

Aus dem Bereich Innere Medizin III  
Klinische und Experimentelle Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar  
(Prof. Dr. med. U. Laufs)

**Vaskuläre Effekte einer gezielten Herzfrequenzreduktion mittels I<sub>(f)</sub>-  
Kanalinhibition im Modell der ApoE-defizienten Maus und in Wildtyp-  
Mäusen**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

vorgelegt von: Christoph Maximilian Stamm  
geb. am: 31.07.1985 in Dillingen/ Saar

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>3</b>
1.1. Vaskuläre Effekte einer gezielten Herzfrequenzreduktion mittels $I_{(f)}$ -Kanalinhhibition im Modell der ApoE-defizienten Maus und in Wildtyp-Mäusen	3
1.2. Vascular effects of heart rate reduction by $I_{(f)}$ channel inhibition in ApoE-deficient and wildtype mice	6
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
2.1. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Herzfrequenz	12
2.2. Herzfrequenz und ihre Rolle für Atherogenese und endotheliale Dysfunktion	12
2.3. Herzfrequenz als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor	14
2.4. Determination der Herzfrequenz durch den $I_{(f)}$ / HCN-Ionenstrom	15
2.5. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	15
2.6. Bedeutung von oxidativem Stress für die Pathogenese der endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose	17
2.7. Vaskuläre Effekte von chronischem Stress	18
2.8. Fragestellung	20
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
3.1. Material	22
Verwendete Substanzen	22
Antikörper: Westernblot	26
Primer und Sonden: RT-PCR	27
Verwendete Kits	27
Geräte und Material	27
Versuchstiere	29
3.2. Methoden	29
Versuchstierbehandlung	29
Blutdruck und Herzfrequenz	31
Organentnahme	31
Angiotensin (ANG II)-Elisa	32
ACE-Aktivitäts-Assay	32
Pull-Down-Assay	33
Westernblot	34
NADPH-Oxidase-Assay	35
RT-PCR	35
Statistische Auswertung	36

<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
4.1. Effekte einer pharmakologischen Herzfrequenzreduktion durch Inhibition des I <sub>(f)</sub> -Kanals mit Ivabradin auf Herzfrequenz und Blutdruck in ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen	37
4.2. Effekte einer Reduktion der Herzfrequenz auf Komponenten des zirkulierenden und gewebeständigen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems	39
4.3. Einfluss von Ivabradin auf die Aktivität der NADPH-Oxidase sowie die Expression ihrer Untereinheiten Rac1 und p <sup>47phox</sup> in der thorakalen Aorta	42
4.4. Detektion einer herzfrequenzspezifischen Genexpression mittels Affymetrix „Genearray“	44
4.5. Effekte von chronischem Stress und pharmakologischer Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin auf die aortale Expression der endothelialen NO-Synthase und des AT1-Rezeptors	50
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>54</b>
5.1. Effekte einer Herzfrequenzreduktion auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	54
5.2. Die Reduktion der Herzfrequenz reguliert die Aktivität der NADPH-Oxidase und ihrer Untereinheiten Rac1 und p <sup>47phox</sup>	56
5.3. Frequenzspezifische vaskuläre Genexpression	58
5.4. Chronischer Stress beeinflusst den vaskulären Phänotyp	60
5.5. Mögliche klinische Bedeutung der Befunde	61
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>64</b>
<b>7. PUBLIKATIONEN/ DANKSAGUNG</b>	<b>79</b>
7.1. Publikationen und Abstract	79
7.2. Danksagung	79

# **1. Zusammenfassung**

## **1.1. Vaskuläre Effekte einer gezielten Herzfrequenzreduktion mittels $I_{(f)}$ -Kanalinhibition im Modell der ApoE-defizienten Maus und in Wildtyp-Mäusen**

### **Hintergrund**

Epidemiologische und klinische Untersuchungen weisen auf einen direkten Zusammenhang zwischen der in Ruhe gemessenen Herzfrequenz und kardiovaskulärer Morbidität sowie Mortalität hin. Studien zufolge ist auch chronischer, mentaler Stress möglicherweise mit kardiovaskulärer Mortalität assoziiert, wobei er zu einer Erhöhung der Herzfrequenz und zur endothelialen Dysfunktion führen könnte. Eine dauerhaft erhöhte Herzfrequenz ist in tierexperimentellen Untersuchungen mit maladaptiven Effekten auf strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Gefäßsystems verbunden. Vorbefunde der eigenen Arbeitsgruppe zeigen am Modell der Apolipoprotein-E-defizienten Maus, dass eine gezielte Herzfrequenzreduktion durch den  $I_{(f)}$ -Kanalinhibitor Ivabradin den vaskulären oxidativen Stress reduziert, die Endothelfunktion verbessert und atherosklerotische Manifestationen vermindert. In der Literatur beschriebene Zellkulturexperimente weisen darauf hin, dass möglicherweise pulsatile, von der Herzfrequenz abhängende Dehnungsreize, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System beeinflussen. Die zugrunde liegenden Signalwege sind bislang unzureichend verstanden. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Auswirkung einer Herzfrequenzreduktion am Modell der Apolipoprotein-E-defizienten Maus im Hinblick auf eine mögliche Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und von vaskulärem oxidativen Stress untersucht sowie anhand eines Genearrays die Induktion eines spezifischen vaskulären Phänotyps charakterisiert. Weiterhin untersuchten wir den Effekt von chronischem Stress auf den vaskulären Phänotyp in Wildtypmäusen.

### **Methoden und Ergebnisse**

Männliche ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden cholesterinreich gefüttert und parallel mit dem  $I_{(f)}$  Kanal-Inhibitor Ivabradin (20mg/ kg Körpergewicht per Trinkwasser) über 6 Wochen behandelt. Eine Kontrollgruppe erhielt Trinkwasser ohne Medikamentenzusatz. Im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkte Ivabradin eine Senkung der Herzfrequenz um 133 Schläge pro

Minute (~23%) ( $583 \pm 20$  vs.  $449 \pm 3$ ,  $p < 0,05$ ) ohne Auswirkungen auf den Blutdruck zu haben. Die Herzfrequenzsenkung veränderte weder die Angiotensin II-Konzentration noch die ACE-Aktivität im Plasma der Mäuse. Die Herzfrequenzsenkung reduzierte die aortale Proteinexpression des AT1-Rezeptors auf  $35,15 \pm 19\%$  ( $p < 0,05$ ) und die mRNA-Expression auf  $70 \pm 8\%$  ( $p < 0,05$ ). Die Senkung der Herzfrequenz führte zu einer Verminderung der NADPH-Oxidase-Aktivität in der Aorta auf  $48 \pm 6\%$  ( $p < 0,05$ ). Rac1-GST-PAK-Pull-Down-Assays zeigten eine auf  $41 \pm 3\%$  verminderte Aktivität von Rac1 im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Demgegenüber wirkte sich die Ivabradinbehandlung nicht auf die Proteinexpression von Rac1 und  $p^{47\text{phox}}$  aus, wenngleich es zu einer Senkung der Membrantranslokation von  $p^{47\text{phox}}$  auf  $39 \pm 5\%$  im Vergleich zur Kontrolle kam ( $p < 0,05$ ).

Die Untersuchung des spezifischen Genexpressionsmusters in der thorakalen Aorta der Maus mittels eines Genearrays und Pathway-Analysen zeigte eine Hochregulation verschiedener, primär mit einem muskulären Phänotyp assoziierten Gene (Tropomyosin 2: 2,399 (fold change), Troponin T3 (skeletal, fast): 5,738 (fold change) und Troponin I (skeletal, fast 2): 6,294 (fold change)). Pathway-Analysen zeigten darüber hinaus eine verstärkte Beteiligung MAP-Kinase assoziierter Signalwege unter gezielter Herzfrequenzreduktion. Daher wurden die Phosphorylierung von ERK und p38 in aortalen Homogenisaten der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse untersucht. Die Reduktion der Herzfrequenz mit Ivabradin führte zu einer verstärkten Proteinexpression des phosphorylierten ERK (p-ERK) ( $200 \pm 23\%$  vs. Kontrolle ( $p < 0,05$ )) und des phosphorylierten p38 (p-p38) ( $190 \pm 33\%$  vs. Kontrolle ( $p = 0,38$ )).

An Wildtypmäusen, die einem standardisierten Stressprotokoll für 28 Tage unterzogen wurden, zeigte sich unter chronischem Stress ein Anstieg der gemittelten Herzfrequenz ( $514 \pm 10$  vs.  $570 \pm 14$  Schläge pro Minute,  $p < 0,05$ ). Eine Ivabradinbehandlung reduzierte hingegen die Herzfrequenz der gestressten Mäuse im Mittel um 14,9% auf  $485 \pm 7$  Schläge pro Minute. Die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte wurden nicht beeinflusst. Darüber hinaus kam es unter Stress zu einer Reduktion der aortalen eNOS-mRNA-Expression auf  $84 \pm 3\%$  im Vergleich zu ungestressten Kontrollen ( $p < 0,05$ ). Die gleichzeitige Behandlung der gestressten Mäuse mit Ivabradin verhinderte die eNOS-Herabregulation. Das Stressprotokoll führte zu einer deutlichen Hochregulation der aortalen AT1-Rezeptor-mRNA-Expression auf  $168 \pm 18\%$ ,  $p < 0,05$ , wohingegen die Ivabradinbehandlung die stressinduzierte Hochregulation der AT1-Rezeptor-mRNA-Expression auf  $112 \pm 14\%$  (vs. Stress,  $p < 0,05$ ) abschwächte.

## **Zusammenfassung**

Eine durch Ivabradin hervorgerufene Herzfrequenzsenkung reduziert sowohl die AT1-Rezeptor-Expression sowie die Aktivität der NADPH-Oxidase als auch die Aktivität von Rac1 in der thorakalen Aorta der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus. Überdies wird die Membrantranslokation von p<sup>47phox</sup> vermindert. Die Behandlung mit Ivabradin ist mit einer vermehrten Expression muskulärer Strukturgene und der Phosphorylierung von MAP-Kinasen assoziiert.

In chronisch gestressten Mäusen wird eine Erhöhung der Herzfrequenz ohne signifikanten Einfluss auf den Blutdruck beobachtet. Eine Herzfrequenzreduktion normalisiert die aortale eNOS-mRNA-Expression und vermindert eine durch Stress vermehrte AT1-Rezeptor-mRNA-Expression.

Die Befunde weisen auf eine mögliche Bedeutung der Herzfrequenz als Regulator vaskulärer Funktion und Integrität hin und identifizieren die Herzfrequenz als Mediator vaskulärer Effekte von chronischem Stress. Die Reduktion der Herzfrequenz durch Blockade des I<sub>(f)</sub>-Kanals könnte somit eine Möglichkeit darstellen, die vaskuläre Integrität unter dem Einfluss von vaskulären Risikofaktoren zu bewahren.

## 1.2. Vascular effects of heart rate reduction by $I_{(f)}$ channel inhibition in ApoE-deficient and wildtype mice

### Background

Epidemiological and clinical trials refer to a positive association between resting heart rate and cardiovascular morbidity and mortality. Epidemiological evidence suggests a relation between chronic mental stress and cardiovascular disease by increasing heart rate and endothelial dysfunction. In animal trials, sustained elevation of heart rate might be associated with maladaptive effects on structural and functional vascular properties. Using a mouse model, our study group could already demonstrate a preventive effect of selective heart rate reduction with the  $I_{(f)}$  current inhibitor ivabradine. It led to a lower level of vascular oxidative stress, improved endothelial function and a reduced size of atherosclerotic plaque forming areas. Cell culture experiments indicate that stretch depending on heart rate could affect the renin-angiotensin-aldosterone-system. The underlying molecular mechanisms are not yet understood enough. So, we have investigated the effect of heart rate reduction on the expression of the renin-angiotensin-aldosterone-system and on the volume of vascular oxidative stress using an Apolipoprotein-E-deficient mouse model. It was also assumed that pharmacological heart rate reduction with ivabradine may induce the expression of a specific vascular phenotype. Moreover we have investigated the effect of chronic stress on the vascular phenotype in wildtype mice.

### Methods and Results

Male ApoE<sup>-/-</sup> mice fed a high cholesterol diet were treated with ivabradine (20mg/ kg per os via drinking water) or control for 6 weeks. Ivabradine reduced heart rate by 133 beats per minute (~23%) (583±20 vs. 449±3, p<0,05) but did not alter blood pressure. Heart rate reduction with ivabradine did not alter Angiotensin II concentration or ACE-activity in the plasma of ApoE<sup>-/-</sup> mice. Ivabradine-treatment decreased protein-expression of the Angiotensin-II type 1 (AT1) receptor to 35,15±19% of control (p<0,05) and mRNA-expression to 70±8% of control (p<0,05) in the thoracic aorta. Reduced heart rate was associated with reduction of the activity of the superoxide-producing NADPH-oxidase in the aorta (48±6%, p<0,05). Rac1 GST-PAK pull-down assays showed a reduced Rac1-activity to 41±3% of controls (p<0,05). Protein expressions of Rac1 and p<sup>47phox</sup> were not affected by ivabradine. However ivabradine decreased membrane translocation of p<sup>47phox</sup> to 39±5% (p<0,05).

To investigate the gene expression profile RNA was isolated from the thoracic aorta. A gene array and a pathway analysis showed an upregulation of several genes primarily associated with a muscular phenotype. In detail tropomyosin 2 by 2,399 (fold change), troponin T3 (skeletal, fast) by 5,738 (fold change) and troponin I (skeletal, fast 2) was upregulated by 6,294 (fold change) in the gene array. Pathway analysis showed increased involvement of MAP-Kinase associated pathways. Therefore we investigated phosphorylation of ERK and p38 in aortic homogenates of ApoE<sup>-/-</sup> mice. Heart rate reduction with ivabradine led to an increased expression of phosphorylated ERK (200±23% of control (p<0,05)) and phosphorylated p38 (190±33% of control (p=0,38)).

In wildtype mice that underwent a standardized stress protocol for 28 days stress increased heart rate (514±10 vs. 570±14 beats per minute, p<0,05) but did not alter blood pressure. Treatment with Ivabradine reduced heart rate by 14,9% to 485±7 beats per minute in the stressed group. Stress also reduced aortic eNOS-mRNA-expression to 84±3% compared to unstressed controls (p<0,05), whereas treatment with ivabradine was protective against eNOS-mRNA-downregulation under stress. Repetitive stress led to a marked upregulation of the aortic AT1-receptor-mRNA-expression to 168±18%, p<0,05. Heart rate reduction was able to attenuate stress-induced up-regulation of the AT1-receptor-mRNA-expression (112±14%, p<0,05 vs. stress).

### **Conclusions**

Heart rate reduction with ivabradine down-regulates AT1-receptor-expression and reduces activity of the NADPH-oxidase. Moreover it decreases activity of Rac1 and prevents membrane translocation of p<sup>47phox</sup>. Heart rate reduction by I<sub>(f)</sub> current inhibition is associated with increased expression of muscular structural genes and phosphorylation of MAP-kinases which might be linked to a contractile vascular phenotype.

Chronic stress increases heart rate but does not alter blood pressure in mice. Heart rate reduction prevents downregulation of eNOS and attenuates AT1-receptor-mRNA-expression in the thoracic aorta.

These findings indicate heart rate as a regulator of vascular function under the influence of chronic mental stress. Pharmacological inhibition of the I<sub>(f)</sub> current could represent an intervention to preserve vascular integrity in vascular disease.

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ANG II	Angiotensin II
ApoE <sup>-/-</sup>	Apolipoprotein E defizient (knockout)
Aqua dest.	Aqua destillata
bpm	Beats Per Minute (Schläge pro Minute)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA
cm	Zentimeter
conc.	Konzentration
d	Tag
d.h.	das heißt
DBP	Diastolischer Blutdruck
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemolumineszenz
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
et al.	et altera

FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMD	Flow Mediated Dilatation
g	Gramm, Erdanziehungskraft (bei Zentrifugen)
h	Stunde
HCL	Hydrochlorid
HCN	Hyperpolarisation Activated Channel
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HF	Herzfrequenz
HRM	High Range Marker
$I_{(f)}$	Ionenstrom über Funny/ HCN-Kanal im Sinusknoten
JAK2	Janus-Kinase 2
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
KCL	Kaliumchlorid
kg, KG	Kilogramm, Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LRM	Low Range Marker
Lsg.	Lösung
LyP	Lysepuffer
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
M, mM, $\mu$ mol	Molar, Milimolar, Mikromolar
mA	Miliamper

MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
mg, µg	Milligramm, Mikrogramm
min	Minute
ml, µl	Milliliter, Mikroliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidiertes LDL
p	p-Wert
p38	p38 MAPK
PAK-1	Serin/ Threonin-Proteinkinase 1
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkription
RT-PCR	Realtime-PCR
s.	siehe
s.g.	so genannt
SBP	Systolischer Blutdruck
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SOD	Superoxid-Dismutase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Unit
vs.	Versus
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

## **2. Einleitung**

### **2.1. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Herzfrequenz**

Die Herzfrequenz ist eine variable Größe des kardiovaskulären Systems und stellt einen grundlegenden Mechanismus dar, mit dem das Herz-Kreislauf-System die kardiale Auswurfleistung an einen individuell erforderlichen Bedarf anpasst. Das Produkt aus Herzfrequenz und Schlagvolumen, das Herz-Zeit-Volumen, bestimmt wesentlich die kardiale Auswurfleistung. Physiologischerweise korreliert die Herzfrequenz mit der Herzkraft positiv (Bowditch Effekt). Entsprechend erhöht eine Steigerung der Herzfrequenz die Kontraktionskraft, während eine Reduktion der Frequenz zu negativ inotropen Effekten führt<sup>98</sup>.

Die Herzfrequenz hat wesentlichen Einfluss auf die Koronarperfusion. Eine wichtige Rolle spielt dabei der Gradient zwischen diastolischem Aortendruck und rechtsatrialem Druck<sup>46</sup>. Da allein in der Diastole das Myokard so weit relaxiert ist, dass der endokardiale Strömungswiderstand überwunden werden kann, ist die Koronarperfusion und in Folge dessen eine myokardiale Blutversorgung hauptsächlich in der Diastole möglich<sup>17</sup>. Mit ansteigender Herzfrequenz nimmt der Anteil der Diastole am Herzzyklus und somit die Koronarperfusion ab. Bedeutsam wird dieser Zusammenhang vor allem bei der koronaren Herzerkrankung (KHK). In gesunden, nicht atherosklerotisch veränderten Koronargefäßen, kompensiert eine metabolische Vasodilatation die verkürzte Diastolen- und Perfusionsdauer<sup>4</sup>. In atherosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten ist diese autoregulatorische Kapazität zum Teil deutlich eingeschränkt<sup>45</sup>. Unter klinischen Gesichtspunkten führt dann eine weitere Frequenzsteigerung zur koronaren Insuffizienz und folglich zu pectanginösen Beschwerden. Eine Herzfrequenzsenkung kann bei KHK-Patienten über eine Diastolenverlängerung zu einer verbesserten Sauerstoffbalance und zu einer Linderung der Angina pectoris führen<sup>44,45,47</sup>.

### **2.2. Herzfrequenz und ihre Rolle für Atherogenese und endotheliale Dysfunktion**

Tierexperimentelle Arbeiten beschreiben einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Ruhe-Herzfrequenz und der Pathogenese endothelialer Dysfunktion bis hin zur Atherogenese. So konnten Beere und Kollegen bereits in den 1980er Jahren zeigen, dass Affen, die aufgrund einer Sinusknotenablation eine reduzierte Herzfrequenz aufwiesen, in geringerem Maße koronare atherosklerotische Läsionen entwickelten als unbehandelte Vergleichstiere<sup>6</sup>. Kaplan et al. haben darüber hinaus bei Affen einen Zusammenhang zwischen einer Herzfrequenzerhöhung durch psychischen Stress und der Entwicklung koronarer Atherosklerose nachweisen können<sup>75,100</sup>. Untersuchungen von Korshunov und Berk an Mäusen zeigten, dass die Herzfrequenz, unabhängig vom systolischen Blutdruck, die Morphologie der Gefäßmedia beeinflusst<sup>57</sup>.

Experimente der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass eine gezielte, medikamentöse Reduktion der Herzfrequenz um etwa 73 Schläge pro Minute (~13,4%), durch Inhibition des  $I_{(f)}$ -Kanals am Sinusknoten cholesterinreich gefütterter ApoE<sup>-</sup>-Mäuse, zu einer verminderten Entstehung atherosklerotischer Gefäßläsionen in der thorakalen Aorta führt. Als diesen Befunden zugrundeliegender Mechanismus wurde eine Verbesserung der endothelabhängigen Vasorelaxation nachgewiesen. Unabhängig von Blutdruck und Lipidwerten ließ sich in diesen Experimenten eine Verbesserung der Endothelfunktion durch eine medikamentöse Behandlung mit dem  $I_{(f)}$ -Kanal Inhibitor Ivabradin nachweisen<sup>5,20</sup>. Die Arbeitsgruppe konnte weitere diesen Befunden zugrundeliegende Mechanismen identifizieren. So führt eine Herzfrequenzreduktion zu einer verminderten Expression des monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) und einer Reduktion von vaskulärem oxidativen Stress<sup>20</sup>.

Ein weiterer möglicher pro-atherogener Mechanismus, der durch eine erhöhte Herzfrequenz potentiell beeinflusst wird, ist oszillatorischer Scherstress. Scherstress ist die auf die Gefäßinnenwand wirkende, tangentielle Kraft in Stromrichtung des Blutes<sup>16</sup>. Niedrige Herzfrequenzen führen möglicherweise zu laminarer Strömung und damit zu einer Optimierung des Scherstress<sup>30,102</sup>. In Zellkulturexperimenten konnte eine Aktivierung gefäßprotektiver Signalkaskaden durch eine Reduktion der Frequenz des pulsatorischen Scherstress nachgewiesen werden. Dies führt unter anderem zu einer verminderten Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle wie dem vascular cellular adhesion molecule (VCAM) und dem MCP-1<sup>48</sup>. Eine Scherstressfrequenz von 1 Hz (60 Perioden/ min) konnte in dieser Arbeit, im Gegensatz zu höheren Frequenzen, als atheroprotektiv identifiziert werden. Darüber hinaus führt Scherstress zu einer erhöhten Steifigkeit von glatten Gefäßmuskelzellen

107,125

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass bei kardiovaskulär bislang nicht erkrankten gesunden Probanden eine erhöhte Herzfrequenz mit einer gesteigerten Expression von Entzündungsmarkern wie CRP, Leukozyten und Fibrinogen assoziiert war<sup>92,95</sup>. Eine Studie von Heidland et. al zeigte, dass bei Patienten mit KHK das Risiko einer koronaren Plaqueruptur positiv mit der Herzfrequenz verknüpft war<sup>41</sup>. Dies weist darauf hin, dass die Herzfrequenz auch durch direkte mechanische Effekte Einfluss auf die Gefäß- und Plaquemorphologie nehmen könnte. Experimentelle Untersuchungen zeigen dabei, dass die Plaqueruptur über eine veränderte Expression der Matrix-Metalloproteinase-1 erleichtert werden könnte<sup>53,69</sup>.

### **2.3. Herzfrequenz als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor**

Neben den genannten experimentellen Beobachtungen weisen epidemiologische und klinische Studien darauf hin, dass eine erhöhte Ruheherzfrequenz mit vermehrter kardiovaskulärer Sterblichkeit assoziiert ist<sup>90</sup>. Belege für einen grundlegenden Zusammenhang zwischen der Herzfrequenz und kardiovaskulären Erkrankungen stammen aus prospektiven Kohortenstudien. Daten der Framingham Studie und eine Reihe weiterer epidemiologischer Untersuchungen demonstrieren eine relevante Assoziation zwischen der Höhe der mittleren Herzfrequenz und der mittleren Überlebenszeit für Personen ohne bekannte kardiovaskuläre Erkrankungen<sup>7,29,51,52,60</sup>. Dieser Zusammenhang besteht, unabhängig von begleitenden kardiovaskulären Risikofaktoren, sowohl für die Gesamtmortalität als auch für die kardiovaskuläre Mortalität und lässt sich ebenfalls unabhängig von Alter und Geschlecht in Populationen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund beobachten. Auch für Personen mit bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, koronarer Herzerkrankung, Myokardinfarkt oder Herzinsuffizienz konnte ein relevanter Zusammenhang zwischen der Herzfrequenz und der kardiovaskulären Mortalität nachgewiesen werden<sup>10,19,49</sup>. Demnach beeinflusst die Herzfrequenz sämtliche Krankheitsentitäten entlang des kardiovaskulären Kontinuums. Die europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC) berücksichtigt die Herzfrequenz in ihren Leitlinien zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen als einen potentiellen kardiovaskulären Risikofaktor<sup>37</sup>.

## 2.4. Determination der Herzfrequenz durch den $I_{(f)}$ / HCN-Ionenstrom

Die Herzfrequenz basiert auf der spontanen Aktivität von Zellen des Sinusknotens. Im Sinusknoten ist ein unselektiver, unter Hyperpolarisation öffnender, s.g. HCN (hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated)-Kanal lokalisiert. Über diesen läuft während der Diastole der Schrittmacherstrom  $I_{(f)}$ , der zu einer kontinuierlichen Depolarisation der Zellen führt<sup>27</sup>. Demnach folgt oberhalb eines Schwellenwertes ein Aktionspotential, welches weitergeleitet wird und zu einer kontrollierten Myokardkontraktion führt. Physiologischerweise erfolgt eine Steigerung der Herzfrequenz über eine Modifikation des  $I_{(f)}$ -Kanals, indem Katecholamine wie Noradrenalin die Adenylatzyklase stimulieren und so cAMP freigesetzt wird, welches direkt am  $I_{(f)}$ -Kanal bindet<sup>13</sup>. Dadurch wird die Öffnung des Kanals erleichtert und die erforderliche Aktivierungsspannung zu positiveren Werten verschoben<sup>27</sup>. Mit Hilfe von  $\beta$ -Blockern ist es deshalb möglich, die Herzfrequenz über eine Abnahme der cAMP-Spiegel indirekt zu senken. Betablocker wirken darüber hinaus negativ inotrop, dromotrop und führen zu einer Blutdrucksenkung (s. Lehrbücher der Pharmakologie).

Eine gezielte Hemmung des Schrittmacherstroms  $I_{(f)}$  ist mittels Ivabradin möglich<sup>26</sup>. Dieser Wirkstoff bindet von intrazellulär an den  $I_{(f)}$ -Kanal und führt zu einer dosisabhängigen Inhibition. Dadurch wird die Anstiegssteilheit der diastolischen Spontandepolarisation gesenkt und somit nur die Schlagfrequenz der Sinusknotenzellen moduliert. Die Morphologie und die Dauer des Aktionspotentials bleibt dabei unverändert. Ivabradin senkt die Herzfrequenz ohne negativ dromotrope und inotrope Effekte auszuüben oder den Blutdruck zu senken. Der  $I_{(f)}$ -Kanal-Inhibitor Ivabradin wird unter dem Handelsnamen Procoralan® in der klinischen Therapie insbesondere der stabilen koronaren Herzerkrankung eingesetzt<sup>26</sup>.

## 2.5. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein grundlegendes vaskuläres Regulationsinstrument und Ziel möglicher pharmakologischer Intervention.

Das in der Leber gebildete Präkursorprotein Angiotensinogen wird durch das in der Niere synthetisierte und frei im Blut zirkulierende Renin gespalten. Dabei entsteht Angiotensin I,

welches durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) in das biologisch aktive Angiotensin II (ANG II) umgewandelt wird<sup>72</sup>. Dieses stellt den Haupteffektor des RAAS dar und wirkt vornehmlich über den Angiotensin II Rezeptor-Typ 1 (AT1-Rezeptor). Dieser Signalweg induziert eine Vasokonstriktion und die Synthese des Mineralkortikoids Aldosteron in der Nebenniere. Somit nimmt das RAAS Einfluss auf den Blutdruck und die Wasser -sowie Kochsalzrestriktion in den Tubuli der Niere. Bei all dem ist das RAAS einem negativen Feedbackmechanismus unterworfen<sup>80</sup>.

Die zentralen Effekte des ANG II werden über den AT1-Rezeptor vermittelt. Intrazelluläre Signalwege führen mittels der Aktivierung dieses G-Protein gekoppelten Rezeptors zur Hypertrophie, Migration und Apoptose von VSMCs und anderen Gewebetypen, was wesentlich für die pathophysiologische Bedeutung des AT1-Rezeptors ist<sup>123</sup>. Der AT1-Rezeptor unterliegt einer Regulation durch verschiedene Faktoren. So zeigten bislang mehrere Arbeiten, dass die AT1-Rezeptor-Expression neben einem negativen Feedback zwischen ANG II und dem AT1-Rezeptor einer Regulation durch das proinflammatorische Zytokin IL-6 und einer Hypercholesterinämie unterliegen, welche beide zu einer Hochregulation des AT1-Rezeptors führen<sup>123</sup>.

In ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen gelang der Nachweis einer direkten, pro-atherogenen Wirkung von ANG II unter einer zentralen und unmittelbaren Beteiligung und Vermittlung des AT1-Rezeptors. Im Gegensatz zu Kontrolltieren entwickelten Mäuse, die mit ANG II behandelt wurden, vermehrt atherosklerotische Läsionen. Dieser Effekt wurde direkt über den AT1-Rezeptor vermittelt, wie Experimente an AT1 knock out-Mäusen belegten<sup>120</sup>.

Neben den genannten Regulatoren des AT1-Rezeptors beschreiben verschiedene experimentelle Arbeiten eine mögliche Regulation der Expression des Rezeptors durch hämodynamische bzw. mechanische Faktoren. Stanley et al. untersuchten den Einfluss von zyklischen, mechanischen Dehnungsreizen (Cyclic Strain) und von ANG II auf die Matrix Genexpression und die Proteinsynthese humaner, glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs). Wesentlicher Befund der genannten Arbeit ist eine ANG II-unabhängige Hochregulation des AT1-Rezeptors sowie von Kollagen und Fibronectin durch zyklische Dehnungsreize<sup>106</sup>. Dieser repetitive, pulsatile mechanische Stress ist im Gefäßsystem durch den Pulsdruck und die Herzfrequenz definiert. Ob diese Faktoren, und insbesondere die Herzfrequenz, die Regulation des AT1-Rezeptors beeinflussen, ist bislang noch nicht untersucht worden.

Zou et al.<sup>131</sup> beschrieben die Bedeutung des AT1-Rezeptors und dessen Aktivierungswege an Kardiomyozyten. Dabei stellten sie fest, dass Dehnungsreize (Stretch) zu einer ANG II-unabhängigen Aktivierung sowohl des AT1-Rezeptors als auch des JAK2-Signalweges führt. Obwohl nur an Kardiomyozyten untersucht<sup>56</sup>, könnte dies möglicherweise auch im Gefäßsystem von Bedeutung sein.

## **2.6. Bedeutung von oxidativem Stress für die Pathogenese der endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose**

Freie Sauerstoffradikale (reactive oxygen species= ROS) spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose<sup>39</sup>. Es handelt sich um kurzlebige Moleküle, die hochgradig bioreaktiv sind. Ein vermehrtes Auftreten von ROS, in Verbindung mit einer verminderten Kapazität antioxidativer Systeme, führt zu oxidativem Stress<sup>121</sup>. ROS entstehen, indem molekularer Sauerstoff reduziert wird. Dies ist ein Prozess, an dem zahlreiche oxidative und antioxidative Enzyme und Substrate beteiligt sind. Neben der im Purinstoffwechsel wichtigen Xanthin-Oxidase und der für die Leukozyten typischen Myeloperoxidase, ist die NADPH-Oxidase ein wichtiger Radikalproduzent des Gefäßsystems. Sie überträgt Elektronen über FAD auf Sauerstoff, wodurch Superoxid-Anionen entstehen, welche über den Zwischenschritt von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> schließlich ROS bilden<sup>121</sup>. Neben O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sind dies u.a. Peroxynitrite und Lipidradikale. Antioxidativ wirkt neben der Glutathionperoxidase und der Catalase insbesondere die Superoxid-Dismutase (SOD), welche Superoxid-Radikale in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> umwandelt<sup>121</sup>. Unter normalen Bedingungen, steht die physiologische ROS-Produktion im Gleichgewicht. Verstärkter Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren kann zu einer Dysregulation der beteiligten Enzyme führen und somit oxidativen Stress fördern<sup>121</sup>.

Die NADPH-Oxidase spielt eine bedeutende Rolle im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose. Dies belegen unter anderem experimentelle Arbeiten, die zeigen, dass sie in atherosklerotisch veränderten Gefäßarealen vermehrt exprimiert und aktiviert ist<sup>101,105</sup>. Bei der NADPH-Oxidase handelt es sich um einen Enzymkomplex, der aus verschiedenen Untereinheiten besteht. Diese sind die membranöse Untereinheit gp<sup>91phox</sup> und p<sup>22phox</sup> sowie die zytosolischen Komponenten p<sup>67phox</sup>, p<sup>47phox</sup> und die kleine GTPase Rac1<sup>121</sup>. Diese einzelnen Bestandteile werden in verschiedenen Schichten der Gefäßwand unterschiedlich exprimiert<sup>63</sup>

und die Aktivierungswege sowie resultierende Radikalproduktionen variieren. Agonisten sind unter anderem Wachstumsfaktoren<sup>99</sup>, Lipide<sup>42,83</sup> und Scherstress<sup>24</sup>. Die NADPH-Oxidase wird aber insbesondere durch Angiotensin II aktiviert, indem dieses am G-Protein gekoppelten AT1-Rezeptor bindet<sup>38,78</sup>. Im Folgenden wird über die Proteinkinase C (PKC) die zytosolische Komponente  $p^{47\text{phox}}$  aktiviert und somit die ROS-Produktion initiiert. Das phosphorylierte  $p^{47\text{phox}}$  kann nun zusammen mit  $p^{67\text{phox}}$  den membranständigen Komplex aus  $gp^{91\text{phox}}$  und  $p^{22\text{phox}}$  binden und so das aktive Oxidase-Enzym bilden<sup>3,25,61</sup>.  $p^{47\text{phox}}$  wird dabei als Adapter angesehen, der die Verbindung von  $p^{67\text{phox}}$  mit dem membranständigen Komplex erleichtert<sup>34,58</sup>. Wichtig für die Funktion der NADPH-Oxidase ist die kleine GTPase Rac1. Angiotensin II erhöht die Rac1-Expression und verstärkt die Aktivität sowie Translokation innerhalb von VSMCs<sup>67,99</sup>. Die Hauptfunktion des aktivierten Rac1 besteht in einer Stabilisierung der Interaktion von  $p^{67\text{phox}}$  mit dem membranständigen Komplex der NADPH-Oxidase und einer dadurch vermehrten ROS-Produktion<sup>33,127</sup>.

Die physiologische Vasorelaxation unterliegt im Wesentlichen dem Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO). Eine Verschlechterung der Endothelfunktion ist durch eine verminderte Synthese von NO und konsekutiv durch eine Abnahme der endothelabhängigen Vasorelaxation gekennzeichnet<sup>64,65</sup>. Durch die Abnahme der NO-Wirkung werden in der Folge vermehrt chemotaktische und proinflammatorische Zytokine sowie Adhäsionsmoleküle exprimiert, wodurch eine vermehrte Interaktion zwischen Gefäßendothel und verschiedenen Zellen, wie beispielsweise Monozyten, gefördert und eine vaskuläre Inflammation initiiert wird<sup>121</sup>. Durch Einwirkung freier Sauerstoffradikale werden darüber hinaus Lipidbestandteile oxidiert und redox-sensitive Gene wie der oxLDL-Rezeptor exprimiert. In Folge dessen werden vermehrt oxLDL in die Gefäßwand aufgenommen, was zur Bildung von Schaumzellen und so genannten „fatty streaks“ führt. Darüber hinaus proliferieren die VSMCs, sodass das betroffene Gefäß zunehmend steifer wird und sich eine atherosklerotische Läsion entwickelt<sup>121</sup>. Die genannten Mechanismen führen zusammen mit einer oxidativen Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase-1<sup>69</sup> zu einer Destabilisierung und letztlich Ruptur der gebildeten Plaques<sup>121</sup>.

## **2.7. Vaskuläre Effekte von chronischem Stress**

Psychosoziale Erkrankungen bedingen eine erhöhte kardiovaskuläre Sterblichkeit. Epidemiologische Untersuchungen identifizieren Erkrankungen wie Depression, chronischen Stress und individuelle Charakterzüge wie Feindseligkeit oder Ängstlichkeit als unabhängige Risikofaktoren für atherosklerotisch bedingte Gefäßerkrankungen <sup>76,93,96,109</sup>. Der kausale Zusammenhang zwischen chronischem Stress, depressiver Symptomatik und vaskulärer Pathologie ist bislang unklar und die zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen weitgehend unbekannt. Während psychosoziale Faktoren bestehende kardiovaskuläre Risikofaktoren durch Lebensstil -und Verhaltensmuster (z.B. Nikotinkonsum) modifizieren, bzw. aggravierern, induzieren sie auch direkte neuro-humorale Effekte und fördern auf diese Weise möglicherweise unmittelbar pathologische vaskuläre Prozesse <sup>2,55</sup>. Klinische Studien konnten zeigen, dass die pathophysiologischen Wirkungen von Stress mittelfristig u.a. eine Herabsetzung der Herzfrequenzvariabilität und sekundäre Veränderungen wie eine Beeinflussung von Gerinnungsparametern (Zunahme der Plättchenaggregation) und des Lipidstoffwechsels <sup>15,32,40</sup> umfassen. Tierexperimentelle Arbeiten wiesen darauf hin, dass chronischer, mentaler Stress insbesondere zu einer Steigerung der Herzfrequenz ohne signifikante Beeinflussung der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte führt <sup>22</sup>.

Wesentliche Voraussetzung für ein intaktes Gefäßsystem ist ein funktionelles Gefäßendothel. Wie eingangs beschrieben, steht eine Einschränkung oder Störung der Endothelfunktion am Beginn der Entwicklung atherosklerotischer Gefäßveränderungen. Klinische Untersuchungen weisen darauf hin, dass es im Rahmen von posttraumatischen Belastungsstörungen sowie auch durch psychischen Stress, induziert durch standardisierte Testsituationen, zu einer endothelialen Dysfunktion kommen kann <sup>35,116</sup>. Vorbefunde der eigenen Arbeitsgruppe können zeigen, dass Wildtyp-Mäuse (129 SV), die über einen Zeitraum von 4 Wochen einem chronischen Stressparadigma unterzogen wurden, im Vergleich zu nicht gestressten Kontrolltieren eine signifikant schlechtere endothelabhängige Vasodilatation, als Marker der endothelialen Funktion, aufweisen <sup>22</sup>. Die Mechanismen, die diesen basalen Befunden zugrunde liegen, sind bislang nicht bekannt.

Allerdings besteht, wie genannt, eine wesentliche physiologische Reaktion auf Stressreize in einem Anstieg der Herzfrequenz. Und eine dauerhaft erhöhte Ruhe-Herzfrequenz stellt einen unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor dar, dessen pathophysiologische Bedeutung durch epidemiologische und klinische Studien untermauert wird <sup>15,20,32</sup>. Dabei ist eine gesteigerte kardiovaskuläre Reaktivität im Rahmen von chronischem Stress durch eine

überschießende oder persistierende sympathische Aktivierung gekennzeichnet und mit einer gesteigerten kardiovaskulären Morbidität verknüpft <sup>40</sup>.

Deshalb hat unsere Arbeitsgruppe im Vorfeld untersucht, ob eine gezielte Herzfrequenzreduktion mittels Ivabradin die durch chronischen Stress induzierte endotheliale Dysfunktion optimieren kann. Tatsächlich konnten Custodis et al. an Tierexperimenten bereits zeigen, dass dies gelingt. Denn die endothelabhängige Vasorelaxation konnte durch Herzfrequenzsenkung in der gestressten Gruppe verbessert werden <sup>22</sup>.

Somit stellt sich die Frage, über welche Signalwege eine Herzfrequenzreduktion die endotheliale Funktion chronisch gestresster Mäuse verbessern könnte. Dabei ist zu bedenken, dass an der Gefäßwand atherogene (z.B. Endothelin-1 und Angiotensin II) und protektive (z.B. NO und Prostaglandine) Mediatoren alterieren <sup>104</sup>. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Koronargefäße von Patienten mit bekannter Atherosklerose unter mentalem Stress eher zur Vasokonstriktion neigen, anstatt der erwarteten Vasodilatation <sup>128</sup>. Dies liegt u.a. an einem Mangel der Flow Mediated Dilatation (FMD) und ist von einem Überwiegen von Adhäsionsmolekülen begleitet <sup>88</sup>. Unter Stress sind demnach Endothelin <sup>82</sup> und Angiotensin II <sup>59</sup> verstärkt nachweisbar und ein Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist ist in der Lage, eine stressinduzierte Endotheldysfunktion zu minimieren <sup>103</sup>. Klinische Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass mentaler Stress zu einer verstärkten ROS-Produktion führt und auf diesem Wege die endotheliale Funktion beeinträchtigt <sup>102</sup>.

## 2.8. Fragestellung

Epidemiologische Studien weisen auf eine positive Assoziation zwischen kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität und der unter Ruhebedingungen gemessenen Herzfrequenz hin. Eine erhöhte Herzfrequenz wird im Rahmen von chronischem Stress beobachtet. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen, dass die Herzfrequenz maladaptive Effekte auf strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Gefäßsystems ausübt. Dabei weisen sie auf eine enge Beziehung zwischen Herzfrequenz, endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose hin. Mittels des  $I_{(f)}$ -Kanal Inhibitors Ivabradin ist eine gezielte pharmakologische Reduktion der Herzfrequenz möglich. Durch diese Intervention konnte in Vorbefunden der Arbeitsgruppe an ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion von vaskulärem

oxidativen Stress kommt. Die Reduktion der Herzfrequenz führte zu einer Protektion der endothelialen Integrität sowie zu einer Verminderung atherosklerotischer Manifestationen<sup>20</sup>. Aus der Literatur bekannte Ergebnisse von Zellkulturexperimenten deuten darauf hin, dass pulsatile Dehnungsreize die Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems beeinflussen<sup>106</sup>. Direkte Effekte der Herzfrequenz und die Auswirkung einer gezielten Herzfrequenzreduktion hinsichtlich der Expression und Regulation einzelner Bestandteile des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems im Gefäßsystem, könnten dazu beitragen, die bislang erhobenen Befunde umfassend zu verstehen. In diesem Zusammenhang ergeben sich daher die folgenden Fragestellungen:

- 1.) Welchen Einfluss hat eine pharmakologische Herzfrequenzreduktion durch den  $I_{(f)}$ -Kanal-Inhibitor Ivabradin auf die Aktivität und die Expression einzelner Bestandteile des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems im Modell der cholesterinreich gefütterten ApoE<sup>-</sup>-Maus?
- 2.) Unterliegt die Aktivität der NADPH-Oxidase einer Regulation durch die Herzfrequenz? Wird die Expression und die Aktivität der Untereinheiten der NADPH-Oxidase, Rac1 und p<sup>47phox</sup>, durch eine Herzfrequenzreduktion beeinflusst?
- 3.) Existieren spezifisch durch die Herzfrequenz, bzw. durch eine pharmakologische Reduktion der Herzfrequenz regulierte Gene?
- 4.) Welchen Effekt hat chronischer Stress auf den vaskulären Phänotyp von Wildtypmäusen (129 SV-Mäuse)? Unterliegt die Expression der eNOS und des AT1-Rezeptors einer Regulation durch chronischen Stress? Beeinflusst eine Behandlung chronisch gestresster Mäuse mit Ivabradin die Expression der eNOS und des AT1-Rezeptors?

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### Verwendete Substanzen

**Acrylamide 30%**, Bio Rad, München, DE

**Algezid II**, Special Biocide AGFA-Photo GmbH, Leverkusen, DE

**Ammonium Persulfate (APS)**, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE

**Ampuwa**, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DE

**Aprotinin**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

**Bromphenol Blue Indicator**, E. Merck, Darmstadt, DE

**Chloroform**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

**Complete-Tablette**, Roche Diagnostics, Mannheim, DE

**Developer A (for medical x-ray film processing)**, AGFA-Healthcare, Mortsel, Belgien

**Developer B (for medical x-ray film processing)**, AGFA-Healthcare, Mortsel, Belgien

**Dithiothreitol (DTT)**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

**Di-Kaliumhydrogenphosphat**, Merck, Darmstadt, DE

**Dinatriumhydrogenphosphat**, E. Merck, Darmstadt, DE

**Ethanol (absolut)**, Merck KGaA, Darmstadt, DE

**Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

**Glycerol**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

**Glycin**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

**HCL (conc.)**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

**Hepes**, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE

**Igepal CA-630**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

**Ivabradin**, (Ivabradine, hydrochloride salt (S 16257-2)) ®, Servier, FR

**2-Propanol (Isopropanol)**, Merck, Darmstadt, DE

**Kaliumchlorid**, Merck, Darmstadt, DE

**Kaliumdihydrogenphosphat**, Merck, Darmstadt, DE

**Ketamin**, Pfizer, Berlin, DE

**Leupeptin**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

**Low Range, Prestained SDS-Page Standards**, Bio-Rad, Hercules, CA, USA

**Lucigenin**, Fluka, Seelze, DE  
**Magnesiumchlorid**, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE  
**2-Mercapto-Ethanol**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA  
**Methanol**, Merck KGaA, Darmstadt, DE  
**Milchpulver**, Sucofin, TSI GmbH, Zeven, DE  
**NADPH**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA  
**Natriumchlorid**, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE  
**Natriumfluorid**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA  
**Natriumhydroxid**, Merck, Darmstadt, DE  
**peqGOLD RNA-Pure**, peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE  
**Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)**, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA  
**Rac/cdc42 Assay Reagent (PAK1PBD, agarose conjugate)**, Millipore, Temecula, CA, USA  
**Rapid Fixer (for medical x-ray film processing)**, AGFA-Gevaert AG, Mortsel, Belgien  
**Sodiumdeoxycholate**, Merck, Darmstadt, DE  
**Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)**, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE  
**Sodiumorthovanadate**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA  
**Sucrose**, Merck, Darmstadt, DE  
**SYBR Green PCR Master Mix**, Applied Biosystems, Warrington, UK  
**N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA  
**Taqman Gene Expression Mastermix**, Applied Biosystems, Warrington, UK  
**Tris[hydroxymethyl]aminomethan (TRIS, TRIZMA-Base)**, VWR, Leuven, Belgien  
**TWEEN 20**, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Saint Louis, MO, USA  
**Western-type Diet**, (21% Fett, 19,5% Kasein und 1,25% Cholesterin), ssniff, Soest, DE  
**Xylazine**, Bayer, Leverkusen, DE

### **Verwendete Puffer und Lösungen**

Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Mengenangaben der Pufferbestandteile auf ein Endvolumen von 1000ml.

<b>Elektrophoresepuffer</b>	720g Glycin  51,5g Tris  50g SDS
-----------------------------	--

	ad 5000ml Ampuwa
<b>Entwickler-Lösung</b>	(2.5l) Aqua dest.: 1.25l, Developer A: 1l, Developer B: 0.25l
<b>Fixierer-Lösung</b>	(2.5l) Aqua dest.: 2l, Rapid Fixer: 0.5l
<b>Kalium-Phosphat-Puffer</b>	5,24g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  12,193g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  0,05 molare Lsg. mit Ampuwa herstellen  51,3g Sucrose
<b>Ladepuffer (Westernblot)</b>	2,0ml Glycerol  2,0ml SDS (10%)  0,25mg Bromphenolblau  2,5ml Stacking Gel Puffer  ad 9,5ml Ampuwa  und frisch 25µl DTT/ 475µl Ladepuffer
<b>Lysepuffer (Gesamtprotein)</b>	5ml Tris (1M)  20ml SDS (10%)  10ml Glycerol  ad 15ml Ampuwa  und frisch: 1µl PMSF und 1µl Leupeptin/ ml LyP sowie 1µg Aprotinin/ ml LyP
<b>MLB-Puffer (100ml)</b>	23,83g 25mM Hepes  5,844g 150mM NaCl  1ml 1% Igepal CA-630

	<p>0,25g 0,25% Natriumdeoxycholate</p> <p>10ml 10% Glycerol</p> <p>4,199g 25mM NaF</p> <p>20,33g 10mM MgCl<sub>2</sub></p> <p>200µl 1mM EDTA</p> <p>100µl 1mM Natriumorthovanadate</p> <p>Frisch 10µl Leupeptin und 10µg Aprotinin/ ml MLB-Puffer</p>
<b>10x PBS</b>	<p>80g NaCl</p> <p>2g KCl</p> <p>2,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></p> <p>14,4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></p> <p>pH 7,4</p>
<b>PBS Tween</b>	1l PBS + 10ml Tween
<b>Sammelgel-Puffer</b>	TRIS: 12g, mit HCl [conc.] pH 6.8, mit Aqua dest. ad 200ml
<b>Stacking Gel Puffer</b>	<p>6,06g Tris</p> <p>4ml SDS (10%)</p> <p>ad 100ml Ampuwa, pH 6,8</p>
<b>Transferpuffer</b>	<p>2,9g Tris</p> <p>14,5g Glycin</p> <p>200ml Methanol</p>
<b>Trenngel-Puffer</b>	TRIS: 90.75g

	<p>mit HCl [conc] pH 8.8</p> <p>mit Aqua dest. ad 500ml</p>
<b>WB-Gel 10%</b>	<p><u>Sammel-Gel:</u></p> <p>30% Acrylamid/ Bis-Solution: 1,7ml, Sammelgel-Puffer: 1,25ml, 10%</p> <p>SDS: 100µl, 10% APS: 100µl, TEMED: 10µl, Aqua dest.: 6,8ml</p> <p><u>Trenn-Gel:</u></p> <p>30% Acrylamid/ Bis-Solution: 6,7ml, Trenngel-Puffer: 5,0ml, 10% SDS: 200µl, Aqua dest. : 7,9ml, 10% APS: 200µl, TEMED: 8µl</p>
<b>WB-Gel 12%</b>	<p><u>Sammel-Gel:</u></p> <p>30% Acrylamid/ Bis-Solution: 1,7ml, Sammelgel-Puffer: 1,25ml, 10%</p> <p>SDS: 100µl, 10% APS: 100µl, TEMED: 10µl, Aqua dest.: 6,8ml</p> <p><u>Trenn-Gel:</u></p> <p>30% Acrylamid/ Bis-Solution: 8ml, Trenngel-Puffer: 5ml, 10% SDS: 200µl, Aqua dest. : 6,6ml, 10% APS: 200µl, TEMED: 8µl</p>

**Antikörper: Westernblot**

**Anti-mouse IgG TRITC CONJUGATE: T6528**, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

**Anti-rabbit IgG (Perox): A-6154**, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Saint Louis, MO, USA

**Erk 1 (C-16): sc-93**, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

**GAPDH (6C5): sc-32233**, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA

**Rac Ak: clone 23A8 (Nr. 05-389)**, Upstate (Millipore), Billerica, USA  
**p<sup>47-phox</sup> (H-195): sc-14015**, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA  
**Phospho-p38 MAP Kinase (Thr 180/ Tyr 182) # 9211**, Cell Signaling, Danvers, MA, USA  
**Phospho-p44/ 42 MAPK (Thr 202/ Tyr 204) (E10) # 9106**, Cell Sign., Danvers, MA, USA  
**Phospho-SAPK/ JNK (Thr 183/ Tyr 185) (G9) # 9255**, Cell Signaling, Danvers, MA, USA  
**Rabbit polyclonal to Angiotensin II Type 1 Receptor (ab47162)**, Abcam, Cambridge, UK  
**Tropomyosin  $\beta$  (J-23): sc-134128**, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA  
**Troponin I-FS (B-7): sc-165982**, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA  
**Troponin T-FS (C-18): sc-8123**, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

### **Primer und Sonden: RT-PCR**

**eNOS, Mm00435204\_m1 Nos3**, Applied Biosystems, Warrington, UK  
**AT1, Mm00616371\_m1 Agtr1a**, Applied Biosystems, Warrington, UK  
**18s for: 5'-TTG ATT AAG TCC CTG CCC TTT GT-3'**, Eurofins GmbH, Ebersberg, DE  
**18s rev: 5'-CGA TCC GAG GGC CTC ACT A-3'**, Eurofins GmbH, Ebersberg, DE

### **Verwendete Kits**

**Angiotensin converting Enzyme Assay, KK-ACE**, Bühlmann Lab. AG, Schönenbuch, CH  
**ANG II-Activity Assay, EA3501-1, Assaypro**, St. Charles, MO, USA  
**DC Protein Assay Reagent A, Cat.No. 500-0113**, Bio-Rad, Hercules, CA, USA  
**DC Protein Assay Reagent B, Cat.No. 500-0114**, Bio-Rad, Hercules, CA, USA  
**ECL-Kit, RPN2106**, GE Healthcare, Amersham™, Buckinghamshire, UK  
**High Capacity cDNA RT Kit, Part. No. 4368814**, Applied Biosystems, Warrington, UK

### **Geräte und Material**

**ALC-Series 0,0001g Analytical Balances**, Acculab UK, Edgewood, NY, USA  
**Bio Rad Extra Thick Filter Paper**, Bio-Rad, München, DE  
**BP-2000, series II**, Visitech Systems, Apex, NC, USA  
**Eismaschine Scotsman Frimont MF 22**, Scotsman Frimont, Milano, IT  
**Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN® 3 Cell**, Bio-Rad, Hercules, CA, USA  
**Entwicklermaschine Curix 60**, AgfaPhoto GmbH, Leverkusen, DE  
**Extra Thick Filter Paper**, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA  
**Film, Amersham Hyperfilm™ MP**, GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK  
**Glasplatte, Glas Plates**, Bio-Rad, USA

**HandyStep electronic Handdispenser**, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE  
**Hamiltonpipette, 1710 RNR**, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH  
**Heizblock, HLC**, HLC-Haep Labor Consult, Bovenden, DE  
**Hybridisierungsöfen**, Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA  
**Kamm, Comb, 10 well, 1.5**, Bio-Rad, USA  
**Konische Polypropylenröhrchen (15ml, 50ml)**, BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA  
**Kühlraum-Schüttler, Reax 2**, Heidolf, Schwabach, DE  
**Kühlzentrifuge, Centrifuge Napco 2019R**, JOUAN SA, St. Herblain, FR  
**Kühlzentrifuge 1K15**, SIGMA Laborzentrifugen, Osterode am Harz, DE  
**Luminometer, Lumat LB 9507**, Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, DE  
**MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate**, Applied Biosystems, Warrington, UK  
**MircoAmp® Optical Adhesive Film**, Applied Biosystems, Warrington, UK  
**MicroAmp® 96-Well Support Base**, Applied Biosystems, Warrington, UK  
**Napco 2019R refrigerated microcentrifuge**, Napco, Winchester, VA, USA  
**Trans-Blot® Transfer Medium**, Bio-Rad, Hercules, CA, USA  
**pH-Meter 526**, WTW GmbH, Weilheim, DE  
**Pipettierhilfe Pipetus Akku**, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE  
**Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)**, Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE  
**Potter/ Homogenisator**, B. Braun, Melsungen AG, DE  
**Powerbox, Power Pac 200**, Bio-Rad, USA  
**Röntgenkassette 24 x 30cm**, Dr. Goos-Suprema, Heidelberg, DE  
**Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)**, Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE  
**RT-PCR-System, StepOnePlus™**, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA  
**Scanner, CanoScan LiDE90**, Canon Deutschland GmbH, Krefeld, DE  
**Schüttler, Heidolph Polymax 1040**, Schwabach, DE  
**Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)**, Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE  
**Spectrophotometer, DU 730**, Bio-Rad, Hercules, CA, USA  
**Thermocycler, Px2 Thermal Cycler**, Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA  
**Trans-BlotSD, Semi-Dry Transfer Cell**, Bio-Rad, USA  
**Ultraschallbad, Bandelin Sonorex RK31**, Bandelin Electronic, Berlin, DE  
**VIC-Series 0,01g Precision Balances**, Acculab UK, Edgewood, NY, USA  
**Vortexer, VV3**, VWR, Darmstadt, DE  
**Wasserbad, GFL**, Burgwedel, DE  
**Zentrifuge, Biofuge pico**, Thermo Electron Corporation, Osterode, DE

## **Versuchstiere**

Alle Tierversuche wurden in Abstimmung mit der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes, Frau Dr. med. vet. Monika Frings sowie nach den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes (BGBI. I S. 3001; 2008, 47) durchgeführt (Tierschutzanträge 14/ 2010 und 44/ 2010, Dr. Custodis). Für die Untersuchungen wurden 12 Wochen alte, männliche Apolipoprotein-E-defiziente ( $ApoE^{-/-}$ ) Mäuse ( $ApoE^{-/-}$ B6.129P2-Apoetm1Unc/Crl, genetischer Hintergrund: C57/B16; Charles River, Sulzfeld, Germany) verwendet, welche im Tierstall des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie bei 22°C Raumtemperatur und einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten wurden. Trinkwasser und Futter standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Für die Stressexperimente wurden männliche 129 SV-Mäuse (Wildtyp (WT)), die in Berlin am Institut für Neurologie der Charité durch Mitarbeiter des Kooperationspartners Herrn Prof. Dr. med. Endres behandelt wurden, verwendet. Die auf die Affymetrix -und Ingenuity-Pathway-Analysen folgenden Experimente zur Charakterisierung des vaskulären Phänotyps wurden, neben  $ApoE^{-/-}$ , auch an C57/B16 (Wildtyp)-Mäusen durchgeführt, deren Haltung analog den o.g. Schema erfolgte.

## **3.2. Methoden**

### **Versuchstierbehandlung**

#### **Ivabradin**

Die  $ApoE^{-/-}$ -Mäuse wurden mit einem Lebensalter von 12 Wochen über einen Zeitraum von insgesamt 6 Wochen mit einer fett -und cholesterinreichen Kost gefüttert, die 21% Fett, 19,5% Kasein und 1,25% Cholesterin enthielt (Western-type Diet, ssniff, Soest, Germany). Parallel zur fettreichen Ernährung erfolgte die Behandlung einer Gruppe mit Ivabradin (Ivabradin hydrochlorid, S 16257-2, Servier, Frankreich) (n=10; 20mg/ kg KG) über das Trinkwasser. Die verbliebenen Kontrolltiere erhielten Wasser ohne Zusatz von Ivabradin. Die Effektivität der Dosierung wurde über die Messung der Herzfrequenz (HF) kontrolliert. Die für die Stressexperimente behandelten 129 SV-Mäuse erhielten Ivabradin über Futterpellets (10mg/ kg KG).

#### **Chronischer Stress**

Die Stressbehandlung wurde im Labor des Kooperationspartners, der Arbeitsgruppe um Prof. Matthias Endres, am Institut für Neurologie der Charité in Berlin, durchgeführt. Die Organentnahmen und alle molekularbiologischen Untersuchungen erfolgten in unserem Labor. Für die Stressexperimente wurden 129 SV-Mäuse verwendet, die analog eines etablierten Stressprotokolls zur Induktion eines depressiven Phänotyps behandelt wurden<sup>108</sup>. Initial wurden die Mäuse dabei auf folgende 4 Behandlungsgruppen (à 10 Tiere) verteilt:

1. Naiv
2. Naiv + Ivabradin
3. Stress
4. Stress + Ivabradin

Jeweils eine Gruppe nicht gestresster (naiver) Mäuse und eine Gruppe gestresster Mäuse wurde mit Ivabradin (10mg/ kg KG) über Futterpellets behandelt. Nach einer initialen, zweiwöchigen medikamentösen Behandlung wurden 2 Gruppen der Tiere einem chronischen Stressparadigma unterzogen. Dieses erstreckte sich über insgesamt 28 Tage und umfasste nachfolgende Behandlungen:

Tag 1-7 „Rattenexposition“, Tag 8-10 „Räumliche Enge“, Tag 11-14 „Höhenfixierung“, Tage 15-21 „Rattenexposition“, die Tage 22-25 „Räumliche Enge“ und schließlich die Tage 26-28 „Höhenfixierung“<sup>108</sup>.

„Rattenexposition“: Platzierung zweier Mäuse, mit Beginn des Dunkelzyklus zwischen 19:30 Uhr und 10:30 Uhr, in einen Käfig von 16x14x22cm. Dieser befand sich wiederum in einem anderen von 33x19x55cm Größe. Anschließend wurde eine männliche Ratte über die gesamten 15 Stunden in den großen Käfig hineingesetzt. Um den Geruchskontakt zwischen den Tieren zu verbessern, wurden in die Seitenwände der Mäusekäfige Löcher von 0,7 cm Durchmesser gebohrt. Nach der gesamten Prozedur wurden die Mäuse für den Rest des Tages von der Ratte isoliert.

„Räumliche Enge“: Platzierung einer Maus während der Dunkelphase für 2,5h in einer 50ml Spritze. Diese besaß Atemlöcher und einen Durchmesser von 30mm.

„Höhenfixierung“: Fixierung der Mäuse mit 3M Durapore Tape in einer Höhe von 80cm über dem Boden für 6min am Tag während der Dunkelphase.

### **Blutdruck und Herzfrequenz**

Blutdruck (systolisch und diastolisch) und Herzfrequenz (HF) wurden mittels des BP-2000-Systems (Series II, Visitech Systems, Apex, NC, USA) gemessen. Dazu wurden die Tiere einzeln auf einer auf 37°C vorgeheizten Bodenplatte mittels einer magnetisch haftenden abgedunkelten Box positioniert und eine Blutdruckmanschette um ihren Schwanz gelegt. Die Messung der Pulsfrequenz erfolgte mittels eines Infrarotsensors, der die Pulskurve in der Schwanzarterie scannte. Der Blutdruck wurde sphygomanometrisch, also nicht-invasiv, bestimmt. Alle Tiere wurden zunächst an drei aufeinander folgenden Tagen an die Messmethode gewöhnt. In den folgenden sechs Wochen Behandlungszeit wurden alle 2-3 Tage von allen Mäusen Blutdruck und Herzfrequenzen gemessen. Die akquirierten Daten wurden für jedes Tier einzeln gespeichert und dann pro Messtag gemittelt.

### **Telemetrie**

Eine kontinuierliche Blutdruck -und Pulsmessung von C57/Bl6-Mäusen erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Freichel, Abteilung für experimentelle Pharmakologie der Universität des Saarlandes, mittels einer Radiotelemetrie-Einheit (PA-C10; Data Sciences International). Dazu wurde den Tieren eine Drucksonde in die linke Arteria Carotis implantiert. Nach einer Gewöhnungsphase von 10 Tagen startete das Stressexperiment, bei dem die akuten Effekte chronischen Stresses bestimmt worden sind. Blutdruck und Puls wurden dabei kontinuierlich alle 5 Sekunden gemessen und je nach Stressart unterschiedlich lange gemittelt. Nach der „Höhenfixierung“ am Tag 11 erfolgte die Messperiode für 1 Minute, am Tag 12 nach „Räumlicher Enge“ für 5 Minuten und schließlich am Tag 13 nach „Rattenexposition“ für 30 Minuten. Ab Tag 18 begann die Ivabradinbehandlung (10mg/ kg KG) und das genannte Stressprotokoll wurde unter Herzfrequenzsenkung an den Tagen 20 bis 22 wiederholt.

### **Organentnahme**

Nach Abschluss der Behandlung wurden die Tiere mittels einer intraperitoneal applizierten Mischung aus Ketamin (50mg/ kg KG) und Xylazin (5mg/ kg KG), jeweils in 0,9% NaCl gelöst, getötet. Im Folgenden wurden die Mäuse auf dem Rücken liegend fixiert und eine Laparo-Thorakotomie durchgeführt. Danach wurde zunächst portalvenöses Blut aus der Vena cava inf. abgenommen und dieses zentrifugiert. Es entstand Serum als Überstand, welches separat bei -80°C weggefroren wurde. Nachfolgend wurden Lunge, Ösophagus und Diaphragma entfernt. Die verbleibenden Organe wurden lateralisiert, sodass die Aorta in

ihrem gesamten Verlauf bis zu den Iliacalgefäßen einsehbar war. Nun wurde die thorakale Aorta entfernt, sofort schockgefroren und später bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **Angiotensin (ANG II)-Elisa**

Das Prinzip des Assays besteht darin, dass im Plasma befindliches Angiotensin II an spezifische Antikörper gegen ANG II bindet. Nachdem der Überstand abgewaschen ist, binden neue, diesmal an Streptavidin-Peroxidase gebundene Antikörper das ANG II. Das so entstandene „Sandwich“ besitzt eine Enzymaktivität, welche nach Zugabe von Peroxidasesubstrat zu einem Farbumschlag proportional der Angiotensin II-Konzentration führt. Diese Reaktion wird mittels Photometer bei 450nm detektiert.

Zuerst wurde Citrat (0,1M, 10% des Probenvolumens)-Plasma für 10min bei 2000g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die entstandenen Proben mussten mit o-Phenanthroline 0,44mM, EDTA 25mM, p-Hydroxy-Mercuribenzo Säure 1mM und Pepstatin A 0,12mM versetzt werden. Danach wurden alle verwendeten Substanzen und die Proben selbst auf Raumtemperatur gebracht und eine Standardkurve von 1000ng/ ml ANG II bis 0,063ng/ ml erstellt, indem jeweils mit EIA-Lösung verdünnt wurde. Alle Substanzen waren zunächst konzentriert (EIA, Wasch-Buffer und SP Konjugat) und mussten deshalb zunächst auf die 1-fache Konzentration verdünnt werden.

Beim Assay selbst wurden 50 $\mu\text{l}$  der Standards und Proben in jeweils eine der 96 Wells einer Polystyrene Microplate in Doppelbestimmung pipettiert und für 2h inkubiert. Danach erfolgten 5 Waschschrte mit 200 $\mu\text{l}$  Wasch-Buffer, gefolgt von einer 2 stündigen Inkubation mit jeweils 50 $\mu\text{l}$  Angiotensin II-Antikörper. Danach wurde wieder 5mal mit 200 $\mu\text{l}$  Buffer gewaschen und anschließend mit 50 $\mu\text{l}$  Streptavidin-Peroxidase-Konjugat für 30min versetzt. Nach 5 weiteren Waschschrten mit 200 $\mu\text{l}$  Wasch-Buffer wurden 50 $\mu\text{l}$  chromogenes Substrat dazugegeben und für 15min inkubiert. Danach wurde die Farbumschlagreaktion von Blau nach Gelb mit 50 $\mu\text{l}$  Stop Solution beendet und bei 450nm photometrisch quantifiziert.

### **ACE-Aktivitäts-Assay**

Das Angiotensin-Converting-Enzyme ist ein integraler Bestandteil des RAAS und katalysiert die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II. Das Enzym katalysiert darüber hinaus auch die Umwandlung von N-Hippuryl-1-Histidyl-1-Leucin in Hippursäure, wobei als Nebenprodukt Histidyl-Leucin entsteht. Diese Reaktion kann gestoppt werden, indem 1M Salzsäure dazugegeben wird. Das Ausmaß der ACE-Aktivität korreliert somit mit der Entstehung von Hippursäure. Diese kann bestimmt werden, indem sie mit Cyanurchlorid

komplexiert wird. Charakteristischerweise absorbiert die Verbindung Licht der Wellenlänge von 382nm, was im Photometer erfasst werden kann.

Um die Reaktion zu starten, wurden 100µl des Leerwertes (Aqua dest.), der Standards, als auch der Kontrollen und Proben (=Mäuseserum) mit 300µl Inkubationspuffer in 15ml Falcons versetzt und anschließend gevortext. Danach erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei 37°C. Im Folgenden wurden zum Leerwert und den Standards 200µl 20mM NaOH, zu den Kontrollen und Proben allerdings 200µl ACE-Substrat gegeben. Bei diesem handelt es sich um das angesprochene N-Hippuryl-1-Histidyl-1-Leucin. Nachdem die Falcons wieder gevortext worden sind, erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 15min. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion gestoppt, indem 500µl 1M HCL in alle Gefäße gegeben worden ist. Wieder wurde gevortext. Anschließend kam in jedes Röhrchen 500µl 1M NaOH und es wurde noch mal gemischt. Nun kam schließlich auch 200µl ACE-Substrat zum Leerwert, welcher ebenfalls danach gevortext worden ist. Das Ausmaß der Hippursäurebildung konnte quantifiziert werden, indem nun in alle Röhrchen 2000µl Verdünnungspuffer und 1500µl Farbreagenz (= Cyanurchlorid) gegeben worden ist. Nach erneutem Vortexen und Inkubieren bei RT für 5min, wurden die Proben bei 1500g und RT für 10min zentrifugiert. Im Überstand wurde nun bei 382nm die Extinktion mittels eines Photometers bestimmt. Nach Anlegen einer Standardkurve wurde die Hippursäure-Konzentration durch die Reaktionszeit des Substrates (=15min) geteilt. Somit konnte die ACE-Aktivität bestimmt werden, deren Einheit ACE unit= 1µmol Hippursäure/ (min x l) = 1U/l ist.

### **Pull-Down-Assay**

Bei einem Pull-Down-Experiment macht man sich die physiologische Eigenschaft des Targets zu Nutze um dessen Aktivierungsgrad zu bestimmen. In diesem Fall die Tatsache, dass Rac1 eine GTPase ist, welche im aktivierten Zustand hochaffin den Effektor PAK bindet. Beim Rac1-Pull-Down wird mit Hilfe dieses Fusionsproteins, welches zusätzlich Glutathion-Agarose gebunden hat, aktiviertes Rac1 ausgefällt, indem es den PAK-Agarosekomplex bindet. Da aktiviertes Rac-GTP schnell zu Rac-GDP inaktiviert wird, mussten frische Lysate für die Pull-Down-Experimente verwendet werden. Aus diesem Grund wurden direkt nach der Organentnahme bei -80°C gefrorene thorakale Aortenstücke in 1ml MLB-Puffer (= Magnesium-containing Lysis Buffer) in Eppendorfgefäßen gepottert. Leupeptin und Aprotinin sind in einer Konzentration wie beim Lysepuffer von Proteinen beim Westernblot dazugegeben worden. Anschließend sind die Proben 5min bei 1000U/ min zentrifugiert worden. Der Überstand wurde weiterverwendet, wobei 100µl des Überstandes für die

Proteinbestimmung und den Gesamt-Rac-Westernblot in extra Eppendorferfäße pipettiert wurden. Die restlichen 900µl des Lysates wurden sofort mit 10µg PAK-1 PMD, also dem GST-Fusionsprotein, welches Glutathion-Agarose gebunden hat, bei 4°C 1h auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden sie für 10sec bei 14000U/ min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Pellets sind anschließend 2 mal mit 200µl MLB gewaschen, anschließend in 50µl Laemmli Puffer resuspendiert und danach bei -20°C gefroren worden. Danach wurde die Proteinkonzentration für den Westernblot mit Hilfe der extra aufbewahrten 100µl Lysat/ Probe bestimmt. Darüber hinaus ist mit diesem Material auch die Gesamt-Rac-Expression über einen Westernblot ermittelt worden. Das Pull-Down-Experiment wurde mit einem Westernblot fortgesetzt, wobei dafür die Lysate verwendet worden sind, die das GST-Fusionsprotein enthielten. Die Auswertung geschah wie bei einem Westernblot mittels der Software Labworks.

### **Westernblot**

Die Grundprinzipien der Proteinisolation -und Bestimmung sowie des Westernblots werden vorausgesetzt. Zunächst wurden die gefrorenen thorakalen Mauseartenstücke mit 300µl Lysepuffer gepottert und anschließend bei 4000U für 5min zentrifugiert. Nur der Überstand wurde weiterverwendet.

Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung nach dem Verfahren von LOWRY et al. (1951)<sup>73</sup>. Dazu wurde das Lysat 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und mit 100µl Biorad D<sub>c</sub> Protein Assay Reagent A sowie 800µl Biorad D<sub>c</sub> Protein Assay Reagent B inkubiert. Dadurch entstand ein Kupfer-Protein-Komplex, der innerhalb von 15min das zugegebene Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagens reduziert hat. Die Farbveränderung wurde spektrophotometrisch bei 540nm erfasst.

Zur Elektrophorese wurde ein diskontinuierliches 10% SDS-Polyacrylamid-Gel mit einem zusätzlichen Sammelgel verwendet um eine besonders hohe Auflösung zu erzielen.

Vor der Beladung sind von jeder Probe 50µg mit gleicher Menge Ladepuffer für 7min bei 70°C homogenisiert worden. Als Mitlaufkontrolle dienten je nach Molekulargewicht des Targets HRM oder LRM. Danach wurde die Kammer mit Elektrophoresepuffer befüllt und eine Spannung von 30mA angelegt.

Nach 2-3h wurden die Proteine 45min bei 200mA auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Waschvorgänge sind mit 5% Tween-PBS-Milch für 30min durchgeführt worden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in 1% Tween-PBS-Milch bei 4°C über Nacht. Als Ladekontrolle diente Gapdh. Am nächsten Tag wurde die Membran bei RT

gewaschen (2x 5min PBS/ Tween, 2x 10min PBS/ Tween, 2x 2min 1xPBS) und anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Diese Inkubationsphase dauerte typischerweise bei Anti-Rabbit 30, bei Anti-Maus als Sekundärantikörper nur 20 Minuten bei RT. Darauf folgte ein erneutes Waschen analog dem Vorigen.

Mittels der Peroxidaseaktivität des Sekundärantiköpers wurde zugegebenes ECL bei 428nm zum Leuchten gebracht, wobei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziert und Luminol oxidiert wurde. Die Schwärzung des Röntgenfilms erfolgte direkt proportional zum detektierten Target. Nach der Entwicklung des Röntgenfilms wurden die sichtbar gemachten Banden eingescannt und am PC mittels des Programms Labworks densitometrisch ausgewertet.

### **NADPH-Oxidase-Assay**

Die Aktivität der NADPH-Oxidase kann bestimmt werden, indem man die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz misst. Zu dieser Lichtemission kommt es, wenn ein Lucigeninradikal mit einem Superoxidradikal reagiert. Dadurch entsteht nämlich ein angeregtes Acridon, welches Licht emittiert, wenn es in seinen Ruhezustand zurückfällt<sup>71,111</sup>. Zuerst wurden die zu untersuchenden Aortenstücke unter Blockade aller Proteasen mittels Complete Tabletten in einem Kalium-Phosphat-Puffer bei 4°C gepottert. Im Anschluss erfolgte eine Ultraschallbad-Exposition für eine Minute. Danach wurden Lucigenin (0,005mmol/ l) und NADPH (1mmol/ l) auf 37°C erwärmt. Im Anschluss sind 500µl Lucigenin und 100µl NADPH zu 250µl Probe gegeben worden. Die daraus resultierende Lichtemission wurde mittels eines Luminometers 10min lang jede Minute detektiert. Die Einheit ist RLU/ µg/ s. Um die Ergebnisse auf das Probengewicht beziehen zu können, wurde anschließend noch die Proteinkonzentration der Proben mittels der Methode von Lowry bestimmt<sup>73</sup> und auf µg aufgelöst.

### **RT-PCR**

Das Ausgangsmaterial für die RNA-Isolation nach Trifast, mittels RNA-Pure, waren die seit der Organentnahme bei -80°C aufbewahrten thorakalen Mauseorten. Die im Endeffekt entstandenen Pallets wurden in 20µl Aqua ad inj. resuspendiert, 5min auf 60°C erwärmt und schließlich bei -80°C gefroren.

Zur RNA-Bestimmung wurde mit Aqua ad inj. eine 1:50 Verdünnung hergestellt und diese gegen einen Leerwert aus Aqua ad inj. photometrisch bei 260nm und 280nm gemessen. Anschließend wurden die Konzentrationen angeglichen, sodass jede Probe 2µg RNA enthielt.

Zur reversen Transkription sind „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits“ benutzt worden. Der Mastermix enthielt dabei pro Probe à 10µl (mit 2µg RNA) 2µl 10x RT Buffer, 0,8µl 25x dNTP Mix (100mM), 2µl 10x RT Random Primers, 1µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1µl RNase Inhibitor und 3,2µl Aqua ad inj. Jeweils 10µl Mastermix wurden anschließend auf die in 10µl verdünnte RNA pipettiert und im Thermal Cycler (10min 25°C, 120min 37°C, 5min 85°C, Rest 4°C) inkubiert. Die jetzt vorhandenen 20µl Probe enthielten jeweils gleich konzentrierte cDNA, die nun bei -20°C gefroren wurde.

Um die eigentliche RT-PCR zu starten, wurden in eine 96-well-plate von jeder Probe eine Doppelbestimmung à 3µl cDNA pipettiert. Handelte es sich um die 18s-PCR als Housekeeper, so sind 1:1000 cDNA-Verdünnungen verwendet worden. Für alle weiteren Targets wurden 1:10 Verdünnungen benutzt. Darüber hinaus ist eine Verdünnungsreihe angelegt worden. Bei der 18s in Stufen von 1:10 bis 1:100000, in den anderen Fällen von 1:10 bis 1:160. Anschließend sind jeweils 22µl Mastermix dazu gegeben worden. Wurde die PCR mit einem Primer durchgeführt, bestand der Mix aus 7,5µl PowerSybrGreen, 0,5µl Primer forward, 0,5µl Primer reverse und 13,5µl Aqua ad inj. Handelte es sich jedoch um eine Sonde, dann sind 12,5µl TaqMan-Mastermix-Reagenz, 1,25µl Sonde und 8,25µl Aqua ad inj. verwendet worden. Anschließend wurde die gesamte Platte für 1min bei 300U/ min zentrifugiert und in das RT-PCR-Gerät eingelegt. Das verwendete Programm war StepOne Software v2.0. Das Ergebnis wurde in Excel exportiert und dann ausgewertet.

### **Statistische Auswertung**

Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels t-Test für zwei Stichproben sowie mittels ANOVA-Test, gefolgt von Newman Keuls post hoc-Analysen bestimmt und für  $p < 0,05$  angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Effekte einer pharmakologischen Herzfrequenzreduktion durch Inhibition des $I_{(f)}$ -Kanals mit Ivabradin auf Herzfrequenz und Blutdruck in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung vaskulärer Effekte einer pharmakologischen Herzfrequenzreduktion in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Reduktion der Herzfrequenz wurde durch eine Behandlung mit Ivabradin, einem Inhibitor des Schrittmacherstroms  $I_{(f)}$  an Zellen des Sinusknotens, induziert. Die Substanz führt zu einer reinen Frequenzmodulation und Reduktion der Schlagaktivität von Schrittmacherzellen des Sinusknotens, ohne die Dauer oder die Morphologie des Aktionspotentials zu verändern. Dementsprechend hat Ivabradin keine negativ inotropen oder dromotropen Effekte und führt nicht zu einer Blutdrucksenkung<sup>26</sup>.

Cholesterinreich gefütterte ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden im Alter von 12 Wochen über einen Zeitraum von 6 Wochen mit Ivabradin (20mg/ kg KG) behandelt. Die Applikation des Medikamentes erfolgte über das Trinkwasser. Die Behandlung mit Ivabradin führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Reduktion der mittleren Herzfrequenz um 133 Schläge, was einer Reduktion um etwa 23% entspricht ( $449 \pm 3$  vs.  $583 \pm 20$  bpm,  $n=10$  pro Gruppe,  $p < 0,05$ ) (Abb. 1A). Ivabradin beeinflusste weder die systolischen noch die diastolischen Blutdruckwerte in signifikanter Weise (Abb. 1B).

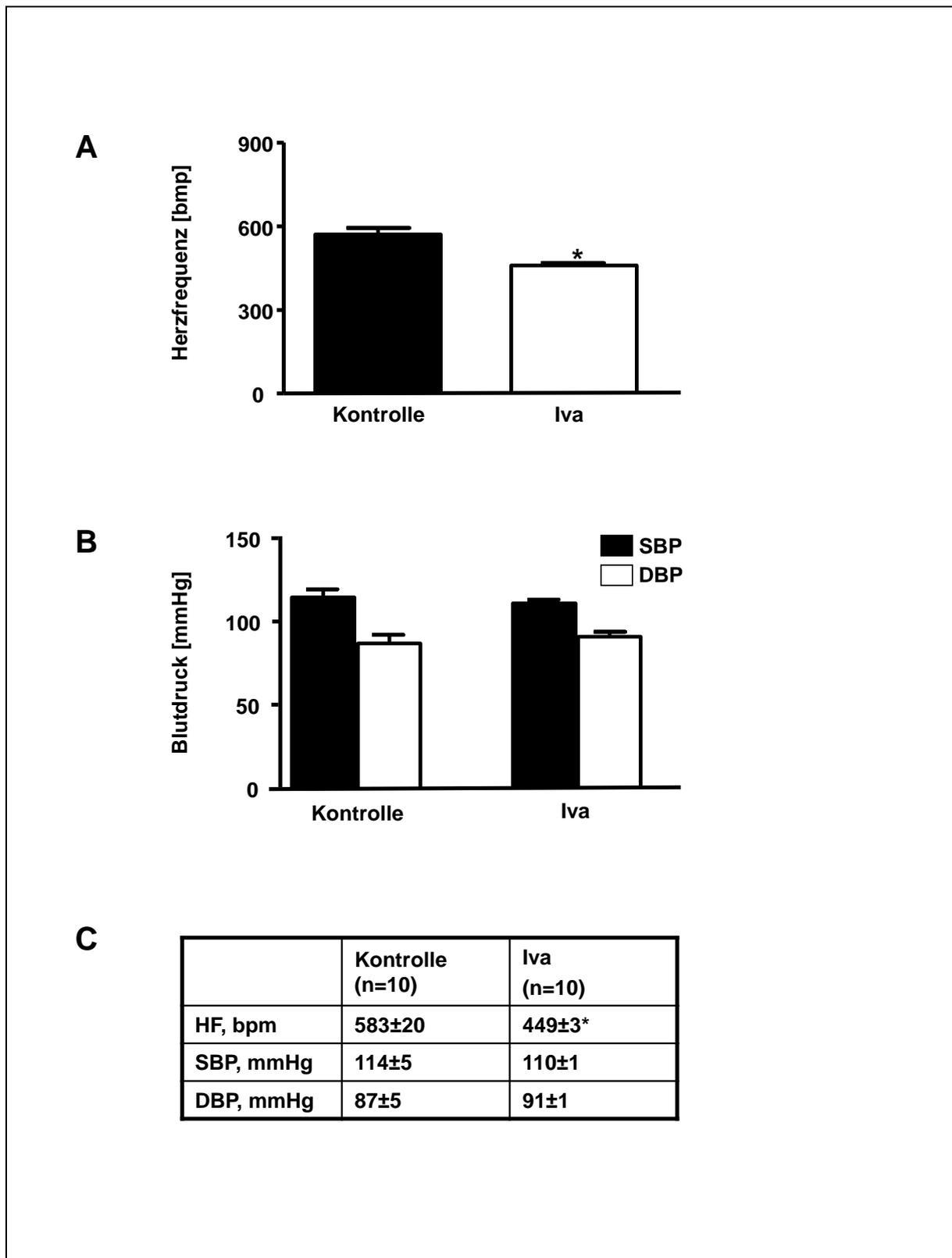


Abb. 1: Effekte einer Herzfrequenzreduktion mit Ivabradin (20mg/ kg Körpergewicht) auf Herzfrequenz und Blutdruckwerte cholesterinreich gefütterter ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse. A: Mittelwerte der durchgeführten Herzfrequenzmessungen. B: Mittelwerte der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte. C: Zusammenfassung der Messwerte (n=10, \*p<0,05).

## 4.2. Effekte einer Reduktion der Herzfrequenz auf Komponenten des zirkulierenden und gewebeständigen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Eine vermehrte Aktivität des RAAS ist wesentlich an der Pathogenese endothelialer Dysfunktion und der Atherogenese beteiligt<sup>123</sup>. Wichtige Bestandteile des RAAS sind das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) und Angiotensin II (ANG II). Um einen möglichen Effekt einer Herzfrequenzreduktion auf die Plasmakonzentration von ANG II und die ACE-Aktivität zu charakterisieren, erfolgte eine Quantifizierung von ANG II mittels ELISA sowie die Bestimmung der ACE-Aktivität mittels eines ACE-Aktivitäts-Assays.

Mit Ivabradin behandelte ApoE<sup>-</sup>-Mäuse zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren keinen Unterschied hinsichtlich der Plasmakonzentration von ANG II (Kontrolle 0,4154±0,03 vs. Iva 0,4566±0,03ng/ ml, n=9 pro Gruppe, p=0,3904) (Abb. 2A). Auch bezüglich der ACE Aktivität unterschieden sich beide Behandlungsgruppen nicht signifikant (Kontrolle 251,5±8 vs. Iva 232,7±12U/ l, n=5 pro Gruppe, p=0,2394) (Abb. 2B).

Ein wichtiger Effektor des RAAS ist der AT1-Rezeptor, der über multiple Mechanismen maladaptive Effekte wie Hypertrophie, Migration und Apoptose in vaskulären Zellen vermittelt und die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion begünstigt<sup>122,123</sup>. Um die Expression des AT1-Rezeptors in der thorakalen Aorta zu charakterisieren, wurden Westernblots und TaqMan PCRs durchgeführt. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen führte die Reduktion der Herzfrequenz mit Ivabradin zu einer um etwa 65% verminderten Proteinexpression des AT1-Rezeptors (35,15±19% vs. Kontrolle, n=6 pro Gruppe, p<0,05) (Abb. 3A, 3B). Darüber hinaus zeigte sich auch auf RNA-Ebene eine im Vergleich zur Kontrollgruppe um etwa 30% auf 70±8% verminderte mRNA-Expression des AT1-Rezeptors unter einer herzfrequenzsenkenden Behandlung mit Ivabradin (n=10 pro Gruppe, p<0,05) (Abb. 3C).

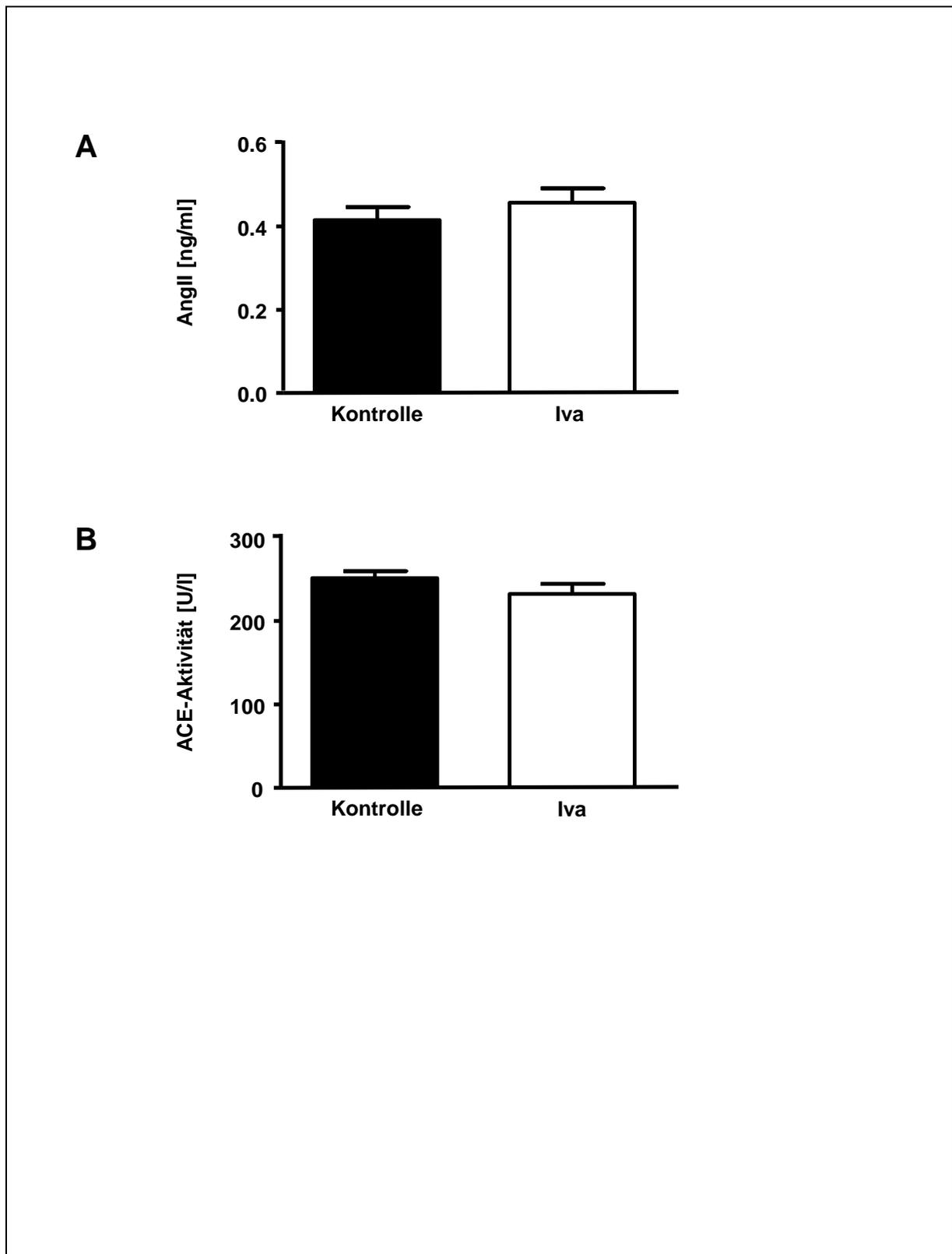


Abb. 2: Effekte einer Herzfrequenzreduktion mit Ivabradin (20mg/ kg Körpergewicht) auf Bestandteile des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. A: Quantifizierung der Plasma-ANG II-Konzentration mittels ELISA (n=9, p=0,3904 vs. Kontrolle) B: Effekte einer Herzfrequenzreduktion auf die Plasma-ACE-Aktivität (n=5, p=0,2394 vs. Kontrolle).

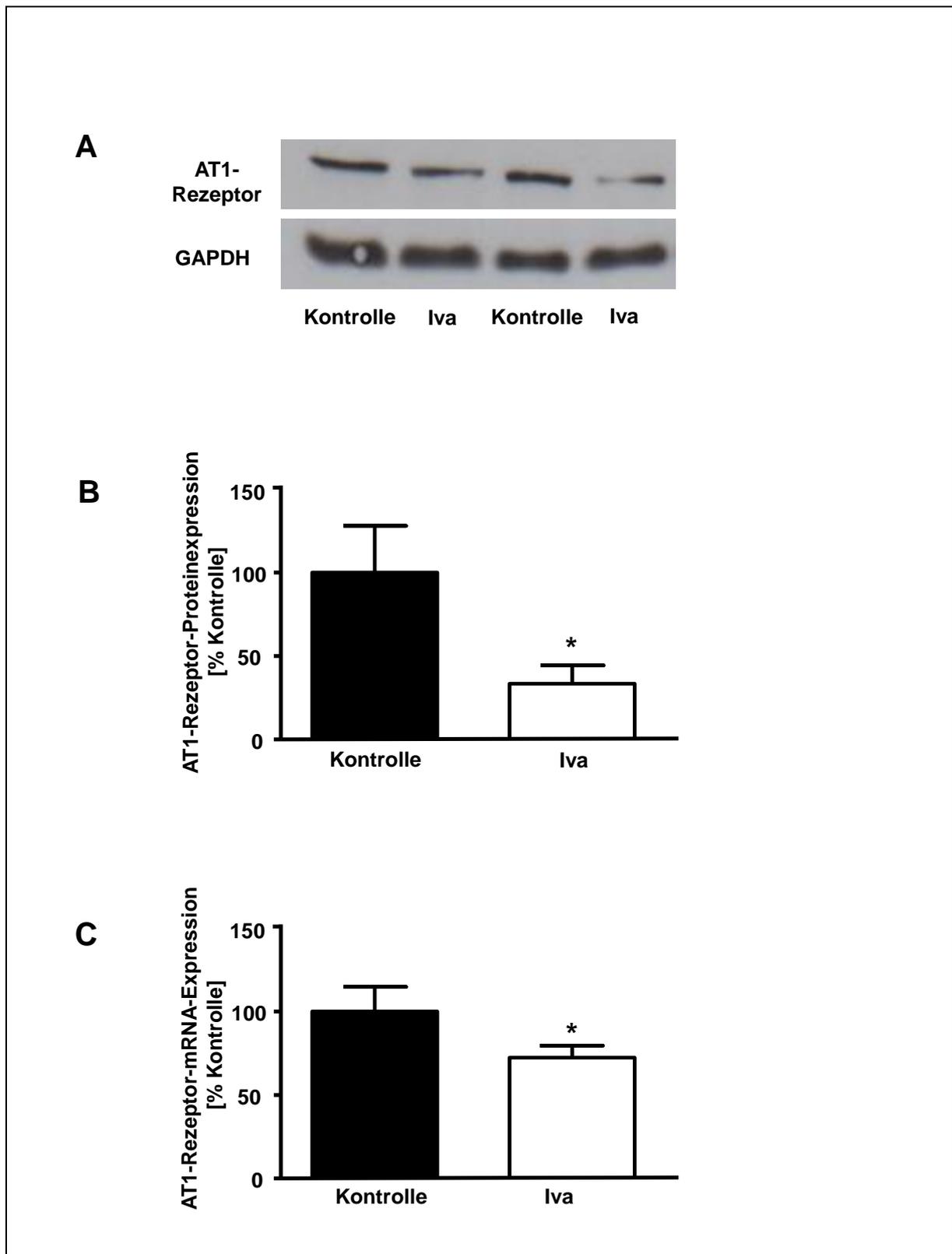
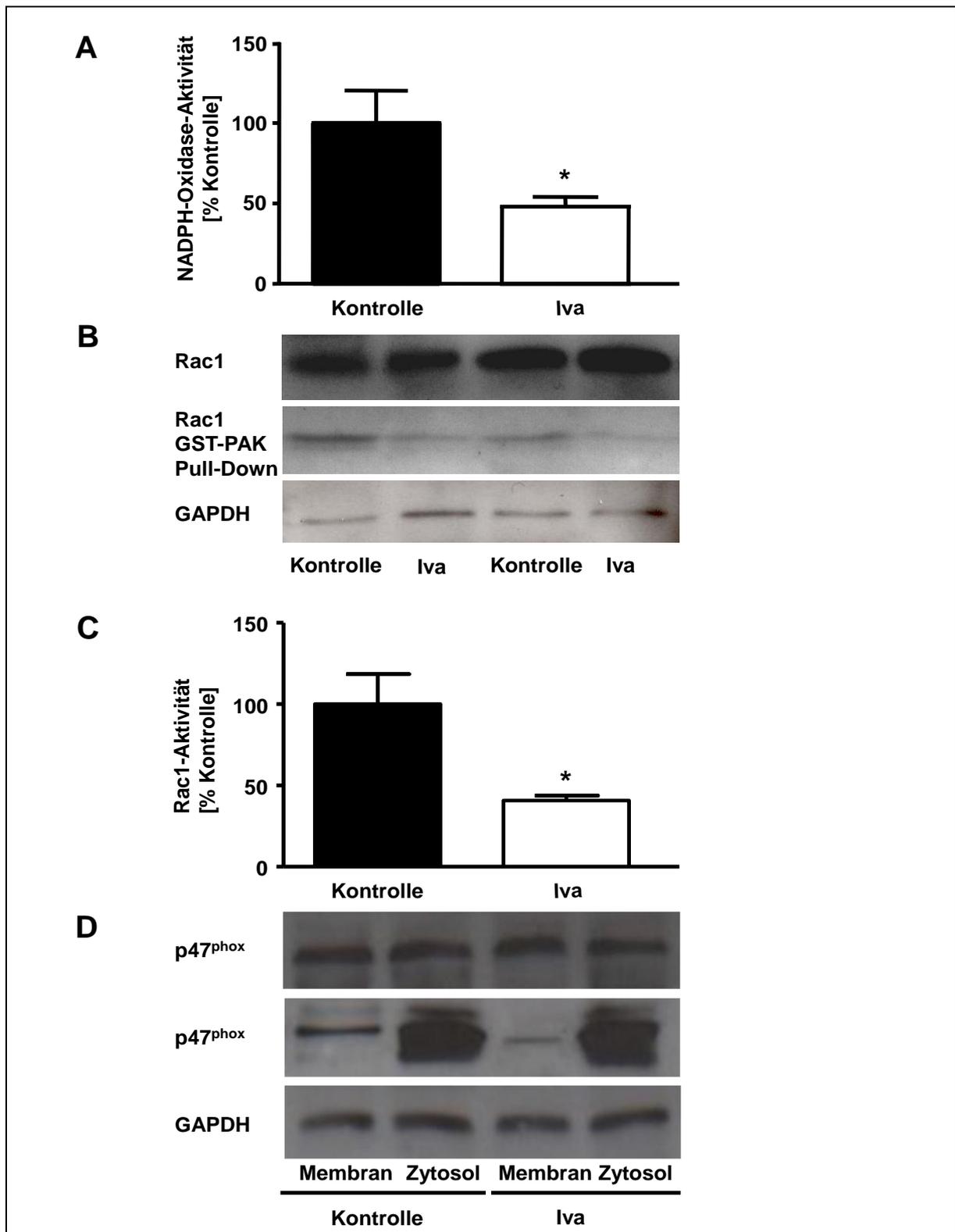


Abb. 3: A: Repräsentativer Westernblot zur Darstellung der AT1-Rezeptor-Expression (n=6,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle). B: Quantifizierung der Proteinexpression. C: Quantifizierung der aortalen AT1-Rezeptor-mRNA-Expression in der TaqMan PCR (n=10,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle).

### **4.3. Einfluss von Ivabradin auf die Aktivität der NADPH-Oxidase sowie die Expression ihrer Untereinheiten Rac1 und p<sup>47phox</sup> in der thorakalen Aorta**

Vaskulärer oxidativer Stress trägt entscheidend zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion und Atherogenese bei <sup>39</sup>. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden im Gefäßsystem unter anderem durch die NADPH-Oxidase, auch vermittelt durch den AT1-Rezeptor, gebildet <sup>38,78,121</sup>. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Aktivität der NADPH-Oxidase durch die Herzfrequenz beeinflusst wird. Zur Messung der NADPH-Oxidase-Aktivität im Homogenisat der thorakalen Aorta wurde ein Lucigenin angereicherter Chemilumineszenzassay verwendet. Abbildung 4A zeigt, dass die Reduktion der Herzfrequenz durch Ivabradin die Aktivität der NADPH-Oxidase in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant vermindert. So weisen die mit Ivabradin behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zur Kontrolle lediglich eine Enzymaktivität von 48±6% auf (n=6 pro Gruppe, p<0,05).

Um mögliche Effekte auf die Expression und die Aktivität von Rac1 durch die Herzfrequenz in Aorten zu untersuchen, erfolgte eine Quantifizierung der Proteinexpression mittels Westernblot (Abb. 4B). Es zeigt sich, dass die Gesamtexpression von Rac1 in der Aorta durch Reduktion der HF mit Ivabradin nicht reguliert wird. Neben der Gesamtexpression ist aber insbesondere die Rac1-Aktivität für die Funktion der NADPH-Oxidase essentiell <sup>54,97,99,127</sup>. Um die Aktivität von Rac1 zu untersuchen, erfolgten Pull-Down-Assays. Abbildung 4C zeigt, dass die Senkung der Herzfrequenz im Vergleich zur Kontrolle in einer geringeren aortalen Rac1-Aktivität resultiert. Bezogen auf die Kontrolltiere führte Ivabradin zu einer Reduktion der Aktivität auf 41±3% (n=5 pro Gruppe, p<0,05). Um mögliche Effekte auf die Expression und die Membrantranslokation von p<sup>47phox</sup> durch Ivabradin zu untersuchen, erfolgte die Quantifizierung der Proteinexpression mittels Westernblot. Das Gefäßhomogenat wurde dazu in eine zytosolische und eine membranöse Komponente aufgetrennt. Dies erlaubt neben der Quantifizierung der Gesamtexpression auch die Bestimmung der zytosolischen und der membranständigen Proteinfraction. Eine Herzfrequenzsenkung beeinflusste die Gesamtexpression von p<sup>47phox</sup> nicht. Die Translokation an die Zellmembran wurde allerdings durch die Ivabradinbehandlung im Vergleich zur Kontrolle auf 39±5%, p<0,05, reduziert (Abb. 4D).



**Abb. 4:** Effekte einer Herzfrequenzreduktion mit Ivabradin auf die Aktivität der NADPH-Oxidase und die Expression und Aktivität von Rac1 sowie die Expression von p<sup>47phox</sup>. A: Aortale NADPH-Oxidase-Aktivität, gemessen mittels Lucigenin-Chemilumineszenzassay (n=6, p<0,05 vs. Kontrolle). B, C: Westernblot und Pull-Down zur Bestimmung der Rac1-Expression und Aktivität (n=5, p<0,05 vs. Kontrolle). D: Proteinexpression und Membrantranslokation von p<sup>47phox</sup>.

#### **4.4. Detektion einer herzfrequenzspezifischen Genexpression mittels Affymetrix „Genearray“**

Experimentelle Vorbefunde der Arbeitsgruppe zeigen, dass der vaskuläre Phänotyp von ApoE<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen einer Regulation durch die Herzfrequenz unterliegt<sup>5,20,22</sup>. Eine pharmakologische Reduktion der Herzfrequenz durch Ivabradin vermittelt antiatherosklerotische Effekte unter anderem durch eine Reduktion von vaskulärem oxidativem Stress. Die Gefäßwand unterliegt neben verschiedenen humoralen Einflüssen vor allem permanenten, durch den Blutfluss und durch die Herzfrequenz definierten, hämodynamischen Effekten. Darüber hinaus wirkt Scherstress auf das Gefäßendothel ein<sup>16</sup>.

Dieser wird über endotheliale Mechanosensoren detektiert und führt zu einer Adaptation des vaskulären Phänotyps. Laminarer Scherstress resultiert in einer flussabhängigen Gefäßdilataion über eine Hochregulation der eNOS<sup>31</sup>. Die vor allem oszillärem Scherstress ausgesetzten Gefäßabschnitte sind dagegen für die Entstehung atherosklerotischer Gefäßläsionen prädisponiert<sup>8,16</sup>. Befunde aus Zellkulturexperimenten zeigen, dass in kultivierten Endothelzellen Scherstress hoher Pulsatilität bzw. Frequenz die Expression proinflammatorischer, proapoptotischer Transkripte<sup>11,70</sup> sowie eine Reduktion der eNOS-Expression begünstigt<sup>9</sup>. Himburg et al. untersuchten darüber hinaus in aortalen Endothelzellen die Abhängigkeit der mRNA-Expression von MCP-1 und VCAM-1 im Bezug zu der Frequenz des in vitro applizierten Scherstress. Eine „physiologische“ Frequenz von 1Hz, die einer Frequenz von etwa 60/Minute entspricht, führt im Gegensatz zu höheren Frequenzen zu einer geringeren Expression proinflammatorischer Transkripte und begünstigt einen atheroprotektiven Phänotyp<sup>48</sup>. Zusammenfassend weisen diese Befunde auf eine spezifische Regulation des vaskulären Phänotyps durch hämodynamische Einflüsse hin. Vor diesem Hintergrund erscheint eine mögliche Regulation mechanosensitiver, vaskulärer Gene durch die Herzfrequenz wahrscheinlich. Um speziell herzfrequenzspezifisch regulierte Gene zu detektieren, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. H. Kroemer (Institut für Pharmakologie, Universität Greifswald) Affymetrix-Assays und Ingenuity-Pathway-Analysen durchgeführt. Untersucht wurde hierbei RNA, die aus thorakalen Aorten Ivabradin behandelter ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse sowie unbehandelter Kontrollen isoliert wurde (n=3 pro Gruppe, Ivabradin, 15mg/kg KG, 6 Wochen vs. Kontrolle).

Hier zeigte sich unter einer Reduktion der HF durch Ivabradin eine signifikante, vermehrte Genexpression verschiedener zytoskelettärer und muskulärer Strukturproteine wie Tropomyosin 2, skeletalem Troponin T3 und skeletalem Troponin I (n=3 pro Gruppe, p<0,05) (Abb. 5).

Experimentelle Daten von Pinet et al. demonstrieren eine Rolle von Troponinen für die Integrität von Nierenarterien <sup>86</sup>. Diese Gene wurden daher in der Folge zunächst mittels Westernblots weiter untersucht.

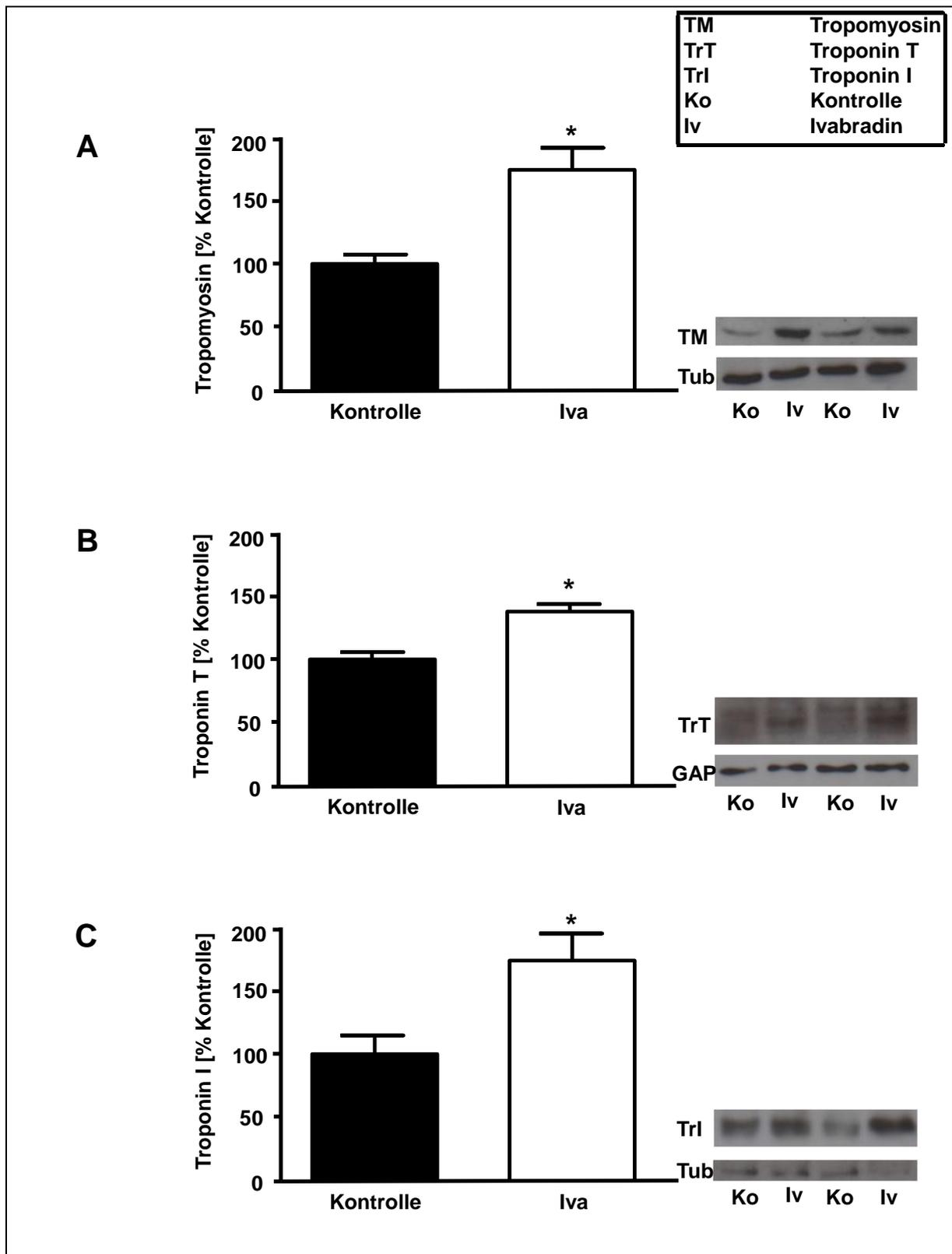
Im Rahmen dieser Experimente zeigte sich an thorakalen Aorten der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse jedoch keine Regulation der Proteinexpression von Tropomyosin 2, Troponin T3 sowie I (Abb.5). In einem separaten Experiment wurde die Expression der beschriebenen Targets in mit Ivabradin behandelten Wildtypmäusen (C57/Bl6) untersucht. Hier hingegen zeigte sich auf Proteinebene eine Hochregulation des Tropomyosin 2 um 80±17% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (n=3 pro Gruppe, p<0,05) (Abb. 6A). Ebenfalls konnte in C57/Bl6-Mäusen gezeigt werden, dass eine Ivabradinbehandlung die Proteinexpression von Troponin T3 um 40±5% (n=6 pro Gruppe, p<0,05) (Abb. 6B) und die von Troponin I um 75±21% (n=6 pro Gruppe, p<0,05) (Abb. 6C) im Vergleich zur Kontrollgruppe steigert.

Target	Genearray		
	ApoE <sup>-/-</sup>		
	Regulation	ratio fold change	p-Wert
Tropomyosin 2	↑	2,39866	<0,05
Troponin T3, skeletal, fast	↑	5,73806	<0,05
Troponin I, skeletal, fast 2	↑	6,2944	<0,05

Target	Westernblot		
	ApoE <sup>-/-</sup>	C57/Bl6	p-Wert
Tropomyosin 2	⇨	↑	<0,05
Troponin T3, skeletal, fast	⇨	↑	<0,05
Troponin I, skeletal, fast 2	⇨	↑	<0,05

**Abb. 5:** Ergebnisse von Gene-Array und Westernblot. Effekte der Herzfrequenzreduktion mit Ivabradin auf die mRNA -und Proteinexpression von Tropomyosin 2, Troponin T3 sowie Troponin I.



**Abb. 6:** Westernblot und Quantifizierung der Proteinexpression in thorakalen Aorten von C57/Bl6-Mäusen. A: Tropomyosin 2 (n=3, p<0,05), B: Troponin T3-skeletal, fast (n=6, p<0,05), C: Troponin I-skeletal, fast (n=6, p<0,05).

Pathway -und Clusteranalysen des Genearrays wiesen auf eine vermehrte Regulation der Gruppe der MAP-Kinase assoziierten Signalwege durch eine Behandlung mit Ivabradin hin. Einzelne MAP-Kinasen selbst, wie beispielsweise ERK, p38 und JNK zeigten sich im Rahmen des Genearrays jedoch nicht reguliert. Verschiedene experimentelle Arbeiten zeigen, dass mechanische Faktoren und hier v.a. zyklische Dehnungsreize (Cyclic Strain), möglicherweise einen Effekt auf die Phosphorylierung von ERK, p38 und JNK haben und damit den Phänotyp, die Proliferation und Differenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) beeinflussen<sup>91,118</sup>. Die Phosphorylierung von MAPK wie ERK1/2, p38 und JNK scheint an der Differenzierung und der Expression eines kontraktiven Phänotyps in glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt zu sein<sup>12,84,112</sup>.

Wir untersuchten daher die Expression und die Phosphorylierung von ERK, p38 und JNK mittels Westernblots in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Es zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrolle um 100±23% gesteigerte Phosphorylierung von ERK durch die Behandlung mit Ivabradin (n=10 pro Gruppe, p<0,05) (Abb. 7A, 7B). Die Gesamt-Expression von ERK wurde durch die gezielte Herzfrequenzreduktion nicht beeinflusst. Ivabradin führt zu einer um 90±33% gesteigerten Expression von p-p38 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (n=9 pro Gruppe, p=0,38) (Abb. 7C, 7D). Auf die Expression von JNK hatte die Behandlung mit Ivabradin keinen Effekt.

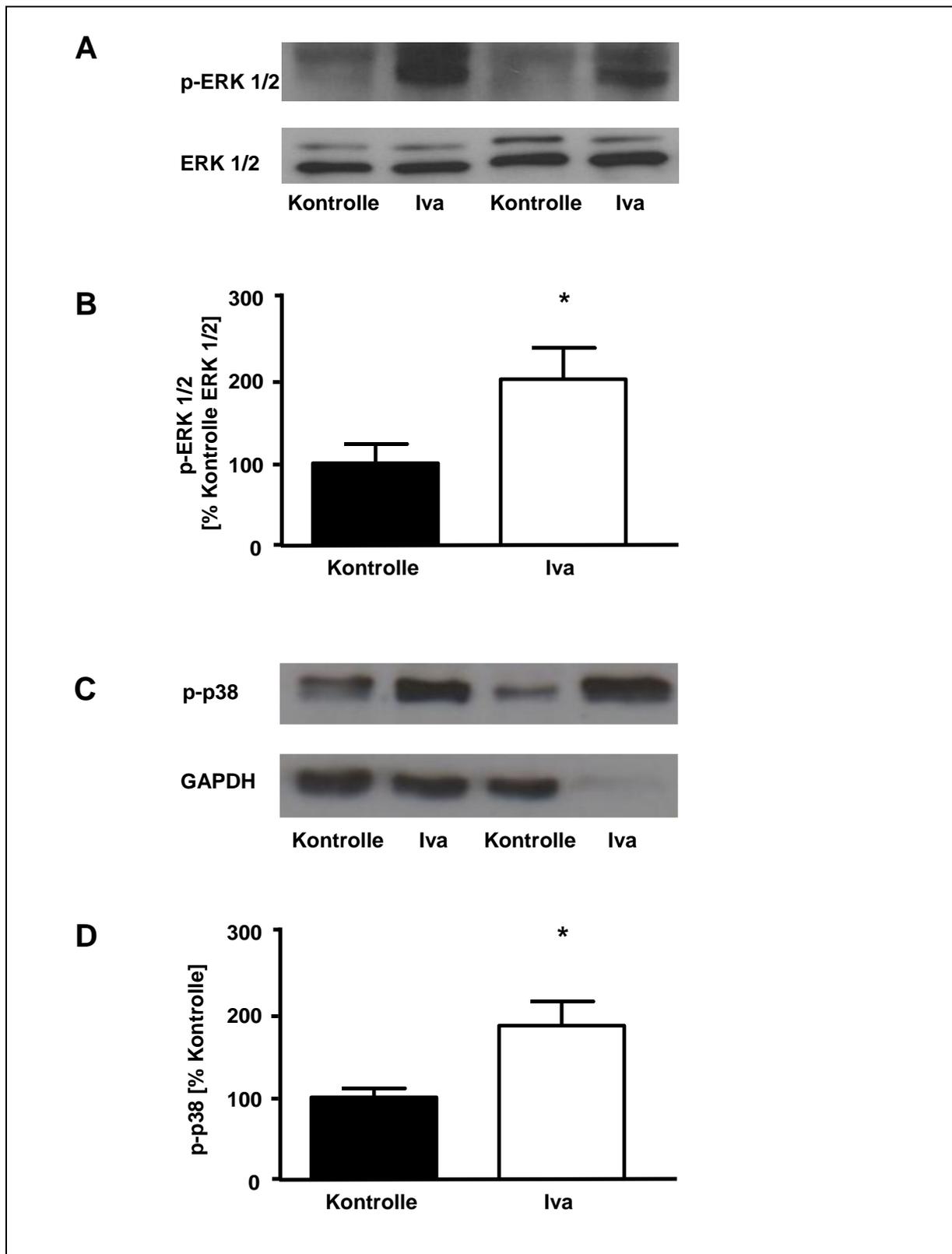


Abb. 7: A: Analyse der Proteinexpression aus thorakalen Aorten von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels Westernblot. A: Oben: p-ERK, A: Unten: Gesamt-ERK als Kontrolle. B: Quantifizierung des Westernblots. Ivabradinbehandlung vs. Kontrolle (n=10, p<0,05). C: Westernblot zur Charakterisierung der Proteinexpression von p-p38 aus thorakalen Aorten von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. D: Quantifizierung des p-p38 Westernblots. Ivabradinbehandlung vs. Kontrolle (n=9, p=0,38).

#### **4.5. Effekte von chronischem Stress und pharmakologischer Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin auf die aortale Expression der endothelialen NO-Synthase und des AT1-Rezeptors**

Klinische Untersuchungen konnten zeigen, dass psychischer Stress im Rahmen standardisierter Testsituationen die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion begünstigt <sup>35</sup>. Vorbefunde der Arbeitsgruppe demonstrieren, dass Wildtypmäuse (129 SV), die über einen Zeitraum von 28 Tagen wiederholt definierten Stressreizen („Rattenexposition“, „räumliche Enge“ und „Höhenfixierung“ („exposure to rat“, „restraining“, „tail suspension“)) <sup>108</sup> ausgesetzt waren, im Vergleich zu nicht gestressten Kontrollen eine reduzierte endothelabhängige Vasorelaxation aufweisen <sup>22</sup>. Eine wesentliche physiologische Reaktion auf Stressreize ist ein Anstieg der Herzfrequenz. Ob es vermittelt durch die Herzfrequenz zu Effekten von chronischem Stress auf den vaskulären Phänotyp bzw. die vaskuläre Signaltransduktion kommt, ist bislang nicht bekannt. Eine physiologische Regulation der eNOS ist ein wesentliches Merkmal einer intakten Endothelfunktion. Ein dysfunktionales Endothel ist durch eine verminderte Expression der eNOS <sup>121</sup>, sowie durch eine vermehrte Expression der NADPH-Oxidase <sup>78,121</sup> und des AT1-Rezeptors gekennzeichnet <sup>38</sup>.

Abbildung 8A zeigt, dass in 129 SV-Mäusen chronischer Stress zu einem Anstieg der Herzfrequenz von  $514 \pm 10$  bpm auf  $570 \pm 14$  bpm führte. Eine Behandlung mit Ivabradin hingegen senkte den stressinduzierten Herzfrequenzanstieg auf  $485 \pm 7$  bpm ab ( $n=10$  pro Gruppe,  $p<0,05$ ). Weder das Stressprotokoll noch die Ivabradinbehandlung hatten einen signifikanten Einfluss auf die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte (Abb. 8B). Um die Effekte von chronischem Stress und einer begleitenden Herzfrequenzreduktion auf die Expression der eNOS und des AT1-Rezeptors in der thorakalen Aorta von 129 SV-Mäusen zu untersuchen, erfolgten TaqMan PCRs. Abbildung 9A zeigt die Quantifizierung der mRNA-Expression der eNOS. Mäuse, die wiederholtem Stress ausgesetzt waren, wiesen im Vergleich zu naiven, d.h. nicht gestressten Mäusen, eine auf  $84 \pm 3\%$  verminderte Expression der eNOS-mRNA auf ( $n=10$  pro Gruppe,  $p<0,05$ ). Die simultane Behandlung der Mäuse während der 28-tägigen Stressphase mit Ivabradin verhinderte dagegen die durch Stress induzierte Reduktion der eNOS-mRNA-Expression. Die Behandlung von naiven Mäusen mit Ivabradin hatte keinen Effekt auf die Expression der eNOS. Abbildung 9B veranschaulicht, dass chronischer Stress zu einer signifikanten Hochregulation der AT1-Rezeptor-mRNA-Expression ( $168 \pm 18\%$ ) im Vergleich zu naiven Tieren führt ( $n=10$  pro Gruppe,  $p<0,05$ ). Simultane

Herzfrequenzreduktion mittels Ivabradin während der Stressbehandlung verminderte die durch Stress induzierte Hochregulation der AT1-Rezeptor-mRNA-Expression ( $112 \pm 14\%$ ,  $p < 0,05$ ). Ivabradin hatte keinen Effekt auf die Expression des AT1-Rezeptors der naiven Mäuse.

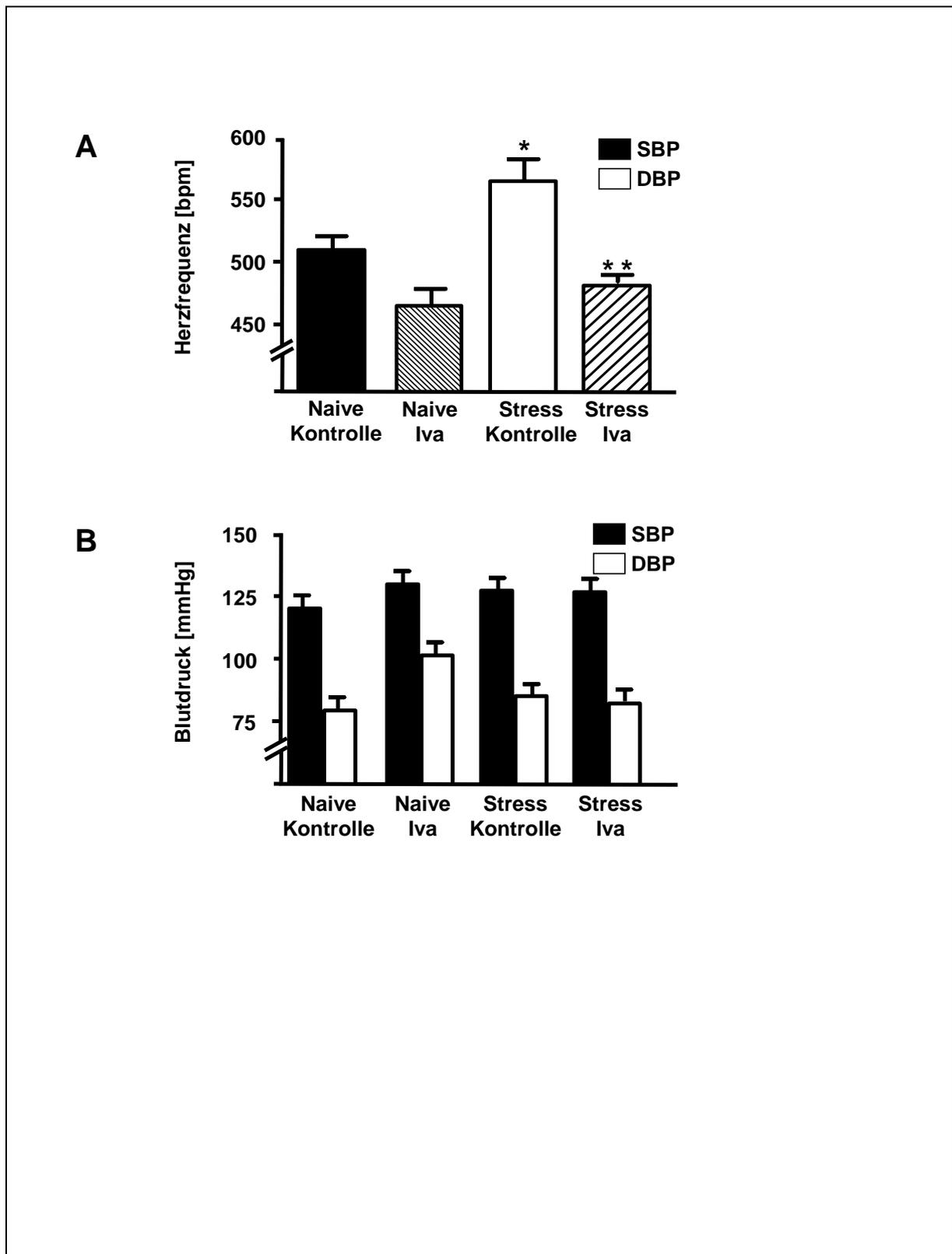


Abb. 8: Effekte von Stress und Herzfrequenzreduktion mit Ivabradin auf gemittelte Herzfrequenz (A) (n=10, p<0,05 für Stress Kontrolle vs. Naive Kontrolle) -und Blutdruckwerte (B) in 129 SV-Mäusen.

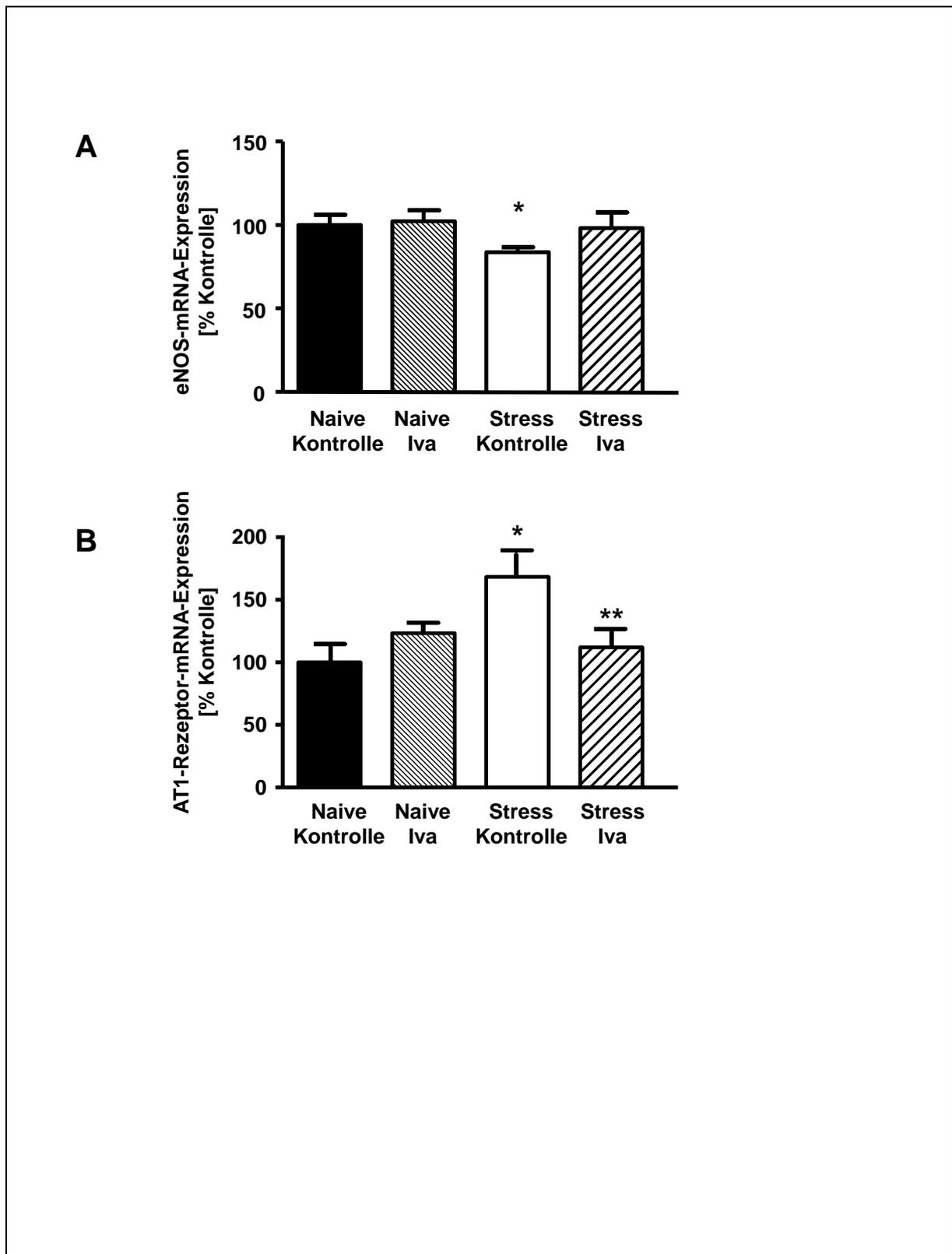


Abb. 9: Effekte von chronischem Stress und Herzfrequenzreduktion mit Ivabradin auf die aortale mRNA-Expression der eNOS (A) (n=10,  $p < 0,05$  für Stress Kontrolle vs. Naive Kontrolle) und des AT1-Rezeptors (B) (n=10,  $p < 0,05$  für Stress Kontrolle vs. Naive Kontrolle) in 129 SV-Mäusen.

## 5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung vaskulärer Effekte einer pharmakologische Herzfrequenzreduktion durch den  $I_{(f)}$ -Kanal Inhibitor Ivabradin bei ApoE<sup>-/-</sup>-und Wildtypmäusen. Die zentralen Befunde sind eine Reduktion der aortalen Expression des AT1-Rezeptors, eine Reduktion der aortalen Aktivität der NADPH-Oxidase und eine verminderte Aktivität der Rac1 GTPase durch die Reduktion der Herzfrequenz. Darüber hinaus zeigt sich unter Behandlung mit Ivabradin eine verminderte Membrantranslokation von p<sup>47phox</sup>. Wildtypmäuse mit erhöhter Herzfrequenz, unter einem chronischen Stressparadigma, weisen eine verminderte aortale mRNA-Expression der eNOS und eine gesteigerte Expression der AT1-Rezeptor-mRNA auf. Die Reduktion der Herzfrequenz, parallel zur Stressbehandlung, verhindert die Herabregulation der eNOS und führt zu einer verminderten Expression des AT1-Rezeptors im Vergleich zu gestressten Mäusen. Die Arbeit identifiziert darüber hinaus mögliche, spezifisch durch die Reduktion der Herzfrequenz regulierte Gene. So weisen die Ergebnisse eines Genearrays sowie von Ingenuity-Pathway-Analysen auf eine verstärkte Expression zytoskelettärer und muskulärer Strukturproteine unter einer Herzfrequenz-senkenden Behandlung mit Ivabradin hin.

### 5.1. Effekte einer Herzfrequenzreduktion auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die physiologische Rolle des RAAS besteht im Wesentlichen in der Regulation des Blutvolumens, des Wasser -und Elektrolythaushaltes sowie des systemischen vaskulären Widerstandes<sup>85</sup>. Neben den genannten physiologischen Funktionen spielt eine Aktivierung des RAAS jedoch auch eine bedeutende Rolle für die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen wie der arteriellen Hypertonie, des Myokardinfarktes und der Herzinsuffizienz<sup>81</sup>. Insbesondere Ang II und der AT1-Rezeptor spielen in allen Stadien des s.g. kardiovaskulären Kontinuums eine zentrale Rolle. Einen wesentlichen Stellenwert nimmt der AT1-Rezeptor ein<sup>123</sup>. Eine Stimulation des Rezeptors durch Angiotensin II führt über verschiedene Aktivierungswege zur Produktion von ROS und damit zu oxidativem Stress, der eine Inaktivierung der endothelialen NO-Synthase, eine Vasokonstriktion und die Expression

von Inflammationsmarkern nach sich ziehen kann. Letztlich manifestiert sich eine endotheliale Dysfunktion<sup>119,120</sup>.

Vorbefunde am Modell der ApoE<sup>-</sup>-Maus zeigen, dass die Senkung der Herzfrequenz über eine Verbesserung der endothelabhängigen Vasorelaxation das Ausmaß atherosklerotischer Plaques in der thorakalen Aorta reduziert. Als wesentlicher zugrundeliegender Mechanismus wurde die Reduktion von oxidativem Stress charakterisiert<sup>20</sup>. Da das RAAS über den AT1-Rezeptor wesentlich an der Produktion von ROS und der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion beteiligt ist<sup>123</sup>, bestand eine der Hypothesen der vorliegenden Arbeit in einer möglichen Regulation des RAAS durch die Herzfrequenz. Eine 6 wöchige Behandlung von ApoE<sup>-</sup>-Mäusen mit Ivabradin führte jedoch nicht zu einer Regulation der ACE-Aktivität und der ANG II-Konzentration im Plasma. Im Gegensatz dazu zeigten die Westernblotexperimente, dass Ivabradin zu einer signifikanten Reduktion der AT1-Rezeptor-Expression auf Protein- und auf mRNA-Ebene in der thorakalen Aorta führt.

Das gewebeständige RAAS entwickelt proatherosklerotische Effekte an der Gefäßwand<sup>50</sup>. So beschleunigt eine ANG II-Perfusion die Ausbildung atherosklerotischer Plaques<sup>18</sup>. Unser Nachweis einer herzfrequenzabhängigen AT1-Rezeptor-Expression könnte dafür sprechen, dass vor allem das gewebeständige RAAS einer Regulation durch die Herzfrequenz unterliegen könnte.

Befunde, die diese Ergebnisse untermauern, sind experimentelle Arbeiten an kultivierten Zellen, die eine Regulation des AT1-Rezeptors durch mechanische Stimuli belegen. So zeigten Ramkhalawon et al. anhand von Zellkulturexperimenten an humanen Umbilicalvenen-Endothelzellen (HUVECs), dass es zu einer Herabregulation des AT1-Rezeptors unter laminarem (protektivem) Scherstress kommt<sup>89</sup>. Darüber hinaus identifizierte die Gruppe anhand von Immunhistofärbungen Gefäßareale wie die innere Krümmung der Aorta als Prädilektionsstellen einer verstärkten AT1-Rezeptor-Expression, da es hier vor allem zu Verwirbelungen<sup>113</sup>, also oszillierendem Scherstress, kommt. ENOS-Knockoutmäuse wiesen den Experimenten von Ramkhalawon et al. zur Folge eine verstärkte AT1-Rezeptor-Expression auf. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, die die eNOS überexprimieren, eine Herabregulation des AT1-Rezeptors, sodass man folgern könnte, dass Scherstress die AT1-Rezeptor-Expression beeinflusst und NO diesen Prozess moduliert<sup>89</sup>. Die Qualität des Scherstress ist frequenzabhängig und beeinflusst den vaskulären Phänotyp<sup>48</sup>. Physiologische Scherfrequenzen (1 Hz) wirken im Zellkulturexperiment im Gegensatz zu höheren Frequenzen atheroprotektiv<sup>48</sup>. Neben Scherstress wurden auch eine Regulation des

AT1-Rezeptors durch zyklische Deformationen bzw. Dehnungsreize (Cyclic Strain) gezeigt. Stanley et al. untersuchten den Einfluss von Cyclic Strain auf die Matrix-Genexpression und die Proteinsynthese humaner, glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs). Wesentlicher Befund der Arbeit ist eine ANG II-unabhängige Hochregulation des AT1-Rezeptors sowie von Kollagen und Fibronectin durch zyklische Dehnungsreize<sup>106</sup>.

Der Charakter strömungsmechanischer Parameter wie des Scherstress oder zyklischer Dehnungsreize ist zum einen durch die Gefäßgeometrie, zum anderen durch die Flussgeschwindigkeit und somit den pulsatilen arteriellen Blutfluss bestimmt, welcher unter anderem von der Herzfrequenz abhängt<sup>16,37</sup>. Die arterielle Blutdruckamplitude wird durch die Herzfrequenz potenziert und als rhythmische Dehnung (Cyclic Strain) auf das Endothel übertragen. Beide strömungsmechanischen Parameter unterliegen dem Herzzeitvolumen und werden somit direkt durch die Herzfrequenz beeinflusst<sup>107,125</sup>. Direkte Effekte der Herzfrequenz auf die genannten Parameter wurden bislang jedoch nicht untersucht und sind daher spekulativ. Dennoch könnte die Herzfrequenz direkten Einfluss auf den lokalen Blutfluss und damit auch auf Scherstress und die lokale Mechanik ausüben und einen Erklärungsansatz für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde bieten. Höhere Herzfrequenzen könnten turbulente Strömungen und damit oszillären Scherstress begünstigen, während niedrige Frequenzen potentiell einen laminaren, protektiven Scherstress hervorrufen.

## **5.2. Die Reduktion der Herzfrequenz reguliert die Aktivität der NADPH-Oxidase und ihrer Untereinheiten Rac1 und p<sup>47phox</sup>**

Die Produktion und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies stellt für die Pathogenese der Atherosklerose ein Schlüsselereignis dar<sup>39</sup>. Risikofaktoren wie Diabetes, Hypercholesterinämie und Rauchen können über eine verstärkte ROS-Produktion zu einer endothelialen Dysfunktion und in der Folge zur Atherosklerose führen<sup>14,66,94</sup>.

Vorbefunde an ApoE<sup>-</sup>-Mäusen zeigten, dass eine Herzfrequenzsenkung mittels Ivabradin zu einer verminderten Freisetzung von ROS führt. L012-Assays demonstrierten, dass die Superoxidproduktion deutlich geringer ausfällt und dementsprechend die Hydroperoxidation

ubiquitärer Lipide – als ein Indikator für oxidativen Stress – vermindert ist <sup>20</sup>. Daher untersuchten wir die Aktivität der NADPH-Oxidase als mögliche Quelle der ROS.

Um zu überprüfen, ob die Aktivität der NADPH-Oxidase durch Ivabradin beeinflusst wird, wurden NADPH-Oxidase-Aktivitäts-Assays durchgeführt. Ein wesentlicher Befund dieser Arbeit ist die Reduktion der Aktivität der NADPH-Oxidase durch eine gezielte Herzfrequenzreduktion. Um zu untersuchen, ob auch die Untereinheiten Rac1 und p<sup>47phox</sup> durch eine Herzfrequenzreduktion reguliert werden, erfolgte die Bestimmung der Rac1-Expression und der Rac1-Aktivität mittels Westernblot sowie Pull-Down-Assays. Darüber hinaus wurde die Proteinexpression von p<sup>47phox</sup> im Westernblot untersucht. Die wesentlichen und neuen Befunde dieser Arbeit sind die Reduktion der Rac1-Aktivität sowie der p<sup>47phox</sup> Membrantranslokation unter gezielter Herzfrequenzreduktion.

Diese Befunde erweitern die bislang bekannten Daten einer verminderten ROS-Freisetzung durch Herzfrequenzreduktion und untermauern die Bedeutung einer Regulation der NADPH-Oxidase-Aktivität durch Ivabradin. Der Befund einer verminderten Aktivität der Rac1 GTPase korrespondiert mit im Rahmen von Zellkulturexperimenten erhobenen Daten von Walcher et al. Die Arbeit zeigt *in vitro* (kultivierte Lymphozyten), dass eine Behandlung von CD4-positiven Lymphozyten mit Ivabradin deren Migration an einer Filtermembran unter chemischer Stimulation reduziert. Methodisch wurde das Ausmaß dieses Effektes in einer Mikro-Chemotaxis-Kammer erfasst <sup>117</sup>. Als einen zugrundeliegenden Mechanismus wird die Reduktion der Rac1-Aktivität in den Lymphozyten beschrieben <sup>43,115</sup>. Dabei ist eine Inhibition der Aktivität der PI3-Kinase wesentlich. So zeigen die Experimente von Wachter et al. darüber hinaus auch, dass die für die Migration der CD4-positiven Lymphozyten kritische Aktivierung der PI3-Kinase durch Ivabradin reduziert wird <sup>117</sup>. Dieses upstream von Rac1 positionierte Enzym ist unter anderem an der AT1-Rezeptor induzierten ROS-Freisetzung in VSMCs beteiligt <sup>99</sup>. Deshalb wäre für zukünftige Arbeiten die Frage interessant, ob die Aktivität der PI3-K auch *in vivo* durch die Herzfrequenzreduktion mit Ivabradin abgeschwächt wird.

Im Hinblick zu den von Walcher et al. ausschließlich in der Zellkultur erhobenen Daten erweitert die vorliegende Arbeit diese um im Tiermodell erhobene Befunde. Dazu zählt auch, dass die NADPH-Oxidase und die Modifikation ihrer Untereinheiten durch eine Reduktion der Herzfrequenz reguliert werden.

### 5.3. Frequenzspezifische vaskuläre Genexpression

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Detektion und Charakterisierung einer möglichen, Herzfrequenz-spezifisch regulierten Genexpression. Es wurde die Hypothese generiert, dass eine Reduktion der Herzfrequenz die Entstehung eines protektiven vaskulären Phänotyps durch Expression antiatherogener Genprodukte fördert. Ein strömungsmechanisches Phänomen, welches indirekt durch die HF beeinflusst wird, ist Scherstress. Für laminären, d.h. physiologischen Scherstress, ist eine vermehrte Expression „protektiver“ Genprodukte belegt. So ist in der Literatur beschrieben, dass beispielsweise die eNOS unter laminärem Scherstress verstärkt exprimiert wird<sup>31</sup>. Im Gegensatz dazu begünstigen pulsatile und nicht laminäre, z.B. oszillierende Wellenformen, ein proinflammatorisches Milieu sowie eine reduzierte Expression der eNOS<sup>9,11,70</sup> und können so zu atherosklerotischen Veränderungen führen<sup>8,16</sup>. Vorbefunde belegen eine Regression aortaler atherosklerotischer Läsionen durch eine Behandlung mit Ivabradin<sup>20</sup>. Vor diesem Hintergrund besteht Grund zur Annahme, dass „protektive“ Gencluster oder Pathways unter Herzfrequenzreduktion mit Ivabradin vermehrt aktiviert und exprimiert werden könnten.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. H. Kroemer (Institut für Pharmakologie, Universität Greifswald) wurden Affymetrix-Assays von aus ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen isolierter aortaler mRNA durchgeführt. Zentraler Befund des Assays ist die aus einer gezielten Herzfrequenzreduktion mittels Ivabradin resultierende vermehrte Expression muskulärer Strukturproteine, welche bislang primär nicht mit einem vaskulären glattmuskulären Phänotyp in Verbindung gebracht wurden. Es zeigte sich insbesondere eine vermehrte Expression von Tropomyosin 2 sowie der skelett-muskulären Troponine T3 und I in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Experimentelle Arbeiten untermauern die erhobenen Befunde. Obwohl Troponine bislang vornehmlich in Skelett- und Herzmuskulatur beschrieben wurden, konnten sie in Arbeiten von Zanellato et al. primär auch in VSMCs nachgewiesen werden<sup>129</sup>. Moran et al. zeigten darüber hinaus eine Expression des s.g. „fast twitch Troponin-Komplexes“ in bovinen und in Rattenaorten, welche, wie die Autoren folgern, die Kontraktilität glatter Gefäßmuskelzellen unterstützen<sup>79</sup>. Pinet et al. wiesen Troponin T in renalen Arteriolen hypertensiver Ratten nach. Am Modell des renovaskulären Hypertonus (one clip-two kidney) konnte an Ratten demonstriert werden, dass eine Clip-induzierte Nierenarterienstenose im Gegensatz zur kontralateralen Niere zu einer Entdifferenzierung renaler VSMCs, zu einer verminderten

Expression von Troponin T und zu einem Verlust an kontraktilen Strukturproteinen führt. Die Autoren folgern, dass die Expression von Troponin T mit einem differenzierten, asekretorischen VSMC-Phänotyp assoziiert ist <sup>86</sup>.

Die Befunde des Genearrays konnten allerdings im Rahmen der eigenen Untersuchungen auf Protein -und auf RNA-Ebene in ApoE<sup>-</sup>-Mäusen nicht bestätigt werden. Dagegen zeigte sich eine korrespondierende Hochregulation der Proteinexpression von Tropomyosin 2, Troponin T3 und I in Wildtyp Mäusen (C57/Bl6), die ebenfalls mit Ivabradin (20mg/ kg KG) für 6 Wochen behandelt wurden. Die Frage, warum sich die Befunde des Assays trotz des Einsatzes identischer RNA-Sonden letztlich in ApoE<sup>-</sup>-Mäusen nicht reproduzieren ließen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt werden. Eine Unwägbarkeit ist sicherlich die geringe Probenanzahl (n=3), die in den Assay einging. Ein Argument für die Validität des Genearrays sind jedoch die Befunde aus den Wildtyp-Mäusen. Diese zeigen unter einer herzfrequenzsenkenden Behandlung eindrücklich eine vermehrte Expression von Tropomyosin 2 sowie der skelett-muskulären Troponine T3 und I in der thorakalen Aorta. Diese Befunde stützen die Hypothese eines frequenzabhängigen, primär kontraktilen, glattmuskulären Phänotyps. Um die Bedeutung der Herzfrequenz bzw. von pulsatilen mechanischen Dehnungsreizen auf zellulärer Ebene weiter zu charakterisieren, müssen diese präliminären Befunde jedoch im Rahmen weiterer Experimente (z.B. gezielte Dehnungsreize mittels Flexercell-Stimulation) umfassend untersucht werden.

Ingenuity-Pathway-Analysen haben eine vermehrte Expression MAP-Kinase-assoziiierter Signalwege unter Behandlung mit Ivabradin identifiziert. Eine Vielzahl experimenteller Daten demonstriert die Bedeutung von MAP-Kinasen für die Differenzierung und Ausbildung eines kontraktilen Phänotyps von VSMCs <sup>12,84,112</sup>. Diese Befunde korrespondieren mit Ergebnissen von Qu MJ et al. <sup>87</sup>. Die Gruppe beschreibt in VSMCs eine frequenzabhängige Aktivierung, d.h. Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK und p38 durch zyklische Dehnungsreize. Dehnungsfrequenzen von 0.5-1 Hz induzierten eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK und p38, während diese unter höheren Frequenzen abnahm. Darüber hinaus zeigte sich, dass nur durch Blockierung des p38, nicht aber des ERK-Signalweges, eine Differenzierung der VSMCs verhindert werden kann und daher insbesondere der p38-Signalweg für die phänotypische Anpassung der VSMCs auf zyklische Dehnungsreize verantwortlich zu sein scheint <sup>87</sup>. Im Gegensatz zu diesen Daten sind in vivo erhobene Befunde bislang nicht bekannt. Daher stellt die Ingenuity-Pathway-Analyse einen richtungsweisenden, neuen Befund dar, der auf die mögliche Bedeutung von MAPK für durch die Herzfrequenz

vermittelte vaskuläre Effekte hinweist. Auf dem Boden der Pathway-Analysen wurde die Phosphorylierung der MAPK ERK und p38 mittels Westernblots in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht, welche eine Hochregulation von p-ERK und p-p38 unter Behandlung mit Ivabradin zeigten. Diese Ergebnisse untermauern die genannten in vitro Daten und zeigen erstmalig im Tiermodell eine Modulation der MAPK-Expression durch die Herzfrequenz. Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse aus den Affymetrix-Assays und den Pathway-Analysen die Hypothese, dass eine Herzfrequenzreduktion die Expression eines kontraktiven vaskulären Phänotyps begünstigen könnte.

#### **5.4. Chronischer Stress beeinflusst den vaskulären Phänotyp**

Klinische und experimentelle Arbeiten weisen darauf hin, dass chronischer, mentaler Stress direkte Auswirkung auf die vaskuläre Funktion hat und das Auftreten einer endothelialen Dysfunktion begünstigen kann <sup>35,100,116,126</sup>. Befunde der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass Mäuse, die chronischem Stress ausgesetzt sind, eine deutlich eingeschränkte endothelabhängige Vasorelaxation aufweisen. Eine gleichzeitige, gezielte pharmakologische Herzfrequenzreduktion mit Ivabradin verbessert die endothelabhängige Vasodilatation <sup>22</sup>. Dabei konnte außerdem gezeigt werden, dass chronischer mentaler Stress zu einer signifikanten Steigerung der Herzfrequenz führt ohne den Blutdruck relevant zu beeinflussen <sup>22</sup>. Die einer eingeschränkten endothelialen Funktion unter chronischem Stress zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang nur unzureichend verstanden.

Die eNOS ist ein integraler Regulator der physiologischen vaskulären Funktion <sup>114</sup>. Eine Einschränkung der endothelialen Homöostase im Sinne einer endothelialen Dysfunktion ist wesentlich durch einen Mangel an NO bzw. durch eine verminderte Aktivität der NO-Synthase gekennzeichnet <sup>62</sup>. Unsere Experimente zeigen, dass chronischer Stress die mRNA-Expression der eNOS in thorakalen Aorten von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu ungestressten Tieren reduziert. Eine Herzfrequenzreduktion gleicht die eNOS-Expression der gestressten Tiere hingegen derjenigen der naiven, d.h. nicht gestressten Tiere, an. Dieser Befund liefert einen Erklärungsansatz und erweitert die im Vorfeld der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde einer gestörten endothelialen Funktion unter chronischem Stress. Die Effekte einer Herzfrequenzreduktion auf die Expression der eNOS stehen im Einklang mit

den bislang erhobenen Daten und untermauern die Bedeutung der Frequenzreduktion für die Wiederherstellung der endothelialen Integrität in verschiedenen Schadensmodellen.

Eine vermehrte Aktivität des Renin-Angiotensin–Aldosteron-Systems (RAAS) ist ein grundlegender Anpassungsmechanismus im Rahmen von Stressreizen -und Situationen <sup>1</sup>. Eine dauerhafte Aktivierung des RAAS im Rahmen von chronischem Stress könnte über die „physiologische“ Stressresponse hinaus auch maladaptive Mechanismen und Regulationsvorgänge begünstigen und möglicherweise die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen wie arterieller Hypertonie begünstigen. Vor diesem Hintergrund erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Charakterisierung der mRNA-Expression des AT1-Rezeptors, da er als wesentlicher Bestandteil des RAAS ebenfalls zur Pathogenese der endothelialen Dysfunktion beiträgt <sup>120</sup>. Es zeigte sich eine deutliche Steigerung der AT1-Rezeptor-Expression unter chronischem Stress im Vergleich zu den nicht gestressten Kontrolltieren. Dieser Befund untermauert korrespondierend zur eNOS die Bedeutung einer endothelialen Dysfunktion als unmittelbares „Schadensereignis“ auf einen Stressreiz. Die Herzfrequenzreduktion mittels Ivabradin führte zu einer Reduktion der AT1-Rezeptor-Expression im Vergleich zu den unbehandelten, gestressten Kontrolltieren. Zusammenfassend charakterisieren die Ergebnisse die HF als einen zentralen Mediator vaskulärer Effekte von chronischem Stress. Im Hinblick auf die in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen erhobenen Befunde, kann in einem weiteren Schadensmodell ein direkter Effekt einer Herzfrequenzreduktion auf die Expression des AT1-Rezeptors nachgewiesen werden, was die Bedeutung der Herzfrequenz für den vaskulären Phänotyp unterstreicht. Die Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass die Herzfrequenz, auch im Rahmen von mentalem Stress, einen eigenständigen und wesentlichen Mediator maladaptiver, vaskulärer Effekte darstellt. Somit könnte die Herzfrequenzreduktion ein wichtiges therapeutisches Ziel darstellen, das im Rahmen klinischer Studien weiter untersucht werden sollte.

## **5.5. Mögliche klinische Bedeutung der Befunde**

In epidemiologischen und klinischen Studien lässt sich eine relevante Assoziation zwischen der Höhe der mittleren Herzfrequenz und der kardiovaskulären Mortalität herstellen. Dabei scheint der Herzfrequenz möglicherweise Bedeutung als ein unabhängiger Risikofaktor zuzukommen <sup>7,29,51,52,60</sup>. Zahlreiche Befunde weisen darauf hin, dass die Herzfrequenz selbst,

ohne weitere Einflüsse autonomer Regulationsvorgänge, direkte Effekte auf strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Herz-Kreislauf-Systems, vor allem auf das Gefäßsystem, ausübt. Experimentelle und klinische Arbeiten zeigen, dass die Herzfrequenz einen wesentlichen Einfluss auf die vaskuläre Mechanik hat <sup>21</sup>. So wirkt an der Gefäßwand ein hämodynamischer Stress, der als ein Produkt von Faktoren entsteht, die von Pulsdruck und Herzfrequenz abhängen <sup>106</sup>. Diese zyklische Dehnung (Cyclic Strain), also die Auswirkung der von der Herzfrequenz potenzierten arteriellen Blutdruckamplitude auf das Gefäß, nimmt wesentlichen Einfluss auf den vaskulären Phänotyp. So wurde in unterschiedlichen Studien der Effekt von Cyclic Strain auf die zelluläre Mechanik von VSMCs untersucht <sup>107,125</sup>. Vor allem zeigte sich eine Hochregulation extrazellulärer Matrixmoleküle wie Fibronectin und Kollagen, die mit einer erhöhten vaskulären Steifigkeit assoziiert wurden <sup>28,110</sup>.

An Ratten durchgeführte Experimente von Mangoni et al. deuten darauf hin, dass eine durch Schrittmacherstimulation akzelerierte Herzfrequenz die Compliance (Dehnbarkeit) der Arteriae Caroticae vermindert <sup>74</sup>. Dabei scheint der Prozess der Gefäßversteifung unabhängig vom sympathischen Nervensystem zu sein <sup>77</sup>. Mittels ultraschallgestützter Distensibilitätsmessung gelang es Giannattasio et al., die Assoziation zwischen einer schrittmacherinduzierten Herzfrequenzsteigerung und einer erhöhten Steifigkeit der A. Carotis auch an Patienten nachzuweisen <sup>36</sup>. Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe am Modell der ApoE-defizienten Maus zeigen, dass eine gezielte Herzfrequenzreduktion die Compliance thorakaler Aorta wiederherstellt. Die entsprechenden Daten sind bislang unveröffentlicht <sup>23</sup>. Es existieren allerdings auch Studien, die eine inverse Assoziation zwischen Herzfrequenz und Gefäßsteifigkeit beschreiben. Diesen Ergebnissen von Wilkinson et al. liegen jedoch nur Pulswellenanalysen zu Grunde <sup>124</sup>. Insgesamt sprechen die Ergebnisse der bislang bekannten Daten für eine positive Assoziation zwischen der Herzfrequenz und vaskulärer Steifigkeit. Klinische und epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass die vaskuläre Steifigkeit, also eine verminderte Compliance, einen positiven Prädiktor für kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren darstellt <sup>68,130</sup>. Vor diesem Hintergrund sollte die Bedeutung einer medikamentösen Senkung der Herzfrequenz für die vaskuläre Steifigkeit im Rahmen einer klinischen Studie untersucht werden. Die Studienteilnehmer sollten kardiovaskuläre Risikofaktoren, bei fehlenden atherosklerotischen Manifestationen, vereinen. Methodisch könnte die vaskuläre Steifigkeit ultraschallgestützt mittels Messung der Pulswellengeschwindigkeit untersucht werden. Darüber hinaus sollte die flussvermittelte Vasodilatation (FMD) am Unterarm, als ein übliches Verfahren zur Messung der Endothelfunktion, bestimmt werden. Im Hinblick auf die

experimentell erhobenen Daten könnte eine Senkung der Herzfrequenz verschiedene Parameter und Marker für vaskuläre Steifigkeit optimieren und zu einer verbesserten vaskulären Compliance beitragen.

Neben der vaskulären Steifigkeit beeinflusst die Herzfrequenz weitere hämodynamische und strömungsmechanische Komponenten der kardiovaskulären Zirkulation. Ein wesentlicher Parameter, welcher die vaskuläre Funktion und den vaskulären Phänotyp entscheidend beeinflusst, sind die durch den Blutfluss auf das innere Gefäßlumen hervorgerufenen und vermittelten Scherkräfte, der sog. Scherstress. Zahlreiche Arbeiten charakterisieren die Effekte von Scherstress und unterschiedlichen Mustern von Scherstress auf die vaskuläre Funktion und Biologie<sup>16</sup>. Besonders im Bereich der koronaren Zirkulation wurden die im koronaren Gefäßbett dominierenden Formen des Scherstress charakterisiert und der Einfluss des Wechsels zwischen systolischem und diastolischem Fluss auf Schermuster untersucht<sup>30</sup>. Der phasische Wechsel zwischen Systole und Diastole führt demnach zu einem in der Systole vorherrschenden oszillierenden, niedrigen Scherstress, während in der Diastole hoher, laminarer Scherstress vorherrscht<sup>102</sup>. Da die Dauer der Diastole direkt abhängig ist von der Herzfrequenz, wäre ein direkter Effekt der Herzfrequenz auf das Muster des Scherstress denkbar. Untersuchungen, die den Effekt der Herzfrequenz auf Scherstress charakterisieren, liegen bislang jedoch nicht vor. Vor diesem Hintergrund wäre eine grundlegende Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Herzfrequenz und Scherstress interessant. Die Quantifizierung des Scherstress kann über verschiedene Methoden erfolgen. Grundsätzlich verhält sich Scherstress proportional zum Produkt aus Blutviskosität ( $\mu$ ) und dem räumlichen Gradienten der Flussgeschwindigkeit des Blutes ( $dv/dy$ ) an einem definierten Punkt des Gefäßes ( $SS = \mu \times dv/dy$ )<sup>16</sup>. Eine gängige Methode ist die dopplersonographische Messung der Geschwindigkeit. Neben grundlegenden experimentellen Untersuchungen wären in der Folge klinische Studien zur Klärung des Effektes einer gezielten Herzfrequenzreduktion auf den Scherstress in unterschiedlichen Gefäßstrombahnen von Interesse. Die zu Grunde liegende Hypothese wäre eine „Normalisierung“ des Scherstress zugunsten eines laminaren, protektiven Scherstress-Musters bei niedrigen Herzfrequenz-Werten. Höhere Herzfrequenzen könnten oszillierenden Scherstress begünstigen. Eine Klärung des Einflusses der Herzfrequenz wäre von grundlegendem Interesse um die positiven Effekte einer gezielten Herzfrequenzreduktion besser zu verstehen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1) Aguilera G, Kiss A, Luo X, Akbasak BS (1995) The renin angiotensin system and the stress response. *Ann N Y Acad Sci* 771:173-186
- 2) Angerer P, Siebert U, Kothny W, Muhlbauer D, Mudra H, von Schacky C (2000) Impact of social support, cynical hostility and anger expression on progression of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 36:1781-1788
- 3) Babior BM (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93:1464-1476
- 4) Bassenge E, Heusch G (1990) Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 116:77-165
- 5) Baumhäkel M, Custodis F, Schlimmer N, Laufs U, Böhm M (2010) Heart rate reduction with ivabradine improves erectile dysfunction in parallel to decrease in atherosclerotic plaque load in ApoE-knockout mice. *Atherosclerosis* 212:55-62
- 6) Beere PA, Glagov S, Zarins CK (1984) Retarding effect of lowered heart rate on coronary atherosclerosis. *Science* 226:180-2
- 7) Benetos A, Rudnichi A, Thomas F, Safar M, Guize L (1999) Influence of heart rate on mortality in a French population: role of age, gender, and blood pressure. *Hypertension* 33:44-52
- 8) Berk BC (2008) Atheroprotective signaling mechanisms activated by steady laminar flow in endothelial cells. *Circulation* 117:1082-9
- 9) Blackman BR, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA Jr (2002) A new in vitro model to evaluate differential responses of endothelial cells to simulated arterial shear stress waveforms. *J Biomech Eng* 124:397-407
- 10) Böhm M, Swedberg K, Komajda M, Borer JS, Ford I, Dubost-Brama A, Lerebours G, Tavazzi L (2010) Heart rate as a risk factor in chronic heart failure (SHIFT): the

association between heart rate and outcomes in a randomised placebo-controlled trial.  
Lancet 376:886-94

- 11) Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM (2002) Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiol Genomics* 9:27-41
- 12) Brown DJ et al. (2005) Endothelial cell activation of the smooth muscle cell phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway promotes differentiation. *J Vasc Surg* 41:509-516
- 13) Brown HF, Difrancesco D, Noble SJ (1979) How does adrenaline accelerate the heart. *Nature* 280:235-6
- 14) Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844
- 15) Carter JR, Kupiers NT, Ray CA (2005) Neurovascular responses to mental stress. *J Physiol* 564:321-327
- 16) Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M et al. (2007) Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol* 49:2379-2393
- 17) Chilian WM, Marcus ML (1982) Phasic coronary blood flow velocity in intramural and epicardial coronary arteries. *Circ Res* 50:775-81
- 18) Chobanian AV, Alexander RW (1996) Exacerbation of atherosclerosis by hypertension. Potential mechanisms and clinical implications. *Arch Intern Med* 156:1952-1956
- 19) Copie X, Hnatkova K, Staunton A, Fei L, Camm AJ, Malik M (1996) Predictive power of increased heart rate versus depressed left ventricular ejection fraction and heart rate variability for risk stratification after myocardial infarction. Results of a two-year

follow-up study. *J Am Coll Cardiol* 27:270-6

- 20) Custodis F, Baumhäkel M, Schlimmer N, et al. (2008) Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 117:2377-87
- 21) Custodis F, Schirmer SH, Baumhäkel M, Heusch G, Böhm M, Laufs U (2010) Vascular pathophysiology in response to increased heart rate. *J Am Coll Cardiol* 56:1973-83
- 22) Custodis F, Gertz K, Balkaya M, Prinz V, Mathar I, Stamm C, Kronenberg G, Kazakov A, Freichel M, Böhm M, Endres M, Laufs U (2011) Heart rate contributes to the vascular effects of chronic mental stress-effects on endothelial function and ischemic brain injury in mice. *Stroke* 42:0-8
- 23) Custodis F, Fries P, Müller A, Stamm C, Grube M, Kroemer HK, Böhm M, Laufs U (2012) Heart rate reduction by ivabradine restores aortic compliance in apolipoprotein E deficient mice. under revision
- 24) DeKeulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander KK, Griendling KK (1998) Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res* 82:1094-101
- 25) DeLeo FR, Quinn MT (1996) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol* 60:677-691
- 26) DiFrancesco D, Camm JA (2004) Heart rate lowering by specific and selective I-f current inhibition with ivabradine - A new therapeutic perspective in cardiovascular disease. *Drugs* 64:1757-1765
- 27) DiFrancesco D (2010) The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res* 106:434-46
- 28) Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ, Schafer AI (2000) Physiological cyclic stretch directs L-arginine transport and metabolism to collagen synthesis in vascular

smooth muscle. *FASEB J* 14:1775-1783

- 29) Dyer AR, Persky V, Stamler J, et al. (1980) Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 112:736-49
- 30) Feldman CL, Ilegbusi OJ, Hu Z, Nesto R, Waxman S, Stone PH (2002) Determination of in vivo velocity and endothelial shear stress patterns with phasic flow in human coronary arteries: a methodology to predict progression of coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 143:931-939
- 31) Fleming I (2010) Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch* 459:793-806
- 32) Fox K, Borer JS, Camm AJ, Danchin N, Ferrari R, Lopez Sendon JL, Steg PG, Tardif JC, Tavazzi L, Tendera M (2007) Resting heart rate in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 50:823-830
- 33) Freeman JLR, Kreck ML, Uhlinger DJ, Lambeth JD (1994) A Ras effector-homologue region on rac regulates protein associations in the neutrophil respiratory burst oxidase complex. *Biochemistry* 33:13431-13435
- 34) Freeman JL, Lambeth JD (1996) NADPH oxidase activity is independent of p47phox in vitro. *J Biol Chem* 271:222578-22582
- 35) Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, O'Connor G, Betteridge J, Klein N, Steptoe A, Deanfield JE (2000) Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 102:2473-2478
- 36) Giannattasio C, Vincenti A, Failla M, et al. (2003) Effects of heart rate changes on arterial distensibility in humans. *Hypertension* 42:253-6
- 37) Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, et al. (2007) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practise: executive summary. *Eur Heart J*

- 38) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-8
- 39) Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 91:7A-11A
- 40) Hayashi N, Someya N, Maruyama T, Hirooka Y, Endo MY, Fukuba Y (2009) Vascular responses to fear-induced stress in humans. *Physiol Behav* 98:441-6
- 41) Heidland UE, Strauer BE (2001) Left ventricular muscle mass and elevated heart rate are associated with coronary plaque disruption. *Circulation* 104:1477-82
- 42) Heinloth A et al. (2000) Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 11:1819-25
- 43) Heller EA, Liu E, Tager AM et al. (2006) "Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells," *Circulation* 113:2301-2312
- 44) Heusch G, Yoshimoto N (1983) Effects of heart rate and perfusion pressure on segmental coronary resistances and collateral perfusion. *Pflugers Arch* 397:284-9
- 45) Heusch G, Schulz R (2005) The pathophysiological role of heart rate in acute myocardial ischemia and the benefits of heart rate reduction. *Heart rate management in stable angina*. Taylor & Francis: 39-50
- 46) Heusch G (2008) Heart rate in the pathophysiology of coronary blood flow and myocardial ischaemia: benefit from selective bradycardic agents. *Br J Pharmacol* 153:1589-601

- 47) Heusch G, Skyschally A, Gres P, van Caster P, Schilawa D, Schulz R (2008) Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction. *Eur Heart J* 29:2265-75
- 48) Himburg HA, Dowd SE, Friedman MH (2007) Frequency-dependent response of the vascular endothelium to pulsatile shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H645-53
- 49) Hjalmarson A, Gilpin EA, Kjeksus J, et al. (1990) Influence of heart rate on mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 65:547-53
- 50) Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA (1998) Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* 32:387-392
- 51) Jouven X, Empana JP, Schwartz PJ, Desnos M, Courbon D, Ducimetiere P (2005) Heart-rate profile during exercise as a predictor of sudden death. *N Engl J Med* 352:1951-8
- 52) Kannel WB, Kannel C, Paffenbarger RS Jr., Cupples LA (1987) Heart rate and cardiovascular mortality: the Framingham study. *Am Heart J* 113:1489-94
- 53) Katritsis DG, Pantos J, Efstathiopoulos E (2007) Hemodynamic factors and atheromatic plaque rupture in the coronary arteries: from vulnerable plaque to vulnerable coronary segment. *Coron Artery Dis* 18:229-237
- 54) Knaus UG, Morris S, Dong HJ, Chernoff J, Bokoch GM (1995) Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein-coupled receptors. *Science* 269:221-3
- 55) Knox SS, Adelman A, Ellison RC, Arnett DK, Siegmund K, Weidner G, Province MA (2000) Hostility, social support, and carotid artery atherosclerosis in the national heart, lung, and blood institute family heart study. *Am J Cardiol* 86:1086-1089

- 56) Komuro I, Yazaki Y (1993) Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 55:55-75
- 57) Korshunov VA, Berk BC (2004) Strain-dependent vascular remodeling: the "Glagov phenomenon" is genetically determined. *Circulation* 110:220-226
- 58) Koshkin V, Lotan O, Pick E (1996) The cytosolic component p47phox is not a sine qua non participant in the activation of NADPH oxidase, but is required for optimal superoxide production. *J Biol Chem* 271:30326-30329
- 59) Kosunen KJ (1977) Plasma renin activity, angiotensin II, and aldosterone after mental arithmetic. *Scand J Clin Lab Invest* 37:425-429
- 60) Kristal-Boneh E, Silber H, Harari G, Froom P (2000) The association of resting heart rate with cardiovascular, cancer and all-cause mortality. Eight year follow-up of 3527 male Israeli employees (the CORDIS study). *Eur Heart J* 21:116-24
- 61) Lambeth JD (2000) Regulation of the phagocyte respiratory burst oxidase by protein interactions. *Biochem Mol Biol* 33:427-439
- 62) Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2004) Endothelial function: A critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 109:II27-33
- 63) Lassegue B, Clempus RE (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R277-97
- 64) Laufs U, La Fata V et al. (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97:1129-35
- 65) Laufs U, Endres M, Custodis F, et al. (2000) Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation* 102:3104-10

- 66) Laufs U (2003) Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol* 58:719-731
- 67) Laufs U, Adam O, Strehlow K, Wassmann S, Konkol C, Laufs K, Schmidt W, Böhm M, Nickenig G (2003) Down-regulation of Rac-1 GTPase by Estrogen. *J Biol Chem* 278:5956–5962
- 68) Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, et al. (2006) Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 27:2588-605
- 69) Lee RT, Schoen FJ, Loree HM, Lark MW, Libby P (1996) Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis. Implications for plaque rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1070-1073
- 70) Li M, Scott DE, Shandas R, Stenmark KR, Tan W (2009) High pulsatility flow induces adhesion molecule and cytokine mRNA expression in distal pulmonary artery endothelial cells. *Ann Biomed Eng* 37:1082-92
- 71) Li Y et al. (1998) Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem* 273:2015-2023
- 72) Löffler G, Petrides P, Heinrich P (2007) *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer, Regensburg München Aachen
- 73) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- 74) Mangoni AA, Mircoli L, Giannattasio C, Ferrari AU, Mancia G (1996) Heart rate-dependence of arterial distensibility in vivo. *J Hypertens* 14:897-901
- 75) Manuck SB, Adams MR, McCaffery JM, Kaplan JR (1997) Behaviorally elicited heart rate reactivity and atherosclerosis in ovariectomized cynomolgus monkeys (*Macaca*

fascicularis). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1774-1779

- 76) May M, McCarron P, Stansfeld S, Ben-Shlomo Y, Gallacher J, Yarnell J, Smith GD, Elwood P, Ebrahim S (2002) Does psychological distress predict the risk of ischemic stroke and transient ischemic attack? The caerphilly study. *Stroke* 33:7-12
- 77) Mircoli L, Mangoni AA, Giannattasio C, Mancina G, Ferrari AU (1999) Heart rate-dependent stiffening of large arteries in intact and sympathectomized rats. *Hypertension* 34:598-602
- 78) Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T (2002) Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90:E58-E65
- 79) Moran CM, Garriock RJ, Miller MK, Heimark RL, Gregorio CC, Krieg PA (2008) Expression of the Fast Twitch Troponin Complex, fTnT, fTnI and fTnC, in Vascular Smooth Muscle. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 65: 652-661
- 80) Müller DN, Luft FC (1998) The renin- angiotensin system in the vessel wall. *Basic Res Cardiol* 93:7-14
- 81) Nickening G et al. (2002) The AT(1)- type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis; part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 105:393-396
- 82) Noll G, Wenzel R, Scheider M, et al. (1996) Increased activation of sympathetic nervous system and endothelin by mental stress in normotensive offspring of hypertensive patients. *Circulation* 93:866-869
- 83) O'Donnell RW et al. (2003) Endothelial NADPH oxidase: mechanism of activation by low-density lipoprotein. *Endothelium* 10:291-7

- 84) Owens GK (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75:487-517
- 85) Peach MJ (1977) Renin- angiotensin system; biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 57:313-370
- 86) Pinet F, Poirier F, Fuchs S, Tharaux PL, Caron M, Corvol P, Michel JB, Joubert-Caron R (2004) Troponin T as a marker of differentiation revealed by proteomic analysis in renal arterioles. *The FASEB J* 18:585-6
- 87) Qu MJ, Liu B, Wang HQ, Yan ZQ, Shen BR, Jiang ZL (2007) Frequency- dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain. *J Vasc Res* 44:345-53
- 88) Rajagopalan S, Brook R, Rubenfire M, et al. (2001) Abnormal brachial artery flow-mediated vasodilation in young adults with major depression. *Am J Cardiol* 88:196-8,A7
- 89) Ramkhelawon B, Vilar J, Rivas D, Mees B, Crom Rd, Tedgui A, Lehoux S (2009) Shear Stress Regulates Angiotensin Type 1 Receptor Expression in Endothelial Cells. *Circ Res* 105:869-875
- 90) Reil JC, Böhm M (2007) The role of heart rate in the development of cardiovascular disease. *Clin Res Cardiol* 96:585-92
- 91) Riha GM, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q et al. (2005) Roles of hemodynamic forces in vascular cell differentiation. *Ann Biomed Eng* 33:772-779
- 92) Rogowski O, Shapira I, Shirom A, Melamed S, et al. (2007) Heart rate and microinflammation in men; a relevant atherothrombotic link. *Heart* 93:940-4
- 93) Rosengren A, Hawken S, Ounpuu S, Sliwa K, Zubaid M, Almahmeed WA, Blackett KN, Sitthi-amorn C, Sato H, Yusuf S (2004) Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11119 cases and 13648 controls from 52 countries (the interheart study): Case-control study. *Lancet* 364:953-962

- 94) Ross R (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
- 95) Sajadieh A, Nielsen OW, Rasmussen V, Hein HO, et al. (2004) Increased heart rate and reduced heart- rate variability are associated with subclinical inflammation in middle-aged and elderly subjects with no apparent heart disease. *Eur Heart J* 25:363-70
- 96) Salaycik KJ, Kelly-Hayes M, Beiser A, Nguyen AH, Brady SM, Kase CS, Wolf PA (2007) Depressive symptoms and risk of stroke: The framingham study. *Stroke* 38:16-21
- 97) Schmitz U, Thommes K, Beier I, Wagner W, Sachinidis A, Dusing R, et al. (2001) Angiotensin II-induced stimulation of p21-activated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase is mediated by Rac1 and Nck. *J Biol Chem* 276:22003-10
- 98) Schwinger RH, Böhm M, Koch A, Erdmann E (1992) Force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* 86:2017-2018
- 99) Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 91:406-13
- 100) Skantze HB, Kaplan J, Pettersson K, Manuck S, Blomqvist N, Kyes R, Williams K, Bondjers G (1998) Psychosocial stress causes endothelial injury in cynomolgus monkeys via beta1-adrenoceptor activation. *Atherosclerosis* 136:153-161
- 101) Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK (2002) Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 105:1429-1435
- 102) Soulis JV, Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Farmakis TM, Giannakoulas GA, Parcharidis GE, Louridas GE (2006) Spatial and phasic oscillation of non-Newtonian wall shear stress in human left coronary artery bifurcation: an insight to atherogenesis. *Coron Artery Dis* 17:351-358

- 103) Spieker LE, Hurlimann D, Ruschitzka F, et al. (2002) Mental stress induces prolonged endothelial dysfunction via endothelin-A receptors. *Circulation* 105:2817-20
- 104) Spieker L, Noll G (2003) Pathophysiologische Herz- Kreislauf- Veränderungen bei Stress und Depression. *Therapeutische Umschau* 60:667-672
- 105) Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Brecht M, Gamez G, Tatge H, Reepschlager N, Hornig B, Drexler H, Harrison DG (2003) Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endotheliumdependent vasodilation. *Circulation* 107:1383-1389
- 106) Stanley A, Patel H, Knight Abigail, Williams Bryan (2000) Mechanical strain-induced human vascular matrix synthesis: The role of angiotensin II. *JRAAS* 1:32-35
- 107) Stegemann JP, Hong H, Nerem RM (2005) Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *J Appl Physiol* 98:2321-2327
- 108) Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P (2004) Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology* 29:2007-2017
- 109) Surtees PG, Wainwright NW, Luben RN, Wareham NJ, Bingham SA, Khaw KT (2008) Psychological distress, major depressive disorder, and risk of stroke. *Neurology* 70:788-794
- 110) Tamura K, Chen YE, Lopez-Illasaca M, Daviet L, Tamura N, Ishigami T, Akishita M, Takasaki I, Tokita Y, Pratt RE, Horiuchi M, Dzau VJ, Umemura S (2000) Molecular mechanism of fibronectin gene activation by cyclic stretch in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275:34619-34627
- 111) Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA (1999) Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue: Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res* 84:1203-11

- 112) Tock J et al. (2003) Induction of SM-alpha-actin expression by mechanical strain in adult vascular smooth muscle cells is mediated through activation of JNK and p38 MAP kinase. *Biophys Res Commun* 301:1116-1121
- 113) VanderLaan PA et al. (2004) Site specificity of atherosclerosis; site- selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:12-22
- 114) Vanhoutte PM (2009) How we learned to say no. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1156-1160
- 115) Veillard NR, Steffens S, Pelli G et al. (2005) "Differential influence of chemokine receptors CCR2 and CXCR3 in development of atherosclerosis in vivo," *Circulation* 112:870-878
- 116) von Kanel R, Hepp U, Traber R, Kraemer B, Mica L, Keel M, Mausbach BT, Schnyder U (2008) Measures of endothelial dysfunction in plasma of patients with posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res* 158:363-373
- 117) Walcher T, Bernhardt P, Vasic D, Bach H, Durst R, Rottbauer E, Walcher D (2010) Ivabradine Reduces Chemokine Induced CD4-Positive Lymphocyte Migration. *Mediators Inflamm* 2010:751313
- 118) Wang HQ, Huang LX, Qu MJ, Yan ZQ et al. (2006) Shear stress protects against endothelial regulation of vascular smooth muscle cell migration in a coculture system. *Endothelium* 13:171-180
- 119) Warnholtz A et al. (1999) Increased NADH- oxidase- mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin- angiotensin system. *Circulation* 99:2027-2033
- 120) Wassmann S et al. (2004) Inhibition of diet- induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A recaptor double-knockout mice. *Circulation* 110:3062-3067

- 121) Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G (2004) Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension* 44:381-386
- 122) Wassmann K et al. (2006) AT1 receptor antagonism improves endothelial dysfunction in postmenopausal women. *Maturitas* 53:176-183
- 123) Wassmann S, Nickenig G (2006) Pathophysiological regulation of the AT1- receptor and implications for vascular disease. *Journal of Hypertension* 24:15-21
- 124) Wilkinson IB, MacCallum H, Flint L, Cockcroft JR, Newby DE, Webb DJ (2000) The influence of heart rate on augmentation index and central arterial pressure in humans. *J Physiol* 525:263-70
- 125) Williams B (1998) Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function. *J Hypertens* 16:1921-1929
- 126) Williams JK, Kaplan JR, Manuck SB (1993) Effects of psychosocial stress on endothelium-mediated dilation of atherosclerotic arteries in cynomolgus monkeys. *J Clin Invest* 92:1819-1823
- 127) Xu S, Barry DC, Settleman J, Schwartz MA, Bokoch GM (1994) Differing structural requirements for GTPase-activating protein responsiveness and NADPH oxidase activation by Rac. *J Biol Chem* 269:23569-23574
- 128) Yeung AC, Vekshtein VI, Krantz DS, et al. (1991) The effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress. *N Engl J Med* 325:1551-6
- 129) Zanellato AM, Borrione AC, Saggin L, Giuriato L, Schiaffino S, Sartore S (1991) Troponin T- and troponin I-like proteins in bovine vascular smooth muscle. *Circ Res* 68:1349-61

- 130) Ziemann SJ, Melenovsky V, Kass DA (2005) Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:932-43
- 131) Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M et al. (2004) Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nature Cell Biology* 6:499-506

## **7. Publikationen/ Danksagung**

### **7.1. Publikationen und Abstract**

#### **Publikationen**

Custodis F, Gertz K, Balkaya M, Prinz V, Mathar I, Stamm C, Kronenberg G, Kazakov A, Freichel M, Böhm M, Endres M, Laufs U (2011) Heart rate contributes to the vascular effects of chronic mental stress-effects on endothelial function and ischemic brain injury in mice. Stroke 42:0-8

Custodis F, Fries P, Müller A, Stamm C, Grube M, Kroemer HK, Böhm M, Laufs U (2012) Heart rate reduction by ivabradine restores aortic compliance in apolipoprotein E deficient mice. under revision

#### **Abstract**

Custodis F, Fries P, Müller A, Stamm C, Schirmer SH, Böhm M, Laufs U (2011) Herzfrequenzreduktion reduziert die aortale Steifigkeit in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Clin Res Cardiol 100, Suppl 1, P663

### **7.2. Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Ulrich Laufs für die Überlassung meines sehr spannenden Themas bedanken. Von Anfang an motivierte er mich zu großem Engagement und half mir über seine konstruktive Kritik, zielgerichtet zu forschen.

Herrn Professor Dr. med. Michael Böhm danke ich für die Möglichkeit, das Labor uneingeschränkt zu nutzen.

Besonderen Dank möchte ich meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Dr. med. Florian Custodis, zusprechen. Geduldig stand er mir unterstützend zur Seite und ermöglichte durch seine ideenreichen Kommentare die Bewältigung meiner Arbeit.

Herzlichen Dank auch an Ellen Becker und Simone Jäger. Die beiden Medizinisch-Technischen Assistentinnen waren von Anfang an hoch motiviert, mich einzuarbeiten und jederzeit aufkommende Fragen zu beantworten. Durch sie habe ich es geschafft, meine Methoden zu optimieren und den Laboralltag zu strukturieren. Diesen empfand ich immer als sehr kollegial, was sich auch in der Hilfsbereitschaft aller im Labor Tätigen widerspiegelte.

Ohne die moralische Unterstützung meiner Eltern und das große Herz meiner Freundin Lisa hätte ich mein Studium und insbesondere meine Doktorarbeit nicht bewältigen können. Euch allen vielen Dank für Euren Rückhalt!