veränderung anderer MAP-Kinasen bei ERK2-Überexpression nach Volumenbelastung.....	56
4	Diskussion	57
4.1	Volumenbelastung im Mausmodell.....	57
4.2	Volumenbelastung <i>in vivo</i> führt zur verringerten ERK1/2-Phosphorylierung.....	58
4.3	Mögliche Mechanismen der ERK1/2-Regulation unter Vorlasterrhöhung.....	60
4.4	ERK1/2 – maladaptiv oder kardioprotektiv?.....	61
4.5	ERK2-Überexpression bewirkt keine Veränderung der basalen kardialen Funktion und der ERK1/2-Aktivität	62
4.6	ERK2-Überexpression in Kardiomyozyten führt zu einer erhöhten ANP-Expression <i>in vivo</i>	63
4.7	ERK2-Überexpression verändert das kardiale Remodeling unter Volumenbelastung nicht.....	64
4.8	Limitationen der Studie	66
4.9	Fazit und Ausblick	67
5	Zusammenfassung.....	68
6	Literaturverzeichnis	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exzentrische und konzentrische Hypertrophie unter hämodynamischer Belastung.	8
Abbildung 2: Schematische vereinfachte Übersicht einiger Signalkaskaden im Rahmen des kardialen Remodeling unter hämodynamischer Belastung.	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der typischen MAPK-Kaskaden.	13
Abbildung 4: Experimentelle Ansätze zur Modulation der ERK1/2-Aktivität.	16
Abbildung 5: Aorto-kavale Shunt-Operation der Maus.	24
Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der M-Mode Auswertung.	26
Abbildung 7: Beurteilung der exzentrischen Hypertrophie in WT C57Bl/6-Mäusen nach zwei Wochen Volumenbelastung.	40
Abbildung 8: Expressionsniveau von ERK sowie Phosphorylierung des kardialen ERK1/2 am TEY-Motiv und der Autophosphorylierungsstelle Thr 188 nach zweiwöchiger Volumenbelastung.	41
Abbildung 9: Phosphorylierung der kardialen MAPK p38 sowie JNK in WT C57Bl/6N-Mäusen nach zweiwöchiger Volumenbelastung.	42
Abbildung 10: Nachweis der ERK2-Überexpression und Untersuchung der Phosphorylierung auf Proteinebene.	44
Abbildung 11: Echokardiographische kardiale Basalcharakterisierung der ERK2tg Mäuse.	45
Abbildung 12: Morphometrische linksventrikuläre Basalcharakterisierung der ERK2tg Mäuse.	46
Abbildung 13: Basale Expression der kardialen Stressmarker in ERK2tg Mäusen.	48
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung gegen ANP.	48
Abbildung 15: Echokardiographische und morphometrische kardiale Analyse zwei Wochen nach Volumenbelastung bei ERK2tg sowie WT-Mäusen.	51
Abbildung 16: Histologische Analyse der Kardiomyozytenhypertrophie, Fibrose und Apoptose im linken Ventrikel zwei Wochen nach Volumenbelastung bei ERK2tg sowie WT-Mäusen.	53
Abbildung 17: Phosphorylierung des kardialen ERK1/2 am TEY-Motiv bei ERK2tg Mäusen nach zweiwöchiger Volumenbelastung.	55
Abbildung 18: Phosphorylierung des kardialen p38, JNK sowie Akt bei ERK2tg sowie WT-Mäusen nach zweiwöchiger Volumenbelastung.	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der Herzinsuffizienz anhand der Ejektionsfraktion	3
Tabelle 2: NYHA-Klassifizierung (<i>New York Heart Association functional classification</i>)	3
Tabelle 3: Symptome und Zeichen der chronischen Herzinsuffizienz	4
Tabelle 4: Ätiologie der chronischen Herzinsuffizienz	5
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien	20
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 7: Puffer	30
Tabelle 8: Antikörper	31
Tabelle 9: cDNA-Synthese Arbeitsschritte	33
Tabelle 10: Zusammensetzung des qPCR-Reaktionsgemisch	34
Tabelle 11: Primer-Sequenzen	34
Tabelle 12: Reaktionsschritte der qPCR	34
Tabelle 13: Echokardiografische und morphometrische Messungen bei ERK2tg Mäusen und WT-Wurfgeschwistern zwei Wochen nach der aorto-kavalen Shunt- bzw. Sham- Intervention	50
Tabelle 14: Genexpression der kardialen Stressmarker bei ERK2tg und WT-Mäusen nach zweiwöchiger Volumenbelastung bei aorto-kavalem Shunt	54

Abkürzungsverzeichnis

α -Mhc	<i>alpha-myosin heavy chain</i>
ANP	atriales natriuretisches Peptid, <i>atrial natriuretic peptide</i>
ARNI	Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitor
BCA	Bicinchonin-Säure
BNP	natriuretisches Peptid Typ B, <i>brain natriuretic peptide</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMKII	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CSA	Querschnittsfläche, <i>cross-sectional area</i>
DTT	Dithiothreitol
DUSPs	<i>dual-specificity phosphatases</i>
EF	Ejektionsfraktion
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ERK2tg	ERK2-transgen
ESC	European Society of Cardiology
FS	<i>fractional shortening</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HF	Herzfrequenz
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit geringgradig reduzierter Ejektionsfraktion, <i>heart failure with mildly reduced ejection fraction</i>
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion, <i>heart failure with preserved ejection fraction</i>
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion, <i>heart failure with reduced ejection fraction</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HZV	Herzzeitvolumen
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KCL	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
LAVES	Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
LV	linker Ventrikel
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVESD	linksventrikuläre endsystolischer Durchmesser

MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinasen, <i>mitogen-activated protein kinases</i>
MAPKAPK	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
NT-proBNP	N-terminales pro-BNP, <i>N-terminal pro-B-type natriuretic peptid</i>
NVL	Nationale Versorgungsleitlinie
NYHA	New York Heart Association
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
qPCR	<i>real-time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
rLSR	<i>reverse longitudinal strain rate</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i>
RV	Rechter Ventrikel
RyR	Ryanodinrezeptor
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums, <i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SV	Schlagvolumen
TAC	<i>transverse aortic constriction</i>
TBST	1 x TBS-Tween
TL	Tibiallänge
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling</i>
VCI	Vena cava inferior
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Chronische Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz umfasst ein komplexes klinisches Syndrom, welches mit einer verminderten Auswurfleistung des Herzens oder einer Einschränkung der Herzfüllung einhergeht und zu einer Unterversorgung des Organismus mit Blut und Sauerstoff in Ruhe oder unter Belastung führt (Savarese und Lund 2017; NVL 2019). Eine fortschreitende Herzinsuffizienz ist mit einer erheblichen Reduktion der Lebensqualität verbunden (Juenger et al. 2002). Die chronische Herzinsuffizienz nimmt aufgrund der hohen Inzidenz und Prävalenz sowohl weltweit als auch in Deutschland eine bedeutende Rolle für die Bevölkerung und das Gesundheitssystem ein (Savarese und Lund 2017). So beansprucht die Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz ca. 1,1% der direkten Gesundheitskosten in Deutschland (Störk et al. 2017). Das Lebenszeitrisko für eine Herzinsuffizienz im Alter von 55 Jahren beträgt 33% für Männer und 28% für Frauen (Ponikowski et al. 2016).

1.1.1 Epidemiologie der chronischen Herzinsuffizienz

Die Prävalenz einer diagnostizierten Herzinsuffizienz wird in europäischen Statistiken zwischen 1-2% der erwachsenen Bevölkerung und die Inzidenz zwischen 1-9/1000 Personenjahren angegeben (Groenewegen et al. 2020; McDonagh et al. 2021). Dabei wird aufgrund nicht diagnostizierter Krankheitsfälle sowie der Limitation statistischer Auswertungen durch häufig auftretende Multimorbidität sowie der Abhängigkeit von der Qualität der ICD-10-Codierung (NVL 2019) von einer Unterschätzung der Prävalenz ausgegangen. Eine auf Basis einer echokardiographischen Screeningstudie kalkulierte Prävalenz der Herzinsuffizienz in der Allgemeinbevölkerung lag entsprechend höher bei 4,2% (Groenewegen et al. 2020). Die Inzidenz gilt in entwickelten Ländern inklusive Deutschland als stabil oder sinkend (NVL 2019; Groenewegen et al. 2020).

In Deutschland lag die Prävalenz der Herzinsuffizienz in einer statistischen retrospektiven Analyse aus dem Zeitraum von 2009 bis 2013 bei 3,96% bei einer Inzidenz von 655/100000. Das Durchschnittsalter der an Herzinsuffizienz erkrankten Personen lag in Deutschland bei 76,2 Jahren. Die Prävalenz sowie die Inzidenz der Herzinsuffizienz zeigt eine deutliche Altersabhängigkeit. Bei der Altersgruppe der 80- bis 84-Jährigen lag die Jahresprävalenz bei 24,3%, bei den über 95 Jährigen bei 47,2% (Störk et al. 2017; NVL 2019). Aufgrund der

Zunahme der Prävalenzen und Inzidenzen mit zunehmendem Lebensalter trotz sinkender altersadaptierter Inzidenzen findet sich eine Zunahme der Gesamtprävalenz und -inzidenz im Rahmen der verbesserten Überlebenschancen und der alternden Gesamtbevölkerung (Störk et al. 2017; Groenewegen et al. 2020).

55% der Herzinsuffizienzpatienten sind weiblich. Die höhere Prävalenz ist am ehesten zurückzuführen auf eine höhere Lebenserwartung von Frauen, die Gesamtinzidenz zeigt sich jedoch vergleichbar zwischen Männern und Frauen (Störk et al. 2017). Die höchste Neuerkrankungsrate liegt bei Frauen in höherem Alter (80-84 Jahre; Durchschnittsalter 80,1) als bei Männern (75-79 Jahre; Durchschnittsalter 73,8) (McDonagh et al. 2021).

Die Herzinsuffizienz (ICD I50) ist gemäß den Angaben des Statistischen Bundesamts im Jahr 2020 die häufigste Einzeldiagnose von vollstationär behandelten Patienten (Deutscher Herzbericht 2021). In der Analyse von Störk et al. (2017) wurden von den zwischen 2009 und 2013 registrierten Herzinsuffizienzpatienten 55,1% innerhalb eines 2-Jahres-Beobachtungszeitraumes hospitalisiert. Davon waren 6% der Einweisungen direkt auf die Herzinsuffizienz zurückzuführen. 22,7% der neu diagnostizierten Herzinsuffizienzpatienten starben im 2-Jahres-Beobachtungszeitraum. Herzkreislaufkrankungen waren im Jahr 2020 in Deutschland die häufigste Todesursache, nach einer Übersichtsarbeit von Groenewegen et al. (2020) versterben 66% der Herzinsuffizienzpatienten an kardiovaskulären Erkrankungen. Sowohl die Ausprägung der Symptomatik anhand der Klassifikation der *New York Heart Association (NYHA)* als auch die Einschränkung der linksventrikulären Funktion korrelieren mit der Mortalität (Störk et al. 2017; Groenewegen et al. 2020).

1.1.2 Klassifikation der chronischen Herzinsuffizienz

Die Einteilung der Herzinsuffizienz kann anhand der linksventrikulären Funktion sowie dem Schweregrad der klinischen Symptomatik erfolgen.

Die Klassifikation anhand der linksventrikulären systolischen Funktion erfolgt durch Bestimmung der echokardiographischen Ejektionsfraktion (EF) in drei Typen. Die Diagnosekriterien nach der aktuellen Leitlinie der *European Society of Cardiology (ESC)* sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Herzinsuffizienz mit reduzierter EF (HF_rEF) ist definiert durch eine Reduktion der linksventrikulären EF unter 40%. Zur Diagnosestellung einer Herzinsuffizienz mit erhaltener EF (HF_pEF) müssen erhöhte natriuretische Peptide und/oder eine echokardiographisch objektivierbare strukturelle und funktionelle Störung mit diastolischer linksventrikulärer Dysfunktion bzw. Nachweis eines erhöhten

linksventrikulären Fülldrucks messbar sein. Bei der Herzinsuffizienz mit geringgradig reduzierter EF (HFmrEF) unterstützen diese Befunde die Diagnosestellung (McDonagh et al. 2021).

Tabelle 1: Klassifikation der Herzinsuffizienz anhand der Ejektionsfraktion

	HFrEF	HFmrEF	HFpEF
Kriterien 1	Symptome + Zeichen*	Symptome + Zeichen*	Symptome + Zeichen*
2	LVEF <40%	LVEF 41-49%	LVEF >50%
3			Objektive Hinweise struktureller und/oder funktioneller Herzfunktionsstörung mit diastolischer linksventrikulärer Dysfunktion und/oder Nachweis erhöhten linksventrikulären Fülldrucks, inklusive erhöhte natriuretische Peptide

HFmrEF = *heart failure with mildly reduced ejection fraction* (Herzinsuffizienz mit geringgradig reduzierter Ejektionsfraktion); HFpEF = *heart failure with preserved ejection fraction* (Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion); HFrEF = *heart failure with reduced ejection fraction* (Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion); LV = linker Ventrikel; LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion. *Zeichen müssen nicht präsent sein bei frühen Stadien der Herzinsuffizienz sowie bei optimal behandelten Patienten. Modifiziert nach McDonagh et al. (2021).

Die insbesondere klinisch verwendete Einteilung nach NYHA (*New York Heart Association*) erfolgt anhand der körperlichen Belastbarkeit und Ausprägung des Leitsymptoms Dyspnoe bei chronischer Herzinsuffizienz. Die Klassifikationskriterien sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: NYHA-Klassifizierung (*New York Heart Association functional classification*)

Schweregrad	Ausprägung der Symptomatik
NYHA I	Asymptomatisch. Keine Einschränkung körperlicher Aktivitäten
NYHA II	Keine Beschwerden in Ruhe. Leichte Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Gewöhnliche körperliche Aktivität führt zu Luftnot, Erschöpfung oder Palpitationen.
NYHA III	Keine Beschwerden in Ruhe. Höhergradige Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Geringe körperliche Belastung führt zu Luftnot, Erschöpfung oder Palpitationen.
NYHA IV	Beschwerden in Ruhe möglich. Jegliche körperliche Aktivität geht mit Beschwerden einher.

Klassifikation der chronischen Herzinsuffizienz basierend auf dem Schweregrad der Symptome und der körperlichen Aktivität. Tabelle modifiziert nach NVL (2019) und McDonagh et al. (2021)

1.1.3 Klinik der chronischen Herzinsuffizienz

Die Definition der Herzinsuffizienz ist auf bereits klinisch manifeste Stadien mit auftretenden Symptomen und oder Zeichen eingegrenzt. Zuvor kann bei objektivierbaren strukturellen oder funktionellen kardialen Dysfunktionen von einer asymptomatischen Vorstufe der Herzinsuffizienz ausgegangen werden. (Bauersachs et al. 2017)

Typische Symptome und Zeichen einer manifesten Herzinsuffizienz sind beispielsweise Dyspnoe, eine Leistungsminderung oder ein erhöhter Jugularvenendruck (McDonagh et al. 2021). Darüber hinaus stehen weitere typische sowie spezifische Symptome und Zeichen, dargestellt in Tabelle 3, im Zusammenhang mit einer Herzinsuffizienz.

Tabelle 3: Symptome und Zeichen der chronischen Herzinsuffizienz

Typische Symptome	Spezifischere Zeichen
Dyspnoe (Belastungsdyspnoe, Ruhedyspnoe, Orthopnoe, paroxysmale nächtliche Dyspnoe, Bendopnoe)	Erhöhter Jugularvenendruck, Hepatojugulärer Reflux
Leistungsminderung, Müdigkeit	Dritter Herzton (Galopp-Rhythmus)
Flüssigkeitsretention, Beinödeme	Verlagerter Herzspitzenstoß
Seltene Symptome	Unspezifischere Zeichen
trockener Husten, nächtlicher Husten	Gewichtszunahme, Gewichtsabnahme
Übelkeit, Völlegefühl, abdominelle Beschwerden, Meteorismus, Obstipation	Kachexie, kalte Extremitäten
Nykturie	Periphere Ödeme (Sprunggelenk, scrotal, sakral), Oligurie, Aszitis, Pleuraergüsse Gewichtszunahme
Desorientierung, Gedächtnisstörung, Depression	Tachykardie, arrhythmischer Puls, verminderte Pulsdruckamplitude, Herzgeräusche
Palpitationen	Tachypnoe, Lungenkrepitationen, Cheyne-Stokes Atmung
Schwindel, Synkopen	Hepatomegalie

Darstellung der klinischen Symptome sowie Zeichen der Herzinsuffizienz eingeteilt nach relativer Spezifität und Häufigkeit. Die Symptome und Zeichen variieren in ihrer Sensitivität und Spezifität und reichen nicht aus um eine spezifische Diagnose zu stellen. Nach NVL (2019) und McDonagh et al. (2021).

1.1.4 Ätiologie der Herzinsuffizienz

Die Ätiologie der Herzinsuffizienz ist vielfältig, zu den häufigsten Ursachen mit großer klinischer und therapeutischer Relevanz zählen die koronare Herzerkrankung, die hypertensive Herzerkrankung und Herzklappenerkrankungen. Eine exemplarische Übersicht über Auslöser einer Herzinsuffizienz bietet Tabelle 4 (NVL 2019).

Tabelle 4: Ätiologie der chronischen Herzinsuffizienz

Kardiovaskuläre Erkrankungen	Koronare Herzerkrankung Myokardinfarkt, Ventrikulaneurysma, chronische Ischämie
Blutdruck-Erkrankungen	Arterielle Hypertonie hypertensive Herzerkrankung
Nicht-ischämische Kardiomyopathien	Dilatative Kardiomyopathie: infektiös (z. B. viral), toxisch (z. B. Alkohol, Kokain, Zytostatika), Schwangerschaft, Autoimmunerkrankungen (z. B. Lupus erythematoses, Polyarteriitis nodosa, idiopathisch u. a.) Hypertrophe/obstruktive Kardiomyopathie: oft autosomal dominant vererbt, wenige Spontanerkrankungen Restriktive Kardiomyopathie: Amyloidose, Sarkoidose, Hämochromatose u. a. infiltrative Erkrankungen, zu diastolischer Dysfunktion führend Oblitative Kardiomyopathie: nur in Entwicklungsländern vorkommend
Arrhythmien	Vorhofflimmern, Tachykardie, Bradykardie
Valvuläre Erkrankungen	Erworbene oder angeborene Klappenitien
Kongenitale Herzerkrankungen	Vorhofseptumdefekt, Ventrikelseptumdefekt, Fallot-Tetralogie, u.a.
Perikarderkrankungen	Perikarderguss, konstriktive Perikarditis
High Output Failure	Anämie, Thyreotoxikose, arteriovenöse Fisteln u. a.

Häufige Ätiologien der chronischen Herzinsuffizienz sortiert nach Oberkategorien. Darüber hinaus sind seltenere Ursachen bekannt, hier nicht aufgeführt. Modifiziert nach NVL (2019) und McDonagh et al. (2021).

1.2 Kardiales Remodeling

Anhaltende oder repetitiv auftretende Herzbelastung resultiert in Anpassungsprozessen des Herzens, dem kardialen Remodeling. Der Begriff umfasst dabei die dem Herzumbau zu Grunde liegenden Veränderungen der Genomexpression in Kombination mit molekularen, zellulären und interstitiellen Veränderungen, welche sich klinisch durch eine Veränderung der Größe, Form und Funktion des Herzens manifestieren (Cohn et al. 2000).

1.2.1 Pathologisches und physiologisches Remodeling

Das kardiale Remodeling kann in eine pathologische sowie physiologische Form unterteilt werden. Physiologisches Remodeling findet sich als Adaptation an eine erhöhte Belastung bei repetitivem sportlichem Training, in der Schwangerschaft sowie im postnatalen Wachstum. Abhängig vom zugrundeliegenden Stimulus kommt es zu einer variablen kompensatorischen Veränderung der Proportionen und Funktion des Herzens (Mihl et al. 2008). Diese Anpassung ist unter physiologischen Bedingungen balanciert und homogen, sie dient der Verbesserung der Muskelfunktion und der Pumpkapazität und ist reversibel (Kemi

und Ellingsen 2012). Da die Herzinsuffizienz mit dem pathologischen Remodeling in Verbindung steht (Cohn et al. 2000), liegt hierauf im Folgenden der Fokus. Beim pathologischen Remodeling liegt ein pathologischer Stimulus wie eine Myokardischämie, hämodynamische Belastung, Inflammation, begleitende neurohumorale Aktivierung oder oxidativer Stress vor (Dirkx et al. 2013). Die molekularen Mechanismen inklusive der Signaltransduktion und der sich daraus entwickelnden Phänotypen sowie die Prognose unterscheiden sich abhängig vom Stimulus (Nakamura und Sadoshima 2018).

1.2.2 Physiologische Grundlagen des kardialen Remodelings

Das kardiale Remodeling manifestiert sich sowohl physiologisch als auch pathologisch durch eine Veränderung der kardialen Geometrie. Diese erfolgt als kompensatorischer Anpassungsmechanismus an eine erhöhte Wandspannung nach dem Laplace-Gesetz. Dieses betrachtet den Ventrikel idealisiert als Hohlkugel und ist definiert als (Norton 2001):

$$T = \frac{PR}{2}$$

T als Wandspannung, P als Kammerdruck, R als Ventrikelradius

Für die Dimensionen des linken Ventrikels gilt aufgrund der dickeren Muskelwand folgender mathematischer Zusammenhang (Norton 2001):

$$\sigma = \frac{PR}{2w}$$

σ als Wandspannung, P als Kammerdruck, R als ventrikulärer Radius und w als Wanddicke

Dabei ist die Wandspannung proportional zum intraventrikulären Kammerdruck sowie zum ventrikulären Radius und antiproportional zur der Wanddicke (Nakamura und Sadoshima 2018).

Die hämodynamische Belastung, welche zu einer Erhöhung der Wandspannung führt, kann in Vorlast und Nachlast aufgeteilt werden. Der Begriff Vorlast definiert alle Faktoren, welche die passive ventrikuläre Wandspannung am Ende der Diastole beeinflussen (Norton 2001). Dies umfasst somit nach dem Gesetz von Laplace den enddiastolischen Kammerdruck sowie das enddiastolische Füllungsvolumen, abhängig davon Kammerradius und Wanddicke. Auf zellulärer Ebene manifestiert sich die Vorlast in der initialen Sarkomeren-Länge (Solaro 2011).

Die Nachlast definiert alle Faktoren, die zur myokardialen Wandspannung während der systolischen Ejektion beitragen und somit die Beanspruchung des Ventrikels, um eine

Ejektion des Blutes während der Systole zu erzielen. Dies umfasst somit nach dem Gesetz von Laplace den systolischen Kammerdruck, den systolischen Kammerradius und die myokardiale Wanddicke (Norton 2001).

1.2.3 Hypertrophie durch hämodynamische Belastung

Als Anpassung des Myokards zur Reduktion einer erhöhten Wandspannung kommt es zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten. Hierbei können sich die Kardiomyozyten in der Länge oder Breite durch Addition von Sarkomeren vergrößern. Es resultiert entweder eine Zunahme oder Reduktion der Wanddicke im Verhältnis zum Ventrikelvolumen (Kemi und Ellingsen 2012). Beide Mechanismen der zellulären Hypertrophie führen zu einer Erhöhung der kardialen Masse, jedoch zu einem unterschiedlichen Phänotyp des Ventrikels. Aufgrund dieser unterschiedlichen Phänotypen wird das kardiale Remodeling auf morphologischer Ebene in eine exzentrische Hypertrophie und eine konzentrische Hypertrophie unterteilt, wie in Abbildung 1 dargestellt (Hill und Olson 2008). Während diese Hypertrophie beim physiologischen Remodeling sowie in der initialen Phase des pathologischen Remodeling adaptiv ist, kommt es im Verlauf des pathologischen Remodelings zu einer Dekompensation mit der Folge einer Herzinsuffizienz (Nakamura und Sadoshima 2018).

Bei den hämodynamischen Ursachen der kardialen Hypertrophie werden Druckbelastung von Volumenbelastung unterschieden; hierbei spielen Hypertrophie-induzierende mechanosensitive Moleküle sowie neurohormonelle Faktoren eine zentrale Rolle (Hartmann et al. 2022). Druckbelastung mit erhöhter Nachlast findet sich pathophysiologisch unter anderem bei einer arteriellen Hypertonie oder Aortenklappenstenose (Bernardo et al. 2010). Die Druckbelastung induziert typischerweise eine konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie zur Reduktion der linksventrikulären Wandspannung nach dem Laplace-Gesetz (Grossman et al. 1975). Hierbei ist die Ventrikelwanddicke deutlich gesteigert ohne gleichzeitige Zunahme des Ventrikeldurchmessers. Daraus resultierend kommt es zu einer Zunahme des Quotienten aus Wanddicke zu enddiastolischem Ventrikeldurchmesser, welcher als relative Wanddicke bezeichnet wird (Bernardo et al. 2010). Die Kardiomyozyten hypertrophieren überwiegend durch die Addition von Sarkomeren in der Breite. Der Ventrikeldurchmesser kann im Vergleich zu normaler Herzgeometrie verringert sein, das Ventrikelvolumen kann reduziert sein (Grossman et al. 1975; Bernardo et al. 2010; Nakamura und Sadoshima 2018).

Volumenbelastung mit erhöhter Vorlast dagegen findet sich bei einer Aorten- oder Mitralklappeninsuffizienz mit Regurgitation oder einem Links-Rechts-Shunt, beispielsweise

bei Ventrikelseptumdefekten (Graham 1991; Lip et al. 2000) Die Geometrie der resultierenden exzentrischen Hypertrophie ist charakterisiert durch eine Erhöhung des Ventrikeldurchmessers bei nicht proportional zunehmender Wanddicke und erhöhtem Ventrikelvolumen; es kommt zu einer Abnahme der relativen Wanddicke. Die absolute Wanddicke kann im Verhältnis zum gesunden Herz zunehmen, gleichbleiben oder abnehmen. Die Kardiomyozyten hypertrophieren durch Addition von Sarkomeren in Reihe (Grossman et al. 1975; Bernardo et al. 2010).

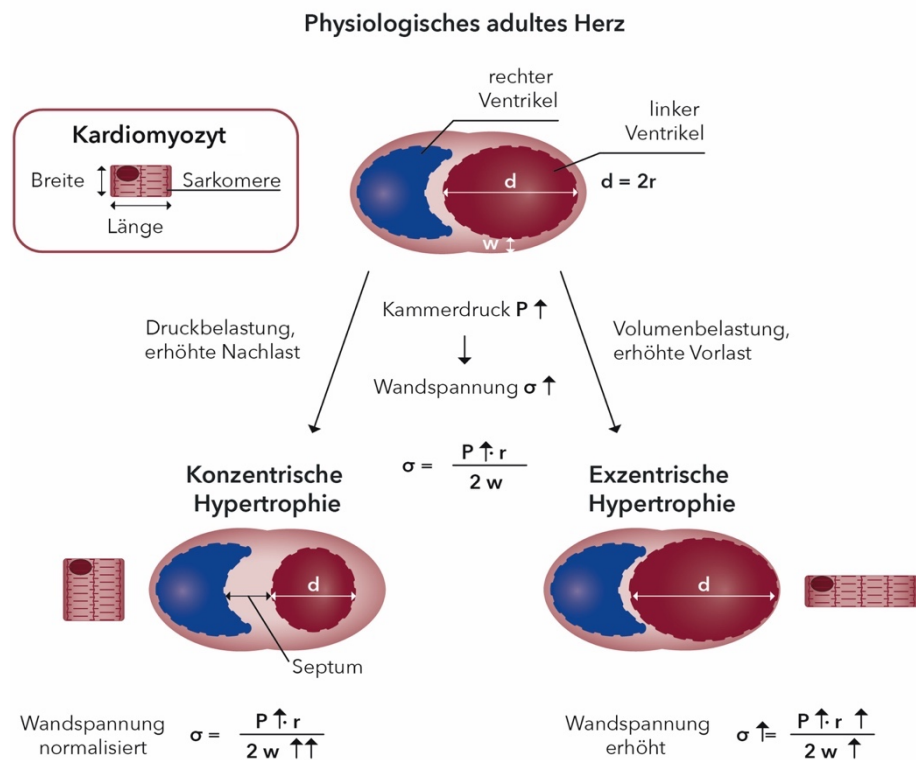


Abbildung 1: Exzentrische und konzentrische Hypertrophie unter hämodynamischer Belastung. Unter hämodynamischer Belastung kommt es zu einer Kardiomyozytenhypertrophie. Bei der Druckbelastung kommt es zu einer Addition von Sarkomeren in der Breite und somit zu einer Zunahme der Ventrikeldicke mit Entwicklung einer konzentrischen Hypertrophie. Im Sinne des Laplace-Gesetzes dient dieses zu Normalisierung der Wandspannung bei erhöhtem Ventrikeldruck unter erhöhter Nachlast. Bei der Volumenbelastung mit erhöhter Vorlast kommt es überwiegend zu einer Addition der Sarkomere in der Länge und somit zu einer exzentrischen Hypertrophie. Im Sinne des Laplace-Gesetzes bleibt die Wandspannung durch Zunahme des Ventrikeldurchmessers erhöht. Abbildung in Anlehnung an Nakamura und Sadoshima (2018).

Neben Kardiomyozyten sind des Weiteren Fibroblasten, Immunzellen, Endothelzellen und Adipozyten am Remodeling beteiligt (Cohn et al. 2000; Nakamura und Sadoshima 2018).

Während das Remodeling initial adaptiv scheint, indem die konzentrische Hypertrophie zunächst zu einer Reduktion der Wandspannung und die exzentrische Hypertrophie zu einer Kompensation des vermehrten enddiastolischen Volumens führt, kommt es beim pathologischen Remodeling zu einer Zunahme der Fibrose, zum Verlust von Myozyten

durch Apoptose, zur Inflammation und zur Veränderung der Angiogenese, was in einer Dekompensation mit Entwicklung einer Herzinsuffizienz resultiert (Hill und Olson 2008; Nakamura und Sadoshima 2018).

1.2.4 Reaktivierung des fetalen Genprogrammes

Im Rahmen der Entwicklung des fetalen zum adulten Herzen kommt es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen als Adaptation an eine sauerstoffarme Umgebung und eine zunehmende hämodynamische Belastung (Taegtmeyer et al. 2010; van der Pol et al. 2020). Genetisch erfolgen diese Anpassungen auf Grundlage des sogenannten fetalen Genprogrammes, welches im adulten Zustand zunehmend supprimiert wird, bis schließlich postnatal das adulte Genprogramm dominiert (van der Pol et al. 2020).

Chronische Belastung des Herzens induziert eine Veränderung der genetischen Expression mit konsekutiver zellulärer und molekularer Anpassung (Azevedo et al. 2016). Die modulierte Genexpression beim pathologischen kardialen Remodeling ähnelt jener der fetalen Herzentwicklung. Diese Reaktivierung fetaler Gene und die Suppression adulter Genprofile wird daher auch als kardiale fetale Reprogrammierung bezeichnet (Hill und Olson 2008; Taegtmeyer et al. 2010; Dirx et al. 2013). Die fetale Reprogrammierung betrifft zentrale Anteile des Herzstoffwechsels. Neben der Energiegewinnung sind auch der Aufbau und die Funktion kardialer kontraktile Strukturen, die kardiale Elektrophysiologie und die Expression der Neurohormone betroffen (van der Pol et al. 2020).

Als Reaktion auf eine gesteigerte Arbeitslast beobachtet man die Verschiebung der Isoformen der Sarkomere inklusive kontraktile Proteine wie Aktin, Myosin, Titin oder Troponin in Richtung eines fetalen Musters (Taegtmeyer et al. 2010). Aktin liegt im humanen adulten Herzen hauptsächlich in zwei Isoformen vor, *α-skeletal*- und *α-cardiac*-Aktin (Crocini und Gotthardt 2021). Im Rahmen der fetalen Reprogrammierung wurde in verschiedenen Studien eine Verschiebung in Richtung der fetal prädominierenden *α-skeletal*-Aktin-Isoform festgestellt (Suurmeijer et al. 2003; Copeland et al. 2010; van der Pol et al. 2020).

Die intrazelluläre Kalziumhämostase nimmt einen relevanten Stellenwert in der Koordination der Erregung und Kontraktion myokardialer Zellen ein (Bers 2008). Hierbei sind insbesondere zwei Proteinkomplexe, die Ryanodinrezeptoren (RyR) und Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*, SERCA) von Bedeutung. In Kardiomyozyten ist die Hauptform SERCA2 α (van der Pol et al. 2020). Im Rahmen des kardialen Remodelings kommt es zu einer reduzierten SERCA2 α -Expression sowie -Aktivität, während das Verhalten des

Ryanodinrezeptor nicht abschließend erforscht ist (Taegtmeyer et al. 2010; van der Pol et al. 2020).

Die fetale Reprogrammierung umfasst darüber hinaus eine erhöhte kardiale Expression von Neurohormonen, dem atrialen natriuretischen Peptids (*atrial natriuretic peptide* (ANP), Genname *NPPA*) und dem natriuretischen Peptids Typ B (*brain natriuretic peptide* (BNP), Genname *NPPB*) (Man et al. 2018; van der Pol et al. 2020). Im Rahmen der fetalen Reprogrammierung kommt es insbesondere als Reaktion auf einen Dehnungsreiz zu einer Reexpression von *NPPA* im Ventrikel und einer Hochregulation des *NPPB*-Expressionsniveaus (van der Pol et al. 2020; Sarzani et al. 2022). Die Reexpression von *NPPA* und *NPPB* ist mit einer kardioprotektiven Wirkung verbunden (Sarzani et al. 2022).

Die genauen Mechanismen der Rückkehr zum fetalen Genprogramm – ob diese Resultat oder Auslöser sind und ob sie maladaptive oder adaptive kardioprotektive Eigenschaften haben – sind nicht sicher geklärt. Experimentelle pharmakologische Ansätze beschäftigen sich mit einer Beeinflussung der fetalen Reprogrammierung, um den Progress der Hypertrophie zur Herzinsuffizienz zu modulieren (Dirkx et al. 2013; van der Pol et al. 2020). Im Rahmen der Herzinsuffizienztherapie konnte bei Verbesserung der ventrikulären Funktion eine Abnahme der Expression fetaler Gene gezeigt werden (Dirkx et al. 2013). Molekulare Marker, welche die fetale Reprogrammierung abbilden, stellen bereits diagnostische und verlaufsbeurteilende Biomarker in der klinischen Routine dar. Etabliert ist die Bestimmung von NT-proBNP (*N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*), welches mit der Ausprägung der Herzinsuffizienz korreliert (McDonagh et al. 2021; Nishikimi und Nakagawa 2022).

Neben der diagnostischen Nutzung ist die Modulation des kardialen Remodelings auch von therapeutischer Bedeutung. Das bedeutendste Beispiel hierfür ist der Wirkstoff Sacubitril. Dieser inhibiert das Enzym Nephilysin, welches für den Abbau von natriuretischen Peptiden verantwortlich ist, es resultiert eine Wirkspiegelerhöhung (van der Pol et al. 2020). In Fixkombination als Angiotensin-Rezeptor-Nephilysin-Inhibitor (ARNI) wird dies in der klinischen Praxis bei der Therapie der HFrEF angewandt und verbessert die Prognose (McDonagh et al. 2021).

1.2.5 Signalwege des kardialen Remodelings

Extrazelluläre neurohumorale Faktoren sowie mechanische Kräfte induzieren intrazelluläre Signalkaskaden. Prozesse wie Transkription, Translation, Proliferation, Differenzierung und Apoptose werden unter anderem über die Bindung extrazellulärer Liganden an spezifischen Transmembranrezeptoren induziert. Durch die Bindung erfolgt eine Aktivierung der Rezeptoren mit konsekutiver Auslösung eines intrazellulären Signalweges und Aktivierung zellulärer Prozesse. Diese ausgelösten Signalwege bestehen aus einem komplexen Netzwerk aus interagierenden Proteinen (Shaul und Seger 2007). Abhängig vom Stimulus – ob physiologisch oder pathologisch, ob Druck- oder Volumenbelastung – variieren die Signalwege des kardialen Remodelings, ihnen liegen andere Mechanismen und ein anderes Aktivitätsniveau zu Grunde (Toischer et al. 2010).

Hämodynamische Belastung führt über mechanischen Stress selbst sowie über die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), Angiotensin II, Endothelin-1 und Katecholaminen zu intrazellulären Reaktionen (Hill und Olson 2008). Diese Signaltransduktion von extrazellulären Stimuli zu einer intrazellulären Antwortreaktion mit veränderter Transkription und Translation erfolgt sowohl über direkt dehnungssensible Rezeptoren als auch mittels G-Protein- und enzymgekoppelter Rezeptoren, welche nachgeschaltete intrazelluläre Signalwege über *second messenger* und Kinasen aktivieren (Nakamura und Sadoshima 2018). Hier sind besonders calciumabhängige und den Calciumstoffwechsel beeinflussende Moleküle wie die *calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II* (CaMKII) oder Calcineurin relevant. Weiterhin spielen in diesem Zusammenhang die Proteinkinase A (PKA) sowie die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) eine zentrale Rolle (Nakamura und Sadoshima 2018). Ein weiterer wichtiger Signalweg im kardialen Remodeling ist der Phosphoinositid-3-Kinase/Akt (PIK3/Akt)-Signalweg, welchem neben einer Rolle im physiologischen Remodeling auch eine Bedeutung in der Modulation der exzentrischen Hypertrophie zugeordnet wird (Walsh 2006; Ikeda et al. 2015; Mohamed et al. 2016; Schnelle et al. 2021). Eine Übersicht über die komplexen Signalwege bietet Abbildung 2.

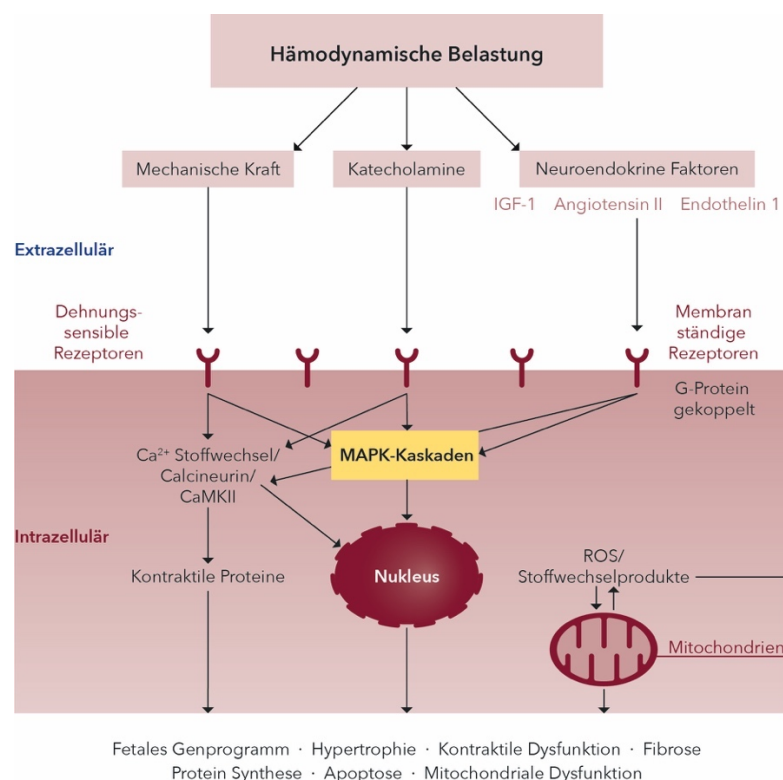


Abbildung 2: Schematische vereinfachte Übersicht einiger Signalkaskaden im Rahmen des kardialen Remodeling unter hämodynamischer Belastung. Eine hämodynamische Belastung führt über mechanische Kraft selbst sowie über die Ausschüttung von neuroendokrinen Faktoren wie *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), Angiotensin II, Endothelin-1 und Katecholaminen zu intrazellulären Reaktionen. Diese Stimuli lösen über Transmembranrezeptoren spezifische intrazelluläre Signalkaskaden aus. Diese Signalkaskaden umfassen unter anderem MAPK-Kinasen, calciumabhängige Moleküle und Kinasen, den Calciumstoffwechsel beeinflussende Signalwege und durch ROS (reaktive Sauerstoffspezies) ausgelöste intrazelluläre Reaktionen. Abbildung nach Nakamura und Sadoshima (2018).

1.3 MAP-Kinasen und MAPK-Kaskaden

Ein zentraler Bestandteil der intrazellulären Signalnetzwerke sind die MAPK (*mitogen-activated protein kinases*)-Signalwege (Shaul und Seger 2007), welche bei dieser Arbeit im Fokus stehen. Eukaryotische Zellen besitzen zahlreiche verschiedene MAPK-Signalwege, welche Transkription, Translation, Proliferation, Metabolismus, Motilität, Überleben, Apoptose und Differenzierung regulieren (Shaul und Seger 2007; Cargnello und Roux 2011). Die MAPK-Signalwege bestehen aus drei bis fünf aufeinanderfolgende Ebenen von Kinasen. Es werden typische von atypischen unterschieden (Shaul und Seger 2007). Die Kerneinheit der regulatorischen MAPK-Signalwege sind drei aufeinanderfolgend wirkende Kinasen, welche eine katalytische Kaskade bilden (Cargnello und Roux 2011; Garrington und Johnson).

Jede typische MAPK-Kaskade besteht dabei aus einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK), welche eine MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) phosphoryliert, welche ihrerseits eine MAP-Kinase (MAPK) phosphoryliert (Garrington und Johnson). Des Weiteren können

MAPKKKK oder MAPKAPK (MAPK-aktivierte Proteinkinase) eine Kaskade ergänzen. Der Startpunkt ist die Aktivierung eines membranständigen GTP-bindenden Proteins der Ras/Rho-Familie als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli (Shaul und Seger 2007; Cargnello und Roux 2011). Dieses aktiviert die nachgeschaltete Proteinkaskade durch Phosphorylierung oder Interaktion mit der MAPKKK (Cargnello und Roux 2011). MAPKKK phosphorylieren daraufhin MAPKK, welche dann MAPK durch eine duale Phosphorylierung am Thr-X-Tyr-Motiv aktivieren. MAPK selbst sind Serin/Threonin-Kinasen, die ihre Funktion durch eine Phosphorylierung einer Vielzahl intrazellulärer Zielsubstrate ausüben (Cargnello und Roux 2011). Zu den Zielsubstraten gehören unter anderem MAPK-aktivierte-Proteinkinasen (MAPKAPK), welche als amplifizierende Ebene zur vergrößerten Reichweite der MAPK-Wirkung führen. Die Spezifität der regulatorischen MAPK-Signalwege basiert auf verschiedenen selektiven und teilweise selektiven Kinasen in den drei Kaskadenebenen (Shaul und Seger 2007) (Abbildung 3). Die Selektivität wird unterstützt durch Interaktionsdomänen zum Substrat (Cargnello und Roux 2011) und durch Verankerungs- und Gerüstproteine (Garrington und Johnson). Somit ist der Effekt durch regulatorische Mechanismen hoch spezifisch (Rose et al. 2010).

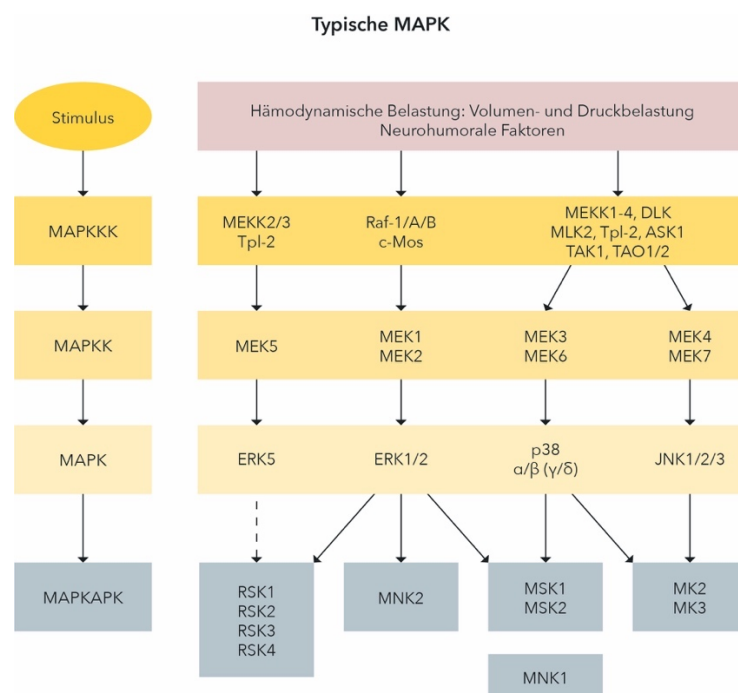


Abbildung 3: Schematische Darstellung der typischen MAPK-Kaskaden. Die MAPK-Kaskade besteht aus drei aufeinander folgenden Kinasen, welche durch eine Phosphorylierung seriell aktiviert werden. Die MAPKKK phosphoryliert und aktiviert die MAPKK, welche die MAPK phosphoryliert und aktiviert. Die MAPK-Kinasen modulieren ebenfalls durch Phosphorylierung Zielstrukturen. MAPK (mitogen-aktivierten Proteinkinasen), MAPKK (MAP-Kinase-Kinase), MAPKKK (MAP-Kinase-Kinase-Kinase), MAPKAPK (MAPK-aktivierte-Proteinkinasen). Modifiziert nach Cargnello und Roux (2011).

Es werden vier typische MAP-Kinasen unterschieden, die *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2), c-Jun N-terminale Kinasen (JNK), p38-Kinasen sowie ERK5 (Shaul und Seger 2007; Cargnello und Roux 2011), welche namensgebend für die jeweiligen MAPK-Kaskaden sind.

Die Regulation der MAPK erfolgt über positive und negative Rückkopplungsschleifen sowie Kreuzinteraktionen zwischen den Signalwegen. Die negative Rückkopplung basiert auf zwei Mechanismen, der schnellen inhibitorischen Rückkopplungsphosphorylierung an regulierenden Phosphorylierungsstellen der Signalwegkomponenten sowie der transkriptionellen Induktion spezifischer MAPK-Signalweg-Inhibitoren (Lake et al. 2016). Ein wichtiger Vertreter sind die *dual-specificity phosphatases* (DUSPs), die größte Gruppe der spezifisch MAPK-regulierenden Phosphatasen. Es sind verschiedene Unterformen der DUSPs bekannt, die unterschiedliche MAP-Kinasen regulieren. DUSPs wirken durch Dephosphorylierung der Threonine oder Tyrosine des jeweiligen Thr-X-Tyr-Motivs (Lake et al. 2016). Neben der Dephosphorylierung können DUSPs auch durch kompetitive Substrat-Hemmung und Regulation der MAPK-Kinasen-Lokalisation in der Zelle die Aktivität inhibieren (Chen et al. 2019).

1.3.1 Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2)

In dieser Arbeit wird insbesondere die Bedeutung von ERK1/2 thematisiert, weshalb diese spezifische MAP-Kinase hier ausführlicher beleuchtet wird. ERK1 und ERK2 sind MAP-Kinasen, deren Aminosäuresequenz zu 83% identisch ist, weshalb sie häufig als ERK1/2 bezeichnet werden (Cargnello und Roux 2011). Sie treten in allen Geweben in unterschiedlichem Maße auf, jedoch im Gehirn, in der Skelettmuskulatur, im Thymus und im Herzen in besonders hohen Konzentrationen (Cargnello und Roux 2011). Jedoch sind ERK1 und ERK2 in ihrer Funktion nicht identisch. ERK1-deletierte Mäuse zeigten einen normalen Phänotyp, während ERK2-deletierte Mäuse in der Embryogenese nicht überlebensfähig waren (Mazzucchelli et al. 2002; Satoh et al. 2007).

Das ERK1/2-Modul besteht aus den MAPKKK A-Raf, B-Raf und Raf-1 (*rapidly accelerated fibrosarcoma*, RAF), den MAPKK MEK1 und MEK2 sowie den MAPK ERK1 und ERK2 (Cargnello und Roux 2011). Die Aktivierung von ERK1/2 wird durch vielfältige extrazelluläre und interne Stimuli ausgelöst (Shaul und Seger 2007). Hierzu gehören Wachstumsfaktoren, Zytokine, osmotischer Stress, Mikrotubuli-Desorganisation und mechanische Belastung (Cargnello und Roux 2011; Hartmann et al. 2022). Die Aktivierung des Moduls erfolgt über ligandengekoppelte Zelloberflächenrezeptoren wie G-Protein-

gekoppelte Rezeptoren sowie Rezeptortyrosinkinasen (Cargnello und Roux 2011; Gallo et al. 2019; Garrington und Johnson). In der Endstrecke wird ERK1/2 im Thr-Glu-Tyr-Motiv (Thr183, Tyr185; TEY-Motiv) von MEK1/2 dual phosphoryliert. ERK1/2 phosphoryliert und aktiviert Transkriptionsfaktoren und zytoplasmatische Proteine und spielt damit eine wichtige Rolle in der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse, z.B. Proliferation (Cargnello und Roux 2011).

Neben der Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 im TEY-Motiv besteht darüber hinaus eine Regulation der ERK1/2-Aktivität durch Thr188-Autophosphorylierung (Lorenz et al. 2009). Die Autophosphorylierung bedarf der vollständigen Aktivierung der ERK1/2 Kaskade auf jeder Stufe, der Phosphorylierung im TEY-Motiv, der Dimerisierung von ERK1/2 und einer Bindung an G-Proteinen (Lorenz et al. 2009).

1.3.2 JNK und p38

Neben ERK1/2 sind auch die MAPK JNK und p38 in der Regulation zellulärer Mechanismen sowie insbesondere beim kardialen Remodeling von Bedeutung.

Viele Stimuli, welche die Aktivität von p38 modulieren, beeinflussen auch JNK, sodass auch MAPKKK in beiden Kaskaden identisch sind (siehe Abbildung 3). Die MAPKK der p38-Kaskade sind überwiegend MEK3 und MEK6, bei der JNK-Kaskade sind dies MEK4 und MEK7. Die p38-MAPK nimmt eine wichtige Rolle in der Immun- und Entzündungsreaktionsregulation, der Zytokinexpression und der Zellproliferation und dem Zellüberleben ein (Cargnello und Roux 2011). JNK ist u.a. in der Regulation der Zellproliferation und der Apoptoseregulation involviert (Cargnello und Roux 2011).

1.4 Bedeutung von ERK1/2 beim kardialen Remodeling

Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten konnten zeigen, dass ERK1/2 neben den anderen typischen MAPK am physiologischen und pathologischen Remodeling sowie der Modulation der Herzhypertrophie beteiligt ist (Lorenz et al. 2009; Mutlak und Kehat 2015; Nakamura und Sadoshima 2018; Gallo et al. 2019). Es bleibt bisher aufgrund unterschiedlicher sowie teils widersprüchlicher Ergebnisse unklar, ob ERK1/2 überwiegend protektive, destruktive oder ambivalente Effekte im kardialen Remodeling vermittelt (Rose et al. 2010).

Die Datenlage umfasst tierexperimentelle Versuche sowie Zellmodell-Studien, die sowohl eine Aktivierung oder Überexpression von ERK1/2 (*gain of function*), als auch eine Inhibition oder ein Knockout von ERK1/2 (*loss of function*) unter Basalbedingungen sowie unter

kardialer Belastung untersuchten (Mutlak und Kehat 2015). Eine Übersicht über die verschiedenen Mechanismen bietet Abbildung 4.

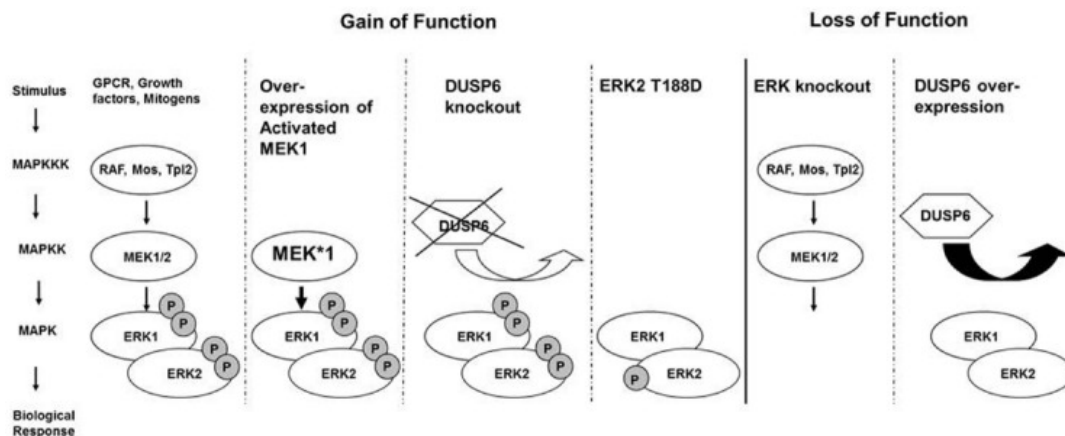


Abbildung 4: Experimentelle Ansätze zur Modulation der ERK1/2-Aktivität. Die ERK1/2-Kaskade besteht aus den MAPKKK A-Raf, B-Raf und Raf-1 (*rapidly accelerated fibrosarcoma*, RAF), den MAPKK MEK1 und MEK2 sowie den MAPK ERK1 und ERK2. Eine Aktivitätserhöhung von ERK1/2 kann durch folgende *gain of function* Modulationen erzeugt werden: Eine Überexpression von der vorgeschalteten MAPKK (MEK1), einer Disinhibition durch Hemmung von DUSP6 oder einer Hochregulation der Autophosphorylierung. Eine Inaktivierung von ERK1/2 kann über *loss of function* Modulationen erfolgen: ERK1/2 Knockout oder eine DUSP6 Überexpression. Abbildung übernommen aus Mutlak und Kehat (2015), Verwendung unter CC-BY4.0.

Bei der hämodynamischen Belastung sind zwei Modelle etabliert. Im TAC-Modell (*transverse aortic constriction*) wird eine Druckbelastung induziert, während im aorto-kavalen Shunt-Modell eine Volumenbelastung erzeugt wird (Toischer et al. 2010).

Bueno et al. zeigten im Maus- und Zellmodell, dass eine kardiomyozytenspezifische MEK1-Überexpression und eine daraus resultierende Erhöhung der ERK1/2-Aktivität unter Basalbedingungen zu einer konzentrischen Hypertrophie führt. Die JNK und p38 wurden durch MEK1 nicht beeinflusst. Dies ging mit einer verbesserten Herzfunktion ohne Zeichen für eine erhöhte Letalität oder Dekompensation einher. Darüber hinaus zeigte sich eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose-Stimuli. Daraus wurde geschlossen, dass ERK1/2 eine physiologische Form des kardialen Remodelings vermittelt (Bueno et al. 2000).

Übereinstimmend zeigte sich bei einer kardiomyozytenspezifischen Überexpression einer intrinsisch aktivierten ERK1-Variante im transgenen Mausmodell eine kompensierte Hypertrophie ohne Fibrose mit verbesserter kontraktile Funktion. Unter Druckbelastung kam es nicht zu einer Zunahme der Hypertrophie bei erhaltener kontraktile Funktion und geringerem Fibroseanteil im Verhältnis zum Wildtyp (Mutlak et al. 2018).

Harris et al. (2004) untersuchten anhand eines transgenen Mausmodells mit kardial-spezifischer Expression einer dominant-negativen Form von Raf-1 (DN-Raf) die Bedeutung der MAPKK-Kinase in der ERK1/2-Kaskade. Ohne Stimulation zeigte sich ein normaler

kardialer Phänotyp, während sich unter Druckbelastung eine erniedrigte ERK-Aktivität bei unveränderter JNK- und p38-Aktivität zeigte. Die Letalität sowie die Apoptose zeigten sich nach Druckbelastung in den DN-Raf-transgenen Mäusen erhöht. Bei den überlebenden Mäusen ließ sich durch Druckbelastung keine kardiale Hypertrophie induzieren. Dies zeigte ebenso wie die Befunde von Mutlak et al. sowie Bueno et al., dass die Raf-1/MEK/ERK-Kaskade ein Positivregulator der kardialen Hypertrophie zu sein scheint. Hier zeigte sich, dass diese Kaskade für die kardiale Hypertrophie unter Druckbelastung notwendig ist und eine adaptive Wirkung aufgrund der erhöhten Letalität und Apoptoserate bei fehlender Aktivierung ebenfalls in Betracht gezogen werden kann (Harris et al. 2004).

In einer weiteren Studie erfolgte die kardiomyozytenspezifische Deletion des ERK2-Gens in Mäusen mit folgender Druckbelastung (TAC). Unter kurzfristiger Druckbelastung zeigten die Mäuse eine abgeschwächte hypertrophe Reaktion mit verringerter Zunahme der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten und verringerter Fibrose. Bei anhaltender pathologischer Stimulation kam es zu einer deutlichen Verschlechterung der Herzfunktion. Unter ERK2-Deletion trat eine vermehrte Apoptose auf, sodass ERK2 eine kardiomyozytenprotektive Funktion zugesprochen werden kann (Ulm et al. 2014).

Li et al. (2009) zeigten ebenfalls, dass ERK1/2 an der regulatorischen Modulation des hypertrophen Remodelings unter Druckbelastung partizipiert. In der frühen Phase nach der Druckbelastung bis zur vierten Woche zeigte sich eine konzentrische Hypertrophie mit erhöhter ERK1/2-Aktivierung. Unter prolongierter Druckbelastung zeigte sich eine Abnahme der linksventrikulären Funktion, welche mit einer exzentrischen Hypertrophie und einer reduzierten ERK1/2-Aktivität assoziiert war (Gallo et al. 2019).

Eine zeitliche Veränderung der ERK1/2-Aktivierung unter Druckbelastung zeigte ebenfalls Toischer et al. (2010). 24 Stunden nach TAC zeigte sich eine deutlich erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung, während sich diese nach 7-tägiger Druckbelastung bereits deutlich gegenüber der Sham-Gruppe reduzierte.

Purcell et al. (2007) untersuchten in ihrer Arbeit die Auswirkungen einer Ausschaltung von ERK1/2, sowohl durch Gen-Knockout als auch durch DUSP6-Überexpression mit spezifischer ERK1/2-Inhibition. Sie beobachteten trotz vorliegender MAPK-Modulation keine Veränderung der hypertrophen Reaktion auf Druckbelastung, neuroendokrine Stimulation sowie physiologischen Stimulus. Somit wurde konträr zu den oben dargelegten Studien postuliert, dass ERK1/2 *in vivo* nicht für die Vermittlung kardialer Hypertrophie erforderlich ist. Gleichzeitig konnte jedoch ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate unter

Langzeit-Druckbelastung bei fehlender ERK1/2-Aktivierung gezeigt werden (Purcell et al. 2007).

Kehat et al. (2011) konnten in ihrer umfangreichen Arbeit dagegen demonstrieren, dass ERK1/2 das Gleichgewicht zwischen konzentrischem und exzentrischen Remodeling moderiert.

Die Studienlage zur Auswirkung der Druckbelastung im Mausmodell ist umfangreich, zur Volumenbelastung und ihrem Zusammenhang mit der ERK1/2 Signalkaskade liegen dagegen nur vereinzelte Untersuchungen vor. So konnten Toischer et al. (2010) in einem aorto-kavalen Shunt-Modell zeigen, dass Volumenbelastung auch im Mausmodell zu einer exzentrischen Hypertrophie führt. Das Aktivitätsniveau von ERK1/2 zeigte sich bei der exzentrischen Hypertrophie in diesem Versuchsaufbau nach 24 Stunden und 7 Tagen allerdings nicht verändert (Toischer et al. 2010). In vorangegangenen Untersuchungen unserer eigenen Arbeitsgruppe zeigte sich dagegen ein Signal, dass auch im *in vivo*-Modell eine Volumenbelastung die Aktivierung von ERK1/2 beeinflusst (Schnelle 2016). Dies ließe sich mit den Ergebnissen von Kehat et al. (2011) in Einklang bringen, die zeigten, dass ein Knockout von ERK1/2 zu einer exzentrischen Kardiomyozytenhypertrophie führt.

Insgesamt ist somit die Rolle von ERK1/2 beim kardialen Remodeling aufgrund divergierender und teilweise ambivalenter Ergebnisse weiterhin nicht eindeutig geklärt (Mutlak und Kehat 2015). In welcher Form ERK1/2 in das hypertrophe Remodeling involviert ist und welcher Zusammenhang zur Volumenbelastung und zum exzentrischen Remodeling besteht, ist nicht abschließend erforscht.

1.5 Zielsetzung

Die chronische Herzinsuffizienz ist trotz bereits etablierter Therapien weiterhin eine Erkrankung mit schlechter Prognose. Zur Entwicklung weiterer therapeutischer Ansätze und Strategien bedarf es eines detaillierteren Verständnisses derjenigen Signalwege, die zu einer Herzinsuffizienz führen. Die hämodynamischen Belastungen des Herzens – Druck- und Volumenbelastung – führen zu einem unterschiedlichem kardialen Remodeling. Dies umfasst verschiedene Hypertrophieformen, Signalwege sowie molekulare und zelluläre Veränderungen.

Die MAP-Kinase ERK1/2 moduliert als Bestandteil der Signalwege des kardialen Remodelings spezifische zelluläre Reaktionen. Die genaue Rolle von ERK1/2, insbesondere unter Volumenbelastung, ist dabei aufgrund widersprüchlicher und divergierender Ergebnisse jedoch nicht eindeutig geklärt.

Diese Arbeit soll zum besseren Verständnis der Rolle von ERK1/2 während exzentrischer Hypertrophie unter chronischer Volumenbelastung *in vivo* beitragen. Wir untersuchten im ersten Schritt die Aktivität von ERK1/2 in einem murinen aorto-kavalen Shunt-Modell. In einem zweiten Schritt studierten wir die Auswirkungen einer kardiomyozytenspezifischen ERK2-Überexpression im transgenen Mausmodell. Dabei erhoben wir sowohl die Auswirkungen auf den basalen Phänotypen als auch jene auf das kardiale Remodeling durch Volumenbelastung anhand morphometrischer, echokardiographischer, molekularbiologischer sowie histologischer Parameter.

Somit sollten folgende zentrale Fragestellungen beleuchtet werden:

1. Wie verhält sich die Aktivität von ERK1/2 unter Volumenbelastung?
2. Verändert eine ERK2-Überexpression der Kardiomyozyten den kardialen Phänotyp unter Basalbedingungen?
3. Führt eine ERK2-Überexpression unter Volumenbelastung zu einem veränderten kardialen Remodeling mit verändertem Hypertrophiemuster?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Aqua	B. Braun SE, Deutschland
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, USA
Citrate Buffer, pH6.0 10x Antigen Retriever	Sigma-Aldrich, USA
cOmplete Tablets, Mini EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor	Roche Holding AG, Schweiz
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Ethanol 99% vollvergällt	Chemsolute, Deutschland
Forene® Isofluran	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Deutschland
iCycler iQ® PCR Plates	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Methanol	Chemsolute, Deutschland
Microseal® `B` seal	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Millipore Water	Gefiltert mit Milli-Q Filter System; (Merck KGaA, Deutschland)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun SE, Deutschland
Nucelase-free water 50 ml	Qiagen N.V., Niederlande
NuPage LDS Sample Buffer	Invitrogen AG, USA
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen AG, USA
NuPAGE™ 4-1% Bis-Tris Gel 1.5mm X 15 well	Invitrogen AG, USA
PhosSTOP EASYpack Phosphatase Inhibitor	Roche Holding AG, Schweiz
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich, USA
Precision Plus Blue (250-10 kDA) All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Proteinase K	Qiagen N.V., Niederlande
Restore™ PLUS Western Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
RIPA Lysis Buffer, 10x	Merck Millipore, USA
RNase Erase [®]	MP Biomedicals, USA
RNase-freies Wasser	Qiagen N.V., Niederlande
Thick Blot Paper Filter Paper	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Triton [™] X-100	Sigma-Aldrich, USA
TWEEN [®] 20	Sigma-Aldrich, USA
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Amersham [™] Protran 0,45 µm Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare Lifescience, USA
Falcon 15 ml und 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Filterspitzen: 0,1 – 1000 µl	Starlab, Deutschland
Labortücher Weiß	Kimtech Science Kimberly-Clark, USA
Menzel Deckgläser	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Microseal 'B' seal	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Nalgene Cryoware	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Nunc [™] MicroWell [™] 96-Well	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Plasteur Plast Pipette	Labsolute Th Geyer GmbH & Co. KG, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Serologische Pipette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
stainless steel bead	Qiagen N.V., Niederlande
Thick Blot Paper Filter Paper	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

2.2 Tiere

2.2.1 Mauslinien

Die tierexperimentellen Untersuchungen erfolgten entsprechend der institutionellen und staatlichen Richtlinien im Rahmen des „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH publication No. 85-23, revised 1985)“. Alle durchgeführten Tierexperimente wurden vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt und erfolgten entsprechend den diesbezüglichen Bestimmungen.

Die durchgeführten Experimente unterteilten sich in reine Wildtyp (WT)-Studien sowie in erweiternde Studien zwischen WT-Mäusen und ERK2-transgenen Mäusen (ERK2tg).

Die WT-Studien erfolgten an gesunden C57Bl/6N-Mäusen in einem Alter von acht bis zehn Wochen. Die Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) käuflich erworben.

Die vergleichenden Studien zwischen WT und transgenen Mäusen erfolgte an kardiomyozytenspezifischen ERK2 überexprimierenden Mäusen (ERK2tg) im genetischen C57Bl/6J-Hintergrund. Diese erhielten wir freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Kristina Lorenz (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg). Die Erstellung der ERK2tg-Mäuse erfolgte initial im FVB/N-Hintergrund, durch Pronukleus-Injektion der befruchteten Oozyten mit einem transgenen Konstrukt, welches die kodierende WT-Maus-ERK2-Sequenz unter der Kontrolle eines „*alpha-myosin heavy chain* (a-Mhc)“ Promoters enthielt (Lorenz et al. 2009). Korrespondierend wurden Wildtyp-Wurfgeschwister verwendet. Für unsere Experimente wurden die transgenen sowie Wildtyp-Mäuse über zehn Generationen in den C57Bl/6J Stamm eingekreuzt. Nur männliche und im Alter von 8-12 Wochen übereinstimmende Tiere wurden verwendet (Jochmann et al. 2019).

Die Tiere wurden unter normalen Laborbedingungen mit regelmäßigem Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 Stunden sowie mit freiem Zugang zu Wasser und Futter in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen gehalten.

2.2.2 Aorto-kavale Shunt-Operation

Die aorto-kavale Shunt-Operation erfolgte wie bereits zuvor beschrieben (Scheuermann-Freestone et al. 2001; Toischer et al. 2010; Schnelle 2016; Lbik 2019). Das Ziel der aorto-kavalen Shunt-Operation war ein direkter Übertritt arteriellen Blutes aus der Aorta abdominalis infrarenalis in die Vena cava inferior. Dies diente der Etablierung einer chronischen Volumenbelastung des Herzens im Mausmodell. Als Vergleichsgruppe erfolgt

eine sogenannte „Sham“-Operation, welche die gesamte Operation der Mäuse, jedoch ohne Anlage des Shunts umfasste. Alle Experimente erfolgten im Vergleich zwischen Sham- und Shunt-Gruppe. Die gleichgeschlechtlichen WT- sowie ERK2tg Mäuse wurden alterskorreliert in gleich große Sham- sowie Shunt- Gruppen randomisiert.

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte durch eine Insufflation mit 1,5% Isofluran und 100% Sauerstoff. Das Vorgehen der Operation ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Nach einer medianen Laparotomie (longitudinaler abdominaler Schnitt) in Rückenlagerung erfolgte unter Verlagerung der intestinalen Organe eine Präparation der retroperitoneal liegenden Vena cava inferior (VCI) sowie der Aorta abdominalis (A. abdominalis) vom umgebenen Gewebe. Die Aorta wurde im Bereich der Aorta abdominalis suprarenalis unmittelbar über den Abgängen der Aa. renales abgeklemmt und im Bereich der Aorta abdominalis infrarenalis von lateral punktiert (23 Gauge Nadel). Die Punktion der lateralen aortalen Wand wurde fortgesetzt bis zur Perforation der gemeinsamen Mittelwand zur VCI, ohne die VCI lateral zu durchstoßen. Im Anschluss erfolgte ein Rückzug der Nadel und der Verschluss der äußeren lateralen Punktionsstelle der Aorta abdominalis mit Cyanoacrylat (Abbildung 5). Somit bestand eine direkte Verbindung der A. abdominalis zur VCI über die gemeinsame mediale Wand.

Eine erfolgreiche Anlage eines aorto-kavalen Shunts konnte unmittelbar intraoperativ nach Lösen der suprarenalen Klemme durch einen Übertritt des oxygenierten arteriellen Blutes in die VCI sowie ein Anschwellen der VCI verifiziert werden.

Die Mäuse der Sham-Gruppe wurden derselben Operation unterzogen mit Ausnahme der Gefäßpunktion und somit ohne Anlage eines aorto-kavalen Shunts. Zur Erhaltung der Vergleichbarkeit erhielten die Tiere der Sham-Gruppe ebenfalls die Gabe eines Tropfen Cyanoacrylats an die laterale Aortenwand.

Nach Anlage des Shunts bzw. nach Durchführung der Sham-Prozedur folgte der Verschluss des Abdomens mit 6-0 Prolene. Bis zum vollständigen Erwachen der Tiere wurden eine Insufflation mit Sauerstoff fortgeführt und bis zur vollständigen Erholung nach der Anästhesie eine Nachbeobachtung der Mäuse auf einer Wärmeplatte ergänzt. Die Operation erfolgte durch PD Dr. med. Dr. M. Schnelle.

Alle Tiere erhielten postoperativ eine Schmerztherapie mit Buprenorphin sowie Metamizol.

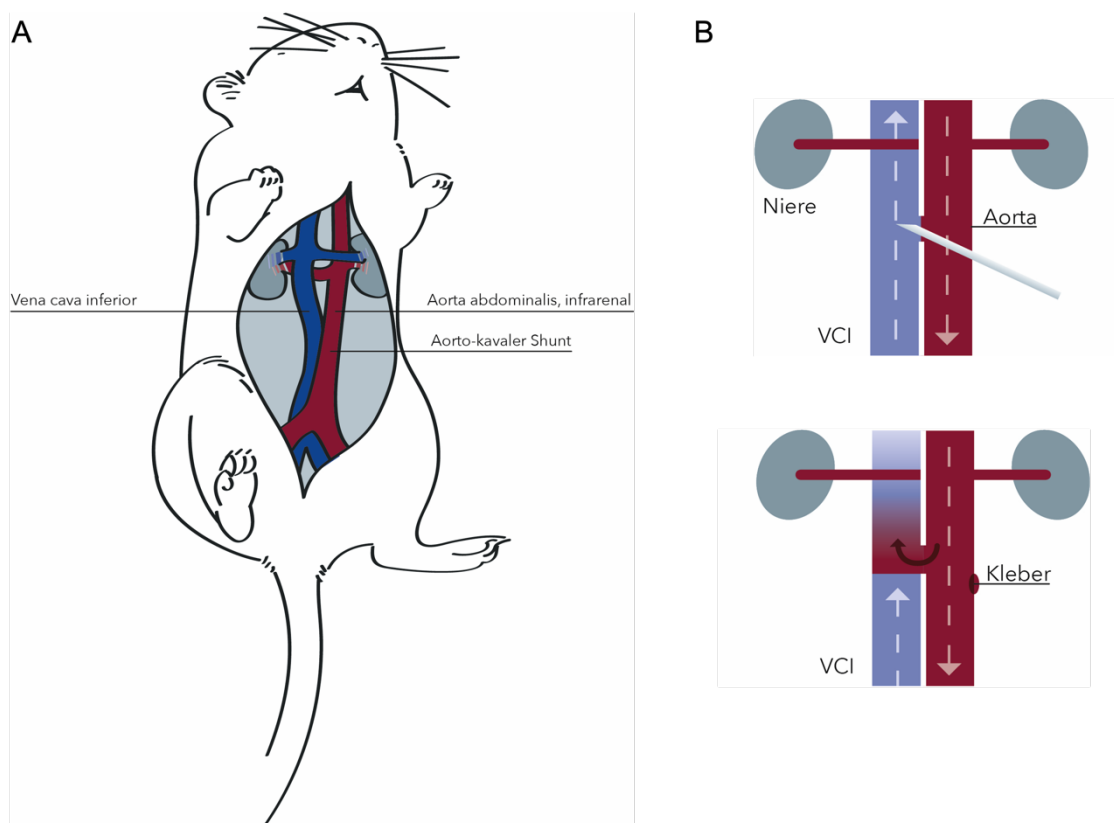


Abbildung 5: Aorto-kavale Shunt-Operation der Maus. Die aorto-kavale Shunt-Operation wird als Mausmodell der kardialen Volumenbelastung verwendet. A Darstellung der medianen Laparotomie zur Freilegung der Aorta abdominalis sowie der Vena cava inferior (VCI). B Schematische Darstellung des Vorgehens zur Anlage eines aorto-kavalen Shunts. Es erfolgt eine infrarenale Punktion der Aorta abdominalis von lateral. Die Nadel wird vorgeschoben bis die mediale gemeinsame Wand der Aorta sowie der VCI punktiert ist. Nach Rückzug der Nadel findet ein Übertritt des oxygenierten arteriellen Blutes aus der Aorta in die VCI statt. Die laterale aortale Punktionsstelle wird mit Kleber verschlossen. VCI = Vena cava inferior. Abbildung in Anlehnung an Abassi et al. (2011) sowie Schnelle (2016).

2.2.3 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Mäuse zwei Wochen nach erfolgter Sham- oder Shunt-Operation unter Verwendung von 5%igem Isofluran in einer geschlossenen Kammer anästhesiert. Nach Erhebung des Körpergewichts mittels einer Feinwaage (Sartorius, Deutschland) erfolgte die Euthanasie durch cervikale Dislokation.

Zur Eröffnung des Thorax und Freilegung des schlagenden Herzens erfolgte ein abdomineller oberer Medianschnitt mit Fortführung des Schnittes durch das Diaphragma und darauffolgender Sternotomie.

Die Entnahme der Herzen erfolgte nach Durchtrennung der Pulmonalgefäße, der Vena cava und der Aorta. Das Herz wurde in das rechte und linke Atrium sowie den rechten und linken Ventrikel (LV) separiert. Die entnommenen Herzanteile wurden von Blutresten und Koageln gereinigt, getrocknet und schließlich mit einer Feinwaage gewogen.

Der linke Ventrikel wurde folgend scharf in drei Teile separiert, Apex, Mittelstück und Basis. Das Mittelstück wurde in 4% PFA (Paraformaldehyd) gegeben und bei 4 °C bis zur histologischen Aufarbeitung gelagert. Apex und Basis wurden unmittelbar nach Separierung separat in Eppendorf-Gefäßen gegeben, in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Nach der Entnahme der Herzen erfolgte die Entnahme der Lunge, Leber und Nieren. Die Organe wurden in steriler Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und gewogen.

Die Tibia der Mäuse wurde entnommen, freipräpariert und dann mit Hilfe eines elektronischen Messschiebers in der Länge von der Fascies articularis superior bis zur Facies articularis inferior gemessen. Eine morphometrische Auswertung der Organgewichte erfolgte normalisiert zur Tibialänge (TL).

2.2.4 Echokardiographie

Eine transthorakale Echokardiographie der Mäuse zur Charakterisierung und Erhebung der kardialen Geometrie und Funktion erfolgte präoperativ sowie postoperativ nach erfolgter Shunt- und Sham-Operation wie zuvor beschrieben (Pistner et al. 2010; Schnelle et al. 2018; Lbik 2019). Verwendet wurde hierzu das Vevo2100 System mit der MS-400 30 MHz-Ultraschallsonde (Visualsonics, Canada).

Zur Durchführung der Echokardiographie wurden die Mäuse mit 1,5% Isofluran anästhesiert und in Rückenlage platziert. Während der Durchführung der Echokardiographie erfolgte eine Überwachung der Vitalparameter, welche während der Untersuchung innerhalb physiologischer Grenzwerte konstant gehalten wurden. Über ein Elektrokardiogramm über Extremitätenelektroden erfolgte die Ermittlung der Herzfrequenz (400-500/min). Die Atemfrequenz befand sich im physiologischen Bereich zwischen 120-180/min. Die Messung der Körpertemperatur erfolgte über eine rektale Sonde und konnte durch eine unterliegende Wärmeplatte auf 37 °C konstant gehalten werden. Zur Durchführung der Echokardiographie wurde der Thorax der Mäuse mit Haarentfernungscreme enthaart. Die 2D-Echokardiographie erfolgte im B-Mode mit links-parasternalen Aufnahmen in der langen Achse sowie in der kurzen Achse. Die M-Mode-Aufnahmen wurden in der Papillarmuskelebene angefertigt. Nach der Durchführung der Echokardiographie und der Ausleitung der Anästhesie wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte bis zur vollständigen Erholung nachbeobachtet. Durchgeführt wurde die Echokardiographie vom SFB1002 Service Team Marcel Zoremba und Roland Blume (Kardiologie und Pneumologie, Universitätsmedizin Göttingen).

2.2.4.1 Echokardiographische Erhebung der linksventrikulären Geometrie und der systolischen Funktion

Die Bestimmung der Geometrie sowie der systolischen Funktion erfolgte über die *LV-trace* Funktion der VevoLab Software Version 3.1.0 (FUJIFILM VisualSonics, Inc.) auf Grundlage der M-Mode Bilder in der langen sowie kurzen Achse. Die Sonographie sowie die Messungen und Auswertungen erfolgten verblindet hinsichtlich der Genotyp- sowie Operations-Gruppen der Mäuse. Die linksventrikulären Dimensionen, welche sich direkt anhand der M-Mode Bilder messen ließen, umfassten die Septumdicke (Septum), die Hinterwanddicke, den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD), den linksventrikulären endsystolischen Durchmesser (LVESD) sowie die Herzfrequenz (HF). Die Messung erfolgte über mehrere Herzkontraktionen (Abbildung 6). Anhand der gemessenen Daten erfolgte eine automatische Berechnung der endsystolischen sowie enddiastolischen Volumina, der EF, des *fractional shortening* (FS) sowie des Schlagvolumens (SV). Ebenso erfolgte eine kalkulierte Berechnung der linksventrikulären Masse. Aufgrund der exakteren Bestimmung wurde jedoch die Messung des Gewichtes der entnommenen Herzen verwendet.

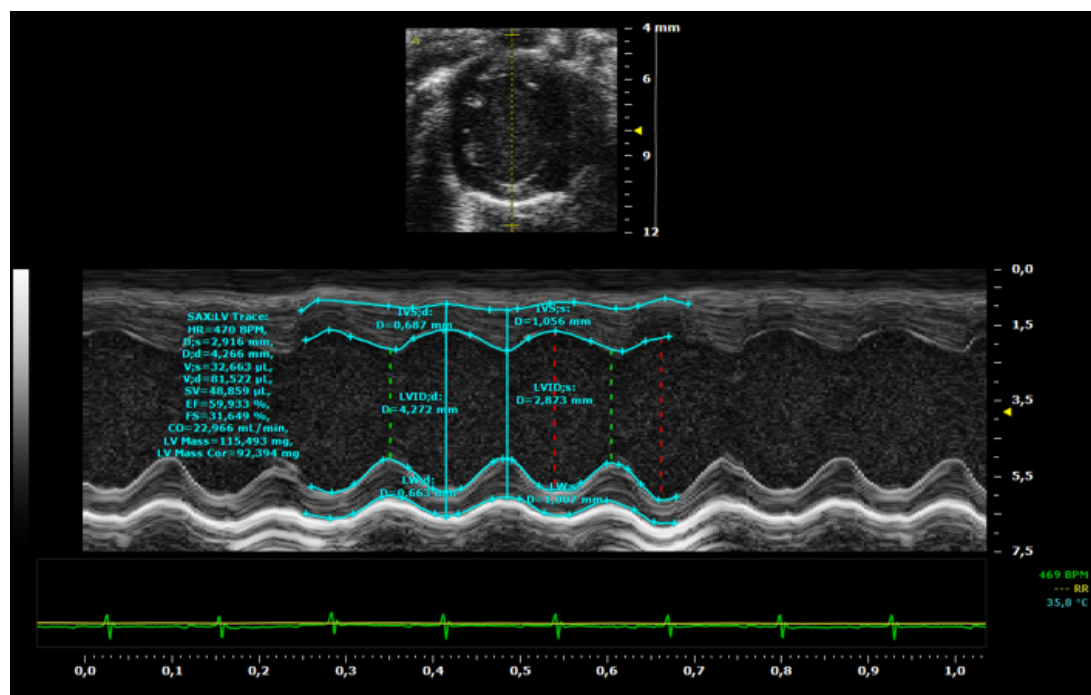


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der M-Mode Auswertung. Dargestellt ist eine exemplarische Messung der linksventrikulären Dimensionen in der parasternalen kurzen Achse. HR = *heart rate*, Herzfrequenz. D;s = Diameter systolisch. D;d = Diameter diastolisch, V;s = systolisches Ventrikelvolumen; V;d = diastolisches Ventrikelvolumen. SV = Schlagvolumen. EF = Ejektionsfraktion. FS = *fractional shortening*. CO = *cardiac output*, Herzzeitvolumen. LV Mass = linksventrikuläre Masse. IVS;s = interventrikuläres Septum in der Systole. IVS;d = interventrikuläres Septum in der Diastole. LVID;d = linksventrikulärer Innendurchmesser in der Diastole. LVID;s = linksventrikulärer Innendurchmesser in der Systole. LW;d = linke Ventrikelhinterwand in der Diastole. LW;s = linke Ventrikelhinterwand in der Systole.

2.2.4.2. Echokardiographische Erhebung der diastolischen Funktion

Die Beurteilung der diastolischen Funktion erfolgte über die Erhebung der *reverse longitudinal strain rate* (rLSR), wie zuvor beschrieben (Bhan et al. 2014; Schnelle et al. 2018, Blessberger et al. 2018).

Strain ist ein Deformationsparameter, der die Verkürzung bzw. Verdickung eines myokardialen Segments angibt. Die *strain rate* bezeichnet dabei die Veränderung des *strain* über die Zeit. Die longitudinale Messung erfasst dabei die Veränderung in der Ventrikellängsachse, der radiale *strain* gibt die Veränderung der Myokarddicke in der kurzen Achse an.

Die Erhebung der *strain rate* erfolgte über *Speckle Tracking* anhand der zuvor erhobenen echokardiographischen parasternalen Untersuchungen in der langen Achse über mehrere Kontraktionen. Zur Messung wurde die Vevo2100 Imaging Software 1.5.0 verwendet.

Es wurden *Tracking*-Punkte an den endokardialen und epikardialen Grenzen identifiziert. Ein darauffolgendes Tracking der räumlichen Verlagerung der *Speckles* im Myokard innerhalb dieser Grenzen von Bild zu Bild durch den kardialen Zyklus ermöglicht über die relative Bewegung der *Speckles* zueinander die Berechnung des *strain* sowie die *strain rate* zu berechnen. Die Software berechnet den longitudinalen sowie radialen *strain* regional innerhalb von sechs Segmenten des linken Ventrikels und kalkuliert daraus die berechneten globalen *strain* und *strain rate* des linken Ventrikels. Zur Berechnung verwendeten wir die mittleren globalen longitudinalen *strain rate*.

Zur Messung der diastolischen Funktion kann der *Peak* der longitudinalen *strain rate* während der frühen linksventrikulären Füllung, in der Vevo2100 1.5.0 Image Software als „*reverse peak*“ bezeichnet, verwendet werden. Wir bezeichneten diesen Parameter als *peak reverse longitudinal strain rate* (rLSR) (Schnelle et al. 2018).

2.3 Molekulare Analyse

2.3.1 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Die entnommenen und unmittelbar in Flüssigstickstoff tiefgefrorenen, bei -80 °C gelagerten Proben des linken Ventrikels wurden in eisgekühltem *RIPA-Lysis-Buffer* (Merck Millipore, USA) 1x (verdünnt in Aqua) mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren mechanisch homogenisiert und lysiert. Dazu wurde die gefrorene Probe mit 500-550 µl Puffergemisch in vorgekühlten 2 ml Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf-Gefäß) mit dem Tissue Lyser LT

(Qiagen N.V., Niederlande) für 5 min homogenisiert und für 30 min bei 4 °C im Überkopf-Rotator inkubiert. Zur Entfernung des Zelldebris der lysierten Zellen erfolgte daraufhin die Zentrifugation der Proben bei 4 °C für 25 min (14.000 g, Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Der Überstand wurde als proteinhaltige Probe entnommen und in zwei neue Mikroreaktionsgefäße aliquotiert, das zentrifugierte Pallet wurde verworfen. Die Probe verblieb gekühlt auf Eis oder wurde zur Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren.

Die Messung der Proteinkonzentration um das Auftragen vergleichbarer Mengen der unterschiedlichen Proben für die Gel-Elektrophorese zu ermöglichen erfolgte mit dem PierceTM BCA-Protein-Assay-Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) nach Herstellerangaben. Das Kit fungiert zum kolorimetrischen Nachweis und zur Quantifizierung des Gesamtproteins der zuvor homogenisierten und lysierten Probe. Das Prinzip des Assays basiert auf der Reduktion von Cu²⁺-Ionen zu Cu¹⁺ durch Bindung von Proteinen in einem alkalischen Milieu und einer daraufhin folgenden Chelatbindung mit Bicinchonin-Säure (BCA), welches einen farbigen Komplex bildet. Die kolorimetrische Quantifizierung erfolgt durch Messung der Absorption bei 562 nm (96-well plate reader uQuant MQX200 Microplate Reader, Biotek).

Die Proteinkonzentration der zu messenden Probe wird dabei im Vergleich zu einem Standardprotein (Rinderserumalbumin, BSA) mit bekannter Konzentration anhand einer linearen Regression der Standardkurve ermittelt.

Zur Durchführung des Experiments erfolgte zunächst das Auftragen der Standard-Verdünnungsreihe auf eine 96-well Mikrotiterplatte. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden 1:10 mit RIPA-Lysis-Puffer verdünnt. Diese Verdünnung wurde in einem Verhältnis von 1:8 mit dem Arbeitsreagenz, bestehend aus Reagenz A und Reagenz B in einem Mischungsverhältnis von 1:50 auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Dies entsprach 25 µl verdünnte Proteinprobe mit 200 µl des Arbeitsreagenz. Jede Proteinprobe wurde in zwei Replikaten auftragen. Als Negativprobe wurde ein nicht proteinhaltiges Gemisch aus RIPA-Lysis-Puffer und dem Arbeitsreagenz aufgetragen. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37 °C erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm erfolgt im 96-well Plattenleser (*plate reader*) die photometrische Messung.

Aus den für den BSA-Standard ermittelten Werte erfolgte anhand der bekannten Proteinkonzentrationen die Erstellung einer Standardkurve. Anhand dieser konnten die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben auf Grundlage der gemessenen Farbreaktion errechnet werden.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine SDS (*sodium dodecyl sulfate*)-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. Das Protein wurde verdünnt mit 6 µl LDS (Lithiumdodecylsulfat)-Sample-Puffer (4x) und 1,25 µl 5% 1,4-Dithiothreitol (DTT). Die Menge der zu verwendenden Proteinprobe errechnete sich nach Proteinkonzentration, sodass in jeder aufgetragenen Probe eine vergleichbare Gesamtproteinmenge aufgetragen werden konnte. Das Gemisch wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 25 µl mit Aqua aufgefüllt. Daraufhin erfolgte eine Denaturierung der Proben. Die Temperatur der Denaturierung variierte abhängig von dem im Western Blot verwendeten Antikörper. In der Regel erfolgte die Denaturierung für 5 min bei 95 °C. Ausnahmen diesbezüglich zeigten sich bei den ERK1/2-Autophosphorylierungs-Antikörpern (Erk 1/2 (pThr188)) sowie bei SERCA (anti-SERCA-2 α). Bei diesen geplanten Untersuchungen erfolgte die Denaturierung bei 30 °C für 5 min. Nach der Denaturierung erfolgte ein Durchmischen der Proben mit dem Vortex um eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Proteins in dem Lysat zu ermöglichen.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte schließlich in Polyacrylamid Novex NuPAGE Bis Tris Gelen (4-12% mit Konzentrationsgefälle). Aufgetragen wurden 20 µg Protein pro Probe. Als Laufpuffer wurde MES SDS Running Puffer 1:20 mit Aqua verdünnt verwendet. Zur Größenbestimmung und zur Laufkontrolle wurde ein Proteinmarker (Precision Plus Blue, Bio-Rad Laboratories (250-10 kDA)) verwendet. Die Elektrophorese lief im XCell SureLock™ Mini-Cell (Thermo Fisher Scientific Inc.) mit 80 V für 15 Minuten und anschließend mit 120 V für 125 Minuten.

2.3.3 Western Blot

Der Transfer der zuvor aufgetrennten Proteine vom SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine 0,2 µm Nitrocellulose-Membran (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) erfolgte im gekühlten Nass-Blot-Verfahren (Microcomputer electrophoresis power supply, Consort; Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Der Puffer für den Nasstransfer setzte sich aus 150 ml Methanol, 100 ml Transferpuffer und 750 ml Wasser zusammen. Der Transferpuffer bestand aus 58 g Tris, 29 g Glycin und 18,5 ml SDS 20% in 1000 ml Aqua. Der Transfer erfolgte auf Eis gekühlt für zwei Stunden bei konstant 0,5 A.

Daraufhin wurde die Membran zur Erfolgsüberprüfung des Transfers in Ponceau-Rot gefärbt und bei Bedarf anhand des Markers in kleinere Membrananteile geschnitten. Nach zweimaligem Auswaschen des Ponceau-Rot mit 1xTBS-Tween (TBST, siehe Tabelle 7) über

5 min erfolgte das Blocken der Membran in 5%iger Milch mit 1xTBST Lösung über eine Stunde bei Raumtemperatur.

Die Membranen wurden nach dem Blocken in 1xTBST für 5 min gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern in 1% Milch in den jeweiligen Antikörperkonzentrationen, siehe Tabelle 8, über Nacht bei 4 °C und folgend für 2 h bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Membranen dreimal für 10 min mit 1xTBST gewaschen und anschließend mit den zugehörigen *horseradish peroxidase-conjugated (HRP)* sekundären Antikörpern für 1,5 Stunden inkubiert. Nach erneutem dreimaligem 10-minütigem Waschen erfolgte das Hinzugeben des Detektionsreagenz *enhanced chemiluminescent detection system* (GE Healthcare) nach Herstellerangaben. Die Detektion des Chemilumineszenz-Signals erfolgte mit dem *Chemidoc XRS+ imager* (Bio-Rad Laboratories). Nach Stripping mit dem *Restore™ PLUS Western Stripping Buffer* nach Herstellerangaben konnte nach erneutem Blocken der Membran eine weitere Antikörperapplikation mit einem anderen Zielantikörper erfolgen.

Die Signalquantifizierung der densitometrisch detektierten Banden erfolgte mit der Software *Image Lab™ v. 6.0.1* (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Die mathematischen Berechnungen erfolgten in Microsoft Excel.

Tabelle 7: Puffer

Puffer	Hersteller
1% BSA (bovine serum albumin)	6,5 ml DPBS + 1 ml 7,5% BSA Solution
1% Milch	10 ml 5% Milch + 40 ml 1% TBST
5% Milch	2,5 g Milchpulver + 50 ml 1% TBST
TBST	20 mM Tris-base, 50 mM NaCl, 0.1% Tween 20, (pH=7.5)

Tabelle 8: Antikörper

Primärer Antikörper	Firma (spezifische ID)	Konzentration, Puffer
p44/42 MAPK (ERK1/2) (e10)	Cell Signaling (#9102)	1:1000 in 1% Milch
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Thr204) (E10)	Cell Signaling (#9106)	1:1000 in 1% Milch
Erk1/2 (pThr188)	Badrilla (A010-40AP)	1:1000 in 1% Milch
Phospho-Akt (Ser473) (D9E)	Cell Signaling (#4060)	1:1000 in 1% Milch
Akt	Cell Signaling (#9272)	1:2000 in 1% Milch
Phospho-p38 Map Kinase (Thr180/Thr182)	Cell Signaling (#9211)	1:1000 in 5% BSA
P38 MAPK	Cell Signaling (#9212)	1:1000 in 5% BSA
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Thr185)	Cell Signaling (#9251)	1:1000 in 1% Milch
SAPK/JNK	Cell Signaling (#9252)	1:1000 in 1% Milch
anti-SERCA-2 α	Thermo Fisher Scientific Inc. (MA3-919)	1:1000 in 1% Milch
Anti-GAPDH	Merck Millipore (MAB374)	1:10000 1% Milch
Anti-proANP	Abcam (ab 91250)	1:300 1% Milch

Sekundärer Antikörper	Firma	Konzentration
Sheep anti-Mouse IgG HRP-conjugated	GE Healthcare, NA931 AB_772210	1:10000 1% Milch
Donkey anti-Rabbit IgG HRP-conjugated	GE Healthcare, NA934 AB_772206	1:10000 1% Milch
Goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated	Cell Signaling #7074	1:10000 1% Milch

2.3.4 RNA-Isolation

Zur Isolation und Aufbereitung der totalen RNA (*ribonucleic acid*) aus dem Herzgewebe erfolgte die Verwendung des RNeasy® Fibrous tissue Mini kit (Qiagen N.V.). Als Gewebeprobe des Herzens wurde der bei -80 °C gelagerte Apex benutzt. Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstelleranleitung sowie des etablierten Verfahrens in unserer Arbeitsgruppe (Lbik 2019).

Zu Beginn erfolgten der Zellaufschluss sowie die Homogenisierung, alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Dazu wurden geringe Mengen (<30 mg) der gefrorenen

Herzproben des linken Ventrikels mit 350 µl RLT Puffer, Guanidin-Isothiocyanat enthaltend, und 14 µM DDT (Dithiothreitol) in einem 2 ml Tube für 5 min bei 50 Hz unter Verwendung eines *stainless steel bead* in einem Tissue Lyser LT (Qiagen N.V.) homogenisiert.

Es erfolgte zum Abbau von Proteinen die Zugabe von 590 µl RNase freien Wassers und 10 µl Proteinase K zum Lysat, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 55 °C (Thermomixer 5436, Eppendorf). Durch Zentrifugation bei 10000 x g für 3 min konnte der bisher verbliebende Debris als Pallet am Boden des Tubes abgesondert werden. Der klare Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Tube transferiert und mit 0,5-fachen Volumen 100%igem Alkohol versetzt und gemixt. Davon wurden 700 µl in ein RNeasy Mini Column mit Silica-Membran in einem 2 ml Sammelgefäß gegeben und für 15 s bei 10000 x g zentrifugiert. 350 µl RW1 Puffer wurden zum Waschen auf die Membran in das RNeasy Mini Column hinzugeben und für 15s bei 10.000 x g erneut zentrifugiert. Nach diesem Durchgang wurden 10 µl DNase in 70 µl RDD Puffer auf die RNeasy Silica-Membrane gegeben, bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert und dann mit 350 µl RW1 bei 10000 x g für 15 s zum Entfernen der Kontaminationen gewaschen. Darauf folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer (verdünnt mit 4 Volumen von Ethanol 100%) für 15 s sowie für eine Minute bei jeweils bei 10000 x g.

Die Extraktion der RNA aus der RNeasy Silica-Membrane erfolgte in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube durch Zugabe von 30-50 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation bei 10.000 x g für eine Minute. Das erhaltene Eluat mit enthaltener RNA wurde umgehend auf Eis gestellt.

Daraufhin folgte eine photometrische RNA-Konzentrationsmessung (Absorption bei 260 nm) mit dem Nanodrop 2000 und NanoDrop 2000 Software (Thermo Fisher Scientific Inc.). Die Proben wurden direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

2.3.5 cDNA-Synthese

Unter Verwendung des iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc.) erfolgte die Synthese von komplementärer DNA (*complementary deoxyribonucleic acid, cDNA*) auf Grundlage der zuvor gewonnenen totalen RNA. Das cDNA Synthese Kit basiert auf einer modifizierten *Moloney murine leukemia virus* (MMLV) reversen Transkriptase. Die Komponenten sind versetzt mit einem RNase-Inhibitor. Der Reaktionsmix enthält eine Mischung aus oligo(dT)s und zufällig zusammengesetzten hexameren Primern. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Pro Probe erfolgt die Herstellung eines Reaktionsgemisches aus 4 µl „5x iScript Reaction Mix“, aus einem 1 µl iScript Reverse Transcriptase und der Zugabe von 1 µg der RNA-Probe. Die Volumina der RNA-Proben wurden gemäß der Konzentrationsmessung der RNA, siehe 2.3.4, angepasst. Dieses beschriebene Gemisch wurde mit Nuklease-freiem Wasser, abhängig von der verwendeten RNA-Volumina, bis auf 20 µl aufgefüllt. Die Bearbeitung erfolgte vollständig auf Eis.

Das Reaktionsgemisch wurde in einem IQ5 Real Time PCR-System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) mit dem Softwareprogramm Bio-Rad iQ5 v. 2.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) bei den in Tabelle 9 angegebenen Temperaturabfolgen und Arbeitsschritten inkubiert. Die cDNA wurde direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

Tabelle 9: cDNA-Synthese Arbeitsschritte

Arbeitsschritt	Temperatur und Dauer
Priming	25 °C für 5 min
Revere transcription	46 °C für 20 min
RT inactivation	95 °C für 1 min
Optional step	Bei 4 °C halten

2.3.6 qPCR

Zur Erhebung der Genexpressionslevel aus der gewonnenen cDNA erfolgte die Durchführung einer quantitativen Echtzeit-PCR (*real-time quantitative polymerase chain reaction*, qPCR). Die Abläufe erfolgten ebenfalls nach etablierten Verfahren unserer Arbeitsgruppe (Lbik 2019).

Der SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc.) wurde in den in Tabelle 10 aufgeführten Verhältnissen mit Nuklease-freiem Wasser und den Primern (Tabelle 11), verdünnt 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser, zusammengegeben und in eine auf Eis gekühlte 96 Well Plate pipettiert. Die entsprechende cDNA wurde 1:4 mit Aqua verdünnt, in einer Menge von 2 µl hinzugegeben. Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung aufgetragen. Bei jedem Durchlauf der qPCR wurden ebenfalls 3 Wiederholungen einer Negativkontrolle ohne cDNA, jedoch mit Nuklease-freiem Wasser aufgetragen. Die Platte wurde mit einer Klebefolie bedeckt und die Proben mit dem IQ5 Real Time PCR-System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) gemäß der in Tabelle 12 dargestellten Reaktionsschritten amplifiziert und gemessen, es erfolgten 45 Zyklen. Die relative Genexpression wurde mit Hilfe der Delta-Delta-Ct-Methode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode) normalisiert zu GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) berechnet.

Tabelle 10: Zusammensetzung des qPCR-Reaktionsgemisch

Reagenzien	Volumen (μ l)
Nuklease freies Wasser	4
Vorwärts-Primer	2
Rückwärts-Primer	2
SsoAdvanced SYBR Green Mix	10
cDNA (1:4 mit Aqua verdünnt)	2

Tabelle 11: Primer-Sequenzen

Primer	Sequenz
Gapdh (GAPDH)	Forward 5'-> 3' GAGACGGCCGCATCTTCTT
	Reverse 5'-> 3' CAATCTCCACTTTGCCACTGC
Atp2a2 (Serca-2 α)	Forward 5'-> 3' GGGCAAAGTGTATCGACAGG
	Reverse 5'-> 3' TCAGCAGGAACTTTGTCCACC
Nppa (ANP)	Forward 5'-> 3' GGGGGTAGGATGACAGGAT
	Reverse 5'-> 3' CAGAATCGACTGCCTTTTCC
Nppb (BNP)	Forward 5'-> 3' ACAAGATAGACCGGATCGGA
	Reverse 5'-> 3' ACCCAGGCAGAGTCAGAAAC
Acta1 (α -Skeletal aktin)	Forward 5'-> 3' CTCACTTCCTACCCTCGGC
	Reverse 5'-> 3' GCCGTTGTCACACACAAGAG

Tabelle 12: Reaktionsschritte der qPCR

Schritt	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zeit
Denaturierung	95	3 min
Amplifikation (x45)	95	10 s
Elongation (x45)	60	30 s
Schmelzkurve (x81)	55-95	6 s/Schritt

2.4 Histologische und immunhistochemische Analyse

2.4.1 Paraffineinbettung, Entwachsen, Rehydratation

Die entnommenen in 4% PFA über Nacht fixierten und bei 4 $^{\circ}$ C gelagerten Mittelstücke des linksventrikulären Herzwebes (siehe 2.2.3) wurden zur weiteren histologischen Aufarbeitung verwendet. Das weitere Vorgehen erfolgte nach etablierten Methoden unserer

Arbeitsgruppe (Lbik 2019). Zunächst erfolgte eine Paraffineinbettung mittels eines automatischen Gewebeeinfiltrationsautomaten (Leica, Deutschland, TP1020; *dip and dunk tissue processor*). Die Dehydratation des fixierten Herzgewebes erfolgte dabei in einer Alkohol-Reihe (60% Ethanol, 2x75% Ethanol, 2x95% Ethanol, 2x100% Ethanol), gefolgt von zweimaliger Inkubation in Xylol und dreimaliger Inkubation in Paraffin. Jeder Inkubationsschritt erfolgte für 90 Minuten.

Die Vorbereitung der Paraffinblöcke erfolgte an einer Gewebeeinbett-Station (Leica, TP1020; *modular tissue embedding center*). Das Gewebe wurde transversal am Mikrotom (Leica RM 2165) in 5 µm dicke Proben geschnitten. Die Gewebeproben wurden im 27 °C warmen Wasserbad auf die Objektträger aufgezogen und in einem Inkubator bei 37 °C getrocknet. Die histologischen Schnitte wurden bei trockener Raumtemperatur aufbewahrt.

Für die weitere histologische Aufarbeitung der histologischen Schnitte erfolgte eine Rehydrierung. Dazu wurden die paraffinierten Gewebeschnitte zunächst für eine Stunde bei 65 °C inkubiert. Daraufhin erfolgt eine absteigende Alkoholreihe der paraffinierten Schnitten zur Deparaffinierung. Dafür wurden die auf den Objektträger aufgebrachten Schnitte zweimal für 10 Minuten in Xylol und darauffolgend für jeweils 5 Minuten in 100% Ethanol, 90% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol, 50% Ethanol und 35% Ethanol inkubiert. Abschließend erfolgte eine Inkubation für fünf Minuten in destilliertem Aqua. Die so vorbereiteten Schnitte wurden folgend für verschiedenen Färbungen verwendet.

2.4.2 Wheat germ Agglutinin (WGA)-Färbung

Zur Erhebung der *cross-sectional area* (CSA) erfolgte die Färbung mit Fluoreszin-konjugiertem *wheat germ agglutinin* (WGA-Alexa Fluor 594, Invitrogen AG, USA) zur Darstellung der Zellmembranen. Dafür wurden die rehydrierten Gewebeschnitte für fünf Minuten mit PBS (*phosphate buffered saline*) auf dem Schüttler gewaschen. Daraufhin erfolgte ein Einkreisen der Gewebeschnitte mit einem hydrophoben Stift. WGA (wheat germ agglutinin, Invitrogen AG) in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS verdünnt wurde auf die Zellschnitte aufgetragen und für 30 min in einer Feuchtkammer abgedunkelt inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS für 5 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte mit ProLong® Gold antifade with DAPI (4',6-Diamidin-2Phenylindol) (Thermo Fisher Scientific Inc.) und einem Deckglas eingedeckt. Mit dem enthaltenen blauen DNA-Färbemittel DAPI wurden die Zellkerne eingefärbt. Das Aushärten erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Aufnahme der Bilder erfolgte in 40-facher Vergrößerung mit dem Leica DM6000 B Mikroskop mit CTR6000-Steuerung, Leica DFC350 FX-Kamera und Leica LAS X v. 3.3.

Software (Leica Microsystems, Schweiz). Die Messung der CSA erfolgte an 400 zufällig ausgewählten Kardiomyozyten pro Tier unter Nutzung der Image J 1.51q Software (National Institutes of Health, USA).

2.4.3 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Pikro-Siriusrot-Färbung (Abcam, Großbritannien, ab150681UK) wurde zur Evaluation der Fibrose verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand der Herstellerangaben.

Die rehydrierten Gewebeschnitte wurden mit der Pikro-Siriusrot-Lösung vollständig bedeckt und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte zweimalig mit Essigsäure und einmalig mit 100% Alkohol abgespült. Daraufhin erfolgte zweimal eine Dehydration in 100% Alkohol. Danach erfolgte ein Eindecken der Gewebeschnitte mit Permout-Medium (Fischer Scientific, SP15-100) und einem Deckglas.

Die Aufnahmen erfolgten als Hellfeldbilder mit dem BX43-Mikroskop (Olympus Life Science), der SC 30-Kamera (Olympus Life Science) und der cellSens Dimension 1.12 Software (Olympus Life Science). Zytoplasma und Muskelfasern sind gelb gefärbt, Kollagen ist rot gefärbt.

Die Auswertung der Fibrose erfolgte semiautomatisiert, wie bereits von D. Lbik (2019) beschrieben. Zwei zufällig ausgewählten Schnitte pro linkem Ventrikel eines Tieres wurden analysiert und per Image J und der Image J-Erweiterung Fiji (Fiji contributors, Schindelin et al. 2012; Rueden et al. 2017) mit einem in unserem Labor etablierten ImageJ-Macro quantifiziert. Der prozentuale Anteil der Fibrose an der Gesamtfläche wurde in Microsoft Excel 2016 berechnet.

2.4.4 Apoptose-Färbung

Zur Detektion der apoptotischen Zellen wurde die TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling*)-Färbung unter Verwendung des In Situ Cell Death Detection Kit; TMR red (Sigma-Aldrich, USA) nach Anleitung der Herstellerinstruktionen durchgeführt.

Die rehydrierten Gewebeschnitte wurden auf dem Objektträger mit einem hydrophoben Stift eingekreist um eine gezielte Auftragung von Lösungen im Verlauf zu ermöglichen.

Es erfolgte ein zweimaliges Waschen für 5 min in PBS. Auf die Gewebeschnitte wurde die Proteinase K-Arbeitslösung (10-20 µg/ml in 10 mM Tris/HCL, pH 7,4-8) aufgetragen und für 24 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte das zweimalige Abspülen der Gewebe mit PBS.

Anschließend erfolgte die unmittelbare Vorbereitung des TUNEL-Reaktionsgemisches vor der Verwendung durch Hinzufügen von 50 µl Enzymlösung zu 450 µl Label-Lösung. Die Lagerung des Reaktionsgemisches erfolgte während der Verwendung auf Eis.

Die Gewebeschnitte wurden vollständig mit dem TUNEL-Reaktionsgemisches bedeckt, mit Parafilm abgedeckt und für 60 min bei 37 °C abgedunkelt inkubiert.

Neben den zu untersuchenden Gewebeschnitten erfolgte gleichzeitig die Durchführung einer Positiv- sowie Negativkontrolle. Für die Positivkontrolle wurde das Reaktionsgemisch DNase I recombinant (DNase in 50 mM Tris-HCL, pH 7,5, 1 mg/ml BSA) auf 3 Zellschnitte verschiedener Tierproben aufgetragen und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNase führt zu DNA-Strang-Brüchen und somit fortführend zu einer positiven TUNEL-Reaktion. Nach Abspülen mit PBS erfolgte entsprechend der zu untersuchenden Zellschnitte das Auftragen des TUNEL-Reaktionsgemisches und eine Inkubation bei 37 °C für 60 min. Die Negativkontrolle erfolgte durch ein direktes Auftragen der Label-Lösung - ohne Hinzufügen der Enzymlösung (ohne TUNEL-Reaktionsgemisch) - auf die Zellschnitte gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C für 60 min.

Alle Schnitte wurden dreimalig mit PBS gewaschen und dann mit ProLong® Gold antifade mit DAPI (Thermo Fisher Scientific Inc.) sowie mit einem Deckglas eingedeckt. Das Aushärten erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Zur Detektion der TUNEL-positiven Zellkerne erfolgte eine Fluoreszenz-Mikroskopie mit dem Leica DM6000 B Mikroskop mit CTR6000-Steuerung sowie Leica DFC350 FX-Kamera. Die Anregungs-Wellenlänge lag im Bereich 520-580 nm (Maximum bei 540 nm, grün) und die Detektion in einem Wellenlänge-Bereich von 570-620 nm (Maximum bei 580 nm, rot). TUNEL-positive Zellen wurden an fünf bis acht zufällig gewählten Feldern (20x) pro linkem Ventrikel verblindet ausgezählt.

2.4.5 Immunhistofärbung ANP

Die Immunhistofärbung mit ANP erfolgte an den entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitten, welche mit 0,1% Triton (0,1% Triton-X-100 + DPBS) in PBS unter Schütteln für 10 Minuten permeabilisiert wurden. Anschließend erfolgte eine Erhitzung der Gewebeschnitte in einem Dampfgerät (Braun) für 40 Minuten bei 89 °C mit einem *antigen retriever* (Citrat Puffer, Sigma-Aldrich, pH 6,0). Die Gewebeschnitte wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und daraufhin mit PBS gewaschen. Nach einem erneuten Abkühlen der Schnitte auf Eis für 30 Minuten erfolgte erneut dreimalig das Waschen mit PBS für je 5 Minuten. Mit dem hydrophoben Stift wurden die Gewebeproben eingekreist

und für eine Stunde mit 10% Serum in PBS/0,01% Tween bei Raumtemperatur inkubiert. Das Serum war bei der ANP-Färbung aufgrund des verwendeten Antikörpers ein Ziegen-Serum. Daraufhin wurden auf die Gewebeschnitte der ANP-Antikörper (Abcam, ab91250) in einer Verdünnung von 1:100 in 1% Serum in PBS / 0,01% Tween aufgetragen und über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Angeschlossen wurde eine Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur sowie dreimaliges Waschen mit PBS für 10 Minuten. Der sekundäre Antikörper (anti-Rabbit IgG) wurde in einer Verdünnung von 1:300 in 1% Serum in PBS / 0,01 Tween auf die Gewebeschnitte aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur lichtgeschützt in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 10 Minuten mit PBS erfolgte das bekannte Eindecken mit ProLong® Gold antifade mit DAPI (Thermo Fisher Scientific Inc.) und einem Deckglas.

Die Aufnahmen der ANP-Färbungen erfolgten mit dem Leica DM6000 B-Mikroskop mit CTR6000-Steuerung sowie Leica DFC350 FX-Kamera. Die Anregung erfolgte bei 488 nm. Es erfolgten rein qualitative Untersuchungen zur Abbildung der ANP-Verteilung ohne statistische quantifizierbare Auswertung.

2.5 Statistische Auswertung und Verschriftlichung

Die Zuordnung der Tiere zu den Interventionsgruppen erfolgte randomisiert. Messungen, Auszählungen sowie Auswertungen erfolgten verblindet. Die mathematischen Berechnungen erfolgten in Microsoft Excel® 2016/2021 (Microsoft Corporation, USA). Die statistische Analyse sowie graphische Darstellung erfolgte in GraphPad-Prism Version 7.03. (GraphPad Software, Inc., USA). Bei den verwendeten statistischen Tests handelte es sich, wenn nicht anders angegeben, um eine two-way-ANOVA Analyse gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur oder einen ungepaarten T-Test. Die Signifikanzniveaus sind unter den Abbildungen angegeben. Falls nicht anders angegeben, wurde ein P-Wert von $< 0,05$ als signifikant angenommen. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert (*mean*) mit Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM)

Die Literaturintegration und -recherche erfolgte mit Zotero 5.0.96.2 (Roy Rosenzweig Center for History and New Media der George Mason University). Die Verschriftlichung dieser Dissertation erfolgte mit Microsoft Word® 2021.

3 Ergebnisse

3.1 Kardiale Veränderung bei WT C57Bl/6-Mäusen nach zweiwöchiger Volumenbelastung

Zur Exploration der Auswirkungen der Volumenbelastung auf die morphologischen, zellulären und molekularen Vorgänge im Rahmen des kardialen Remodelings – mit besonderem Augenmerk auf den MAPK-Signalwegen – erfolgte im ersten Versuchsaufbau die Untersuchung von WT-Mäusen mit Volumenbelastung in Gegenüberstellung zu WT-Mäusen ohne Volumenbelastung.

Zur Erzeugung einer Volumenbelastung erfolgte die operative Anlage eines aorto-kavalen Shunts. In der Kontrollgruppe erfolgte ein analoges operatives Procedere ohne die Anlage des Shunts selbst (Sham-Prozedur, siehe 2.2.2). Es erfolgte die Verwendung von WT C57Bl/6N-Mäusen. Die Zuordnung zu der Sham- bzw. Shunt-Gruppe erfolgte randomisiert und alterskorreliert.

3.1.1 Echokardiographischer und morphometrischer Nachweis der exzentrischen Hypertrophie nach zweiwöchiger Volumenbelastung

Zur Beurteilung der morphologischen und funktionellen Veränderungen des Herzens als Anpassung an eine Volumenbelastung durch einen aorto-kavalen Shunt erfolgte bei der Shunt-Gruppe sowie der Sham-Kontroll-Gruppe 14 Tage postinterventionell eine echokardiographische Beurteilung (siehe 2.2.4). Daraufhin erfolgte *post mortem* die Organentnahme und eine morphometrische Untersuchung des Herzens (siehe 2.2.3).

Echokardiographisch zeigte sich in der Shunt-Gruppe ein signifikant erhöhter linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD) im Vergleich zur Sham-Gruppe (Abbildung 7A). Die Dicke des interventrikulären Septums unterschied sich nicht signifikant zwischen der Sham- und Shunt-Gruppe (Abbildung 7B). Es zeigte sich somit durch eine Shunt-induzierte Volumenbelastung eine Dilatation des linken Ventrikels ohne Zunahme der Wanddicke durch eine Shunt-induzierte Volumenbelastung.

Die *post mortem* bestimmte linksventrikuläre Masse (LV) normalisiert zur Tibiallänge (TL) (LV/TL) zeigte, wie in Abbildung 7C dargestellt, nach Volumenbelastung im Shunt-Modell eine signifikante Zunahme von 72,22%. Folglich zeigte sich in der Shunt-Gruppe nach zweiwöchiger Volumenbelastung eine kardiale Hypertrophie.

Die Zunahme der linksventrikulären Masse als Nachweis einer Hypertrophie, kombiniert mit einem erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser ohne Wanddickenzunahme, zeigte somit Veränderungen im Sinne einer exzentrischen linksventrikulären Hypertrophie (siehe 1.2.3).

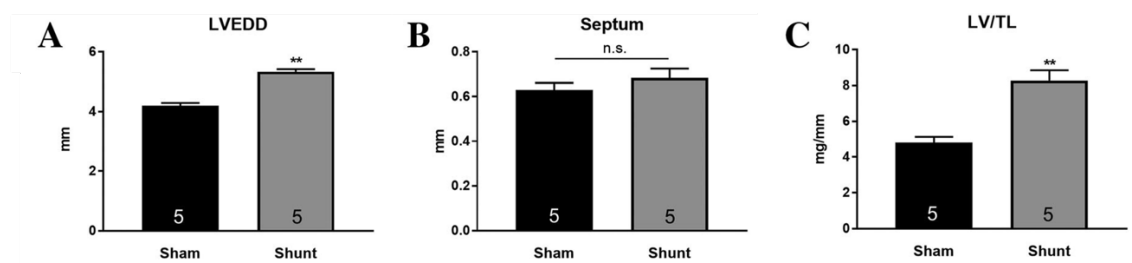


Abbildung 7: Beurteilung der exzentrischen Hypertrophie in WT C57Bl/6-Mäusen nach zwei Wochen Volumenbelastung. Kardiale echokardiographische sowie *post mortem* morphometrische Auswertung zwei Wochen postinterventionell bei Sham- sowie aorto-kavalen Shunt-WT C57Bl/6N-Mäusen. (A) Echokardiographisch bestimmter linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD). (B) Echokardiographisch bestimmte Septumdicke. (C) Verhältnis der linksventrikulären Masse (LV) zur Tibiallänge (TL) nach Entnahme der Organe (LV/TL). In den Balken dargestellte Zahlen stellen die Anzahl der Mäuse dar; Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, n.s. nicht signifikant unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *Student's t-test*. Abbildung modifiziert nach Jochmann et al. (2019), Verwendung erfolgt unter CC BY-NC 4.0.

3.1.2 Reduzierte Aktivierung von ERK1/2 durch volumenbelastungsinduzierte exzentrische Hypertrophie

Zur Evaluierung der möglichen Rolle von ERK1/2 als Bestandteil der Signalwege des kardialen Remodelings erfolgte im ersten Schritt die Untersuchung des Expressionsniveaus der MAP-Kinase sowie des Phosphorylierungsstatus dieser Kinase im Gewebe des linken Ventrikels. Hierzu erfolgte nach Proteinextraktion (siehe 2.3.1) mittels Western Blot (siehe 2.3.2, 2.3.3) die Quantifizierung ausgewählter Proteine (ERK1/2, GAPDH) sowie phosphorylierter Formen zur Beurteilung der Aktivierung (pERK1/2-TEY-Motiv; pERK1/2-Autophosphorylierungsstelle (Thr188)). Eine repräsentative Abbildung der Western Blots ist in Abbildung 8A dargestellt.

Das Expressionsniveau des Gesamt-ERK1/2-Protein (ERK1/2) im Verhältnis zu GAPDH als Ladungskontrolle zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Sham- und der Shunt-Gruppe (Abbildung 8B). Es zeigte sich somit keine Veränderung des Expressionsniveaus von ERK1/2 unter zweiwöchiger Volumenbelastung.

Das TEY-Motiv ist als ERK1/2-Phosphorylierungsstelle des MAPK-Kinase-Weges bekannt. Zusätzlich zur Phosphorylierung des TEY-Motivs konnte gezeigt werden, dass die

Autophosphorylierung von ERK1/2 an Thr188 ein relevanter Mechanismus des maladaptiven, kardialen Remodelings ist. Es erfolgte eine vergleichende Untersuchung beider Phosphorylierungsstellen der ERK1/2-Kinase zwischen der Sham- sowie Shunt-Gruppe, normalisiert zu ERK, um das Verhalten unter Volumenbelastung zu evaluieren.

Die exzentrische Hypertrophie nach zwei Wochen Volumenbelastung durch einen aorto-kavalen Shunt war assoziiert mit einer signifikanten Abnahme der ERK1/2-Phosphorylierung des TEY-Motivs um 28% ($P < 0,05$) (siehe Abbildung 8C). Diese Daten deuten auf eine reduzierte ERK1/2-Aktivierung im linken Ventrikel unter Volumenbelastung hin. Die Autophosphorylierungsstelle Thr188 zeigte im linksventrikulären Lysat ein unverändertes Phosphorylierungslevel in der Shunt-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe (siehe Abbildung 8D). Somit erschien die Autophosphorylierungs-Aktivität von ERK1/2 unbeeinflusst von der zweiwöchigen Volumenbelastung.

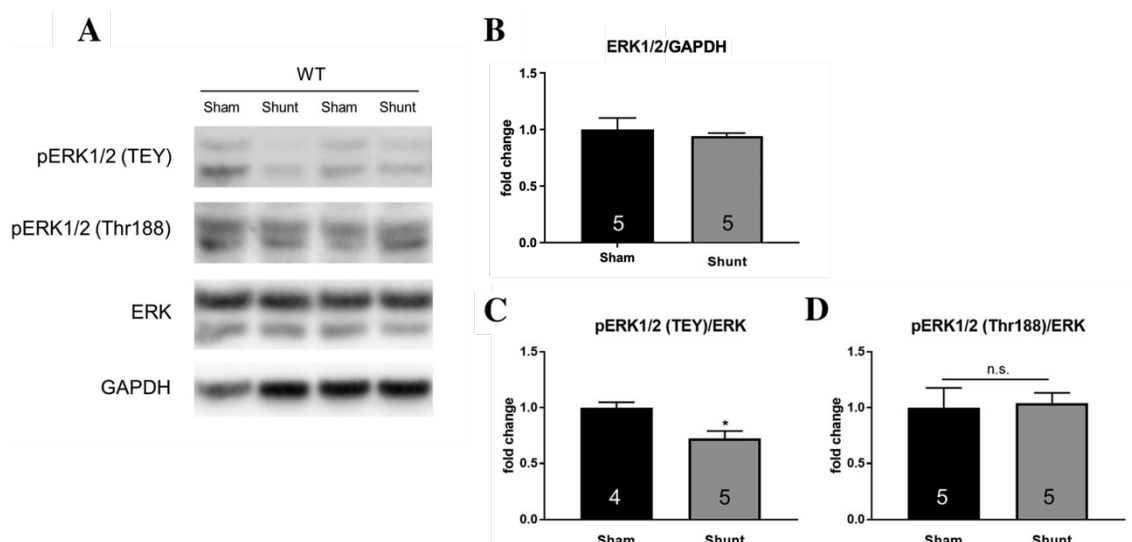


Abbildung 8: Expressionsniveau von ERK sowie Phosphorylierung des kardialen ERK1/2 am TEY-Motiv und der Autophosphorylierungsstelle Thr 188 nach zweiwöchiger Volumenbelastung. *Post mortem* Proteinanalyse des linksventrikulären Lysats zwei Wochen postinterventionell bei alterskorrelierten Sham- sowie aorto-kavalen Shunt-WT C57Bl/6N-Mäusen. (A) Repräsentative Western Immunoblot- Abbildung für die Antikörper gegen pERK1/2 (TEY), pERK1/2 (Thr188), gesamt ERK1/2 (ERK) und GAPDH als Ladekontrolle. Quantitative, densitometrische Auswertung des Gesamt-ERK1/2-Protein (ERK) normalisiert zu GAPDH (B) sowie des Phosphorylierungslevels des TEY Motivs (pERK1/2 (TEY)) (C) und der Autophosphorylierungsstelle Thr188 (D) normalisiert zum Gesamt-ERK1/2-Protein (ERK). Die Werte werden als *fold change* im Verhältnis zur Sham-Kontroll-Gruppe dargestellt. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. In den Balken dargestellt Zahlen stellen die Anzahl der Mäuse dar. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, n.s. nicht signifikant unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *Student's t-test*. Abbildung modifiziert nach Jochmann et al. (2019), Verwendung erfolgt unter CC BY-NC 4.0.

3.1.3 Keine Aktivitätsveränderung anderer MAP-Kinasen nach zweiwöchiger Volumenbelastung

Die MAP-Kinasen JNK und p38 nehmen bekanntermaßen in den Signalwegen des kardialen Remodelings ebenfalls eine wichtige Rolle ein. Um zu evaluieren, welche Bedeutung diese Kinasen in der Modulation des Remodelings unter Volumenbelastung im aorto-kavalen Shunt-Modell einnehmen, erfolgte die quantitative Messung des Phosphorylierungslevels (p-p38, pJNK) als Äquivalent für die biologische Aktivität. Die Proteinisolierung, die Western Blots sowie die quantitative Auswertung erfolgte wie bereits zuvor beschrieben (siehe 2.3.3). Repräsentative Abbildungen der Western Blots sind in Abbildung 9A dargestellt.

Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Phosphorylierungslevel von JNK sowie p38 in der Shunt-Gruppe verglichen zur Sham-Gruppe (Abbildung 9B und C). Eine zweiwöchige Volumenbelastung scheint somit keine Auswirkung auf die Aktivität der Proteinkinasen JNK und p38 zu haben.

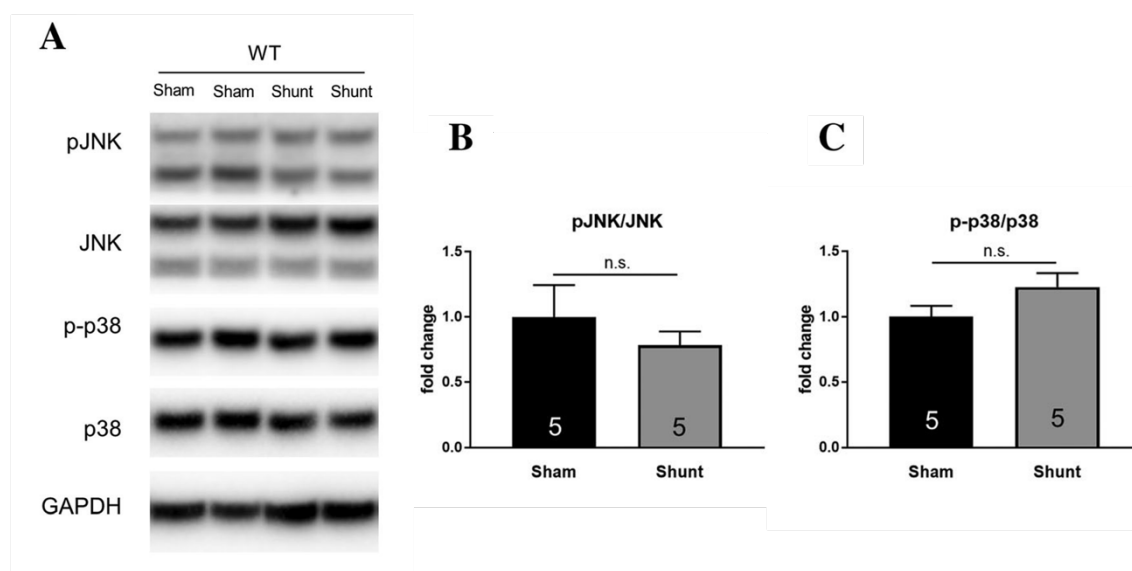


Abbildung 9: Phosphorylierung der kardialen MAPK p38 sowie JNK in WT C57Bl/6N-Mäusen nach zweiwöchiger Volumenbelastung. *Post mortem* Proteinanalyse des linksventrikulären Lysats zwei Wochen postinterventionell bei alterskorrelierten Sham- sowie aorto-kavalen Shunt-WT C57Bl/6N-Mäusen. (A) Repräsentative Western Immunoblot-Abbildung für die Antikörper gegen p38, p-p38, JNK, pJNK und GAPDH als Ladekontrolle. (B) Quantitative Auswertung des Phosphorylierungslevels von JNK (pJNK) normalisiert zum Gesamt-JNK-Protein (JNK) (C) sowie von p38 (p-p38) normalisiert zu Gesamt-p38-Protein (p38). Die Werte werden als *fold change* im Verhältnis zur Sham-Kontroll-Gruppe dargestellt. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. In den Balken dargestellt Zahlen stellen die Anzahl der Mäuse dar; Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, n.s. nicht signifikant unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *Student's t-test*. Abbildung modifiziert nach Jochmann et al. (2019), Verwendung erfolgt unter CC BY-NC 4.0.

3.2 Basalcharakterisierung von kardiomyozytenspezifischen ERK2 transgenen Mäusen

Da sich unter zweiwöchiger Volumenbelastung im Shunt-Modell eine Herunterregulation der ERK1/2 Aktivität zeigte, erfolgte eine weitere Evaluation der Bedeutung von ERK1/2 in einem kardiomyozytenspezifischen ERK2 Überexpressions-Modell. Hierzu erfolgte die Verwendung von männlichen ERK2-überexprimierenden Mäusen aus dem C57Bl/6J-Hintergrund (siehe 2.2.1), freundlicherweise von Frau Prof. Dr. K. Lorenz (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Aufgrund der bisher nicht näher analysierten Auswirkungen der ERK2-Überexpression im C57Bl/6J-Hintergrund erfolgte zunächst eine basale kardiale Charakterisierung der ERK2-transgenen (ERK2tg) Mäuse im Vergleich zu WT-Wurfgeschwistern ohne Einfluss einer Intervention. Die ERK2tg Mäuse zeigten sich, wie im FVB/N-Hintergrund bereits beschrieben, lebensfähig und entwickelten sich normal.

Zur Charakterisierung erfolgte die Analyse der Proteinexpression von ERK2 zur Bestätigung der erfolgreichen ERK2-Überexpression in den transgenen Mäusen.

Um bereits im Basalniveau einen Einfluss der kardialen ERK2-Überexpression auf das Herz und ein mögliches, damit einhergehendes Remodeling zu untersuchen, erfolgte eine transthorakale echokardiographische Untersuchung und die *post mortem* morphometrische Untersuchung des Herzens. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung bekannter kardialer Stressmarker des fetalen Genprogrammes.

3.2.1 Nachweis der ERK2-Überexpression auf Proteinebene

Die Untersuchung der Proteinexpression im linken Ventrikel erfolgte mittels Gelelektrophorese und Western Blot (siehe 2.3.3). Die Proteinexpression von ERK2 normalisiert zu GAPDH im linken Ventrikel von ERK2tg Mäusen zeigte sich im Vergleich zu WT-Wurfgeschwistern um das 10,5-fache signifikant erhöht (Abbildung 10A und B). Das ERK1-Expressionniveau zeigte sich unverändert. Die Überexpression von ERK2 war nicht mit einer veränderten Aktivität von ERK1/2 verbunden. So zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung des ERK1/2-TEY-Motivs und der Autophosphorylierungsstelle Thr188 zwischen WT- und ERK2tg Mäusen normalisiert zu GAPDH (Abbildung 10C und D).

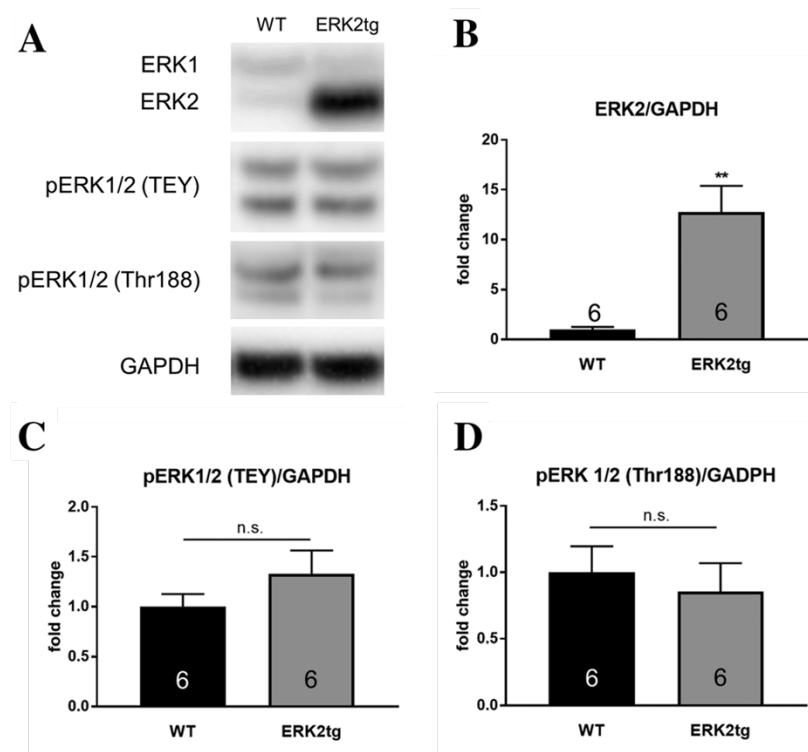


Abbildung 10: Nachweis der ERK2-Überexpression und Untersuchung der Phosphorylierung auf Proteinebene. Untersuchung der kardialen ERK2-Überexpression auf Proteinebene sowie der Phosphorylierung des kardialen ERK1/2 am TEY-Motiv sowie an der Autophosphorylierungs-Stelle Thr188. Die Organentnahme und folgende proteinbiochemische Untersuchung des linken Ventrikels erfolgte bei alterskorrelierten, männlichen ERK2tg Mäusen und entsprechenden WT-Wurfgeschwistern ohne Shunt-Operation aus dem C57Bl/6J-Hintergrund. (A) Repräsentative Western Immunoblot-Abbildung für die Antikörper gegen pERK1/2 (TEY), pERK1/2 (Thr188), gesamt ERK1/2 und GAPDH als Ladekontrolle von linksventrikulären Lysaten. (B) Quantitative Auswertung der ERK2-Expression normalisiert zu GAPDH. (C) Quantitative Auswertung des Phosphorylierungslevels des TEY-Motivs (pERK1/2 (TEY)) normalisiert zu GAPDH. (D) Quantitative Auswertung des Phosphorylierungslevels der Autophosphorylierungsstelle Thr188 normalisiert zu GAPDH. Die Werte werden als *fold change* im Verhältnis zur WT-Kontroll-Gruppe dargestellt. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. In den Balken dargestellte Zahlen stellen die Anzahl der Mäuse dar; Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, n.s. nicht signifikant unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *Student's t-test*. Abbildung modifiziert nach Jochmann et al. (2019), Verwendung erfolgt unter CC BY-NC 4.0.

3.2.2 ERK2-Überexpression hat keinen Einfluss auf die echokardiographisch erhobene linksventrikuläre Funktion und Geometrie

Zur Untersuchung der basalen Herzgeometrie und -funktion unter dem Einfluss der ERK2-Überexpression erfolgte eine echokardiographische Untersuchung (siehe 2.2.4) von ERK2tg Mäusen und WT-Wurfgeschwistern ohne Intervention.

Zur Beurteilung der linksventrikulären Geometrie wurden der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) und die Septumdicke herangezogen. Die Beurteilung des LVEDD und der Septumdicke in Kombination mit der kardialen Masse diente der Unterscheidung zwischen normaler Herzgeometrie oder einer möglichen

Hypertrophie. Die Beurteilung der systolischen Funktion erfolgte über die echokardiographisch gemessene EF. Exemplarische M-Mode-Aufnahmen der ERK2tg Mäuse sowie der WT-Wurfgeschwister sind in Abbildung 11A dargestellt.

In der kardialen Echokardiographie konnte kein signifikanter Unterschied in der linksventrikulären Geometrie, gemessen über den LVEDD und die Septumdicke, zwischen ERK2tg Mäusen und WT-Wurfgeschwistern erhoben werden (Abbildung 11 B-C). Auch die systolische Funktion zeigte sich zwischen ERK2tg Mäusen (EF 54,66% \pm 1,28%) und WT-Wurfgeschwistern (EF 50,71% \pm 1,74%) vergleichbar ohne signifikanten Unterschied (Abbildung 11D). Echokardiographisch zeigte sich somit kein Unterschied der linksventrikulären Geometrie oder Funktion zwischen ERK2tg sowie WT-Mäusen.

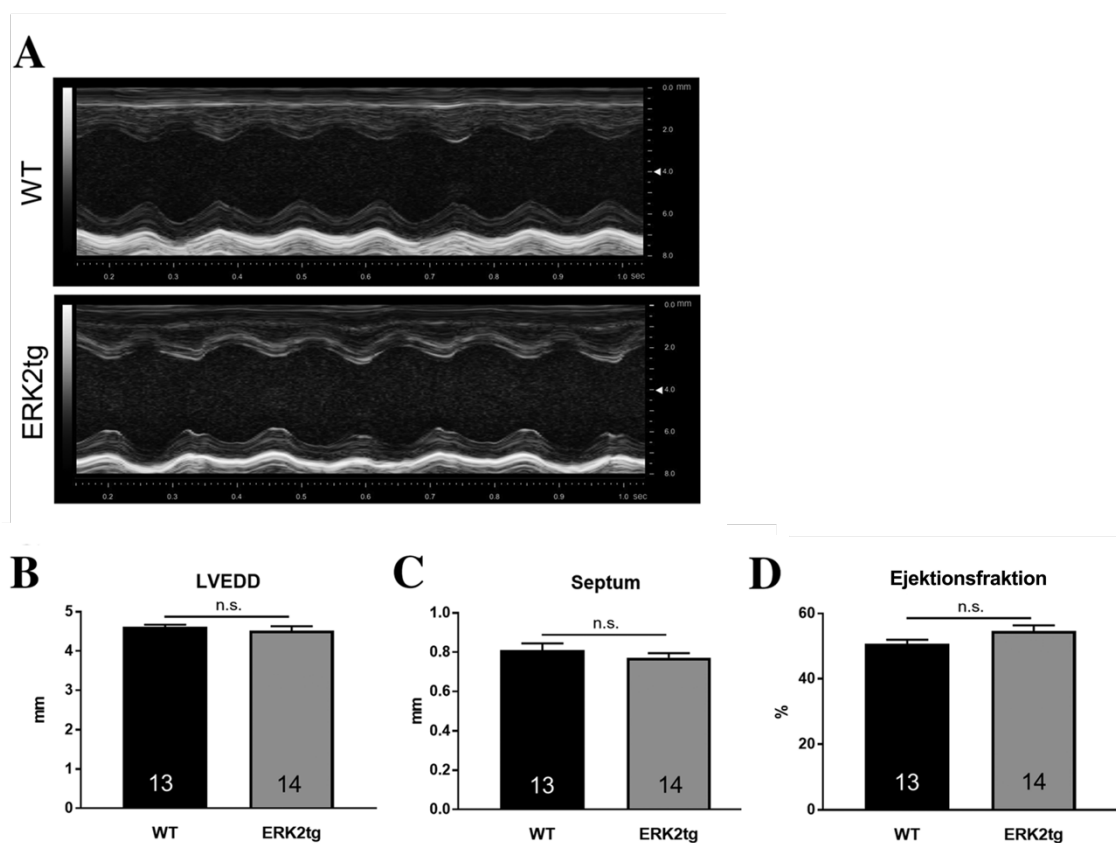


Abbildung 11: Echokardiographische kardiale Basalcharakterisierung der ERK2tg Mäuse. Kardiale echokardiographische Untersuchung der ERK2tg Mäuse im Vergleich zu WT-Wurfgeschwistern ohne Einfluss einer Intervention. (A) Repräsentative echokardiographische Abbildungen im M-Mode. (B) Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD). (C) Septumdicke (Septum). (D) Ejektionsfraktion (EF). In den Balken dargestellt Zahlen stellen die Anzahl der Mäuse dar; Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, n.s. nicht signifikant unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *Student's t-test*. Abbildung modifiziert nach Jochmann et al. (2019), Verwendung erfolgt unter CC BY-NC 4.0.

3.2.3 ERK2-Überexpression hat keinen Einfluss auf die linksventrikuläre Masse

Die *post mortem* erhobene und zur Tibiallänge normalisierte linksventrikuläre Masse (LV/TL) verblieb ebenfalls ohne signifikanten Unterschied zwischen den WT- sowie ERK2tg Mäusen (Abbildung 12). Es zeigte sich keine linksventrikuläre Hypertrophie. Somit zeigte sich keine Auswirkung der kardialen ERK2-Überexpression auf die basale kardiale Morphologie.

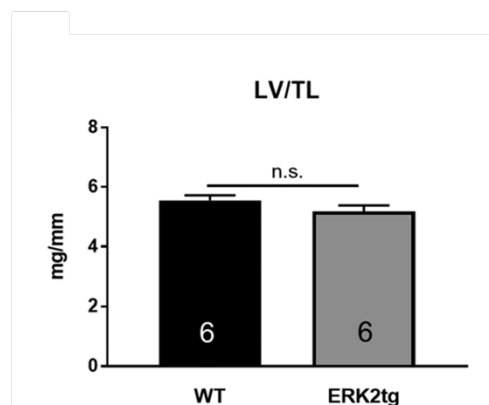


Abbildung 12: Morphometrische linksventrikuläre Basalcharakterisierung der ERK2tg Mäuse. Kardiale morphometrische Untersuchung *post mortem* der ERK2tg Mäuse im Vergleich zu WT-Wurfgeschwistern ohne Einfluss einer Intervention. Dargestellt ist das Verhältnis der linksventrikulären Masse zur Tibiallänge nach Entnahme der Organe (LV/TL). In den Balken dargestellt Zahlen stellen die Anzahl der Mäuse dar (n = 6); Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * P < 0,05; ** P < 0,01, n.s. nicht signifikant unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *Student's t-test*. Abbildung modifiziert nach Jochmann et al. (2019), Verwendung erfolgt unter CC BY-NC 4.0.

3.2.4 ERK2-Überexpression ist mit einer Erhöhung von ANP auf Gen- und Proteinniveau verbunden

Um einen möglichen Einfluss der ERK2-Überexpression auf das kardiale Remodeling, ohne sichtbare Zeichen des morphometrischen und funktionellen Umbaus (3.2.2, 3.2.3), noch näher zu untersuchen, erfolgte eine Analyse der sogenannten kardialen Stressmarker des fetalen Genprogrammes auf Genexpressionslevel. Diese Untersuchung zielte auf mögliche molekulare Veränderungen, welche sich nicht auf der morphologischen Ebene manifestierten, ab.

Hierzu erfolgte eine quantitative Messung der Genexpression von ANP (Nppa), BNP (Nppb), α -skeletalektin (Acta1) und SERCA-2 α (Atp2a2) in linksventrikulären Lysaten der ERK2tg Mäusen verglichen mit WT-Wurfgeschwistern. Dies erfolgte über die quantitative Analyse der Genexpression auf Ebene der mRNA durch Erzeugung einer komplementären DNA und Messung mittels qPCR (siehe 2.3.4, 2.3.5, 2.3.6). Hier zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression von natriuretischem Peptid Typ A (Nppa, ANP) auf mRNA-Ebene bei ERK2tg Mäusen im Vergleich zu WT-Wurfgeschwistern (Abbildung 13A). SERCA-2 α

(Atp2a2) zeigte sich bei ERK2tg Mäusen erniedrigt. Die Expression von BNP (Nppb) und α -skeletal aktin (Acta1) zeigte keine signifikante Differenz.

Eine ergänzende Untersuchung auf Proteinebene ergab ebenfalls ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau von ANP bei ERK2tg Mäusen verglichen mit WT-Wurfgeschwistern (Abbildung 13B). Die SERCA-2 α zeigte sich auf Proteinniveau nicht signifikant verändert zwischen ERK2tg und WT-Mäusen.

Insgesamt konnte eine deutlich erhöhte Expression von ANP auf mRNA- sowie Protein-Niveau in Verbindung mit einer ERK2-Überexpression im Herzen gezeigt werden. Diese Regulation schien relativ spezifisch für ANP zu sein, da die Genexpression anderer Stressmarker, beispielsweise des natriuretischen Peptids Typ B und des α -Skelett-Aktins unverändert war (Abbildung 13A) sowie SERCA-2 α zwar eine signifikante Reduktion in der kardialen mRNA, jedoch keine signifikante Veränderung auf Proteinebene (Abbildung 13B) zeigte.

Eine exemplarische, nicht quantifizierte Darstellung der erhöhten ANP-Expression mittels immunhistologischer Färbung ist in Abbildung 14 dargestellt.

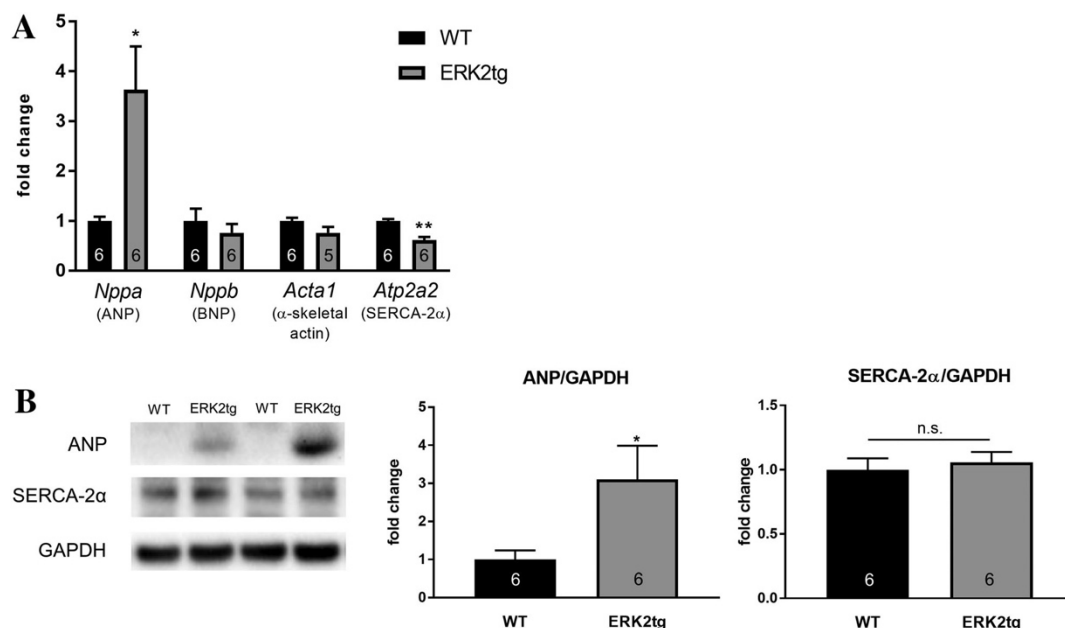


Abbildung 13: Basale Expression der kardialen Stressmarker in ERK2tg Mäusen. Untersuchung der basalen kardialen Stressmarker auf Ebene der Genexpression sowie der Proteinexpression in linksventrikulären (LV) Lysaten bei alterskorrelieren ERK2tg sowie WT-Mäusen ohne Intervention. (A) Quantitative Auswertung der Genexpression von ANP (*Nppa*), BNP (*Nppb*), α -skeletal aktin (*Acta1*) und SERCA-2 α (*Atp2a2*) in LV-Lysaten der ERK2tg Mäusen verglichen mit WT-Wurfgeschwistern. Verwendung einer quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR), normalisiert gegen GAPDH. (B) Repräsentative Western Immunoblot-Abbildung für die Antikörper gegen ANP, SERCA-2 α und GAPDH als Ladekontrolle. (C) Quantitative Auswertung der Proteinexpression von ANP und SERCA-2 α normalisiert gegen GAPDH. Die Werte werden als *fold change* im Verhältnis zur Sham-Kontroll-Gruppe dargestellt. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. In den Balken dargestellt Zahlen stellen die Anzahl der Mäuse dar. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, n.s. nicht signifikant unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *Student's t-test*. Die Verwendung der Abbildung erfolgt unter CC BY-NC 4.0 aus Jochmann et al. (2019).

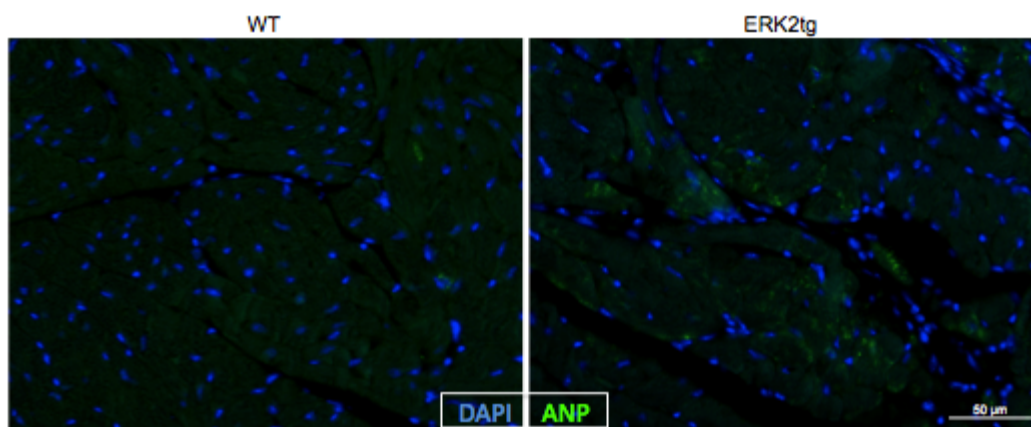


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung gegen ANP. Exemplarische Abbildung der Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörper gegen ANP (grün) sowie DAPI-Zellkernfärbung (blau).

3.3 Einfluss der kardiomyozytenspezifischen ERK2-Überexpression auf das kardiale Remodeling nach Volumenbelastung

Zur Erhebung der Auswirkungen einer kardialen ERK2-Überexpression auf das Remodeling bei Volumenbelastung erfolgte eine aorto-kavale Shunt-Operation bei ERK2tg Mäusen des C57Bl/6J-Hintergrunds im Vergleich zur ERK2tg Sham-Kontrolle. Simultan erfolgte eine vergleichende aorto-kavale Shunt-Operation bei WT-Wurfgeschwistern des C57Bl/6J-Hintergrunds mit Sham-Kontrollgruppe.

3.3.1 ERK2-Überexpression hat keinen Einfluss auf das Remodeling der linksventrikulären Geometrie und Funktion nach Volumenbelastung

Die Untersuchung der kardialen Funktion sowie der Geometrie unter Volumenbelastung erfolgte durch eine echokardiographische Untersuchung zwei Wochen nach der Intervention sowie durch eine *post mortem* morphometrische Untersuchung. Die Untersuchungen erfolgten vergleichend zwischen den vier Untersuchungsgruppen – WT-Sham, WT-Shunt, ERK2tg-Sham und ERK2tg-Shunt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt. Echokardiographische repräsentative M-Mode-Bilder sind in Abbildung 15A abgebildet.

In der echokardiographischen Auswertung zeigte sich eine vergleichbare Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVEDD) bei den ERK2tg- sowie WT-Mäusen nach Volumenbelastung durch einen aorto-kavalen Shunt (Abbildung 15B). Die Wanddicke des Septums zeigte sich im Vergleich zu den Sham-Kontrollen bei ERK2tg- sowie WT-Mäusen unter Volumenbelastung nicht signifikant verändert (Abbildung 15C). Das Verhältnis von linksventrikulärer Masse zur Tibiallänge (LV/TL) zeigte sich signifikant erhöht im Vergleich mit der jeweiligen Sham-Gruppe bei beiden Genotypen nach Shunt (WT: + 38%, $P < 0,01$ vs WT-Sham; ERK2tg: + 31%, $P < 0,05$ vs ERK2tg-Sham). Insgesamt zeigten somit beide Genotypen, ERK2tg sowie WT-Mäuse, nach Volumenbelastung eine exzentrische Hypertrophie, welche jedoch weitgehend vergleichbar war. Bei ERK2tg Mäusen zeigte sich eine statistisch nicht signifikante Tendenz zu einer geringeren Hypertrophie bei kleinerem LV/TL-Verhältnis (Tabelle 13, Abbildung 15).

Die kardiale systolische Funktion, abgebildet durch die EF, sowie die kardiale diastolische Funktion, abgebildet durch die umgekehrte longitudinale *strain rate* (*reverse longitudinal strain rate*, rLSR) (2.2.4.2), zeigten sich ebenso wie die Herzfrequenz nach Volumenbelastung in allen Gruppen erhalten und untereinander auf vergleichbarem Niveau (Tabelle 13, Abbildung 15E und F).

Insgesamt zeigte sich somit eine vergleichbare linksventrikuläre Funktion bei ERK2tg-Mäusen und WT-Wurfgeschwistern zwei Wochen nach aorto-kavalem Shunt mit Volumenbelastung des Herzens.

Tabelle 13: Echokardiografische und morphometrische Messungen bei ERK2tg Mäusen und WT-Wurfgeschwistern zwei Wochen nach der aorto-kavalen Shunt- bzw. Sham-Intervention.

	WT		ERK2tg	
	Sham	Shunt	Sham	Shunt
Anzahl der Mäuse	6	7	6	8
Echokardiographie				
Herzfrequenz (1/min)	444 ± 23	500 ± 23	452 ± 15	479 ± 13
LVEDD (mm)	4.63 ± 0.07	5.15 ± 0.08 ^{b**}	4.51 ± 0.10	5.35 ± 0.07 ^{b**}
LVEDS (mm)	3.37 ± 0.12	3.66 ± 0.13	3.17 ± 0.13	3.66 ± 0.09 ^{a*}
EF (%)	52.3 ± 3.5	56.4 ± 2.1	55.0 ± 3.0	57.8 ± 1.5
FS (%)	26.1 ± 1.6	29.8 ± 1.4	28.6 ± 2.0	30.8 ± 1.0
SV (µl)	50.1 ± 1.6	71.7 ± 1.5 ^{b**}	50.6 ± 2.6	79.5 ± 2.3 ^{b**}
Septum (mm)	0.88 ± 0.03	0.92 ± 0.07	0.80 ± 0.03	0.83 ± 0.04
PW (mm)	0.83 ± 0.04	0.86 ± 0.07	0.72 ± 0.02	0.73 ± 0.02
rLSR (1/s)	4.92 ± 0.48	5.97 ± 0.96	4.22 ± 0.41	5.43 ± 0.33
Morphometrie				
KG (g)	30.5 ± 0.8	31.5 ± 0.6	32.0 ± 0.8	30.5 ± 0.8
HW/TL (mg/mm)	7.41 ± 0.16	10.80 ± 0.93 ^{b**}	6.87 ± 0.28	9.47 ± 0.32 ^{a*}
LV/TL (mg/mm)	5.55 ± 0.17	7.67 ± 0.58 ^{b**}	5.18 ± 0.20	6.78 ± 0.24 ^{a*}
RV/TL (mg/mm)	1.42 ± 0.04	1.79 ± 0.15	1.21 ± 0.09	2.0 ± 0.11 ^{b*}

Körpergewicht (KG); Ejektionsfraktion (EF); Verkürzungsfraktion (*fractional shortening*; FS); Verhältnis aus Herzgewicht zur Tibiallänge (*heart weight to tibia length ratio*; HW/TL); linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD); linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser (LVEDS); Verhältnis aus linksventrikulärem Gewicht und Tibiallänge (LV/TL); Hinterwanddicke während der Diastole (*posterior wall thickness during diastole*; PW); umgekehrte longitudinale *strain rate* (reverse longitudinal strain rate, rLSR); Verhältnis aus rechtsventrikulärem Gewicht und Tibiallänge (RV/TL); Septumdicke während der Diastole (Septum; septal thickness during diastole); Schlagvolumen (SV). Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. a*P < 0.05, a**P < 0.01, n.s. nicht signifikant zwischen Shunt-Gruppe und korrespondier Sham-Gruppe unter Verwendung des two-way ANOVA test mit Bonferroni post-test. b* P < 0.05, ** P < 0.01 zwischen Shunt-Gruppe und korrespondier Sham-Gruppe unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *Student's t-test*. Tabelle modifiziert nach Jochmann et al. (2019), Verwendung erfolgt unter CC BY-NC 4.0.

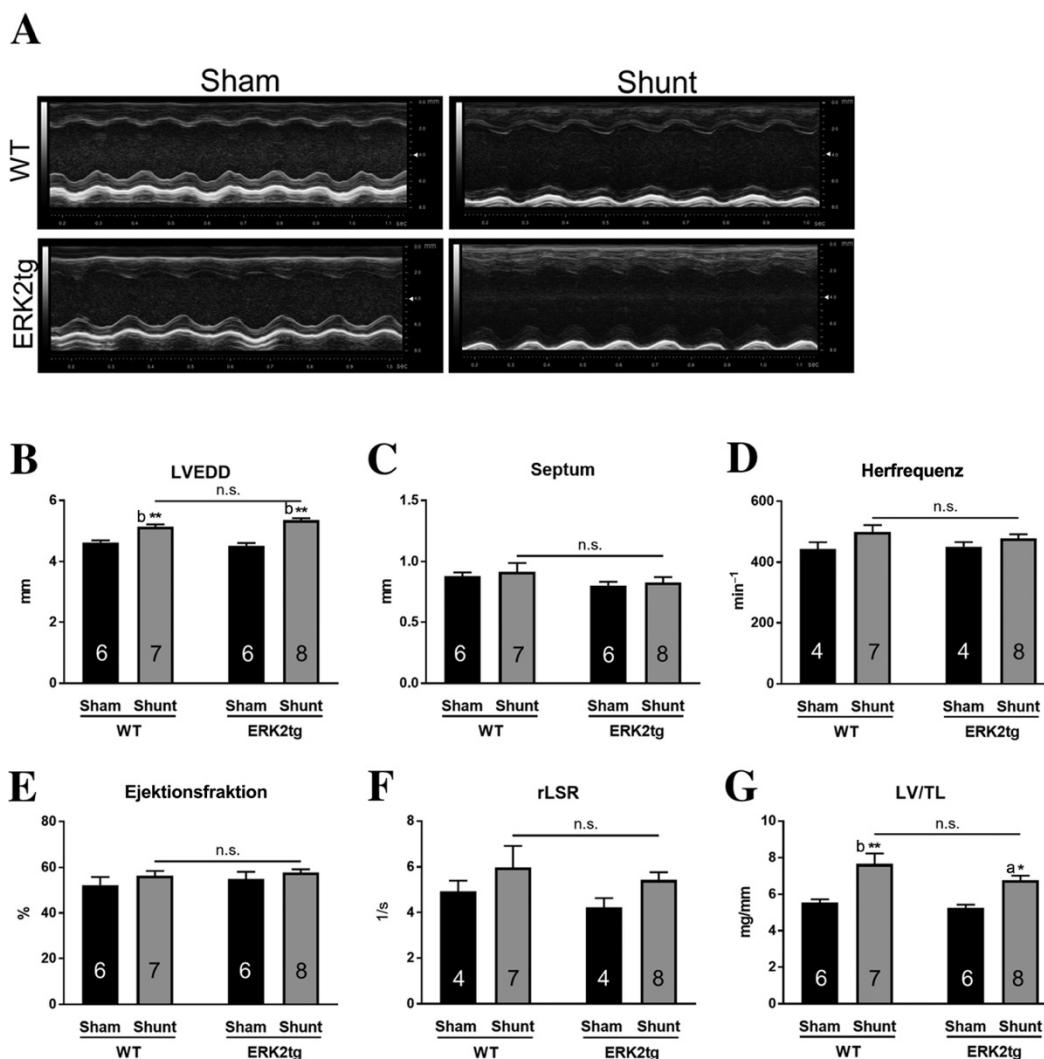


Abbildung 15: Echokardiographische und morphometrische kardiale Analyse zwei Wochen nach Volumenbelastung bei ERK2tg sowie WT-Mäusen. Kardiale echokardiographische Untersuchung der ERK2tg Mäuse sowie WT-Wurfgeschwistern des C57Bl/6J-Hintergrund zwei Wochen nach aorto-kavaler Shunt- bzw. Sham-Operation. (A) Repräsentative echokardiographische Abbildungen im M-Mode. (B) Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD). (C) Septumdicke. (D) Herzfrequenz. (E) Ejektionsfraktion (EF). (F) Diastolische Funktion (*reverse longitudinal strain rate* (rLSR)). (G) *Post mortem* morphometrische Untersuchung des Verhältnis der linksventrikulären Masse zur Tibialänge (LV/TL). In den Balken dargestellt Zahlen stellen die Anzahl der Mäuse dar; Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. a*P < 0.05, a**P < 0.01, n.s. nicht signifikant zwischen Shunt-Gruppe und korrespondier Sham-Gruppe unter Verwendung des two-way ANOVA test mit Bonferroni post-test. b* P < 0.05, ** P < 0.01 zwischen Shunt-Gruppe und korrespondier Sham-Gruppe unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *Student's t-test*. Abbildung modifiziert nach Jochmann et al. (2019), Verwendung erfolgt unter CC BY-NC 4.0.

3.3.2 ERK2-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Fibrose, die Kardiomyozytengröße sowie die Apoptose

Zur weiteren Charakterisierung des Remodelings unter Volumenbelastung erfolgte eine histologische Aufarbeitung der in 4% PFA fixierten und paraffinierten linksventrikulären Mittelstücke wie in Kapitel 2.4 erläutert. Die Analysen erfolgten sowohl in der Sham als auch der aorto-kavalen Shunt-Gruppe der ERK2tg sowie WT-Mäusen zwei Wochen nach Intervention.

Es erfolgte eine Untersuchung der Querschnittsfläche (*cross sectional area*, CSA), der interstitiellen Fibrose, sowie der Apoptose. Eine exemplarische Abbildung der histologischen Darstellungen findet sich in der Abbildung 16A.

Messungen der Querschnittsfläche (CSA) zeigten einen geringen Anstieg der Kardiomyozytengröße durch Volumenbelastung bei ERK2tg sowie WT-Mäusen, welcher jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 16B). Die Tendenz zur nicht signifikanten Kardiomyozytenhypertrophie war jedoch zwischen WT- und ERK2tg-Mäusen vergleichbar (Abbildung 16B).

Die Analyse der interstitiellen linksventrikulären Fibrose mittels Picro-Siriusrot-Färbung zeigte keine Unterschiede zwischen allen vier Versuchsgruppen, weder folgend nach einer Volumenbelastung noch zwischen den verschiedenen Genotypen (Abbildung 16C).

Die Quantifizierung der Apoptose erfolgte mittels TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling) Färbung (siehe 2.4.4). TUNEL-positive Zellen waren nach Volumenbelastung sowohl bei ERK2tg als auch bei WT-Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 16). Dies zeigte eine erhöhte Apoptoserate nach zweiwöchiger Volumenbelastung. Die Apoptose zeigte sich jedoch vergleichbar zwischen den ERK2tg- sowie WT-Mäusen, sodass kein Unterschied durch die ERK2 Überexpression aufgezeigt werden konnte.

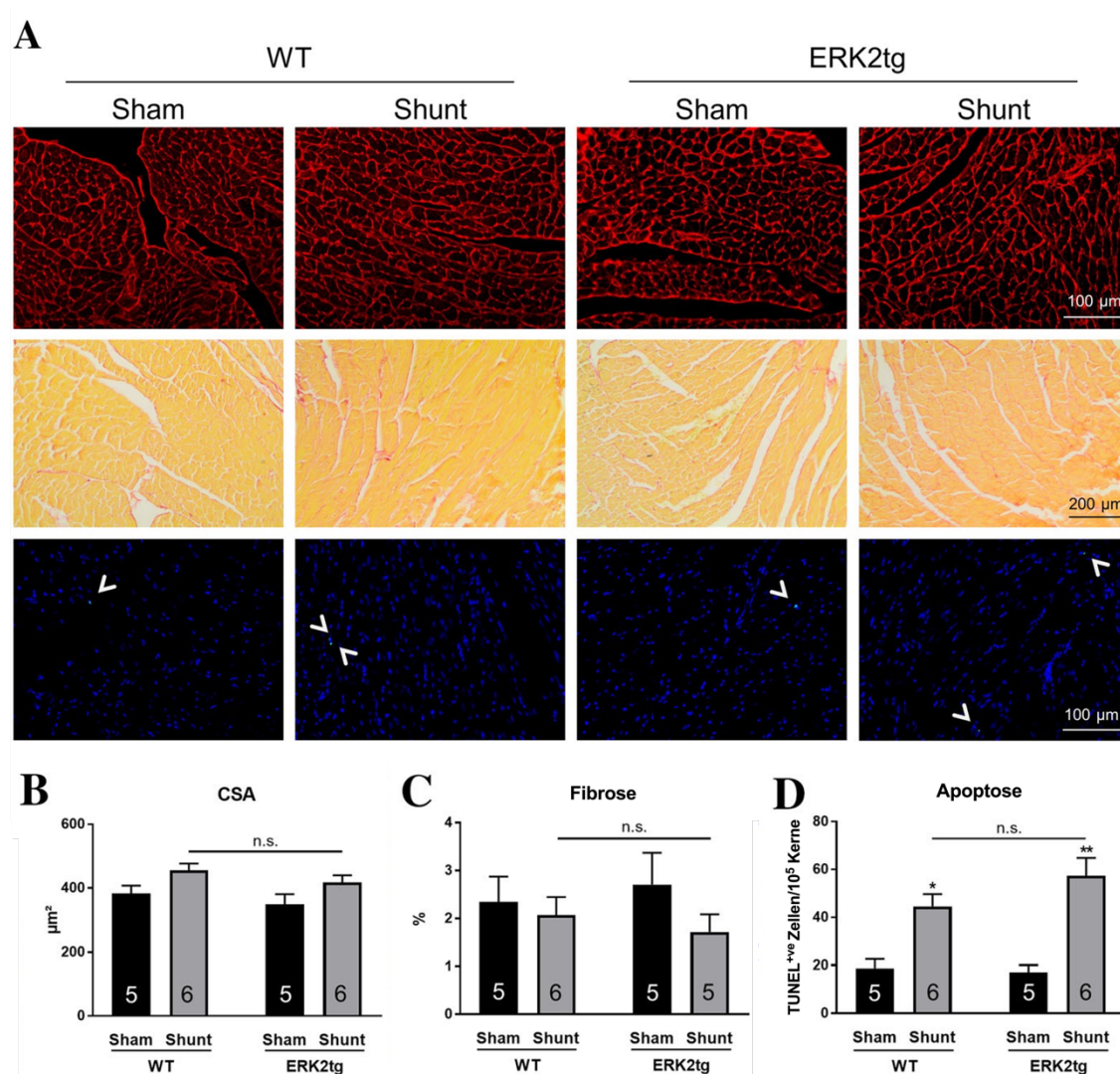


Abbildung 16: Histologische Analyse der Kardiomyozytenhypertrophie, Fibrose und Apoptose im linken Ventrikel zwei Wochen nach Volumenbelastung bei ERK2tg sowie WT-Mäusen. Histologische Untersuchung transversaler linksventrikulärer Gewebeschnitte der ERK2tg-Mäuse sowie WT-Wurfgeschwistern zwei Wochen nach aorto-kavaler Shunt- bzw. Sham-Intervention. Erhebung der Querschnittsfläche (*cross sectional area*; CSA) erfolgte durch Färbung mittels *wheat germ agglutinin* (Weizenkeimagglutinin; WGA). Die Fibrosedarstellung erfolgte durch Picro-Siriusrot-Färbung. Die Apoptosefärbung erfolgte mit TUNEL-Assay. (A) Repräsentative histologische Bilder der WGA-Färbung (erste Zeile), der Fibrose (zweite Zeile) sowie der Apoptose (dritte Zeile; weiße Pfeile kennzeichnen TUNEL-positive Zellen). (B) Quantitative Darstellung der CSA (pro Kardiomyozyt in μm^2). (C) Fibrose in Prozent der Fläche. (D) Apoptose durch Angabe der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen pro mit DAPI-Färbung identifizierten 105 Kernen. In den Balken dargestellt Zahlen stellen die Anzahl der Mäuse dar; Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, n.s. nicht signifikant zur korrespondieren Sham-Gruppe sowie zwischen den Genotypen unter Verwendung des two-way ANOVA test mit Bonferroni post-test. Abbildung modifiziert nach Jochmann et al. (2019), Verwendung erfolgt unter CC BY-NC 4.0.

3.3.3 Reaktivierung des fetalen Genprogramms unter Volumenbelastung

Zur Evaluierung kardialer Stressmarker des fetalen Genprogramms erfolgte die quantitative Analyse der Genexpression auf Ebene der mRNA wie bereits zuvor beschrieben. Die Analyse erfolgte für ANP, BNP, α -Skeletat-Aktin und SERCA-2 α nach zweiwöchiger Volumenbelastung durch einen aorto-kavalen Shunt bei ERK2tg-Mäusen und WT-Wurfgeschwistern sowie im jeweiligen Genotyp in den Sham-Gruppen aus dem linksventrikulären Lysat.

Unter Volumenbelastung kam es bei den ERK2tg sowie WT-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme der BNP-Expression. ANP und α -Skeletal-Aktin zeigten sich in ERK2tg Mäusen ebenfalls signifikant hochreguliert, während in der WT-Gruppe eine Tendenz zur gesteigerten Expression vorlag, ein Signifikanzniveau jedoch nicht erreicht wurde. SERCA-2 α zeigte sich in der WT-Gruppe nach Volumenbelastung signifikant reduziert, während sich in der ERK2tg Gruppe nach Shunt ebenfalls eine nicht signifikante Tendenz zeigte. Insgesamt konnten unter Volumenbelastung ähnliche Tendenzen der Genexpression kardialer Stressmarker bei WT- und ERK2tg Mäusen gezeigt werden. Obwohl die Veränderungen nicht durchgehend signifikant waren, zeigte sich eine Tendenz zur Erhöhung von ANP, BNP und α -Skeletal-Aktin und eine Erniedrigung der SERCA-2 α Expressionsniveau. Eine Darstellung der Expressionsniveaus findet sich in Tabelle 14.

Tabelle 14: Genexpression der kardialen Stressmarker bei ERK2tg und WT-Mäusen nach zweiwöchiger Volumenbelastung bei aorto-kavalem Shunt.

	WT	ERK2tg
ANP	2.46 \pm 0.80	2.00 \pm 0.27*
BNP	1.99 \pm 0.32*	2.17 \pm 0.27**
α -Skeletal aktin	3.48 \pm 1.17	1.94 \pm 0.30*
SERCA-2 α	0.61 \pm 0.04**	0.83 \pm 0.08

Untersuchung der kardialen Stressmarker auf Ebene der Genexpression in linksventrikulären Lysaten nach zweiwöchiger Volumenbelastung. Quantitative Auswertung der Genexpression von ANP (Nppa), BNP (Nppb), α -skeletal aktin (Acta1) und SERCA-2 α (Atp2a2) in LV Lysaten von ERK2tg Mäusen und WT-Wurfgeschwistern zwei Wochen nach aorto-kavalem Shunt sowie der Sham-Gruppen der jeweiligen Genotypen. Verwendung einer quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR). Die Werte wurden normalisiert gegen GAPDH. Die Werte werden als *fold change* im Verhältnis zur jeweiligen zum Genotyp zugehörigen Sham-Kontroll-Gruppe dargestellt. Anzahl der Mäuse n=5-8/Gruppe; Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Die dargestellten P-Werte beziehen sich auf das Verhältnis zwischen Shunt-Gruppe und der jeweiligen, dem Genotypen zugehörigen Sham-Kontroll-Gruppe unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *Student's t-test*. * P < 0,05; ** P < 0,01, n.s. nicht signifikant. Tabelle modifiziert nach Jochmann et al. (2019), Verwendung erfolgt unter CC BY-NC 4.0.

3.3.4 ERK1/2 zeigt auch bei ERK2-Überexpression reduzierte Phosphorylierungslevel unter Volumenbelastung

Bei der Erhebung der MAPK-Kinasen-Phosphorylierungslevel durch Western Blots zeigte sich auch bei ERK2tg-Mäusen, analog zu den vorigen Untersuchungen in WT-Mäusen (siehe Abbildung 8), eine signifikant reduzierte Phosphorylierung im TEY-Motiv nach Volumenbelastung als Hinweis auf eine reduzierte Aktivität (Abbildung 17). Ein repräsentativer Western Blot ist in Abbildung 17A dargestellt.

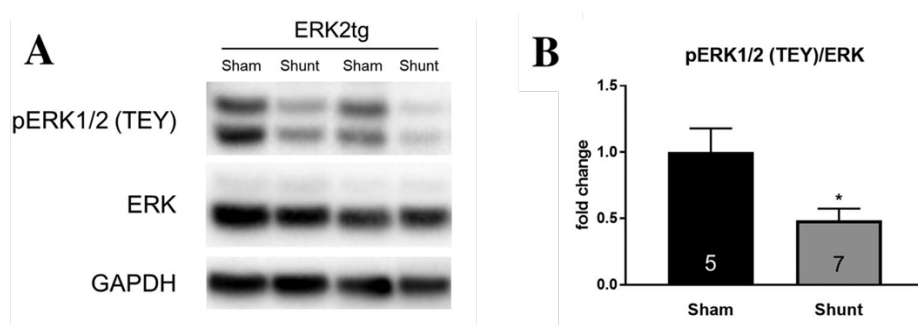


Abbildung 17: Phosphorylierung des kardialen ERK1/2 am TEY-Motiv bei ERK2tg Mäusen nach zweiwöchiger Volumenbelastung. Aorto-kavale Shunt-Operationen wurden bei alterskorrelierten, männlichen ERK2tg Mäusen im C57Bl/6J-Hintergrund durchgeführt und mit entsprechenden Sham-Kontrollen verglichen. Linksventrikuläre Lysate wurden zur Proteinanalyse per Western Blot verwendet (A) Repräsentative Western Immunoblot-Abbildung für die Antikörper gegen pERK1/2 (TEY), gesamt ERK1/2 und GAPDH als Ladekontrolle von Herzlysaten zwei Wochen postoperativ. (B) Quantitative Auswertung des Phosphorylierungslevels des TEY-Motivs (pERK1/2 (TEY)) normalisiert zu ERK1/2-Gesamtprotein. Die Werte werden als *fold change* im Verhältnis zur Sham-Kontroll-Gruppe dargestellt. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. In den Balken dargestellt Zahlen stellen die Anzahl der Mäuse dar. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, n.s. nicht signifikant unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *Student's t-test*. Abbildung modifiziert nach Jochmann et al. (2019), Verwendung erfolgt unter CC BY-NC 4.0.

3.3.5 Keine Veränderung anderer MAP-Kinasen bei ERK2-Überexpression nach Volumenbelastung

Die Phosphorylierungslevel der anderen relevanten Kinasen wie Akt und der typischen MAPK JNK und p38 verblieben sowohl bei WT- als auch bei ERK2tg Mäusen nach Volumenbelastung unverändert (Abbildung 18A-D). Es ergab sich somit kein Hinweis auf ein verändertes Aktivitätsniveau.

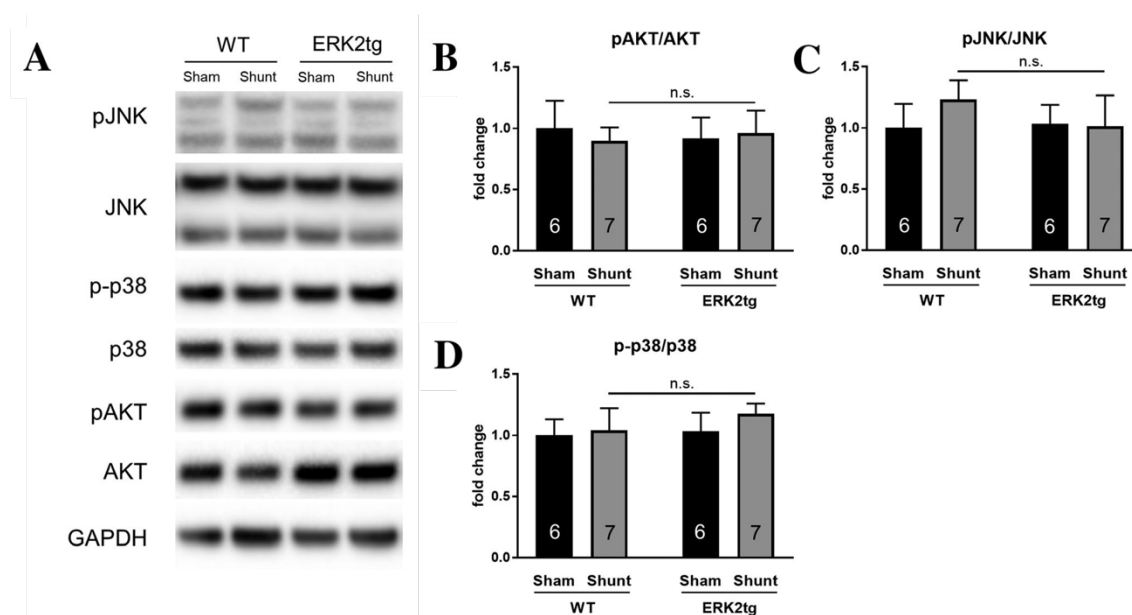


Abbildung 18: Phosphorylierung des kardialen p38, JNK sowie Akt bei ERK2tg sowie WT-Mäusen nach zweiwöchiger Volumenbelastung. Aorto-kavale Shunt-Operationen wurden bei alterskorrelierten, männlichen ERK2tg Mäusen im C57Bl/6J-Hintergrund sowie WT-Wurfgeschwistern durchgeführt und mit entsprechenden Sham-Kontrollen verglichen. Linksventrikuläre Lysate wurden zur Proteinanalyse per Western Blot verwendet (A) Repräsentative Western Immunoblot-Abbildung für die Antikörper gegen p38, p-p38, JNK, pJNK (phosphoryliertes JNK), AKT, pAKT und GAPDH als Ladekontrolle von Herzlysaten zwei Wochen postoperativ. Quantitative Auswertung des Phosphorylierungslevels normalisiert zum jeweiligen Gesamtprotein, (B) pAKT normalisiert zu AKT, (C) pJNK normalisiert zu JNK, (D) p-p38 normalisiert zu p38. Die Werte werden als *fold change* im Verhältnis zur jeweiligen Sham-Kontroll-Gruppe dargestellt. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. In den Balken dargestellt Zahlen stellen die Anzahl der Mäuse dar; Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, n.s. nicht signifikant unter Verwendung des two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Abbildung modifiziert nach Jochmann et al. (2019), Verwendung erfolgt unter CC BY-NC 4.0.

4 Diskussion

Volumenbelastung und Druckbelastung sind hämodynamische Stressoren, die unbehandelt zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führen (Dirkx et al. 2013). Sie induzieren unterschiedliche Arten des kardialen Remodelings mit Ausbildung verschiedener Formen der Hypertrophie - Druckbelastung führt zu einer konzentrischen Hypertrophie, Volumenbelastung führt zu einer exzentrischen Hypertrophie (Grossman et al. 1975; Toischer et al. 2010). Aufgrund der unterschiedlichen Remodeling-Vorgänge mit unterschiedlichen Prognosen und Behandlungsansätzen bedarf es einer differenzierten Untersuchung der genauen mechanistischen Vorgänge (Nakamura und Sadoshima 2018). ERK1/2 nimmt als typische MAP-Kinase eine relevante Rolle in den Signalwegen des kardialen Remodelings ein (Mutlak und Kehat 2015; Nakamura und Sadoshima 2018; Gallo et al. 2019). Bisher erfolgten die Untersuchungen hinsichtlich der Bedeutung von ERK1/2 im pathologischen kardialen Remodeling überwiegend an Modellen, die Medikamente oder Druckbelastung als Stimulus zu Grunde legten (Harris et al. 2004; Li et al. 2009; Ulm et al. 2014; Mutlak et al. 2018). Die Bedeutung von ERK1/2 im Zusammenhang mit Volumenbelastung im murinen Modell *in vivo* ist dagegen bisher nur eingeschränkt untersucht worden (Jochmann et al. 2019).

4.1 Volumenbelastung im Mausmodell

Zur Untersuchung der Volumenbelastung verwendeten wir das etablierte murine Modell eines aorto-kavalen Shunts (Scheuermann-Freestone et al. 2001; Toischer et al. 2010; Schnelle et al. 2018). Mausmodelle sind in der Untersuchung der Herzinsuffizienz weit verbreitet. Die Maus gehört neben den Ratten zu den am häufigsten verwendeten Kleintiermodellen in der kardiovaskulären Grundlagenforschung (Riehle und Bauersachs 2019). Neben einer unkomplizierten Haltung mit leichter Umgebungskontrolle und niedrigen Haltungskosten, kurzen Brutzyklen mit schneller Reproduktion und vielen Nachkommen ist das hohe Maß der Homologie zum Menschen ein Vorteil (Riehle und Bauersachs 2019; Noll et al. 2020). Neben der anatomischen Nähe stimmen bis zu 85% der proteinkodierenden Regionen des Genoms mit dem des Menschen überein (Uhl und Warner 2015). Genetische Modifikationen im Mausmodell sind etabliert (Haruyama et al. 2009). Das operative Volumenbelastungsmodell ermöglicht es, eine klare Ursache-Wirkungskausalität herzustellen und die Volumenbelastung ohne andere, die Ursprungserkrankung begleitende Komorbiditäten zu untersuchen (Rai et al. 2017).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente erfolgten im Vergleich zu einer Sham-Operation, um andere Umgebungsfaktoren wie Entzündungsreaktionen nach Operationen als Störfaktor auszuschließen (Alazawi et al. 2016).

Wir konnten zunächst bestätigen, dass den Erwartungen entsprechend das aorto-kavale murine Shunt-Modell über eine Erhöhung der Vorlast zu einer exzentrischen Hypertrophie führte. Es zeigte sich nach dem zweiwöchigen Beobachtungszeitraum, dass die linksventrikuläre Masse normalisiert zur Tibiallänge in der Shunt-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant erhöht war. Diese Zunahme der kardialen Masse repräsentiert somit eine deutliche linksventrikuläre Hypertrophie. Die echokardiographische Untersuchung bestätigte bei signifikant erhöhtem LVEDD den zu erwartenden kardialen Phänotyp unter Volumenbelastung - eine exzentrische Hypertrophie. Somit konnte die Funktionalität des Shunt-Modells zur Simulation der Volumenbelastung, wie zuvor bereits vorbeschrieben (Toischer et al. 2010), nachgewiesen werden (Jochmann et al. 2019).

4.2 Volumenbelastung *in vivo* führt zur verringerten ERK1/2-Phosphorylierung

Die Entwicklung einer exzentrischen Hypertrophie nach zweiwöchiger Volumenbelastung durch eine aorto-kavale Shunt-Operation ging in unseren Versuchen mit einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung des ERK1/2-TEY-Motives (-28%) einher. Somit konnten wir im *in vivo*-Modell nachweisen, dass eine Volumenbelastung zu einer Verringerung der kardialen ERK1/2-Aktivierung führt (Jochmann et al. 2019).

Mit diesen Ergebnissen ergänzen wir den von Kehat et al. (2011) in Vorarbeiten aufgezeigten Zusammenhang, dass die Aktivität von ERK1/2 unter pathophysiologischen Bedingungen das exzentrische Remodeling moduliert. Kehat et al. (2011) zeigten im Mausmodell, dass Kardiomyozyten von Mäusen mit Verlust der ERK1/2-Proteine eine exzentrische Hypertrophie und Kardiomyozyten von Mäusen mit einer Verstärkung des ERK1/2-Signalweges (durch eine MEK1-Überaktivierung) im Herzen eine konzentrische Hypertrophie ausbildeten. Diese Befunde konnten analog im Zellmodell an isolierten Kardiomyozyten reproduziert werden. Kardiomyozyten mit einer Inhibition des ERK1/2-Signalweges zeigten eine spontane Längenzunahme, während Kardiomyozyten mit einer ERK1/2-Aktivierung eine spontane Breitenzunahme zeigten. Kehat et al. stellten die Hypothese auf, dass ERK1/2 nicht für die „Gesamtorgan“-Hypertrophie notwendig ist, sondern für die koordinierte Hypertrophie durch Addition von Sarkomeren in Serie und in Reihe und somit den Phänotyp lenkt (Kehat et al. 2011).

Übereinstimmende Ergebnisse lieferten auch Liu et al. (2016), welche zeigten, dass eine Deletion der Phosphatase DUSP8 in Mäusen mit konsekutiver gesteigerter Aktivierung von ERK1/2 zu einem konzentrischen Remodeling führt, während die spezifische Überexpression von DUSP8 in einer exzentrischen Hypertrophie resultierte. Auch sie formulierten die Hypothese, dass DUSP8 das Längen-Breiten-Verhältnis der Myozyten durch eine veränderte Phosphorylierung von ERK1/2 reguliert. Jedoch war die DUSP8-Veränderung nicht selektiv für eine ERK1/2-Modifikation, auch p38 und JNK1/2 waren in ihrer Aktivität verändert. Darüber hinaus nehmen auch andere DUSPs eine Rolle in der Regulation von ERK1/2 ein (Liu et al. 2016). Unter zweiwöchiger Volumenbelastung konnten wir hingegen eine isolierte Veränderung der ERK1/2-Aktivität messen, p-p38 und pJNK zeigten sich nicht signifikant verändert im Vergleich zur Sham-Kontrolle. Dies lässt darauf schließen, dass die Beziehung zwischen Vorlasterhöhung und ERK1/2-Aktivität von den anderen MAP-Kinasen unabhängig ist (Jochmann et al. 2019).

Während Kehat et al. und Liu et al. zeigten, dass ein Verlust der ERK1/2-Funktion zu einer exzentrischen Hypertrophie führt, konnten wir vice versa zeigen, dass eine volumenbelastungsinduzierte exzentrische Hypertrophie mit einer verringerten kardialen ERK1/2 Aktivität *in vivo* einhergeht (Jochmann et al. 2019). Somit scheint ERK1/2 für die Selektivität einer konzentrischen vs. exzentrischen Hypertrophie erforderlich. Aus unserer Sicht ist dies bislang das einzige kardiale Stressmodell, welches zu einer Abnahme der ERK1/2-Aktivität führt und ist daher von großem wissenschaftlichem Interesse.

Andere Arbeitsgruppen und Studien konnten im Kontrast zu unseren Ergebnissen keinen Unterschied in der ERK1/2-Phosphorylierung und somit der biologischen ERK1/2-Aktivität nach Volumenbelastung feststellen (Toischer et al. 2010; You et al. 2018a). Diese Ergebnisdifferenz könnte einerseits auf Unterschiede im Studiendesign zurückzuführen sein. Toischer et al. (2010) untersuchten die Volumenbelastung ebenfalls über einen aorto-kavalen Shunt. Jedoch erfolgte die Studie inklusive der Untersuchung der ERK1/2-Phosphorylierung unter Verwendung von FVB/N-Mäusen, wohingegen unsere Mäuse dem C57Bl/6-Hintergrund entstammten (Jochmann et al. 2019). Eine weitere Studie, welche keine Veränderung im Phosphorylierungslevel von ERK1/2 aufwies, verwendete zur Erzeugung einer Volumenbelastung ein neues Modell einer valvulären Aortenregurgitation (You et al. 2018a). Bisher existieren keine Studien zur Vergleichbarkeit bzw. zum Ausmaß der erzeugten Volumenbelastung. Es ist zu vermuten, dass sich der Schweregrad der Volumenbelastung in diesem Modell von jenem in dem von uns verwendeten, gut etablierten Shunt-Modell unterschied (Jochmann et al. 2019).

Andererseits bestanden Unterschiede in der Dauer der Volumenbelastung vor Untersuchung des Proteinniveaus. So fanden Toischer et al. 24 Stunden sowie 7 Tage nach Shunt-Anlage kein verändertes Phosphorylierungslevel von ERK1/2 im Vergleich zu Sham-Kontrollen. p38 zeigte sich nach 24 Stunden erhöht und nach 7 Tagen normalisiert. JNK zeigte sich zu beiden Zeitpunkten nicht im Aktivitätsniveau verändert. Auch bei uns zeigte sich nach 2 Wochen kein Unterschied im Aktivitätslevel von JNK und p38. Aufgrund des erniedrigten pERK1/2 nach 2 Wochen ist es somit denkbar, dass ERK1/2 ähnlich zu p38 eine zeitliche Dynamik aufweist und erst im Verlauf herunterreguliert wird (Jochmann et al. 2019). Diesbezüglich sei zu erwähnen, dass eine zeitliche Dynamik der ERK1/2-Aktivität bereits in anderen Modellen beschrieben wurde. So zeigten Li et al. (2009) sowie Toischer et al. (2010), dass es im TAC-Mausmodell bei Druckbelastung zunächst zu einer vermehrten Aktivierung von ERK1/2 und im zeitlichen Verlauf zu einer verringerten Aktivierung kommt.

4.3 Mögliche Mechanismen der ERK1/2-Regulation unter Vorlasterrhöhung

Die genauen Mechanismen und Signalwege, die von einer Volumenbelastung zur Abnahme der ERK1/2-Aktivität führen sind bisher nicht aufgeklärt. Es kann spekuliert werden, dass es zunächst auf Grundlage der mechanischen Belastung durch Vorlasterrhöhung zu einer Dehnung der Kardiomyozyten kommt, welche die Aktivität von ERK1/2 reduziert (Jochmann et al. 2019). So zeigten Kehat et al. (2011) in einem *ex vivo* „engineered heart tissue“-Modell, dass unter zyklischer Gewebedehnung im Sinne einer physiologischen, kardialen Pumpfunktion bei ERK1/2-Hemmung eine Myozytenverlängerung mit Abnahme der Zelldicke auftrat. Hieraus könnte man ableiten, dass eine exzentrische Dehnung der Myozyten umgekehrt zu einer reduzierten ERK1/2-Aktivität führt.

So könnte die Verringerung der Aktivität von ERK1/2 über eine dehnungsvermittelte Induktion der spezifischen Phosphataseaktivität vermittelt werden (Jochmann et al. 2019). Diese Verbindung zeigten Zavala et al. (2019) in einer Studie an isolierten Ratten-Papillarmuskeln. Die mechanische Dehnung der myokardialen Zellen führte zu einer DUSP6-vermittelten reduzierten ERK1/2-Phosphorylierung. Die Transduktion von myokardialer Dehnung zu Reduzierung der ERK1/2-Phosphorylierung wurde in dieser Studie in Zusammenhang mit der Aktivierung von p38 gesetzt. In unserer Studie konnte allerdings *in vivo* keine Erhöhung der Phosphorylierung der p38-MAPK nachgewiesen werden. Dies eröffnet die Spekulation, dass neben der von Zavala et al. (2019) dargestellten Aktivierung der DUSP6 über eine p38-Aktivierung ein weiterer dehnungsabhängiger

Signalweg ohne p38-Involvierung existiert. So könnte die Aktivität der Phosphatasen wie DUSP6 durch dehnungssensible Proteine vermittelt werden (Jochmann et al. 2019). Denkbar wäre eine Vermittlung über das elastische Strukturprotein der Sarcomere Titin, welches als Mechanosensor gemeinsam mit seinen Liganden eine mechanische Belastung mit der nachgeschalteten Modulation der Genexpression verknüpft und somit die Hypertrophiereaktion reguliert (Linke 2008; Stöhr et al. 2018; van der Pijl et al. 2018; Jochmann et al. 2019). Die Signalwege von der Detektion der Dehnung bis zur verringerten Phosphorylierung bedürfen diesbezüglich noch weiterer Forschung und einer näheren Betrachtung.

4.4 ERK1/2 – maladaptiv oder kardioprotektiv?

Die Rolle, die ERK1/2 in der Modulation des kardialen Remodelings einnimmt, ist nicht abschließend geklärt. Mehrere Studien zeigten eine generell prohypertrophe und kardioprotektive Wirkung von ERK1/2. So wurde unter erhöhter ERK1/2-Aktivierung sowohl eine geringere Apoptoserate als auch weniger Fibrose beobachtet (Bueno et al. 2000; Mutlak et al. 2018). Eine Verringerung von ERK1/2 führte in Studien zu einem maladaptiven Phänotyp mit vermehrter Fibrose und Apoptose (Harris et al. 2004; Ulm et al. 2014). Im Rahmen der kardialen Dekompensation nach Druckbelastung zeigten Li et al. (2009), dass die Entwicklung einer exzentrischen Hypertrophie mit einer Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung einhergeht. All diese Studien erfolgten jedoch unter Druckbelastung.

Im Gegensatz zu der maladaptiven Hypothese einer verringerten ERK1/2-Aktivität zeigten Toischer et al. (2010), dass ein exzentrisches Remodeling, was unseren Befunden nach mit einer erniedrigten ERK1/2-Aktivität verbunden ist, einen vorteilhafteren Phänotyp als das konzentrische Remodeling nach Druckbelastung darstellte. So zeigte das exzentrische Remodeling ein verbessertes Überleben, eine geringere Apoptoserate und eine länger erhaltene systolische Funktion im Vergleich zum konzentrischen Remodeling unter Druckbelastung (Toischer et al. 2010).

Neben der etablierten Phosphorylierungsstelle im TEY-Motiv von ERK1/2 wurde 2009 ein alternativer Weg zur ERK2-Aktivierung aufgezeigt. Dabei handelt es sich um die Aktivierung der Proteinkinase über eine Autophosphorylierung von Thr188 (Lorenz et al. 2009). Es konnte weiter gezeigt werden, dass diese Aktivierung von ERK2 über die Autophosphorylierungsstelle unter pathologischer Stimulation zu einem nachteiligen kardialen Remodeling beiträgt (Ruppert et al. 2013). Die physiologische Hypertrophie durch

Training der Mäuse war durch die Autophosphorylierung jedoch nicht beeinflusst (Ruppert et al. 2013). In unseren Untersuchungen zeigte sich die Phosphorylierung der Autophosphorylierungsstelle Thr188 durch die Volumenbelastung nicht signifikant beeinflusst. Diese Ergebnisse passen zu dem Konzept, dass eine kurzfristige durch eine Volumenbelastung induzierte exzentrische Hypertrophie eher eine physiologische Form des Herzbbaus darstellt, einhergehend mit vorteilhaften Signalen und ohne kardiale Dysfunktion (Toischer et al. 2010; Olsen et al. 2013; Jochmann et al. 2019).

Es ist anzunehmen, dass die kardioprotektive oder maladaptive Rolle von ERK1/2 vom zugrunde liegenden Stimulus abhängig ist. In unserer Studie führte explizit die Volumenbelastung als Stimulus zu einer Abnahme der ERK1/2-Aktivität. Interessant ist, ob eine Veränderung der ERK-Signalkaskade zu einer verbesserten Kompensation einer Volumenbelastung führt. Hierzu liegen bisher keine interventionellen Studien vor.

4.5 ERK2-Überexpression bewirkt keine Veränderung der basalen kardialen Funktion und der ERK1/2-Aktivität

ERK2 und ERK1 scheinen trotz ihrer molekularen Ähnlichkeit *in vivo* im Herzen unterschiedliche Funktionen einzunehmen (Ulm et al. 2014). Neben der unterschiedlichen Relevanz in der embryonalen Entwicklung, ERK1-Knockoutmäuse entwickeln sich zum Beispiel normal während der ERK2-Knockout letal ist, wurde auch gezeigt, dass insbesondere ERK2 eine bedeutende Rolle im kardialen Remodeling unter ischämischen Bedingungen (Lips et al. 2004) sowie in der Entwicklung der pathologischen Hypertrophie spielt (Ulm et al. 2014; Jochmann et al. 2019). Unsere Ergebnisse zeigten, dass es unter Volumenbelastung bei C57Bl/6N-Mäusen zu einer Abnahme der kardialen ERK-Aktivierung messbar durch eine verringerte Phosphorylierung kam. Aufgrund dieser Erkenntnisse und in Anbetracht der Bedeutung von ERK2 als kardiales Protein, stellten wir die Hypothese auf, dass die Überexpression von ERK2 in Kardiomyozyten zu einer Beeinflussung des kardialen Remodelings mit Veränderung der exzentrischen Hypertrophie unter Volumenbelastung führt (Jochmann et al. 2019).

Zur Untersuchung der ERK2-Überexpression verwendeten wir kardiomyozytenspezifische ERK2tg Mäuse, welche aus dem ursprünglichen FVB/N-Hintergrund in den C57Bl/6J-Hintergrund im Labor von Frau Prof. K. Lorenz eingekreuzt wurden. Diese ERK2tg Mäuse wurden jedoch bislang in diesem Hintergrund nicht beschrieben, sodass zunächst eine basale Charakterisierung erfolgte.

Auf Proteinebene zeigte sich im Vergleich zu WT-Wurfgeschwistern die erfolgreiche Überexpression (10,2-fach) von ERK2. Das transgene Modell konnte somit bestätigt werden. Die neu generierten ERK2tg-Mäuse zeigten im Vergleich zu den WT-Wurfgeschwistern durch die ERK2-Überexpression basal keine Veränderung der kardialen Funktion und Geometrie. So zeigten sich die linkventrikuläre Funktion (EF) und Geometrie (LVEDD) in der Echokardiographie, sowie die Morphometrie, gemessen durch die linksventrikuläre Masse normalisiert zur Tibiallänge *post mortem*, ohne signifikante Differenz (Jochmann et al. 2019). Diese Befunde zeigten sich übereinstimmend zu jenen von Lorenz et al. (2009), welche auch im FVB/N-Hintergrund keine basale Varianz erheben konnten. Die Aktivität der ERK1/2-Kinase unter ERK2-Überexpression zeigte sich, gemessen anhand der ERK1/2-Phosphorylierung im TEY-Motiv, im basalen Niveau nicht verändert. Auch die Autophosphorylierungsstelle Thr188 zeigte sich ebenfalls unter ERK2-Überexpression ohne verändertes Aktivitätsniveau. Dies lässt darauf rückschließen, dass die ERK2-Aktivität nicht von der ERK2-Expression, sondern von den vorgeschalteten Signalen der Kaskade und somit der Phosphorylierung abhängt (Jochmann et al. 2019). Dies spricht in der von Mutlak und Kehat (2015) bereits diskutierten Kontroverse eher gegen den Gedanken, dass das Herz auf den Anteil des phosphorylierten ERK1/2 zum Gesamt-ERK1/2 reagiert und eher für die Hypothese, dass die absoluten phosphorylierten ERK1/2-Moleküle relevant sind. Auch andere Mechanismen, die die Aktivität abhängig vom Stimulus spezifisch beeinflussen, wie die Lokalisation der Kinasen in der Zelle oder eine Interaktion mit Gerüstproteinen, sind in diesem Zusammenhang natürlich denkbar.

4.6 ERK2-Überexpression in Kardiomyozyten führt zu einer erhöhten ANP-Expression *in vivo*

Auch wenn keine Veränderungen der Morphologie und Funktion vorlagen und die ERK1/2-Kinase keine gesteigerte Funktion aufwies, so zeigte sich überraschenderweise in der basalen Untersuchung des fetalen Genprogrammes im Herzen eine Differenz zwischen den ERK2tg-Mäusen und den WT-Wurfgeschwistern. ANP zeigte sich bei kardiomyozytenspezifischen ERK2-überexprimierenden Mäusen sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf der Proteinebene signifikant erhöht. Andere kardiale Stressmarker des fetalen Genprogrammes zeigten sich unverändert, beziehungsweise wie bei SERCA-2 α beobachtet nur auf dem mRNA-Level verändert (Jochmann et al. 2019). Dass ERK2 unter hypertrophieauslösenden Stimuli die nukleäre ANP- und BNP-Expression induziert, wurde bereits zuvor von Ulm et al. (2014) gezeigt. Nach unseren Ergebnissen scheint ERK2

darüber hinaus die ANP-Expression im Herzen unabhängig von der ERK1/2-Aktivität und Hypertrophiestimuli zu modulieren. Dieses Merkmal konnten wir erstmalig im C57Bl/6J-Hintergrund zeigen (Jochmann et al. 2019). ANP und BNP werden als Bestandteilen des fetalen Genprogramms eine kardioprotektive Wirkung zugesprochen (Wang et al. 2014; Sarzani et al. 2022). Dies findet bereits bei der leitliniengerechten Verwendung der Nephilysin-Inhibitoren-Therapie Anwendung (McDonagh et al. 2021). Es konnte gezeigt werden, dass unter Nephilysin-Therapie insbesondere der Plasmaspiegel von ANP erhöht ist, während sich der BNP-Spiegel im Verlauf normalisiert. Somit kann postuliert werden, dass die kardioprotektive Wirkung der Nephilysin-Inhibitoren über einen Anstieg von ANP vermittelt wird (Ibrahim et al. 2019; Nishikimi und Nakagawa 2022). Der Zusammenhang zwischen einer ERK2- und ANP-Überexpression ist bisher nicht verstanden. Diesbezüglich und auch hinsichtlich der weiteren pathophysiologischen Relevanz sind weitere Studien notwendig. ERK2 wurde in vorherigen Studien eine protektive Rolle unter pathologischen Bedingungen zugesprochen (Ulm et al. 2014), ggf. kann hier ein Zusammenhang mit der Regulation von ANP bestehen. Andere murinen Untersuchungen unter Volumenbelastung eröffneten die Hypothese, dass ANP ein physiologischer Modulator der vorlastinduzierten Hypertrophie ist (Mori et al. 2004).

4.7 ERK2-Überexpression verändert das kardiale Remodeling unter Volumenbelastung nicht

Unter ERK2-Überexpression zeigten sich im Shunt-Modell unter Volumenbelastung ebenfalls eine signifikant reduzierte Phosphorylierung des TEY-Motivs und somit eine reduzierte Aktivierung von ERK1/2 im Vergleich zur Sham-Kontrolle. Die ERK2-Überexpression hatte somit keinen Einfluss auf die Volumenbelastungs-induzierte Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung (Jochmann et al. 2019). Die linksventrikuläre Dilatation und Hypertrophie zeigten sich ohne signifikante Differenz zwischen den ERK2tg Mäusen und WT-Mäusen nach Volumenbelastung. Die ERK2-Überexpression führte entgegen unserer Hypothese somit nicht zu einer Modulation des exzentrischen Remodelings. In beiden Genotypen fand sich eine für pathologische kardiale Belastung typische Reexpression des fetalen Genprogrammes (Taegtmeyer et al. 2010). Diese zeigten sich teilweise auf verschiedenen Signifikanzniveaus, jedoch mit gleicher Tendenz (Jochmann et al. 2019).

Die echokardiographisch erhobene diastolische und systolische Funktion zeigte sich sowohl bei den transgenen als auch WT-Mäusen während des zweiwöchigen Beobachtungszeitraums

im Vergleich zur Sham-Gruppe erhalten und ohne Differenz in der Ausprägung (Jochmann et al. 2019). Dies zeigt sich in Übereinstimmung mit Vorstudien, welche eine Entwicklung zur Herzinsuffizienz mit linksventrikulärer Funktionseinschränkung unter Volumenbelastung erst nach einem längeren Beobachtungszeitraum berichteten (Toischer et al. 2010; Mohamed et al. 2016; Jochmann et al. 2019). Somit besteht grundsätzlich auch die Möglichkeit, dass bei einem längeren Beobachtungszeitraum die Überexpression von ERK2 eine Auswirkung auf die kardiale Funktion haben könnte (Jochmann et al. 2019). Alternativ ließe sich das gleiche Verhalten von ERK2tg sowie WT-Mäusen darauf zurückführen, dass die ERK2-Überexpression ohne eine erhöhte Phosphorylierung und somit fehlende Aktivierung keinen Einfluss auf das kardiale Remodeling hat (Jochmann et al. 2019).

Die anderen MAP-Kinasen zeigten sich verglichen zwischen den Genotypen sowie nach Volumenbelastung auch bei ERK2tg-Mäusen nach Volumenbelastung unverändert. Akt als Bestandteil des PI3K/Akt-Signalwegs zeigte sich ebenfalls nach der Volumenbelastung nicht vermehrt phosphoryliert. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass Akt in der Modulation der exzentrischen Hypertrophie unter Volumenbelastung eine relevante Rolle einnimmt (Toischer et al. 2010; Ikeda et al. 2015; Schnelle et al. 2021) und eine Akt-Defizienz zu einer erhöhten Mortalität und schlechteren ventrikulären Funktion unter Volumenbelastung führt (Mohamed et al. 2016). Akt zeigt sich unter Volumenbelastung in der frühen Phase nach 24 Stunden und 7 Tage erhöht, während sich die Aktivität nach langfristiger Beobachtung über 20 Wochen bei zunehmender Herzinsuffizienz herunterreguliert zeigt (Toischer et al. 2010; Mohamed et al. 2016). Der Zeitpunkt unserer Studie scheint zwischen diesen Zeitpunkten zu liegen, da verglichen zur Sham-Kontrolle eine normwertige Akt-Aktivierung gezeigt werden konnte (Jochmann et al. 2019).

Unter zweiwöchiger Volumenbelastung zeigte sich sowohl bei den ERK2tg Mäusen als auch bei den WT-Wurfgeschwistern in der histologischen Untersuchung eine signifikante Zunahme der Apoptose bei nahezu unveränderter Fibrose. Die vermehrt auftretende Apoptose spiegelt auch auf histologischer Ebene die frühe Phase des pathologischen kardialen Remodelings unter Volumenbelastung wider (Toischer et al. 2010; You et al. 2018; Jochmann et al. 2019). Zuvor erfolgte Studien zeigten ebenfalls, dass Volumenbelastung zu einer vermehrten Apoptoserate ohne Fibrose führt. (Toischer et al. 2010; Mohamed et al. 2016). Eine kardiomyozytenspezifische ERK2-Überexpression hatte keinen Einfluss auf die auftretende Apoptose oder Fibrose nach Volumenbelastung, die Veränderungen nach Shunt zeigten sich vergleichbar zwischen ERK2tg und WT-Mäusen. Somit konnten wir auch auf zellulärer Ebene keine Auswirkung der ERK2-Überexpression auf das kardiale Remodeling

zeigen (Jochmann et al. 2019). Voruntersuchungen zeigten, dass ERK1/2 unter Druckbelastung eine protektive Eigenschaft mit verringerter Apoptose aufweist (Bueno et al. 2000; Harris et al. 2004; Ulm et al. 2014). Zur weiteren Untersuchung des Zusammenhanges von ERK1/2 zur Apoptose unter Volumenbelastung bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen unter ERK1/2-Aktivierung.

4.8 Limitationen der Studie

Das Shunt-Modell der Maus ist eine etablierte Möglichkeit, eine Volumenbelastung des Herzens mit konsekutiver Erhöhung des diastolischen Wandstress und exzentrischem Remodeling experimentell zu simulieren. Neben den zuvor genannten Vorteilen, die ein Mausmodell bietet, bringt dieses jedoch auch Limitationen mit sich. Neben dem Aspekt, dass ein Mausmodell immer nur in einem gewissen Maße auf den Menschen übertragbar ist, hat auch das Shunt-Modell an sich seine Grenzen. Ein operativ erfolgter aorto-kavaler Shunt ist ein akut auftretendes Ereignis, mit einer akuten Volumenbelastung des Herzens. Dies bildet nicht die graduelle Entwicklung einer pathophysiologischen Volumenbelastung, wie bei einer Aortenklappen- oder Mitralklappeninsuffizienz ab (Riehle und Bauersachs 2019). Dies gilt jedoch für alle aktuellen operativen Modelle der hämodynamischen Belastung (TAC, *aortic regurgitation*). Des Weiteren kommt es beim aorto-kavalen Shunt zu einer artifiziellen Vermischung von arteriellem Blut mit venösem Blut (Riehle und Bauersachs 2019). Dies ist unter pathophysiologischen Zuständen lediglich bei der sehr seltenen Form eines Ventrikelseptumdefekts der Fall.

In unserem Studienmodell erfolgte eine zweiwöchige postinterventionelle Beobachtung. Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass es im längeren Beobachtungszeitraum zu einer weiteren Entwicklung einer Herzinsuffizienz und der zu Grunde liegenden Signalwege kommt. Mit dem Beobachtungszeitpunkt zwei Wochen nach Intervention ist somit nur ein einziger und relativ früher Zeitpunkt abgebildet. Die Mäuse zeigten nach zwei Wochen keine Einschränkung der EF und somit noch keine manifeste Herzinsuffizienz. Welche Rolle ERK1/2 somit insbesondere in der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz übernimmt, bleibt weiter zu evaluieren.

Eine weitere Limitation ergab sich dadurch, dass sich entgegen unserer Erwartungen die ERK2-Überexpression nicht auf die Aktivität von ERK1/2 innerhalb unseres Untersuchungszeitraumes auswirkte (Jochmann et al. 2019). Diesbezüglich sollten weitere Studien mit einer anderen Aktivierung von ERK1/2 *in vivo* unter Volumenbelastung erfolgen. Denkbar wären eine spezifische Phosphatase-Inaktivierung oder eine MEK1/2-

Überexpression, wie von Bueno et al. (2000) beschrieben, unter Durchführung eines aortokavalen Shunt.

4.9 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend zeigten wir erstmalig, dass eine volumenbelastungs-induzierte exzentrische Hypertrophie im *in vivo*-Modell mit einer reduzierten ERK1/2-Aktivierung assoziiert ist.

Eine kardiomyozytenspezifische ERK2-Überexpression führte nicht zu einer Veränderung des basalen Phänotypes oder der kardialen Funktion. Überraschenderweise konnte eine erhöhte ANP-Expression auf mRNA- und Proteinebene bei ERK2-Überexpression gezeigt werden, dieser Zusammenhang wurde bisher nicht gezeigt. Ebenso zeigte sich unter ERK2-Überexpression keine Veränderung des kardialen Remodelings unter chronischer Volumenbelastung. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die ERK2-Überexpression nicht mit einer erhöhten Aktivität einherging.

Zur Entschlüsselung der genauen Rolle von ERK1/2 beim kardialen Remodeling unter Volumenbelastung sind weitere Studien notwendig. Ließe sich hier eine adaptive Modulation hin zu einer verbesserten Kompensation einer Volumenbelastung nachweisen, ergäben sich hieraus interessante therapeutische Ansätze für die Volkskrankheit Herzinsuffizienz.

5 Zusammenfassung

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine Erkrankung, welche aufgrund der hohen Prävalenz, der Einschränkung der Lebensqualität, der schlechten Prognose sowie der hohen Gesundheitskosten einen großen sozioökonomischen Stellenwert einnimmt. Zu den Ursachen der Herzinsuffizienz gehören hämodynamische Stressoren, die in Volumenbelastung und Druckbelastung unterteilt werden können. Diese Belastungen induzieren unterschiedliche Arten des kardialen Remodelings mit Ausbildung verschiedener Formen der Hypertrophie – Druckbelastung führt zur konzentrischen Hypertrophie, Volumenbelastung führt zur exzentrischen Hypertrophie. Aufgrund der unterschiedlichen Remodeling-Vorgänge bedarf es einer differenzierten Untersuchung der Signalwege zur Entwicklung spezifischer therapeutischer Ansätze. ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*) nimmt als typische MAP-Kinase (mitogen-aktivierte Proteinkinase) eine relevante Rolle als Komponente der Signalwege des kardialen Remodelings ein. Bisher erfolgten Untersuchungen überwiegend zu der Bedeutung von ERK1/2 unter Druckbelastung. Die Bedeutung von ERK1/2 bei Volumenbelastung im murinen Modell *in vivo* ist dagegen bisher nur eingeschränkt untersucht. Unsere Arbeit soll zu einem umfassenderen Verständnis beitragen.

Eine zweiwöchige Volumenbelastung erfolgte durch das etablierte Modell eines aortokavalen Shunts im Vergleich zu Sham-Kontrollen. Die Beurteilung der Auswirkungen der Volumenbelastung erfolgte anhand morphometrischer, echokardiographischer, molekulargenetischer sowie histologischer Parameter. Im ersten Versuchsaufbau erfolgte eine Wildtyp-Studie an C57Bl/6N-Mäusen. Eine zweiwöchige Volumenbelastung führte erwartungsgemäß zu der Entwicklung einer exzentrischen Hypertrophie und ging in unseren Versuchen mit einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung des ERK1/2-TEY-Motives (-28%) einher. Somit konnten wir erstmalig zeigen, dass eine volumenbelastungsinduzierte exzentrische Hypertrophie im *in vivo*-Modell mit einer reduzierten ERK1/2-Aktivierung assoziiert ist. ERK1/2 scheint für die Selektivität einer konzentrischen vs. exzentrischen Hypertrophie erforderlich zu sein. Aus unserer Sicht ist dies bislang das einzige kardiale *in vivo*-Stressmodell, welches zu einer Abnahme der ERK1/2-Aktivität führt und ist daher von großem wissenschaftlichem Interesse.

Aufgrund dieser Erkenntnisse formulierten wir die Hypothese, dass die Überexpression von ERK2 in Kardiomyozyten zu einer Beeinflussung des kardialen Remodelings mit Veränderung der exzentrischen Hypertrophie unter Volumenbelastung führt. In einem zweiten Versuchsaufbau erfolgte eine vergleichende Untersuchung zwischen

kardiomyozytenspezifisch ERK2-überexprimierenden Mäusen (ERK2tg) im C57Bl/6J-Hintergrund und Wildtyp-Mäusen im Basalniveau sowie nach zweiwöchiger Volumenbelastung. Eine kardiomyozytenspezifische ERK2-Überexpression bewirkte keine Veränderung des basalen kardialen Phänotyps und der Funktion sowie der ERK1/2-Aktivität. Überraschenderweise führte eine ERK2-Überexpression in Kardiomyozyten *in vivo* im Basalniveau zu einer erhöhten ANP-Expression auf mRNA- und Proteinebene, dieser Zusammenhang wurde bisher nicht gezeigt. Es scheint, dass ERK2 die ANP-Expression unabhängig von der ERK1/2-Aktivität oder Hypertrophiestimuli moduliert. Es zeigte sich nach zweiwöchiger Volumenbelastung unter ERK2-Überexpression entgegen unserer Hypothese keine Veränderung des kardialen Remodelings, abgebildet durch echokardiographische, morphometrische, molekulare sowie histologische Untersuchungen. Zur Entschlüsselung der genauen Rolle von ERK1/2 beim kardialen Remodeling unter Volumenbelastung sind weitere Studien notwendig. Interessant wäre ein Modell mit einer Aktivierung von ERK1/2 *in vivo* unter Volumenbelastung, beispielsweise mittels einer spezifischen Phosphatase-Inaktivierung oder einer MEK1/2-Überexpression. Ließe sich hier eine adaptive Modulation hin zu einer verbesserten Kompensation der Volumenbelastung nachweisen, ergäben sich hieraus interessante therapeutische Ansätze für die Volkskrankheit Herzinsuffizienz.

6 Literaturverzeichnis

- Abassi Z, Goltsman I, Karram T, Winaver J, Hoffman A (2011): Aortocaval Fistula in Rat: A Unique Model of Volume-Overload Congestive Heart Failure and Cardiac Hypertrophy. *J Biomed Biotechnol* 2011, 729497
- Alazawi W, Pirmadjid N, Lahiri R, Bhattacharya S (2016): Inflammatory and Immune Responses to Surgery and Their Clinical Impact. *Ann Surg* 264, 73–80
- Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM (2016): Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol* 106, 62–69
- Bauersachs J, Butler J, Sandner P (Hrsg.): Heart Failure (Handbook of Experimental Pharmacology). Band 243; Springer International Publishing, Cham 2017
- Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR (2010): Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* 128, 191–227
- Bers DM (2008): Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70, 23–49
- Bhan A, Sirker A, Zhang J, Protti A, Catibog N, Driver W, Botnar R, Monaghan MJ, Shah AM (2014): High-frequency speckle tracking echocardiography in the assessment of left ventricular function and remodeling after murine myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, H1371-1383
- Blessberger H, Hackl M (2018): Strain-Echokardiographie / Strain Echocardiography. *Austrian Journal of Cardiology* 25, 343-348
- Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, et al. (2000): The MEK1–ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 19, 6341–6350
- Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (Hrsg.) (2019): Nationale Versorgungs Leitlinie Chronische Herzinsuffizienz Langfassung, 3. Auflage. Version 3. <https://www.leitlinien.de/themen/herzinsuffizienz/pdf/herzinsuffizienz-3aufl-vers3.pdf>; abgerufen am 03.1.0.2023
- Cargnello M, Roux PP (2011): Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50–83
- Chen HF, Chuang HC, Tan TH (2019): Regulation of Dual-Specificity Phosphatase (DUSP) Ubiquitination and Protein Stability. *Int J Mol Sci* 20, 2668
- Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N (2000): Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 35, 569–582

- Copeland O, Nowak KJ, Laing NG, Ravenscroft G, Messer AE, Bayliss CR, Marston SB (2010): Investigation of changes in skeletal muscle alpha-actin expression in normal and pathological human and mouse hearts. *J Muscle Res Cell Motil* 31, 207–214
- Crocini C, Gotthardt M (2021): Cardiac sarcomere mechanics in health and disease. *Biophys Rev* 13, 637–652
- Deutsche Herzstiftung e.V. (Hrsg.): Deutscher Herzbericht 2021. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2022. http://epaper.herzstiftung.de/epaperarchiv/epaper_09_2022/#6; abgerufen am 06.10.2022
- Dirkx E, da Costa Martins PA, De Windt LJ (2013): Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim Biophys Acta* 1832, 2414–2424
- Gallo S, Vitacolonna A, Bonzano A, Comoglio P, Crepaldi T (2019): ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *Int J Mol Sci* 20, 2164
- Garrington TP, Johnson GL (1999): Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11, 211–218
- Graham TP (1991): Ventricular performance in congenital heart disease. *Circulation* 84, 2259–2274
- Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, Hoes AW (2020): Epidemiology of heart failure. *Eur J Heart Fail* 22, 1342–1356
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975): Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56, 56–64
- Harris IS, Zhang S, Treskov I, Kovacs A, Weinheimer C, Muslin AJ (2004): Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation* 110, 718–723
- Hartmann N, Preuß L, Mohamed BA, Schnelle M, Renner A, Hasenfuß G, Toischer K (2022): Different activation of MAPKs and Akt/GSK3 β after preload vs. afterload elevation. *ESC Heart Fail* 9, 1823–1831
- Haruyama N, Cho A, Kulkarni AB (2009): Overview: engineering transgenic constructs and mice. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 19, Unit 19.10
- Hill JA, Olson EN (2008): Cardiac Plasticity. *N Engl J Med* 358, 1370–1380
- Ibrahim NE, McCarthy CP, Shrestha S, Gaggin HK, Mukai R, Szymonifka J, Apple FS, Burnett JC, Iyer S, Januzzi JL (2019): Effect of Nephilysin Inhibition on Various Natriuretic Peptide Assays. *J Am Coll Cardiol* 73, 1273–1284
- Ikeda M, Ide T, Fujino T, Matsuo Y, Arai S, Saku K, Kakino T, Oga Y, Nishizaki A, Sunagawa K (2015): The Akt-mTOR axis is a pivotal regulator of eccentric hypertrophy during volume overload. *Sci Rep* 5, 15881
- Jochmann S, Elkenani M, Mohamed BA, Buchholz E, Lbik D, Binder L, Lorenz K, Shah AM, Hasenfuß G, Toischer K, Schnelle M (2019): Assessing the role of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in volume overload-induced cardiac remodelling. *ESC Heart Fail* 6, 1015–1026

- Juenger J, Schellberg D, Kraemer S, Haunstetter A, Zugck C, Herzog W, Haass M (2002): Health related quality of life in patients with congestive heart failure: comparison with other chronic diseases and relation to functional variables. *Heart* 87, 235–241
- Kehat I, Davis J, Tiburcy M, Accornero F, Saba-El-Leil MK, Maillet M, York AJ, Lorenz JN, Zimmermann WH, Meloche S, Molkentin JD (2011): Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. *Circ Res* 108, 176–183
- Kemi OJ, Ellingsen Ø: Cardiac Hypertrophy, Physiological. In: Mooren FC (Hrsg.): *Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease*. Springer, Berlin 2012, 171–175
- Lake D, Corrêa SAL, Müller J (2016): Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cell Mol Life Sci* 73, 4397–4413
- Lbik D: *From Chromatin Readers to Heart Failure: BET Protein Family Members in Cardiac Remodeling*. Dissertation Göttingen 2019
- Li XM, Ma YT, Yang YN, Liu F, Chen BD, Han W, Zhang JF, Gao XM (2009): Downregulation of survival signalling pathways and increased apoptosis in the transition of pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36, 1054–1061
- Linke WA (2008): Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res* 77, 637–648
- Lip GY, Gibbs CR, Beevers DG (2000): ABC of heart failure: aetiology. *BMJ* 320, 104–107
- Lips DJ, Bueno OF, Wilkins BJ, Purcell NH, Kaiser RA, Lorenz JN, Voisin L, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Pouysségur J, et al. (2004): MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo. *Circulation* 109, 1938–1941
- Liu R, van Berlo JH, York AJ, Maillet M, Vagnozzi RJ, Molkentin JD (2016): DUSP8 Regulates Cardiac Ventricular Remodeling by Altering ERK1/2 Signaling. *Circ Res* 119, 249–260
- Lorenz K, Schmitt JP, Schmitteckert EM, Lohse MJ (2009): A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med* 15, 75–83
- Man J, Barnett P, Christoffels VM (2018): Structure and function of the Nppa–Nppb cluster locus during heart development and disease. *Cell Mol Life Sci* 75, 1435–1444
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pagès G, Valverde O, et al. (2002): Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34, 807–820
- McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, et al. (2021): 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 42, 3599–3726
- Mihl C, Dassen WRM, Kuipers H (2008): Cardiac remodelling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. *Neth Heart J* 16, 129–133

- Mohamed BA, Schnelle M, Khadjeh S, Lbik D, Herwig M, Linke WA, Hasenfuss G, Toischer K (2016): Molecular and structural transition mechanisms in long-term volume overload. *Eur J Heart Fail* **18**, 362–371
- Mori T, Chen YF, Feng JA, Hayashi T, Oparil S, Perry GJ (2004): Volume overload results in exaggerated cardiac hypertrophy in the atrial natriuretic peptide knockout mouse. *Cardiovasc Res* **61**, 771–779
- Mutlak M, Kehat I (2015): Extracellular signal-regulated kinases 1/2 as regulators of cardiac hypertrophy. *Front Pharmacol* **6**, 149
- Mutlak M, Schlesinger-Laufer M, Haas T, Shofti R, Ballan N, Lewis YE, Zuler M, Zohar Y, Caspi LH, Kehat I (2018): Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation preserves cardiac function in pressure overload induced hypertrophy. *Int J Cardiol* **270**, 204–213
- Nakamura M, Sadoshima J (2018): Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol* **15**, 387–407
- Nishikimi T, Nakagawa Y (2022): B-Type Natriuretic Peptide (BNP) Revisited-Is BNP Still a Biomarker for Heart Failure in the Angiotensin Receptor/Neprilysin Inhibitor Era? *Biology (Basel)* **11**, 1034
- Noll NA, Lal H, Merryman WD (2020): Mouse Models of Heart Failure with Preserved or Reduced Ejection Fraction. *Am J Pathol* **190**, 1596–1608
- Norton JM (2001): Toward consistent definitions for preload and afterload. *Adv Physiol Educ* **25**, 53–61
- NVL (2019): siehe Bundesärztekammer (BÄK) et al.
- Olsen NT, Dimaano VL, Fritz-Hansen T, Sogaard P, Chakir K, Eskesen K, Steenbergen C, Kass DA, Abraham TP (2013): Hypertrophy signaling pathways in experimental chronic aortic regurgitation. *J Cardiovasc Transl Res* **6**, 852–860
- Pistner A, Belmonte S, Coulthard T, Blaxall B (2010): Murine echocardiography and ultrasound imaging. *J Vis Exp* **42**, 2100
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, et al. (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* **37**, 2129–2200
- Purcell NH, Wilkins BJ, York A, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Robbins J, Molkenin JD (2007): Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14074–14079
- Rai V, Sharma P, Agrawal S, Agrawal DK (2017): Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Mol Cell Biochem* **424**, 123–145
- Riehle C, Bauersachs J (2019): Small animal models of heart failure. *Cardiovasc Res* **115**, 1838–1849

- Rose BA, Force T, Wang Y (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev* 90, 1507–1546
- Ruppert C, Deiss K, Herrmann S, Vidal M, Oezkur M, Gorski A, Weidemann F, Lohse MJ, Lorenz K (2013): Interference with ERK(Thr188) phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7440–7445
- Sarzani R, Allevi M, Di Pentima C, Schiavi P, Spannella F, Giuliotti F (2022): Role of Cardiac Natriuretic Peptides in Heart Structure and Function. *Int J Mol Sci* 23, 14415
- Satoh Y, Endo S, Ikeda T, Yamada K, Ito M, Kuroki M, Hiramoto T, Imamura O, Kobayashi Y, Watanabe Y, et al. (2007): Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 (ERK2) Knockdown Mice Show Deficits in Long-Term Memory; ERK2 Has a Specific Function in Learning and Memory. *J Neurosci* 27, 10765–10776
- Savarese G, Lund LH (2017): Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev* 3, 7–11
- Scheuermann-Freestone M, Freestone NS, Langenickel T, Höhnel K, Dietz R, Willenbrock R (2001): A new model of congestive heart failure in the mouse due to chronic volume overload. *Eur J Heart Fail* 3, 535–543
- Schnelle M, Catibog N, Zhang M, Nabeebaccus AA, Anderson G, Richards DA, Sawyer G, Zhang X, Toischer K, Hasenfuss G, et al. (2018): Echocardiographic evaluation of diastolic function in mouse models of heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 114, 20–28
- Schnelle M, Sawyer I, Anilkumar N, Mohamed BA, Richards DA, Toischer K, Zhang M, Catibog N, Sawyer G, Mongue-Din H, et al. (2021): NADPH oxidase-4 promotes eccentric cardiac hypertrophy in response to volume overload. *Cardiovasc Res* 117, 178–187
- Schnelle M: Physiology, metabolism and redox mechanisms in chronic cardiac volume overload. Dissertation Göttingen 2016
- Shaul YD, Seger R (2007): The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1213–1226
- Solaro RJ: Integration of Sarcomere Mechanics with Cardiac Function Clarifies the Meaning of Preload, Afterload, and Contractility. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael 2011
- Stöhr EJ, Takayama H, Ferrari G (2018): Stretch your heart-but not too far: The role of titin mutations in dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 156, 209–214
- Störk S, Handrock R, Jacob J, Walker J, Calado F, Lahoz R, Hupfer S, Klebs S (2017): Epidemiology of heart failure in Germany: a retrospective database study. *Clin Res Cardiol* 106, 913–922
- Suurmeijer AJH, Clément S, Francesconi A, Bocchi L, Angelini A, Van Veldhuisen DJ, Spagnoli LG, Gabbiani G, Orlandi A (2003): Alpha-actin isoform distribution in normal and failing human heart: a morphological, morphometric, and biochemical study. *J Pathol* 199, 387–397
- Taegtmeier H, Sen S, Vela D (2010): Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci* 1188, 191–198

- Toischer K, Rokita AG, Unsold B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T, et al. (2010): Differential Cardiac Remodeling in Preload Versus Afterload. *Circulation* 122, 993–1003
- Uhl EW, Warner NJ (2015): Mouse Models as Predictors of Human Responses: Evolutionary Medicine. *Curr Pathobiol Rep* 3, 219–223
- Ulm S, Liu W, Zi M, Tsui H, Chowdhury SK, Endo S, Satoh Y, Prehar S, Wang R, Cartwright EJ, Wang X (2014): Targeted deletion of ERK2 in cardiomyocytes attenuates hypertrophic response but provokes pathological stress induced cardiac dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 72, 104–116
- van der Pijl R, Strom J, Conijn S, Lindqvist J, Labeit S, Granzier H, Ottenheijm C (2018): Titin-based mechanosensing modulates muscle hypertrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 9, 947–961
- van der Pol A, Hoes MF, de Boer RA, van der Meer P (2020): Cardiac foetal reprogramming: a tool to exploit novel treatment targets for the failing heart. *J Intern Med* 288, 491–506
- Walsh K (2006): Akt signaling and growth of the heart. *Circulation* 113, 2032–2034
- Wang D, Gladysheva IP, Fan THM, Sullivan R, Houng AK, Reed GL (2014): Atrial natriuretic peptide affects cardiac remodeling, function, heart failure, and survival in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Hypertension* 63, 514–519
- You J, Wu J, Zhang Q, Ye Y, Wang S, Huang J, Liu H, Wang X, Zhang W, Bu L, et al. (2018): Differential cardiac hypertrophy and signaling pathways in pressure versus volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 314, H552–H562
- Zavala MR, Díaz RG, Medina AJ, Acosta MP, Escudero DS, Ennis IL, Pérez NG, Villa-Abrille MC (2019): p38-MAP Kinase Negatively Regulates the Slow Force Response to Stretch in Rat Myocardium through the Up-Regulation of Dual Specificity Phosphatase 6 (DUSP6). *Cell Physiol Biochem* 52, 172–185

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater PD Dr. Dr. Moritz Schnelle sowie Prof. Dr. Karl Toischer, für die Möglichkeit, dieses spannende Thema bearbeiten zu können und eine hervorragende Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten erhalten zu haben. Insbesondere PD Dr. Dr. Moritz Schnelle möchte ich für die perfekte Planung des Projektes, die stets anregende Unterstützung, die Motivation, die schnellen Antworten auf jegliche Fragen und die stete Begeisterung für die Wissenschaft, die auch meine weitere Laufbahn beeinflusst hat, danken.

Mein Dank geht auch an das gesamte Toischer-Schnelle-Seidler-Labor für die herzliche Betreuung im Labor, die vielen Ratschläge und helfenden Hände. Dabei möchte ich insbesondere Manar für die enge Zusammenarbeit und die schönen Erfahrungen sowie Eric und Dawid für die weitere Unterstützung danken.

Ein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dörthe Katschinski für die Zweitbetreuung meiner Dissertation und die Unterstützung und anregenden Gedanken.

Mein Dank geht ebenfalls an die Mäuse, die für diese wissenschaftliche Arbeit ihr Leben lassen mussten und an alle Beteiligten, die sich um die Tiere gekümmert haben.

Ich danke Clarissa Ahlers für die Hilfe bei der Erstellung und Bearbeitung der Grafiken.

Abschließend danke ich der IRTG 1816 sowie der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle, persönliche und ideelle Förderung während meiner Forschungszeit, welche mir diese ermöglichten.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen nicht Teil der elektronischen Version dieser Arbeit.