Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
(Direktor: Prof. Dr. T. Eschenhagen)
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Generierung und kardiale Phänotypisierung von Mäusen, die phospho-mutierte Formen des Phosphatase-Inhibitor-1 herzspezifisch und konditional überexprimieren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
vorgelegt im Department Chemie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

von
Katrin Wittköpper

Hamburg, Mai 2009

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Michael Korth

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Tag der Disputation: 17. Juli 2009

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung**	**1**
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.2	Physiologie der Herzaktion	3
1.2.1	Die elektromechanische Kopplung und die Regulation der kardialen Kontraktion	3
1.2.2	Die β-adrenerge Signalkaskade als Modulator der Kontraktion	5
1.3	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	9
1.4	Serin/Threonin Protein-Phosphatasen	11
1.5	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1	13
1.6	Transgene Mausmodelle	17
1.7	Zielsetzung	22
2	**Methoden**	**24**
2.1	Generierung der Inhibitor-1 induzierbaren Mäuse auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund	24
2.1.1	Generierung der Inhibitor-1 Responderkonstrukte	24
2.1.2	Generierung der doppelt-transgenen Inhibitor-1 Linien auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund	28
2.2	Genotypisierung	30
2.2.1	Genotypisierung mittels Southern Blot	30
2.2.2	Genotypisierung mittels PCR	30
2.3	Restriktionsverdau von DNA	31
2.4	Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.5	DNA-Sequenzierung	31
2.6	Transfektion von HEK-293-Zellen	32
2.7	Organentnahme	32
2.8	RNA-Analysen	33
2.8.1	Isolation von RNA	33
2.8.2	Reverse Transkription	33
2.8.3	Klassische RT-PCR	33
2.8.4	Quantitative RT-PCR	34

2.9	Proteinanalytische Methoden	35
2.9.1	Generierung der rekombinanten Inhibitor-1 Proteine	35
2.9.2	*In vitro* Bindungsassay (GST *Pull-down*)	37
2.9.3	Proteinisolation aus Geweben	38
2.9.4	Untersuchung der Proteinexpression	41
2.9.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.9.4.2	Coomassie-Färbungen	42
2.9.4.3	Western Blot Analyse	42
2.9.5	Bestimmung der Phosphatase Aktivität	43
2.9.5.1	Herstellung [^{32}P]-markierter Phosphorylase a	43
2.9.5.2	Phosphatase-Assay	44
2.9.6	[^{3}H]-Ryanodin-Bindungstest	45
2.9.7	Bestimmung der β-Adrenozeptorendichte	45
2.10	Histologische Untersuchungen	46
2.10.1	Paraffineinbettungen für Mikrotomschnitte	46
2.10.2	Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin (HE)	47
2.10.3	Übersichtsfärbungen mit Pikrinsäure/Siriusrot	47
2.10.4	X-Gal-Färbungen von Geweben und Gewebe-Kryoschnitten	48
2.11	Physiologische Methoden	48
2.11.1	Messungen des diastolischen SR Ca^{2+}-Lecks (Ca^{2+}-Sparks) am konfokalen Mikroskop	48
2.11.2	Echokardiographie	50
2.11.3	Implantation osmotischer Minipumpen	52
2.11.4	Linksherzkatheterisierung	52
2.11.5	Telemetrische Messungen	53
2.12	Statistische Auswertung	54
3	**Ergebnisse**	**55**
3.1	Generierung der Inhibitor-1 Respondermauslinien auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund	55
3.1.1	Generierung der Inhibitor-1 Responderkonstrukte	55
3.1.2	*In vitro* Expression und Regulierbarkeit der Inhibitor-1 Responder-konstrukte	56
3.1.3	*In vitro* Aktivitätsnachweis der rekombinanten Inhibitor-1 Proteine	57

3.1.4	Generierung der transgenen Inhibitor-1 Responderlinien	59
3.1.5	Etablierung der Inhibitor-1 Responderlinien auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund	61
3.2	Die Transaktivatorlinie auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund	62
3.2.1	Charakterisierung von zwei verfügbaren Transaktivatorlinien	62
3.2.2	Etablierung der Transaktivatorlinie auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund	65
3.3	Generierung der doppelt-transgenen Inhibitor-1 Linien auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund	65
3.4	Charakterisierung des Tet-Off Systems *in vivo*	66
3.4.1	Herzspezifische Inhibitor-1 Expression auf mRNA-Ebene	66
3.4.2	Analyse der Doxycyclin-abhängigen Inhibitor-1 Expressionskinetik	67
3.4.3	Inhibitor-1 Expression auf Proteinebene	70
3.5	Kardiale Charakterisierung der beiden Inhibitor-1 Mutanten unter basalen Bedingungen	71
3.6	Funktionelle Charakterisierung der beiden Inhibitor-1 Mutanten unter basalen Bedingungen	74
3.6.1	Effekte von Inhibitor-1* auf die Herzfunktion	74
3.6.2	Auswirkungen des trunkierten Inhibitor-1c auf die Kontraktilität	76
3.7	Untersuchung der Arrhythmieneigung nach Provokation mittels akutem β-adrenergen Stress	81
3.8	Konsequenzen der Inhibitor-1 Expression auf molekularer Ebene	83
3.8.1	Phosphorylierung von zentralen Elementen in der kardialen Hypertrophie	83
3.8.2	Expression und Phosphorylierung Calcium-regulierender Proteine	84
3.8.3	Bestimmung der Protein-Phosphatase Aktivität	87
3.8.4	Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Inhibitor-1 und dem Ryanodin-Rezeptor	89
3.8.5	Die Isoprenalin-stimulierten SR Ca^{2+}-Entladungen (Ca^{2+}-Sparks)	90
3.9	Auswirkungen einer chronischen β-adrenergen Stimulation	92
3.9.1	Auswirkungen einer chronischen β-adrenergen Stimulation in den Inhibitor-1c Transgenen	94
3.9.1.1	Organgewichte nach chronischer β-adrenerger Stimulation	94

3.9.1.2	Echokardiographische Untersuchungen nach chronischer β-adrenerger Stimulation	95
3.9.1.3	Histologische Untersuchungen nach chronischer β-adrenerger Stimulation	96
3.9.1.4	Untersuchungen auf mRNA-Ebene nach chronischer β-adrenerger Stimulation	98
3.9.1.5	Einfluss einer chronischen β-adrenergen Stimulation auf Phosphorylierungs-abhängige Regulatorproteine	99
3.9.2	Auswirkungen einer chronischen β-adrenergen Stimulation in der Inhibitor-1* Mutante	102
3.9.2.1	Organgewichte nach chronischer β-adrenerger Stimulation	102
3.9.2.2	Echokardiographische Untersuchungen nach chronischer β-adrenerger Stimulation	102
3.9.2.3	Untersuchungen auf mRNA-Ebene nach chronischer β-adrenerger Stimulation	104
3.9.2.4	Einfluss einer chronischen β-adrenergen Stimulation auf die Phosphorylierung von Regulatorproteinen	104
3.10	Langzeitfolgen einer Inhibitor-1 Überexpression	106
4	**Diskussion**	**109**
4.1	Rationale und Hauptergebnisse	109
4.2	Methodische Aspekte: Responderkonstrukte und das Tet-Off Mausmodell	111
4.3	Die Hauptergebnisse	118
4.4	Vergleich mit anderen transgenen Inhibitor-1 Mausmodellen	133
4.5	Ausblick	138
4.6	Nachträgliche Anmerkung	140
5	**Zusammenfassung**	**142**
6	**Literaturverzeichnis**	**147**
7	**Lebenslauf**	**164**

8 Veröffentlichungen 165

9 Erklärung 168

10 Danksagung 169

11 Anhang 171

11.1 Abkürzungsverzeichnis 171

11.2 Aminosäuren 173

11.3 Material 174

11.3.1 Substanzen 174

11.3.2 Hilfsmittel und Geräte 176

11.3.3 Antikörper 177

11.4 Primer und PCR-Bedingungen 179

11.5 Weitere Abbildungen 183

11.6 Ergebnistabellen 184

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

In der Bundesrepublik Deutschland wird knapp die Hälfte aller Todesfälle auf Krankheiten des Kreislaufsystems zurückgeführt (Bundesamt für Statistik 2007). Davon gehen 9,3% der Fälle auf chronisch ischämische Myokarderkrankungen, 7% auf einen akuten Myokardinfarkt und 6% auf eine Herzinsuffizienz zurück. Die Herzinsuffizienz stellt eine der häufigsten internistischen Erkrankungen dar, worunter schätzungsweise 15 Millionen Europäer leiden (ESC-European Heart Journal Guidelines 2008). Nach wie vor geht die Herzinsuffizienz mit einer schlechten Prognose einher, so dass insgesamt 50% der Patienten innerhalb von 4 Jahren versterben. Damit verlangt sie nach neuen Therapieoptionen und verbesserten Präventionsmaßnahmen (McMurray und Stewart 2000).

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, das die Unfähigkeit des Herzens beschreibt, die Gewebe mit genügend Blut und Sauerstoff zu versorgen. Beim Auftreten typischer Symptome, wie z.B. Atemnot, Belastungsintoleranz und Flüssigkeitsretention, liegt klinisch eine Herzinsuffizienz vor. Sie ist die gemeinsame Endstrecke einer Vielzahl von Krankheiten, zu denen die koronare Herzerkrankung, primäre und toxische Kardiomyopathien, die arterielle Hypertonie und verschiedene Herzklappenerkrankungen zählen (Ho et al. 1993a, Ho et al. 1993b). Trotz der unterschiedlichen Ursachen sind die pathophysiologischen Mechanismen in fortgeschrittenen Stadien stereotypisch. Eine initiale myokardiale Schädigung und die fehlende endogene Regenerationsfähigkeit des Herzens nach Myokardverlust führen einerseits zu einer neurohumoralen Aktivierung, die darauf gerichtet ist, die adäquate Durchblutung der Organe zu gewährleisten, und andererseits zu einer verstärkten Belastung des verbleibenden Myokards. Die Aktivierung des neurohumoralen Systems erhöht wiederum über eine periphere Vasokonstriktion und eine gesteigerte Flüssigkeitsretention die Nachlast des Herzens und steht damit im Zentrum eines pathophysiologischen Teufelskreises (Eschenhagen 2008).

Die zentrale Rolle der neurohumoralen Aktivierung wird am Beispiel des sympathischen Nervensystems deutlich. So wurden bei herzinsuffizienten Patienten erhöhte Noradrenalin-Plasmaspiegel nachgewiesen, die mit der Schwere der Erkrankung und der Mortalität korrelierten (Packer 1988). Diese Erkenntnis wurde in der Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz bereits erfolgreich umgesetzt, insbesondere durch die Anwendung von β-Adrenozeptorblockern (siehe unten).

Die Pharmakotherapie mit positiv inotrop wirkenden Substanzen, wie z.B. den Herzglykosiden, führte akut zu einer Verbesserung der Hämodynamik, beeinflusste jedoch nicht die Überlebensrate. Durch die konsequente Anwendung der Leitlinienempfehlungen, die die Applikation von ACE-Hemmern, β-Adrenozeptorblockern, Diuretika, Aldosteron-Antagonisten, insbesondere Spironolacton, und ggf. Herzglykosiden beinhaltet, konnte neben der verbesserten Symptomatik auch eine Senkung der Mortalität erreicht werden (z.B. SOLVD-Studie 1992, MERIT-HF Studie 1999). Somit hat sich die Lebenserwartung von Patienten gegenüber 1985 fast verdoppelt. Dennoch hat die Herzinsuffizienz eine sehr schlechte Prognose (siehe oben) und die symptomatische Einschränkung der Leistungsfähigkeit ist stärker als bei fast allen anderen internistischen Erkrankungen.

Um die Progression der Erkrankung aufzuhalten, greift die Pharmakotherapie über ACE-Hemmer und β-Adrenozeptorblocker hemmend in das aktivierte sympathische Nervensystem bzw. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ein. Die neurohumorale Blockade soll den *Circulus vitiosus* durchbrechen und somit zu einer neurohumoralen Entlastung des Herzens führen. Dagegen haben sich viele Arzneimittelprinzipien zur Herzinsuffizienztherapie als unwirksam oder sogar schädlich erwiesen. Sowohl Phosphodiesterase-III-inhibierende Substanzen, die über einen cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat)-Anstieg direkt positiv inotrop wirken, als auch β-Sympathomimetika begünstigen tachykarde Rhythmusstörungen (PROMISE-Studie, Packer et al. 1991, Gheorghiade et al. 2003). Diese Therapeutika sind vielmehr der kurzfristigen Therapie einer akuten dekompensierten Herzinsuffizienz und des kardiogenen Schocks vorbehalten.

Auch eine Hemmung der neurohumoralen Aktivierung durch beispielsweise Endothelinrezeptorantagonisten birgt mehr Risiken als Nutzen. Aktuell sind keine neuen pharmakologischen Therapieansätze erkennbar und das Prinzip der neurohumoralen Blockade scheint ausgereizt.

1.2 Physiologie der Herzaktion

Die Aufgabe des Herzens ist es, die Blutzirkulation ein Leben lang aufrecht zu erhalten. Dies wird durch einen fortwährenden Ablauf von Kontraktion und Relaxation von Atria und Ventrikel gewährleistet. Unter Führung des Sinusknoten arbeitet das Herz weitgehend autonom. Im Sinusknoten werden im normalen Herzzyklus durch verschiedene Ionenkanäle Aktionspotentiale generiert, die im Erregungsleitungssystem über Gap Junctions weitergeleitet und auf jede einzelne Muskelzelle übertragen werden. Somit wird die Kontraktionskraft des Herzens über das Ausmaß der Kontraktion jeder einzelnen Zelle reguliert. Das menschliche Herz schlägt in Ruhe mit einem Rhythmus von 60-80 Schlägen pro Minute. Entsprechend den körperlichen Anforderungen werden Frequenz und Kontraktionskraft über verschiedene Mechanismen, wie dem Frank-Starling-Mechanismus, der Kraft-Frequenz-Beziehung und das vegetative Nervensystem, reguliert.

1.2.1 Die elektromechanische Kopplung und die Regulation der kardialen Kontraktion

Die elektromechanische Kopplung beschreibt den Prozess zwischen dem Aktionspotential einer Muskelzelle und der darauf folgenden Kontraktion, wobei Calcium (Ca^{2+}) als Mediator fungiert (Übersicht in Bers 2002, Kobayashi und Solaro 2005). Bereits 1883 zeigte Ringer, dass die kontraktile Funktion des Herzmuskels in erster Linie durch die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration gesteuert wird (Ringer 1883).

Ein in den Schrittmacherzellen des Sinusknoten ausgelöstes Aktionspotential führt durch den Na^{+}-Einstrom ins Zytosol zur Depolarisation des Sarkolemmas und somit zur Aktivierung der L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle in den transversalen Tubuli (T-

Tubuli). Die einströmenden Ca^{2+}-Ionen binden an den Ryanodin-Rezeptor (RyR2) und verursachen dadurch eine intrazelluläre Ca^{2+}-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR; Ca^{2+}-induzierte Ca^{2+}-Freisetzung, CICR). Das SR ist der zelluläre Ca^{2+}-Speicher und enthält Ca^{2+}-Ionen im millimolaren Bereich. Die Ca^{2+}-Speicherung erfolgt primär durch das Ca^{2+}-bindende Protein Calsequestrin (CSQ), wobei auch das histidinreiche Ca^{2+}-bindende Protein eine Rolle spielt. Das Öffnen des RyR2 Kanals führt zu einem Anstieg der freien Ca^{2+}-Konzentration im Zytosol der Zelle von 10^{-7} M diastolisch auf 10^{-5} M systolisch. Dieser Anstieg der Ca^{2+}-Ionen initiiert die Interaktion der Aktin- und Myosinfilamente in den Myofibrillen. Durch die Bindung von Ca^{2+} an Troponin C wird die inhibitorische Wirkung des Troponin-Tropomyosinkomplexes auf die Aktin-Myosin-Wechselwirkung aufgehoben, und die beiden kontraktilen Proteine können sich miteinander verknüpfen. Diese Verknüpfung führt zur Verkürzung und Kraftentwicklung jeder einzelnen Herzmuskelzelle und im Verband zur Kontraktion des Herzmuskels. Die genaue Funktion von RyR2 und PLB wird im späteren Textverlauf erläutert.

Um die Aktin-Myosin-Interaktion (Querbrückenbildung) zu inaktivieren und somit die Relaxationsphase herbeizuführen, muss die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration verringert werden. Vier Systeme sind für diesen Prozess verantwortlich: (i) die Ca^{2+}-ATPase des SR (SERCA2a), (ii) der sarkolemmale Na^{+}/Ca^{2+}-Austauscher (NCX), (iii) die sarkolemmale Ca^{2+}-ATPase und (iv) der mitochondriale Uniporter. Speziesabhängig werden etwa 70% (Mensch) bzw. 92% (Ratte und Maus) des zytosolischen Ca^{2+} über die SERCA2a zurück in das SR gepumpt, 28% bzw. 7% werden durch den NCX in den Extrazellularraum transportiert, während die restlichen 1% über die sarkolemmale Ca^{2+}-ATPase und den mitochondrialen Uniporter aus dem Zytosol entfernt werden (Bers 2002). Die Aktivität der SERCA2a wird dabei reversibel durch Phospholamban (PLB; Tada et al. 1974) und durch ein weiteres assoziiertes Protein, Sarkolipin, gehemmt (MacLennan et al. 2003).

1.2.2 Die β-adrenerge Signalkaskade als Modulator der Kontraktion

Bei körperlicher Belastung kann die Pumpleistung des Herzens innerhalb von Sekunden etwa auf das Fünffache gesteigert werden und somit die Herzleistung an den peripheren Bedarf anpassen. Diese funktionelle Anpassung wird primär über das sympathische Nervensystem gesteuert. Von entscheidender Bedeutung ist die Aktivierung der β-Adrenozeptoren über die Neurotransmitter Noradrenalin und Adrenalin. Intrazelluläre Signalkaskaden, die über Phosphorylierung und Dephosphorylierung zu funktionellen Veränderungen von regulatorischen Phosphoproteinen führen, werden so aktiviert (Übersicht in Brodde und Michel 1999, Port und Bristow 2001, Lohse et al. 2003). Etwa 70-80% der kardialen β-Adrenozeptoren gehören dem Subtyp β_1 an, wohingegen ca. 20% β_2-Adrenozeptoren sind, so dass diese beiden Formen dominieren. Die Expression von β_3-Adrenozeptoren konnte auch im Herzen nachgewiesen werden, wobei die Rolle dieser Isoform bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt ist (Gauthier et al. 1998, Heubach et al. 2002).

Die kardiale Stimulation der β_1- und β_2-Adrenozeptoren führt zur Steigerung der Kontraktionskraft (positiv inotrop), der Herzfrequenz (positiv chronotrop), der Erregungsüberleitung (positiv dromotrop) und der Relaxation (positiv lusitrop). Die β-Adrenozeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wobei die G-Proteine aus drei Untereinheiten (Gα, Gβ, Gγ) bestehen. Im Falle der β_1-Adrenozeptoren ist die Gα-Untereinheit ein stimulierendes G-Protein (Gαs), dass zur Aktivierung der membranständigen Adenylylcyclase führt, die wiederum die Bildung des sekundären Botenstoffes cAMP katalysiert. Durch die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) werden essentielle Regulatorproteine der elektromechanischen Kopplung phosphoryliert, die insgesamt maßgeblich zu einer gesteigerten kardialen Funktion beitragen (Bers 2002, Lohse et al. 2003, El-Armouche und Eschenhagen 2008). Die Phosphorylierungen des L-Typ-Ca^{2+}-Kanals, des RyR2 und von PLB erhöhen die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration bzw. führen zur schnelleren SR Ca^{2+}-Aufnahme. Somit sind diese Phosphoproteine maßgeblich an der Vermittlung von Inotropie und Lusitropie beteiligt. Die PKA-abhängige Phosphorylierung der Myofilamentproteine Troponin

Inhibitor (TnI; human bzw. murin: Serin 23/24 bzw. Serin 22/23) und Myosin-bindendes Protein C (C-Protein; Serin 282) führt zu einer Abnahme der Ca^{2+}-Sensitivität der Myofilamte und trägt dadurch zur beschleunigten Relaxation bei (Kobayashi und Solaro 2005, Carrier 2007). Phospholemman ist eine reversibel inhibierende Untereinheit der Na^{+}/K^{+}-ATPase und ein weiteres PKA-abhängiges Phosphoprotein. Seine Phosphorylierung hebt den inhibierenden Effekt auf und führt somit zur Aktivierung der Na^{+}/K^{+}-ATPase, analog der PLB/SERCA2a Interaktion (Despa et al. 2005). Die positiv chronotrop wirkenden HCN (*hyperpolarisation activated cyclic nucleotide gated*)-Kanäle werden durch Membranhyperpolarisation aktiviert und durch cAMP gesteuert, so dass sie weitere PKA Zielproteine darstellen (Biel et al. 2002, Lohse et al. 2003).

Die Aktivität des cAMP/PKA-Signalweges wird zum einen durch cAMP-abbauende Phosphodiesterasen (PDE) und zum anderen durch Protein-Phosphatasen (siehe 1.4) im Gleichgewicht gehalten. Diese setzen sich neben der katalytischen Untereinheit noch aus verschiedenen regulatorischen Untereinheiten zusammen (Cohen 2002). Der Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 (I-1) stellt eine solche regulatorische Untereinheit der kardial dominierenden Protein-Phosphatase-1 (PP1) dar, ist aber ebenfalls ein PKA-abhängiges Phosphoprotein (siehe 1.5).

PLB ist das bekannteste und wichtigste Zielprotein der PKA. Experimente an PLB *Knockout* (KO) Mäusen zeigten, dass PLB zumindest teilweise die positiv lusitropen, aber auch positiv inotropen Effekte der β-Adrenozeptoren vermittelt und somit entscheidend die Kinetik der kardialen Ca^{2+}-Transienten beeinflusst (Luo et al. 1994). PLB ist ein kleines, reversibel phosphorylierbares, transmembranäres Protein, welches am SR lokalisiert ist. In Abhängigkeit von seiner Phosphorylierung kann PLB an die SERCA2a binden und so deren Aktivität regulieren. Im unphosphorylierten Zustand hemmt PLB die SERCA2a-Aktivität durch Abnahme der Ca^{2+}-Affinität. Eine PKA-abhängige Phosphorylierung an Serin 16 führt zu einer veränderten PLB/SERCA2a-Interaktion, wodurch der hemmende Effekt auf die SERCA2a aufgehoben werden kann und die Ca^{2+}-Affinität der SERCA2a steigt. Gleichzeitig scheint allerdings die maximale Ca^{2+}-Aufnahmegeschwindigkeit unverändert zu bleiben (Wegener et al. 1989, MacLennan und Kranias 2003). Es wird angenommen, dass die systolische Ca^{2+}-

Konzentration die CaMKII (Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Kinase) aktiviert, was die Phosphorylierung von PLB an Threonin 17 zur Folge hat, so dass die PLB-vermittelte SERCA2a-Inhibition aufgehoben wird (Le Peuch et al. 1979, Maier und Bers 2002). Insgesamt führen mit großer Wahrscheinlichkeit beide Phosphorylierungen zu einer gesteigerten Ca^{2+}-Aufnahme ins SR und somit zu einer beschleunigten Relaxation und gesteigerten SR Beladung, so dass in der nächsten Systole mehr Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt werden kann. Die Konsequenz ist ein erhöhter Ca^{2+}-Transient, ein verkürztes Aktionspotential und somit gesteigerte Kontraktion (positiv inotroper Effekt; Simmerman und Jones 1998, MacLennan und Kranias 2003). PLB wird vorwiegend über die PP1 dephosphoryliert, aber auch durch die Protein-Phosphatase-2A (PP2A; MacDougall et al. 1991).

RyR sind Proteinkomplexe, die die SR-Membran durchspannen und die Funktion der Ca^{2+}-Freisetzungskanäle während des CICR übernehmen (Bers 2002). Ihre hohe Affinität zum neutralen Pflanzenalkaloid Ryanodin hat ihnen den Namen gegeben (Elison und Jenden 1967). RyR-Monomere formieren sich als Homotetramere zu funktionellen Einheiten, wobei jede Untereinheit aus ca. 5000 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von etwa 565 kDa besteht (Fill und Copello 2002). Jedes RyR-Monomer besteht aus zwei Hauptdomänen (N- und C-Terminus). Der N-Terminus bildet die zytoplasmatische Domäne, die 90% des Moleküls repräsentiert und Bindungsstellen für unterschiedliche Modulatoren des RyR enthält (Otsu et al. 1990). Im C-terminalen Bereich hingegen befinden sich die Transmembrandomäne und die Porenregion (Du et al. 2002). RyR2 stellt die dominierende Isoform, von insgesamt drei unterschiedlichen, im Herzmuskel dar (Nakai et al. 1990).

Marx et al. (2000) zeigten, dass der kardiale RyR2 einen Megakomplex bildet. Dieser setzt sich zusammen aus RyR2, dem FK-506-Bindeprotein FKPB12.6, welches den geschlossenen RyR2 Zustand stabilisiert, den Protein-Phosphatasen PP1 und PP2A und einem PKA Ankerprotein (mAKAP). Zusätzlich interagiert RyR2 mit weiteren Proteinen wie Calmodulin (inaktiviert die Öffnungswahrscheinlichkeit durch Bindung an RyR2, allerdings ist die Bindung positiv Ca^{2+}-abhängig), Triadin, Junctin, Spinophilin (verankert PP1 am Komplex)

und Sorcin (inhibiert die Öffnungswahrscheinlichkeit; Übersicht in Bers 2004). Die Regulierung von RyR2 kann durch (i) physiologische (Ca^{2+}, Mg^{2+}, ATP) bzw. (ii) nicht-physiologische (Koffein, Ryanodin) Agentien, (iii) unterschiedliche Phosphorylierungszustände (siehe unten) und (iv) über zuvor erwähnte, RyR2-assoziierte Proteine erfolgen. Bei der mechanischen Kopplung erfolgen sowohl Aktivierung (Ca^{2+}-Konzentrationen von 10 nM - 10 µM) als auch Inaktivierung (Ca^{2+}-Konzentrationen >10 µM) des RyR2 durch den konzentrationsabhängigen Einfluss von Ca^{2+}.

Von großer Bedeutung könnte die Regulation des Rezeptors durch seinen Phosphorylierungszustand sein. Mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen sind bekannt, die wiederum über verschiedene Kinasen phosphoryliert werden. Bisher beschrieben wurden Phosphorylierungen durch die PKA (Takasago et al. 1989, Marx et al. 2000, Xiao et al. 2005) und CaMKII (Takasago et al. 1991, Witcher et al. 1991, Wehrens et al. 2004). Die PKA Phosphorylierung erfolgt an Serin 2809/2808 (murin/human; Marx et al. 2000). Xiao et al. (2005) identifizierten eine weitere PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle an Serin 2030 und konnten in Rattenkardiomyozyten zeigen, dass im Unterschied zu Serin 2809 bei β-adrenerger Stimulation diese bevorzugt phosphoryliert wurde (Xiao et al. 2006). Des Weiteren blieb Serin 2809 unter PKA-Inhibition weiterhin phosphoryliert, Serin 2030 hingegen nicht. Die CaMKII phosphoryliert RyR2 ebenfalls an Serin 2809 (Witcher et al. 1991, Rodriguez et al. 2003). Neuere Untersuchungen beschreiben eine weitere CaMKII-abhängige Phosphorylierungsstelle an Serin 2815/2814 (murin/human; Wehrens et al. 2004).

Neben der Diskrepanz der unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen, die durch verschiedene Proteinkinasen phosphoryliert werden, wird auch die funktionelle Konsequenz der Phosphorylierungszustände kontrovers diskutiert. So zeigten Einzelkanalmessungen, dass nach einer PKA Phosphorylierung die Öffnungswahrscheinlichkeit und somit die RyR2-Aktivität gesteigert war (Takasago et al. 1989, Takasago et al. 1991, Marx et al. 2000). Allerdings wurde der Einfluss der PKA-abhängigen Phosphorylierung auf die RyR2-Aktivität vielfach angefochten. Untersuchungen an PLB KO Mäusen ergaben, dass die gesteigerte diastolische Ca^{2+}-Freisetzung in Folge einer β-adrenergen Stimulation primär auf

den gesteigerten SR Ca^{2+}-Gehalt zurückzuführen sei (Li et al. 2002). Andere Gruppen bestätigten in Mutationsstudien (S2808D und S2808A) diese Ergebnisse (Stange et al. 2003, Xiao et al. 2004, Benkusky et al. 2007). Der Einfluss der CaMKII-abhängigen Phosphorylierung auf die RyR2 Öffnungswahrscheinlichkeit konnte ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt werden. Eine gesteigerte Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR in Folge einer *in vivo* bzw. *in vitro* Überexpression der CaMKII (Maier et al. 2003, Kohlhaas et al. 2006) und durch eine gesteigerte RyR2 Phosphorylierung wurde beschrieben (Serin 2815, Wehrens et al. 2004, Ai et al. 2005, Guo et al. 2006, Curran et al. 2007).

Trotz der kontroversen Meinungen hinsichtlich der Relevanz der jeweiligen Phosphorylierungsstellen und ihrer funktionellen Konsequenz ist es unumstritten, dass eine gesteigerte RyR2 Öffnungswahrscheinlichkeit insgesamt zu einer Erhöhung der Amplitude des systolischen Ca^{2+}-Transients und somit zu einer positiv inotropen Wirkung beiträgt (Eisner et al. 2009).

1.3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Die unter 1.1 beschriebene Therapie der Herzinsuffizienz verdeutlicht, dass keines der beschriebenen Pharmaka seinen primären Angriffspunkt am Kardiomyozyten hat. Dabei weist bei der Herzinsuffizienz nicht nur das Gesamtorgan morphologische und funktionelle Veränderungen auf (z.B. Fibrose und Dilatation), sondern insbesondere der einzelne Kardiomyozyt ist phänotypisch stark verändert.

Eine charakteristische Veränderung stellt hierbei die Desensitivierung der β-adrenergen Signalkaskade dar, die mit einer verminderten Ansprechbarkeit auf Katecholamine und dadurch bedingter kardialer Dysfunktion einhergeht (Übersicht in Port und Bristow 2001, Lohse et al. 2003, Eschenhagen 2008, El-Armouche und Eschenhagen 2008). Die β-adrenerge Desensitivierung ist unter anderem eine Folge der Herunterregulation von β_1-Adrenozeptoren und wahrscheinlich Konsequenz des chronisch erhöhten Sympathikotonus (Bristow et al. 1982, Cohn et al. 1984). Es zeigte sich eine Abnahme der mRNA-Menge (~50%) der β_1-

Adrenozeptoren in Korrelation zur Schwere der Erkrankung (Engelhardt et al. 1996). Des Weiteren wird die Desensitivierung durch (i) die Zunahme der desensitivierenden β-Adrenozeptorkinasen (GRK2; Ungerer et al. 1993), die zu einer Entkopplung der β-Adrenozeptoren von den Gs-Proteinen führen, und (ii) eine gesteigerte Expression hemmender G-Proteine gefördert (Gi; Neumann et al. 1988, Eschenhagen et al. 1992). Die Interpretation dieses Mechanismus ist aber weiterhin nicht vollständig geklärt. Die Desensitivierung stellt sicherlich einen wichtigen Schutz vor den pro-arrhythmischen, -hypertrophen, -apoptotischen und energieverbrauchssteigernden Effekten der Katecholamine dar. Andererseits könnte sie aber, beispielsweise über die Abnahme der SERCA2a-Aktivität, den Defekt der diastolischen SR Ca^{2+}-Aufnahme verstärken und somit zur mangelnden Belastbarkeit der Patienten und zur Verschlechterung der Symptomatik beitragen (Lohse et al. 2003). Bis heute ist unklar, ob man dieses System resensitivieren oder weiter hemmen soll.

Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang zusätzlich eine Herunterregulation und gleichzeitig verminderte Phosphorylierung von I-1 (siehe 1.5) nachgewiesen werden (El-Armouche et al. 2003, El-Armouche et al. 2004) bzw. eine gesteigerte Expression der SR-assoziierten PP1 (Neumann at al. 1997).

Biochemisch liegen der Desensitivierung neben quantitativen Expressionsveränderungen vor allem veränderte Phosphorylierungszustände regulatorischer Phosphoproteine zugrunde, die direkt oder indirekt an der Ca^{2+}-Homöostase beteiligt sind. Direkt sind überwiegend PKA Substrate involviert, da die cAMP/PKA-Achse den wichtigsten β_1-vermittelten Signalweg repräsentiert. Nach der aktuellen Literatur könnte eine verminderte PLB Phosphorylierung, in Übereinstimmung mit der β-adrenergen Desensitivierung, als ein entscheidendes Kriterium für das Relaxationsdefizit in der Herzinsuffizienz gelten (Bartel et al. 1996, MacLennan und Kranias 2003, El-Armouche et al. 2007a). Weiterhin wird angenommen, dass eine verminderte Phosphorylierung von TnI und C-Protein zum Relaxationsdefizit beitragen könnte (Bodor et al. 1997, El-Armouche et al. 2007b). Für die verringerte diastolische Ca^{2+}-Aufnahme ins SR scheint aber auch

eine verringerte Expression bzw. Funktion der SERCA2a verantwortlich zu sein (Hasenfuss 1998).

Überraschenderweise und gegensinnig zur Herunterregulation der β_1-Adrenozeptoren, wird sowohl für den L-Typ-Ca^{2+}-Kanal (Schröder et al. 1998) als auch den RyR2 (Marx et al. 2000) eine Hyperphosphorylierung angenommen. Dies könnte über einen gesteigerten sarkolemmalen Ca^{2+}-Einstrom und zusätzlich eine erhöhte diastolische Ca^{2+}-Freisetzung verstärkt depolarisierend wirken und somit pro-arrhythmogen sein (Eisner und Trafford 2002). Gleichzeitig deutet dies möglicherweise auf eine subzelluläre Kompartimentierung hin, mit Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der Phosphorylierung.

Die β-adrenerge Signalkaskade beeinflusst insbesondere die Phosphorylierung wichtiger Ca^{2+}-Proteine, so dass sie aktiv an der Regulation der Ca^{2+}-Homöostase beteiligt ist. Letztendlich könnte das pathologische Ungleichgewicht des cAMP/PKA-Signalweges zu einem veränderten Ca^{2+}-Gleichgewicht beitragen, charakterisiert durch einen verbreiterten Ca^{2+}-Transienten. Tatsächlich wird dieser hervorgerufen durch (i) einen verringerten Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration während der Systole (aufgrund eines diastolischen Ca^{2+}-Lecks mit der Gefahr von verzögerten Nachdepolarisationen und anschließender Ca^{2+}-Verarmung des SR), (ii) eine verlangsamte Entfernung des Ca^{2+} in der Diastole mit folgender SR Ca^{2+}-Verarmung und (iii) eine daraus resultierende erhöhte zytosolische Ca^{2+}-Konzentration im Ruhezustand der Zelle. Als Konsequenz ist die Kontraktionskraft vermindert, die Relaxationszeit verlängert und das Risiko von Arrhythmien gegeben. Allerdings scheint auch der Einfluss von Ca^{2+}-abhängigen Proteinen wie Calcineurin und die CaMKII auf den Mechanismus der veränderten Ca^{2+}-Homoöstase entscheidend zu sein. Was in dieser Arbeit aber nicht näher erläutert wird (Übersicht in Maier und Bers 2007).

1.4 Serin/Threonin Protein-Phosphatasen

Lange Zeit standen die Proteinkinasen im Zentrum der Regulation von Phosphorylierungen. Inzwischen weiß man aber, dass der Phosphorylierungszustand wichtiger Phosphoproteine nicht nur über eine

Aktivierung der entsprechenden Proteinkinase, sondern auch über eine Hemmung der involvierten Phosphatase erhöht werden kann (Cohen 2002). Die reversible Phosphorylierung führt zur Konformationsänderung der Proteine und beeinflusst so ihre Eigenschaft mit anschließender Auswirkung auf ihre Aktivität, ihre subzelluläre Kompartimentierung oder ihre Interaktion mit anderen Proteinen (DePaoli Roach et al. 1994, Cohen 2000). Etwa 33% aller eukaryontischen Proteine werden über Phosphorylierung reguliert. Dabei spiegelt der jeweilige Phosphorylierungszustand eines Proteins die Aktivität der Proteinkinasen und der Protein-Phosphatasen wider.

Die Serin-/Threonin-dephosphorylierenden Phosphatasen werden aufgrund struktureller Merkmale, ihrer Abhängigkeit von verschiedenen Cofaktoren, ihrer Substratspezifität und Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Inhibitoren in vier Hauptgruppen unterteilt: Typ 1 und Typ 2A, 2B und 2C Phosphatasen (Cohen und Cohen 1989, Shenolikar und Nairn 1991). Etwa 90% der kardialen Phosphatase-Aktivität lassen sich auf die PP1 und PP2A zurückführen (Lüss et al. 2000). Die katalytische Aktivität der PP1 und PP2A ist unabhängig von zweiwertigen Kationen, wohingegen die PP2B (Calcineurin) und PP2C eine Ca^{2+}/Calmodulin- bzw. Mg^{2+}-Abhängigkeit aufweisen (Ingebritsen und Cohen 1983, Cohen und Cohen 1989).

Viele der bislang untersuchten Serin-/Threonin-spezifischen Phosphatasen setzen sich neben den katalytischen noch aus verschiedenen regulatorischen Untereinheiten zusammen. Durch die Assoziation beider Untereinheiten können diese die intrazelluläre Lokalisation, die Aktivität und Substratspezifität der Phosphatasen steuern (Cohen 1997, Cohen 2002). Die Abspaltung des Phosphatrestes erfolgt dabei durch die katalytischen Untereinheiten. Die vier in Säugerzellen gefundenen Isoformen der katalytischen Untereinheit der PP1 sind PP1α, PP1β, PP1γ_1 und PP1γ_2 und werden von drei Genen kodiert (Sasaki et al. 1990). Die Sequenzen zwischen den PP1 Isoformen sind hoch konserviert und liegen bei über 90%. Die PP1 reguliert im Organismus neben der Kontraktion der glatten und quergestreiften Muskulatur auch andere zelluläre Prozesse, wie den Zellzyklusverlauf, die Proteinbiosynthese, den Kohlenhydratmetabolismus, die Transkription und die neuronale Signaltransduktion (Cohen 2002, Shenolikar und

Nairn 1991). Mehr als 45 regulatorische und *targeting/anchoring* Untereinheiten sowie über 9 modulatorische Proteine der PP1 sind bekannt. Durch diese Vielzahl wird die Regulation zahlreicher Prozesse durch nur ein Enzym ermöglicht (Cohen 2002). Des Weiteren zählen zu den regulatorischen Untereinheiten noch inhibitorische Untereinheiten. Interessanterweise wird ausschließlich die PP1 durch zwei inhibitorische Proteine 1 (I-1) und 2 (I-2) inhibiert. Die Interaktion der regulatorischen bzw. inhibitorischen Untereinheiten erfolgt dabei über ein kurzes, stark konserviertes Bindungsmotiv (RVXF-Motiv; Cohen 2002).

Der PP1 wird eine wichtige Rolle in der kardialen Ca^{2+}-Homöostase zugesprochen. Die katalytische Untereinheit der PP1 (PP1c) wird unter anderem durch die lokalisierende Untereinheit G_M (Glykogen-bindende Untereinheit) am SR verankert (Johnson et al. 1996). Weitere regulatorische Untereinheiten der PP1 sind die Myosin-bindende Untereinheit $M_{110-113}$, die regulatorischen Proteine des Zellkerns mit dem Kerninhibitor der PP1 (NIPP-1; nukleärer Inhibitor der PP1) sowie Spinophilin (Aggen et al. 2000). Spinophilin wurde im makromolekularen Komplex am SR nachgewiesen und bindet PP1 an RyR2 (Marx et al. 2000). Dies veranschaulicht nochmals, dass die Phosphatasen im Allgemeinen nicht frei im Zytosol lokalisiert sind, sondern gezielt über regulatorische Untereinheiten ihrem Substrat zugeführt werden.

Verschiedene Befunde deuten auch auf eine wichtige Rolle der Protein-Phosphatasen in der Pathogenese der Herzinsuffizienz hin. Die Phosphatase Aktivität und auch die Phosphatase Konzentration waren sowohl in der menschlichen Herzinsuffizienz (Neumann et al. 1997) als auch im Tiermodell der Herzinsuffizienz (Gupta et al. 2003) erhöht. Carr et al. (2002) konnten zeigen, dass die herzspezifische Überexpression der PP1 mit phänotypischen Veränderungen einherging, die der menschlichen Herzinsuffizienz sehr ähnlich sind.

1.5 Protein-Phosphatase-Inhibitor-1

Inhibitor-1 (I-1) wurde 1976 erstmalig nach der Isolation aus der Skelettmuskulatur von Kaninchen als Phosphorylase-Phosphatase-Inhibitor beschrieben (Huang und

Glinsmann 1976). I-1 wird im Zytosol verschiedener Gewebe exprimiert, insbesondere jedoch im Gehirn, Skelettmuskulatur, Niere und Fettgewebe (MacDougall et al. 1989), aber auch in Herzmuskelzellen (Neumann et al. 1991, Gupta et al. 1996). I-1 ist ein hitze- und säurestabiles Protein mit einem Molekulargewicht von 18700 Da. Des Weiteren ist es sehr empfindlich gegenüber Trypsin (Huang und Glinsmann 1976). I-1 besitzt eine speziesübergreifende (Ratte, Maus, Kaninchen und Mensch), hoch konservierte Primärstruktur. Insbesondere im N-terminalen Bereich liegt eine hohe Strukturhomologie vor (98%), wobei die Gesamtsequenz zu ~80% homolog ist (Elbrecht et al. 1990, El-Armouche et al. 2003, Weiser et al. 2004). Im N-Terminus befinden sich das PP1 Bindungsmotiv (^{9}KIQF^{13}) sowie die cAMP-/PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle Threonin 35 (Egloff et al. 1997, Goldberg 2003). Die Arbeitsgruppe von Prof. Greengard identifizierte ein Strukturhomologon von I-1, DARPP-32 (Dopamin- und cAMP-reguliertes Phosphoprotein-32), welches überwiegend im Gehirn, aber auch im Fettgewebe und in der Niere exprimiert wird (Williams et al. 1986). DARPP-32 weist innerhalb der N-terminalen 40 Aminosäuren eine Sequenzhomologie auf und stimmt in der PP1 Erkennungssequenz und der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle Threonin, hier allerdings an Position 34, mit I-1 überein (Greengard et al. 1999).

I-1 wird durch die cAMP-abhängige PKA an Threonin 35 phosphoryliert und fungiert ausschließlich in diesem Zustand als potenter und spezifischer Inhibitor der PP1 (K_i = 1,6 nM; Aitken und Cohen 1982). Interessanterweise kann I-1 aber auch im unphosphorylierten Zustand mit gleicher Affinität die PP1 binden (Cohen et al. 1977, Endo et al. 1996, Connor et al. 1998). I-1 ist ebenso ein Substrat der Ca^{2+}-abhängigen Proteinkinase Cα (PKCα) und wird an zwei weiteren Phosphorylierungsstellen phosphoryliert, an Serin 67 (Braz et al. 2004, Sahin et al. 2006) und an Threonin 75 (Rodriguez et al. 2006). Die Phosphorylierung von Serin 67 und/oder Threonin 75 resultiert in einer Abnahme der I-1-Aktivität (Rodriguez et al. 2007), so dass die PKCα wahrscheinlich einen funktionell gegensinnigen Effekt einer PKA Phosphorylierung ausübt. In Übereinstimmung mit diesem Modell zeigten Braz et al. (2004), dass PKCα KO Mäuse eine verminderte PP1-Aktivität und eine vermutlich daraus resultierende gesteigerte PLB Phosphorylierung

aufwiesen. Mechanistisch wurde dies mit einer gesteigerten I-1-Aktivität in Zusammenhang gebracht.

In Neuronen konnte mittels rekombinantem I-1 Phosphopeptid durch Mulkey et al. (1994) gezeigt werden, dass I-1 an Threonin 35 durch die Ca^{2+}-abhängige Phosphatase PP2B (Calcineurin) dephosphoryliert wird. In Nierenepithelzellen wurde PP2A hingegen als die dephosphorylierende Phosphatase aufgedeckt (Higuchi et al. 2000). Unsere Arbeitsgruppe konnte in Herzmuskelzellen durch spezifische Blockade von PP2A bzw. PP2B eine gesteigerte I-1 Phosphorylierung an Threonin 35 nachweisen. Somit wurden PP2A und PP2B als die kardialen, I-1-dephosphorylierenden Phosphatasen identifiziert (El-Armouche et al. 2006). Die Ca^{2+}-abhängige Phosphatase PP2B scheint *in vivo* allerdings bei erhöhten Ca^{2+}-Konzentrationen zu dominieren.

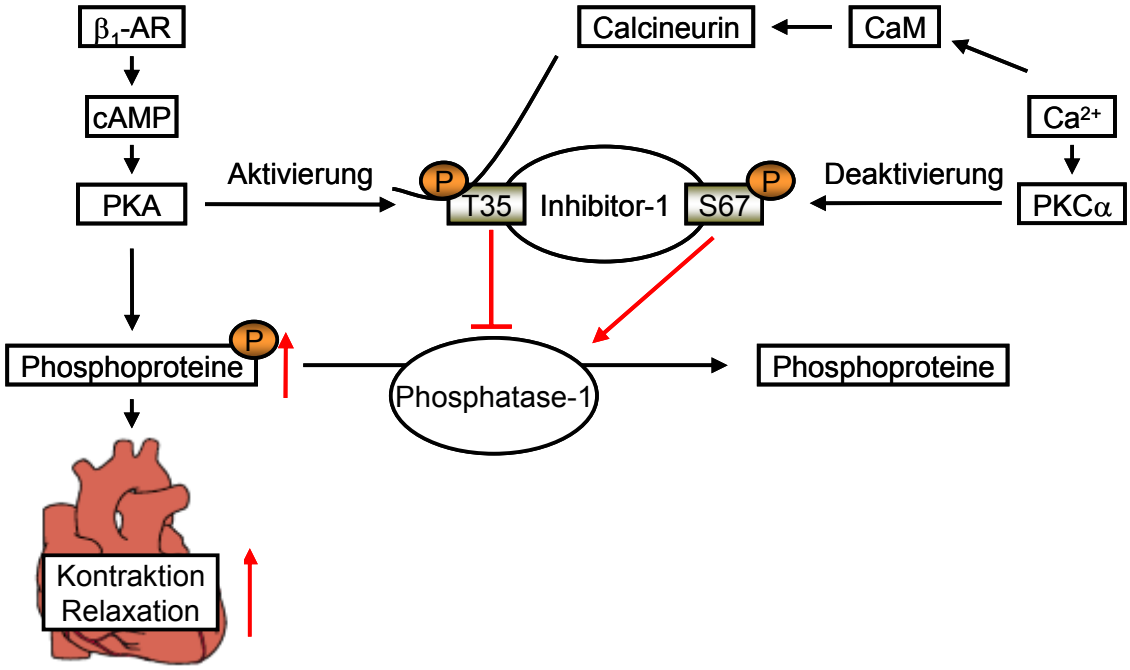


Abb. 1.1 Inhibitor-1 (I-1) als Verbindungselement zwischen PKA und Phosphatase-1 (PP1). Die Stimulation der β_1-Rezeptoren führt über die Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA zur Phosphorylierung wichtiger Regulatorproteine. Zeitgleich wird die Phosphorylierung durch die PP1 antagonisiert. I-1 kann nach cAMP-/PKA-abhängiger Phosphorylierung über eine Hemmung der PP1 den Phosphorylierungszustand der Phosphoproteine steigern. Die Phosphorylierung durch die Ca^{2+}-abhängige PKCα schwächt die inhibitorische Wirkung von I-1 gegenüber PP1 ab. Über die Ca^{2+}-abhängige Aktivierung der PP2B (Calcineurin) wird I-1 dephosphoryliert und somit deaktiviert.

Die Funktion von I-1 wurde in einer Vielzahl zellulärer Mechanismen untersucht, wie (i) der hormonalen Kontrolle des Glykogenmetabolismus, (ii) der

Muskelkontraktion und (iii) der synaptischen Plastizität (Oliver und Shenolikar 1998). Nach seiner Entdeckung wurde die Rolle von I-1 vorwiegend und intensiv im Glykogenmetabolismus der Skelettmuskulatur und Leber erforscht. Es wurde angenommen, dass (i) der durch Adrenalin gesteigerte Gykogenabbau über die cAMP-/PKA-abhängige Aktivierung von I-1 vermittelt wird und (ii) die Insulin-induzierte Hemmung der Glykogenolyse durch eine Abnahme von cAMP und somit verminderte I-1-Aktivität vermittelt wird (Cohen et al. 1977, Foulkes et al. 1980, Nakielny et al. 1991). Diese Annahme wurde jedoch von Scrimgeour et al. (1999) in Frage gestellt. Untersuchungen an I-1/DARPP-32 Doppel-KO Mäusen zeigten im Vergleich zu Wildtyp Mäusen keinen Unterschied in der Glykogensynthase-Aktivität und Glykogensynthese.

Aufgrund der starken I-1 Expression in der glatten Gefäßmuskulatur wurde ein Effekt auf den Phosphorylierungsgrad der leichten Kette des Myosins (MLC20) erwartet. Die Phosphorylierung von MLC20 wird durch die Ca^{2+}-abhängige Kinase (MLCK) und PP1 reguliert (Ito et al. 2004), so dass I-1 über eine Steigerung der MLC20 Phosphorylierung die Kontraktilität erhöhen könnte. Jedoch zeigten intakte aortale Gefäßringe von I-1 KO Mäusen nach β-adrenerger Stimulation keine Änderung in der Kontraktionskraft (Carr et al. 2001).

Mittels zweier transgener Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass I-1 im Gehirn für die Lernfähigkeit und für die Gedächtnisleistung von Bedeutung sein könnte. Elektrophysiologische *in vivo* Messungen an I-1 KO Mäusen ergaben, dass die Ca^{2+}-abhängige Langzeit-Potenzierung (LTP) in Neuronen bestimmter Hirnareale stark vermindert war (Allen et al. 2000). Des Weiteren war die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von I-1, über die Hemmung der PP1, mit einer gesteigerten Phosphorylierung von CREB (cAMP *dependent response element binding protein*) und einer verbesserten Lern- und Gedächtnisleistung assoziiert (Genoux et al. 2000).

Obwohl I-1 schon vor über 30 Jahren als ein prototypisches Bindeglied zwischen PKA und PP1 beschrieben wurde (Huang und Glinsmann 1976), fand er sehr lange in der Herz-Kreislaufforschung keine Beachtung. Neumann et al. (1991) fanden erstmalig Hinweise darauf, dass I-1 *in vivo* nach β-adrenerger Stimulation

durch die cAMP-abhängige PKA an Threonin 35 phosphoryliert wurde und die PP1 hemmte. Die Frage, ob I-1 PKA-vermittelte Phosphorylierungszustände von Regulatorproteinen im Herzen stabilisieren kann, blieb aber offen. Unsere Arbeitsgruppe konnte durch adenoviralen Gentransfer in zwei verschiedenen Modellen zeigen, dass die Überexpression von I-1 zu einer Supersensitivität gegenüber Katecholaminen führte und mit einer vermehrten Phosphorylierung von PLB einherging (El-Armouche et al. 2003). In Übereinstimmung damit konnten Carr et al. (2002) nachweisen, dass eine adenovirale Überexpression von konstitutiv aktivem I-1 in Herzmuskelzellen insuffizienter menschlicher Herzen zu einer Resensitivierung gegenüber Katecholaminen führte. Dies zeigte erstmalig, dass I-1 *in vitro* tatsächlich als positives Rückkopplungselement der β-adrenergen Signalkaskade fungierte. Die kardiale Charakterisierung von I-1 KO Mäusen durch Carr et al. (2002) unterstützte diese Erkenntnisse. Untersuchungen ergaben, dass die basale Kontraktilität *in vivo* verringert war und dass *ex vivo* in perfundierten Herzen das Fehlen von I-1 mit einer geringeren maximalen kontraktilen Reserve assoziiert war.

Interessanterweise waren im insuffizienten menschlichen Myokard sowohl die Proteinmenge (~57%) als auch der PKA Phosphorylierungsgrad (~72%) von I-1 stark erniedrigt (El-Armouche et al. 2003, El-Armouche et al. 2004). Diese Ergebnisse lassen sich sehr gut in den Kontext einer β-adrenergen Desensitivierung in der menschlichen Herzinsuffizienz einbetten und konnten auch im Tiermodell bestätigt werden. So fand sich in Katecholamin-induzierten Herzinsuffizienzmodellen eine verminderte I-1 mRNA- und Proteinkonzentration (El-Armouche et al. 2007a).

1.6 Transgene Mausmodelle

Die Entwicklung der transgenen Technologie ermöglicht es, *in vivo* Untersuchungen durchzuführen und komplexe Fragestellungen in der genetischen, biologischen und medizinischen Grundlagenforschung zu beantworten. Hierbei ist die Maus ein besonders wertvoller Modellorganismus, da sie als kleinstes Säugetier genetische, physiologische und anatomische Ähnlichkeiten zum Menschen besitzt. Zu ~80% der murinen Gene gibt es im

Menschen ein passendes Gegenstück und die DNA-Sequenzhomologie liegt bei 78% (Boguski 2002). Mausmodelle dienen daher als gute Vorlage zur Untersuchung von Physiologie, Embryogenese, Organogenese, Reproduktion und als Krankheitsmodell.

Des Weiteren besitzt die Maus eine kurze Generationsfolge mit 21 Tagen Tragezeit, verbunden mit einer hohen Nachkommenzahl und nur weiteren vier Wochen bis zur Geschlechtsreife. Jedoch zeigen die physiologischen Parameter im Herz-Kreislaufsystem zwischen Maus und Mensch wichtige Unterschiede. So liegt beispielsweise die Herzfrequenz von Mäusen bei durchschnittlich 550-620 Schlägen pro Minute, wohingegen der Mensch eine Ruhefrequenz von 60-80 Schlägen pro Minute aufweist (Kass et al. 1998).

Bereits in den 60er Jahren wurden molekularbiologische Mechanismen und die zugehörige Biotechnologie so gut verstanden, dass zusätzliche Gene in Zellen eingefügt und somit überexprimiert werden konnten (Nagy et al. 2003). Schnell war es ein wissenschaftliches Anliegen, diese Technologie auf den ganzen Organismus anzuwenden. 1982 gelang Palmiter und Kollegen der große Durchbruch zur Integration von Genen in Säugetieren: Das Titelblatt des Fachjournals *Nature* zeigte die erste genetisch veränderte Maus, die durch das Einfügen eines Wachstumshormon-Gens aus der Ratte in die Keimbahn der Maus wesentlich größer war als nicht-transgene Geschwistertiere (Palmiter et al. 1982). Dies repräsentierte den Prototyp einer *gain of function* Mutante, bei der ein zusätzlich eingebrachtes Gen (über)exprimiert wurde und dieses stabil an ihre Nachkommen weitergab.

Mit der erfolgreichen Isolierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) aus Mausembryonen (Martin et al. 1981, Evans und Kaufman 1981) eröffnete sich die Möglichkeit des *loss of function* Ansatzes. Die gezielte Inaktivierung eines Gens oder dessen Funktion (*Knockout;* KO*)* wurde zwischen 1987 und 1989 anhand der ersten KO Mäuse von den Gruppen Evans, Smithies und Capecchi etabliert (Doetschman et al. 1987, Kuehn et al. 1987, Mansour et al. 1988, Koller et al. 1989). Für ihre Verdienste wurden die drei Wissenschaftler 2007 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. In Analogie spricht man von *Knockin* Mäusen, wenn

kodierende Regionen des endogenen Gens durch ein gezielt mutiertes Gen ersetzt werden.

Für die hier beschriebenen Verfahren zur Generierung transgener bzw. KO Mäuse werden zwei prinzipiell verschiedene Techniken angewandt. Bei der Pronukleusinjektion werden DNA-Konstrukte durch Mikroinjektion in den Vorkern (Pronukleus) einer Zygote (befruchtete Eizelle im Einzellstadium) eingebracht (Gordon et al. 1980). Dabei integriert die injizierte DNA zufällig. Die homologe Rekombination (*Gene targeting)* hingegen stellt einen gezielten Genaustausch mit Hilfe eines Austausch- oder Insertionsvektors in embryonalen Stammzellen dar (Capecchi 1989). Die Zielgensequenz wird durch doppeltes Überkreuzen (*crossing-over*) durch die transgene Sequenz chromosomal ersetzt. Im Gegensatz zur Pronukleusinjektion ist diese Methode nur bei Mäusen durchführbar, weil nur hier embryonale Stammzellen vorhanden sind.

Trotz der Entwicklung dieser bahnbrechenden Technologie erwies sich die Genmanipulation *ab initio* oftmals als zu drastisch und unflexibel. So führten viele homozygot inaktivierte Gene zur Letalität. Folglich wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um die Transgenexpression bzw. Geninaktivierung *in vivo* regulieren zu können (Chien 2001, Nagy et al. 2003).

Die Entwicklung konditioneller Mausmodelle ermöglicht eine regulierbare Transgenexpression. Bakterielle und körperfremde Systeme führen am ehesten zum Erfolg, da hierbei eine mögliche Interaktion zwischen den regulatorischen Elementen und endogenen Proteinen als unwahrscheinlich gilt. Dabei handelt es sich meistens um binäre Expressionssysteme, bei denen zwei Mauslinien erforderlich sind, die jeweils ein regulatorisches Element stabil in ihrem Genom tragen. Die Kreuzung führt zu doppelt-transgenen Tieren mit einem funktionellen Expressionssystem. Durch Kopplung dieser Systeme an zelltypspezifische Promotoren kann die Transgenexpression lokal auf ein bestimmtes Gewebe begrenzt werden. Der αMHC-Promoter beispielsweise wird zur herzspezifischen Genexpression verwendet (Subramaniam et al. 1991).

Häufige Anwendung finden sequenzspezifische Rekombinationssysteme, wobei hier zwei Systeme zur Verfügung stehen: das Cre/loxP- und Flp/FRT-System (Lewandoski 2001). Neben der organspezifischen Expression der Rekombinase (Cre bzw. Flp) kann durch induzierbare Promotoren eine posttranslationale Kontrolle der Rekombinase-Aktivität erzielt werden (Schönig et al. 2002). Ebenso kann dies durch die Verwendung von Fusionskonstrukten, die sich aus Rekombinase und einer mutierten Hormonrezeptor-Ligandenbindungsdomäne zusammensetzen, erreicht werden (Übersicht in Metzger und Chambon 2001).

Das Tetrazyklin-gesteuerte System stellt das am besten charakterisierte konditionelle Mausmodell dar, welches *in vivo* eine gezielte und vor allem reversible Kontrolle der Genaktivität ermöglicht. Zur Generierung Tetrazyklin-abhängiger Expressionssysteme wurden die regulatorischen Elemente des Tetrazyklin-Resistenzoperons des Transposons 10 (Tn10) aus *E. coli* erfolgreich zur Anwendung in eukaryontischen Organismen adaptiert. Im bakteriellen System wird die Transkription des Tetrazyklin-Resistenzgens durch die Bindung des Tet-Repressors (TetR) an die spezifische Operatorsequenz (TetO) des Tetrazyklin-Promoters verhindert. Bindet Tetrazyklin an TetR kommt es zu einer allosterischen Konformationsänderung von TetR, so dass es von der Operatorsequenz abdissoziiert und die Transkription des Tetrazyklingens induziert wird (Hillen und Berens 1994).

Die Adaption an eukaryontische Systeme erfolgte durch Fusion von TetR mit der C-terminalen VP16 (Virales Protein *16)*-Transaktivatordomäne des *Herpes Simplex* Virus. Der ursprüngliche Tet-Repressor (TetR) wurde dadurch zum Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (tTA) umgewandelt (Gossen und Bujard 1992). Wichtig ist, dass die DNA-bindenden Eigenschaften des ursprünglichen Repressors erhalten blieben. Der korrespondierende Promoter besteht aus einer Fusion der Minimalsequenz des humanen Cytomegalovirus (CMV_{min}; Boshart et al. 1985) mit einer am 5'-Ende eingefügten Tandem Struktur von sieben Tet-Operatorsequenzen (TetO7), die für die tTA-abhängige Aktivierung essentiell ist. Das jeweilige Zielgen steht unter Kontrolle des tTA-aktivierbaren Promoters. In Anwesenheit von Tetrazyklin oder seinem Analogon Doxycyclin (Dox) bindet tTA nicht an die TetO-Sequenz, wohingegen die Abwesenheit zur Bindung von tTA

führt und dadurch die Transgenexpression initiiert wird (Tet-Off System). Durch Punktmutationen in der TetR-Domäne des Transaktivators tTA konnte ein Transaktivator mit invertierter Reaktion auf Tetrazyklin konstruiert werden. Der so genannte reverse Tetrazyklin-abhängige Transaktivator (rtTA) aktiviert die Genexpression in Anwesenheit von Tetrazyklin (Tet-On System; Gossen et al. 1995).

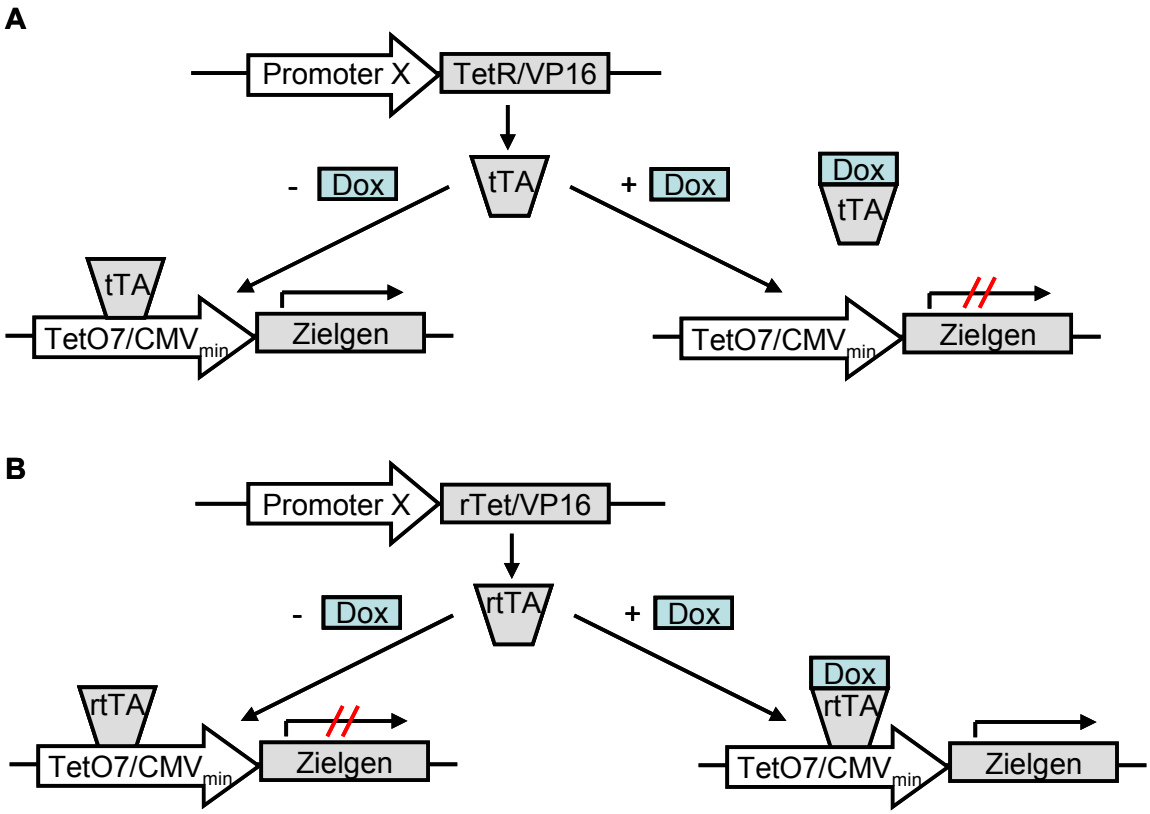


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des induzierbaren Tet-Off bzw. Tet-On Genexpressionssystems. Doppelt-transgene Mäuse verfügen entweder über ein funktionelles (A) Tet-Off System oder (B) Tet-On System. (A) Tet-Off: tTA ist ein Fusionsprotein aus dem Tet-Repressor (TetR) und dem C-Terminus der VP16-Domäne des *Herpes Simplex* Virus. Bei Abwesenheit des Induktors Doxycyclin (Dox) kann tTA an die Operatorsequenz (TetO7) binden, die stromaufwärts eines CMV-Minimalpromoters (CMV_{min}) liegt, und das Zielgen wird exprimiert. Doxycyclin hingegen bindet tTA, und die Genexpression wird inhibiert. (B) Tet-On: Doxycyclin aktiviert die Bindung des reversen Transaktivators (rtTA) an die Operatorsequenzen und initiiert somit die Genexpression. In Abwesenheit von Doxycyclin kann rtTA nicht binden.

Der erfolgreiche Einsatz dieses Systems spiegelt sich in der enormen Anzahl von Veröffentlichungen (über 5700 bis einschließlich Dezember 2008) seit der Erstbeschreibung 1992 (Gossen und Bujard 1992) wider. Eine Zusammenstellung aller publizierten Arbeiten findet man unter: www.tetsystems.com. Des Weiteren ist unter www.zmg.uni-mainz.de/tetmouse eine Liste mit allen verfügbaren tTA

bzw. rtTA Linien in Abhängigkeit von der Gewebespezifität zusammengestellt sowie allen publizierten Reporter- bzw. Respondermauslinien. Zur herzspezifischen Expression existieren sowohl für die tTA als auch die rtTA Expression jeweils zwei verschiedene Mauslinien. Passman und Fishman (1994) setzten trunkierte Elemente des αMHC-Promoters aus der Ratte zur herzspezifischen Expression von tTA bzw. rtTA ein (Valencik und McDonald 2001), wohingegen Sanbe et al. (2003) den ungekürzten αMHC-Promoter aus der Maus verwendeten.

Eine potentielle Limitation dieses Systems stellt der Erhalt des endogenen Gens dar, das weiterhin seine normale Funktion ausübt. In diesem Kontext wäre folgender Lösungsansatz denkbar und wurde bereits erfolgreich durchgeführt: Die Etablierung des funktionellen Tet-Expressionssystems im genetischen Hintergrund einer homozygoten Deletion des zu untersuchenden Gens (Mack et al. 2001). Dieser Ansatz wurde auch in dieser Arbeit umgesetzt.

1.7 Zielsetzung

Eine charakteristische Veränderung des kranken Herzens ist die Desensitivierung des β-adrenergen/cAMP/PKA-Systems. Sie schützt einerseits vor pro-arrhythmischen und energieverbrauchssteigernden Effekten der Katecholamine, trägt aber gleichzeitig zur mangelnden Belastbarkeit von Patienten mit Herzinsuffizienz bei. Der Phosphatase-Inhibitor-1 (I-1) ist ein distales, verstärkendes Element dieses Systems. Eigene Befunde zeigten, dass der I-1 im insuffizienten menschlichen Myokard stark erniedrigt ist und dies wahrscheinlich zur β-adrenergen Subsensitivität beiträgt. Dies führte uns zu der Hypothese, dass eine Modulation der I-1 Proteinmenge die kontraktile Funktion und/oder die Neigung zu Arrhythmien beeinflusst und somit einen potentiellen Angriffspunkt in der Therapie der Herzinsuffizienz darstellen könnte.

Diese Hypothese sollte mittels transgener Technologie, die eine herzspezifische und zeitlich regulierbare I-1 Überexpression (Tet-Off System) ermöglicht, überprüft werden. Um zusätzlich eine bidirektionale Ursache-Wirkungsbeziehung zu

ermöglichen und potentielle Anpassungsreaktionen innerhalb des komplex phospho-regulierten I-1 zu überschauen, sollten die Linien zum einen auf einen I-1 KO Hintergrund gekreuzt werden und zum anderen folgende Mutationen mittels PCR-Mutagenese vorgenommen werden: In der einen Mutante sollte die Serin Phosphorylierungsstelle gegen „nicht-phosphorylierbares“ Alanin an der Aminosäure 67 (I-1-S67A) ausgetauscht werden, um bei erhaltener PKA-abhängiger Aktivierbarkeit an Threonin 35 eine potentielle Aktivitätsminderung durch die PKCα auszuschließen. In der zweiten Mutante sollte Threonin 35 gegen phosphomimetisches Aspartat ausgetauscht werden und gleichzeitig auf 65 Aminosäuren (I-1-T35D) verkürzt werden, um eine nicht-regulierbare, konstitutiv aktive I-1 Form zu generieren. Die finalen Linien sollten dann unter Nutzung der Regulierbarkeit der I-1 Expression funktionell, histologisch und molekular sowohl basal als auch in einem etablierten kardiovaskulären Stressmodell charakterisiert werden.

2 Methoden

2.1 Generierung der Inhibitor-1 induzierbaren Mäuse auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund

2.1.1 Generierung der Inhibitor-1 Responderkonstrukte

Die zwei Responderlinien (I-1* und I-1c) wurden durch Pronukleusinjektion der jeweiligen *Xho*I-verdauten cDNA Endkonstrukte (Abb. 2.1) erhalten. Die Generierung wurde durch die Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Freien und Hansestadt Hamburg (G05/042) genehmigt.

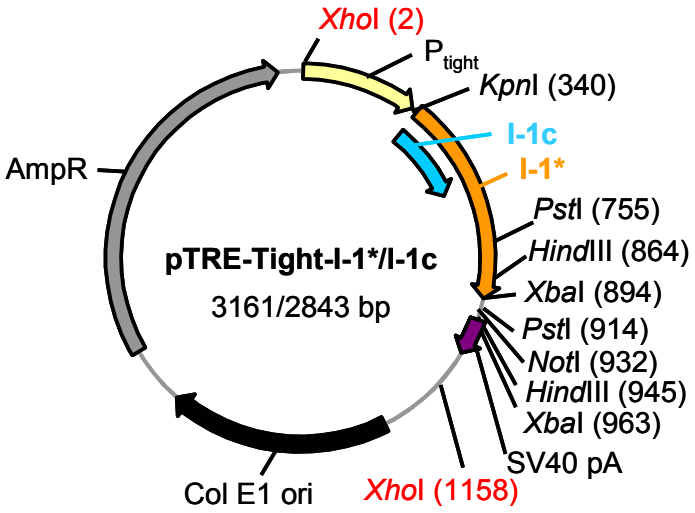


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des pTRE-Tight-Vektors mit I-1* bzw. I-1c cDNA. P_{tight}: tTA-abhängiger Promoter, bestehend aus einem modifizierten Tetrazyklin-ansprechenden Element (TRE), das aus einem Heptamer der 19 bp langen TetO-Sequenz (Tet-Operator aus dem *E. coli* Tet-Operon) und der Minimalsequenz des humanen CMV (Cytomegalovirus) *immediate early promotor* (Boshart et al. 1985) besteht. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind eingezeichnet. Die zur Fragmentierung verwendeten Schnittstellen sind rot markiert.

Die Generierung der zwei I-1 Mutanten, die an Phosphorylierungsstellen verändert sind: (i) I-1-S67A (I-1*; Serin gegen „nicht-phosphorylierbares“ Alanin substituiert) und (ii) I-1-T35D (I-1c; N-terminal 65 statt 171 Aminosäuren und Threonin gegen phosphomimetisches Aspartat substituiert), erfolgte ausgehend vom Wildtyp I-1 im pCRII-Vektor.

Generierung eines pCRII-Vektors für Wildtyp I-1

Aus 30 mg gefrorenem und pulverisiertem Ventrikelgewebe wurde die Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.7 und 2.8.1) und mittels Reverser Transkriptase cDNA synthetisiert (siehe 2.8.2). Durch Verwendung entsprechender Primer wurde der endogene Wildtyp Inhibitor-1 (I-1) mittels PCR amplifiziert und zusätzlich N-terminal eine *Kpn*I-Schnittstelle und C-terminal eine *Xho*I-Schnittstelle sowie ein c-myc-Tag angefügt (PCR-Bedingungen und Primersequenzen, siehe Tab. 11.9). Das resultierende PCR-Fragment wurde über ein 1%iges Agarosegel aufgereinigt (1% Agarose und 0,4 µg/ml Ethidiumbromid in TBE-Puffer: 45 mM Tris-Base, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8) und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die enthaltene DNA wurde mittels QIAquick *Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Herstelleranweisung extrahiert und aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA in einem 1%igen Agarosegel dargestellt und die DNA-Konzentration durch Vergleich der Bandenintensität mit einem Größen-Marker (MassRuler™ DNA *ladder,* Fermentas) abgeschätzt.

Das resultierende I-1 Fragment wurde mittels TA-Klonierung nach Anweisung des Herstellers in den pCRII-Vektor kloniert (Invitrogen; siehe Anhang, Abb. 11.1). Bei der TA-Klonierung macht man sich zunutze, dass mittels PCR-Reaktion amplifizierte DNA an ihrem 3'-Ende ein überhängendes Adenin Nukleotid besitzt. Somit kann sie direkt in einen Plasmidvektor (pCRII-Vektor) kloniert werden, welcher ein überhängendes Thymidin Nukleotid enthält. Der Ligationsansatz (siehe 2.4) wurde mittels Hitzeschock in chemisch kompetente *E. coli* Bakterien des Stammes DH10B (Invitrogen) transformiert, auf Ampicillin-enthaltene LB-Agarplatten (1,5% Agar und 100 µg/ml Ampicillin in LB-Medium: 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,4) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden zur Plasmidisolation 3 ml LB-Ampicillin-Kulturen mit Einzelkolonien angeimpft und erneut über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die DNA wurde entsprechend der Herstelleranweisung mittels QIAGEN *Plasmid Mini Kit* (Qiagen) isoliert und aufgereinigt. Positive Klone wurden über Restriktionsverdau (siehe 2.3) mittels *Kpn*I und *Not*I und anschließender Darstellung auf einem 1%igen Agarosegel identifiziert. Die

Nukleinsäurekonzentration wurde im UV-Spektrometer (Smart Spec® 3000, Bio-Rad) durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Eine Absorptionseinheit entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml.

Generierung eines pCRII-Vektors für I-1* bzw. I-1c

Zur Generierung von I-1* im pCRII-Vektor wurde, ausgehend von der Wildtyp I-1 cDNA im pCRII-Vektor, gezielt ein Basenaustausch (T → G; Nukleotid 199) mittels *in vitro* Mutagenese vorgenommen. Hierzu wurden in zwei getrennten PCR-Ansätzen (A und B; PCR-Bedingungen und Primersequenzen, siehe Tab. 11.2) zwei Amplifikate erzeugt, die jeweils auf einem der beiden Stränge die gewünschte Mutation trugen. In jedem der Ansätze wurden ein Amplifikations-flankierender Primer und ein den Basenaustausch beinhaltender innerer Mutageneseprimer eingesetzt. Durch die Wahl der internen Mutageneseprimer besaßen die Amplifikate einen überlappenden Bereich von 20 bp, so dass die beiden mutierten DNA-Fragmente in einer abschließenden Fusions-PCR miteinander hybridisiert werden konnten. Die Amplifikate für die Fusions-PCR wurden zuvor mittels Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion isoliert und aufgereinigt. Das Fusions-PCR-Produkt wurde, wie für den Wildtyp I-1 detailliert beschrieben, über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Die DNA wurde aus dem Gel extrahiert und mittels TA-Klonierung in den pCRII-Vektor kloniert. Durch die Identifizierung positiver Klone, analog der Klonierung von I-1 in den pCRII-Vektor, wurde I-1* im pCRII-Vektor erhalten (Abb. 2.2).

Die Generierung von I-1c im pCRII-Vektor erfolgte analog der Generierung der I-1* Mutante mit folgenden Abweichungen. Mittels gerichteter *in vitro* Mutagenese wurde folgender Basenaustausch vorgenommen (AC → GA; Nukleotide: 103 und 104). Die Amplifikate der beiden Mutagenese-Ansätze besaßen einen überlappenden Bereich von 17 bp. Des Weiteren erfolgte die Fusions-PCR unter Verwendung eines *anti-sense*-Primers, der neben einer *Not*I-Schnittstelle ein c-myc-Tag enthielt und gleichzeitig zu einer C-terminalen Verkürzung auf insgesamt 231 kodierende Basenpaare führte (Abb. 2.2; PCR-Bedingungen und Primersequenzen, siehe Tab. 11.3).

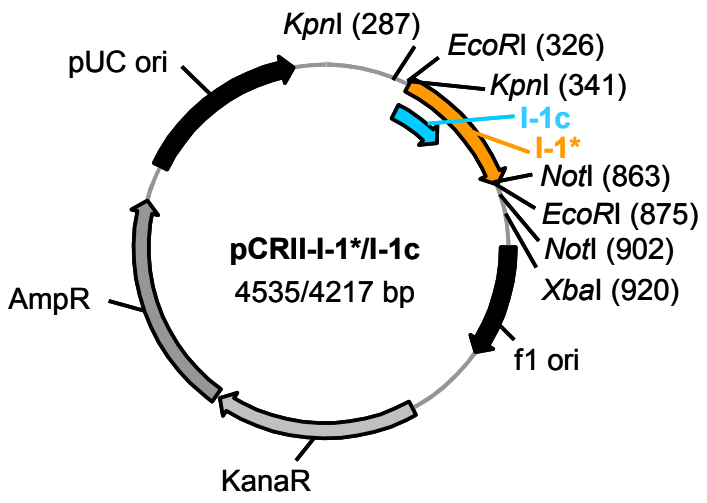


Abb. 2.2 Schematische Darstellung des pCRII-Vektors mit cDNA von phosphospezifisch mutiertem I-1. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind eingezeichnet.

Generierung eines pTRE-Tight-Vektors für I-1* und I-1c

Die Generierung der Endkonstrukte (Abb. 2.1) erfolgte durch Subklonierung der I-1* bzw. I-1c cDNA von dem pCRII-Vektor in den pTRE-Tight-Vektor (Clontech). Hierzu wurden die beiden pCRII-Vektoren, zur Freisetzung von I-1* und I-1c, sowie der pTRE-Tight-Vektor mit *KpnI/NotI* verdaut (siehe 2.3). Die resultierenden DNA-Fragmente wurde über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und mittels DNA-Gelextraktion (QIAquick *Gel Extraction Kit,* Qiagen) isoliert. Die frisch isolierten Fragmente wurden stromabwärts des P_{tight}-Promoters in den pTRE-Tight-Vektor ligiert (Abb. 2.1; siehe 2.4). Wie bereits beschrieben, wurde der Ligationsansatz mittels Hitzeschock in *E. coli* (DH10 B) transformiert, auf Ampicillin-haltige Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Identifizierung positiver Klone erfolgte nach DNA-Isolation mit anschließendem *KpnI/NotI*-Restriktionsverdau. LB-Flüssigkulturen (LB-Medien) für Maxi-DNA-Präparationen wurden angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die DNA-Isolation und –Reinigung wurde mittels QIAGEN *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration bestimmt. In allen Konstrukten, sowohl nach Klonierung in den pCRII-Vektor als auch nach Klonierung in den pTRE-Tight-Vektor, wurden die klonierten Bereiche und die Einführung der jeweiligen Mutation durch DNA-Sequenzierung verifiziert (siehe 2.5).

Um möglichst reine DNA für die Pronukleusinjektion zur Verfügung zu haben, wurde die DNA der beiden Endkonstrukte (pTRE-Tight-I-1*/I-1c) in *E. coli* XL1-*Blue* (Stratagene) transformiert und eine endotoxinfreie Plasmid-Maxi-Präparation aus einer 100 ml LB-Kultur (*EndoFree Plasmid Maxi* Aufreinigungssystem, Qiagen) durchgeführt. Anschließend wurden 25 µg DNA mit *Xho*I verdaut, um unnötige Teile des Vektors zu eliminieren und eine Linearisierung herbeizuführen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 1%igen Ethidiumbromid-freien Agarosegel und anschließender Aufreinigung der ausgeschnittenen DNA (QIAquick *Gel Extraction Kit,* Qiagen) wurde die DNA mit Injektionspuffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) eluiert. Die Endkonzentration wurde auf einen Gehalt von 10 ng/µl eingestellt und Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer (Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg) übergeben. Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer führte die Mikroinjektionen der jeweiligen DNA-Konstrukte in den Pronukleus von Mausblastozysten des Stammes FVB/N durch.

Die Generierung der Sonde für den Southern Blot (siehe 2.2.1) erfolgte durch *Xho*I/*Pst*I-Restriktionsverdau (I-1*; 754 bp) bzw. *Xho*I/*Xba*I-Restriktionsverdau (I-1c; 600 bp) der jeweiligen Endkonstrukte (Abb. 2.1). Die entsprechenden Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt (QIAquick *Gel Extraction Kit,* Qiagen). Die DNA-Konzentrationen wurden durch Vergleich der Bandenintensität mit einem Größen-Marker (MassRuler™ DNA *ladder,* Fermentas) in einem 1%igen Agarosegel abgeschätzt.

2.1.2 Generierung der doppelt-transgenen Inhibitor-1 Linien auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund

Transgene Tiere, welche das Antwort (*response)*-Plasmid (pTRE-Tight) des Tet-Off Systems (Gossen und Bujard 1992), einschließlich der jeweiligen I-1 DNA, stabil in ihr Genom integriert hatten, wurden mittels Southern Blot (siehe 2.2.1) identifiziert. Durch Rückkreuzung auf einen C57BL/6J Hintergrund wurden diese Tiere heterozygot weitergezüchtet. Anschließend wurden sie durch Kreuzung mit I-1 KO Mäusen (Allen et al. 2000) auf einen homozygoten I-1 KO Hintergrund gekreuzt und fortan als I-1* bzw. I-1c bezeichnet.

Die Transaktivatorlinie (tTA Linie) enthält das regulatorische Tet-Element in Form eines Tetrazyklin-ansprechenden Transkriptionsaktivators (tTA) unter der Kontrolle des herzspezifischen αMHC-Promoters. Das Transaktivatorprotein ist ein Fusionsprotein, bestehend aus dem TetRepressor (TetR) und der VP16 Aktivationsdomäne des *Herpes Simplex* Virus. Zwei Zuchtpärchen der tTA Linie (Passman und Fishman 1994) wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dirk Isbrandt (Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt und heterozygot weitergezüchtet ($tTA^{I\text{-}1(+/+)}$ Linie). Zeitgleich wurde die tTA Linie durch Kreuzung mit I-1 KO Mäuse auf einen homozygoten I-1 KO Hintergrund generiert ($tTA^{I\text{-}1(-/-)}$).

Doppelt-transgene Tiere, die den jeweiligen I-1 auf einem vollständigen I-1 KO Hintergrund exprimieren, entstanden durch Kreuzung mit tTA Mäusen, die sich ebenfalls auf einem homozygoten I-1 KO Hintergrund befanden ($tTA^{I\text{-}1(-/-)}$; Abb. 3.9). Diese Tiere wurden im Folgenden als dTG I-1* und dTG I-1c, entsprechend der jeweiligen Responderlinie, bezeichnet. Doppelt-transgene Tiere unter Doxycyclineinfluss (Dox), das die Expression des Transgens inhibiert, wurden als Kontrollen (dTG I-1* +Dox und dTG I-1c +Dox) verwendet ebenso wie einfach-transgene tTA Tiere ($tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ bzw. $tTA^{I\text{-}1(+/+)}$).

Die Mäuse wurden unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten. Gleichgeschlechtliche Gruppen (≤5 Tiere) wurden unter konventionellen Laborbedingungen (Temperatur 19-21 °C, Luftfeuchtigkeit 50-55%) in Standardkäfigen in einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h Licht (7-19 Uhr) und 12 h Dunkelheit gehalten. Wasser bzw. Doxycyclin-haltiges Wasser und Qualitätsfutter (Sniff) standen jederzeit *ad libitum* zur Verfügung. Doxycyclin wurde unter Zusatz von Süßstoff in Wasser gelöst (2 Süßstofftabletten pro 500 ml), um den bitteren Geschmack des Antibiotikums zu überdecken. Braune Trinkflaschen, die einen lichtinduzierten Zerfall von Doxycyclin verlangsamen, wurden alle drei Tage gewechselt.

2.2 Genotypisierung

2.2.1 Genotypisierung mittels Southern Blot

Zur Genotypisierung wurde aus Schwanzspitzen drei Wochen alter Mäuse, entsprechend den Herstellerangaben des DNA Isolations Reagenz (AppliChem), genomische DNA isoliert. Mit der Ausnahme, dass die DNA in 100 µl TE-Puffer (1 M Tris-HCl, 0,5 M EDTA, pH 7,4) anstatt 8 mM NaOH gelöst wurde. Anschließend wurde die DNA über Nacht mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut (siehe 2.3) und gelelektrophoretisch mit langsamer Laufgeschwindigkeit (50 V) aufgetrennt (1%iges Agarosegel). Das Gel wurde für 15 min mit 0,25 M HCl behandelt, um die DNA partiell zu depurinieren und anschließend zum Denaturieren mit 0,4 M NaOH (15 min) versetzt. Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht mittels Kapillarblot-Verfahren unter alkalischen Transferbedingungen (0,4 M NaOH) auf eine positiv geladene Nylonmembran (*Hybond* N^+*,* Amersham Biosciences). Die Membran wurde in einer Rollflasche mit Hybridisierungslösung (ExpressHyb™, Becton Dickinson), inklusive frisch denaturierter Heringssperma-DNA (20 µg/ml), für 1 h bei 42 °C prähybridisiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde (α-^{32}P-dCTP; 1x10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung) erfolgte die Hybridisierungsreaktion über Nacht bei 65 °C. Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte mittels Zufalls-Oligonukleotide (*random primer;* Rediprime™ II Kit; Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben. Die Membran wurde nach der Hybridisierung gewaschen (75 mM NaCl, 7,5 mM Natriumcitrat, 1% SDS, pH 7,0), anschließend feucht in Frischhaltefolie eingepackt und in einer Phosphor-Imager-Kassette für 24 h exponiert. Das Hybridisierungsmuster wurde mittels Phosphor-Imager System (FLA-3000, Fuji) visualisiert.

2.2.2 Genotypisierung mittels PCR

Die Genotypisierung erfolgte aus Schwanzspitzen von einer Woche alten Mäusen. Die DNA wurde für 1 h bei 95 °C durch Zugabe von 75 µl Lysispuffer (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA) lysiert. Die Reaktion wurde durch dreiminütige Inkubation auf Eis gestoppt und durch Zugabe von 75 µl 40 mM Tris-HCl-Puffer neutralisiert. Die PCR-Bedingungen und verwendeten Oligonukleotide zur PCR-Amplifizierung

sind im Anhang (Tab. 11.5-11.8) aufgeführt. Das jeweilige PCR-Produkt wurde auf ein 1%iges Gel aufgetragen und die Gelbilder wurden mittels Chemie Genius^2 Bio Imaging System (Syngene) elektronisch festgehalten.

2.3 Restriktionsverdau von DNA

Die gewünschte DNA wurde mit der erforderlichen Menge des jeweiligen Restriktionsenzyms 1-2 h gemäß Herstellerangaben (Puffer, Temperatur; New England Biolabs, NEB) inkubiert. Genomische DNA wurde mit dem 2-4-fachen Enzymüberschuss über Nacht bei 37 °C verdaut. Der Verdau der DNA-Injektionsfragmente und der DNA zur Generierung der Southern Blot Sonden, wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktionen wurden bei 65 °C für 10 min gestoppt und die entstandenen Fragmente gelelektrophoretisch analysiert.

2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

In einem Ligationsvolumen von 10-20 µl wurden 10-30 ng Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuss an Fragment-DNA mit T4-DNA-Ligase (1 U; beides New England Biolabs, NEB) in Ligationspuffer über Nacht bei 14 °C inkubiert. Der Ansatz wurde direkt zur Transformation eingesetzt.

2.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung mit *BigDye*-Terminatoren (Applied Biosystems) basiert auf einer modifizierten Form der enzymatischen Didesoxynukleotid-Methode (Sanger et al. 1977). Folgender Reaktionsansatz (20 µl) wurde verwendet: 200-400 ng DNA, 15 pmol *sense*- bzw. *anti-sense*-Primer, 4 µl *BigDye-Terminator-Ready Reaction*-Mix (Applied Biosystems). Die DNA wurde wie in Tab. 11.4 beschrieben amplifiziert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 80 µl 0,3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 300 µl Ethanol gemischt und 10 min zentrifugiert (16000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde über Nacht luftgetrocknet und im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) analysiert. Die Detektion der vier unterschiedlich markierten

BigDye-Terminatoren erfolgte dort auf einem Applied Biosystems 377 *DNA-Sequencer.*

2.6 Transfektion von HEK-293-Zellen

HEK-293 (*Human Embryonic Kidney)*-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 60-70% kultiviert. Die Transfektion der jeweiligen Endkonstrukte erfolgte mittels Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben. In einem weiteren Ansatz wurden die jeweiligen Responderkonstrukte mit einem tTA-exprimierenden Vektor (pTet-Off-Vektor, Clontech; Abb. 2.3) jeweils in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin (1 µg/ml) kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in 100 µl PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4, 8,1 mM Na_2HPO_4, pH 7,0) mit Proteinprobenpuffer (siehe 2.9.4.1) 6:1 verdünnt, geerntet und für Proteinexpressionsanalysen (siehe 2.9.4) verwendet.

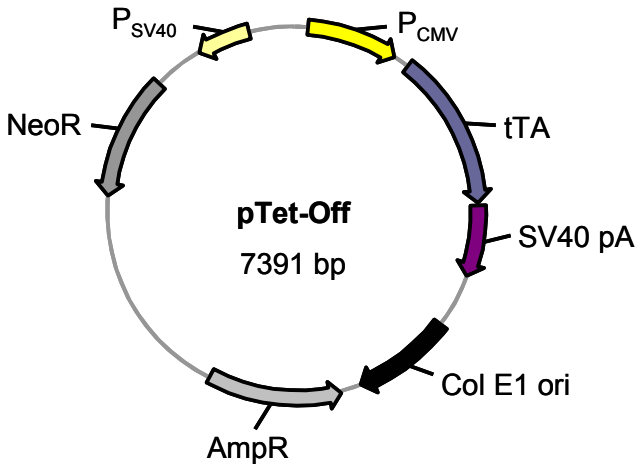


Abb. 2.3 Plasmidkarte des pTet-Off-Vektors. Der Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivator (tTA), unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promoters (P_{CMV}), ist ein Fusionsprotein. Dieses besteht aus dem TetR (Tet-Repressor des Tet-Operons von *E. coli*) und der VP16-(Transkriptions)-Aktivatordomäne (Triezenberg et al. 1988) des *Herpes Simplex* Virus.

2.7 Organentnahme

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation nach vorheriger CO_2-Narkose getötet. Anschließend wurden sie gewogen, der Thorax geöffnet und die entsprechenden Organe entnommen. Das Gewebe wurde in 0,9% Kochsalzlösung gespült, kurz getrocknet und dann gewogen. Bei der Herzentnahme wurden die

Vorhöfe entfernt und das Ventrikelgewicht bestimmt. Die gewogenen Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Vor Verwendung wurde das jeweilige Gewebe mittels Stahlmörtel unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff pulverisiert.

2.8 RNA-Analysen

2.8.1 Isolation von RNA

Gesamt-RNA wurde aus ~30 mg gefrorenem und pulverisiertem Ventrikelgewebe (siehe 2.7) gemäß den Angaben des *SV Total RNA Isolation System* Kits (Promega) isoliert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (Smart Spec® 3000, Bio-Rad). Eine optische Dichte (OD) von 1 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

2.8.2 Reverse Transkription

Nach der Konzentrationsbestimmung wurde 1 µg RNA mittels Reverser Transkriptase unter Verwendung von Oligo(dt)-Primern in cDNA, gemäß Herstellerangaben des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems), umgeschrieben und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zusätzlich wurde von jeder Probe eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase mitgeführt.

2.8.3 Klassische RT-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels nicht-quantitativer RT-PCR die aus muriner RNA umgeschriebene cDNA mit unterschiedlichen Primern (siehe Anhang, Tab. 11.9 und 11.10) für folgende Untersuchungen amplifiziert: (i) Zur anschließenden PCR-Klonierung von I-1 in den pCRII-Vektor mittels TA-Klonierung (siehe 2.1.1), (ii) zur gerichteten *in vitro* Mutagenese (siehe 2.1.1) und (iii) für Untersuchungen der I-1*/I-1c und GAPDH Expression in verschiedenen Organen. Der Reaktionsansatz zur Amplifikation wurde entsprechend den

Angaben der AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase gewählt (Applied Biosystems). Die amplifizierte cDNA wurde über ein 1%iges Agarosegel separiert und die Größe der separierten Fragmente über einen Molekulargewichtsmarker bestimmt (*Gene Ruler*™ 100 bp, Fermentas). Die Gelbilder wurden mittels Bio-Rad (Syngene) elektronisch festgehalten.

2.8.4 Quantitative RT-PCR

Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer (RT)-*real-time* PCR mit einem ABI PRISM 7900HT *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) laut Herstellerhandbuch bestimmt. Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit beruht auf der Verwendung spezifischer Taqman®-Sonden, die am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein; FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-tetramethylrhodamin; TAMRA) markiert sind. Wenn die Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold®), die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Reporter voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Diese steigt entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts mit jedem PCR-Zyklus an.

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als interner Standard verwendet. Die cDNA wurde 1:10 verdünnt, mit Ausnahme der Quantifizierung von I-1, hier wurde die cDNA unverdünnt eingesetzt. Die Analyse erfolgte unter Verwendung des TaqMan® Universal PCR-Master Mix (Applied Biosystems). Die verwendeten Primer- bzw. Sondensequenzen und das verwendete PCR-Programm sind im Anhang in Tab. 11.11 aufgeführt. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung mit der *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software,* Version 2.1.2 analysiert. Die mRNA-Menge wurde über den Vergleich der relativen Ct-Werte unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$-Formel bestimmt. Die GAPDH Ct-Werte wurde von den Ct-Werten der zu bestimmenden RNA subtrahiert (ΔCt). Der Mittelwert der ΔCt-Werte der Kontrollgruppe wurde wiederum von jedem einzelnen ΔCt-Wert abgezogen,

wodurch die ΔΔCt-Werte erhalten wurden. Die Anwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$-Formel zeigte dann den relativen mRNA-Gehalt bezogen auf die Kontrolle an.

2.9 Proteinanalytische Methoden

2.9.1 Generierung der rekombinanten Inhibitor-1 Proteine

Die jeweiligen I-1 cDNAs (I-1/I-1*/I-c) wurden aus den entsprechenden pCRII-Vektoren (Abb. 2.2) in den prokaryontischen Expressionsvektor (pGEX-2T, Amersham-Pharmacia; Abb. 2.4) subkloniert. Hierbei wurde die jeweilige I-1 cDNA, N-terminal mit einem GST (Glutathion-S-Transferase)-Tag versehen. Die drei pCRII-Vektoren und der pGEX-2T-Vektor wurden mit *Eco*RI verdaut.

Der pGEX-2T-Vektor wurde mittels alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP; New England Biolabs, NEB) nach Herstellerangaben am 5'-Ende dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindert. Anschließend wurden die Fragmente über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und die DNA über Gelextraktion isoliert und C-terminal der GST-Markierung in den pGEX-2T-Vektor ligiert (Abb. 2.4; siehe 2.4). Wie bereits unter 2.1.1 beschrieben, wurde der Ligationsansatz mittels Hitzeschock transformiert und Bakterienklone über Ampicillin-enthaltene Agarplatten isoliert. Gewachsene Klone wurden durch analytische Plasmidisolierung auf das Vorhandensein des Inserts überprüft und von positiven Klonen mittels Maxi-Präparationen die DNA isoliert. Die Richtigkeit der Klonierung wurde durch Sequenzierung (siehe 2.5) verifiziert.

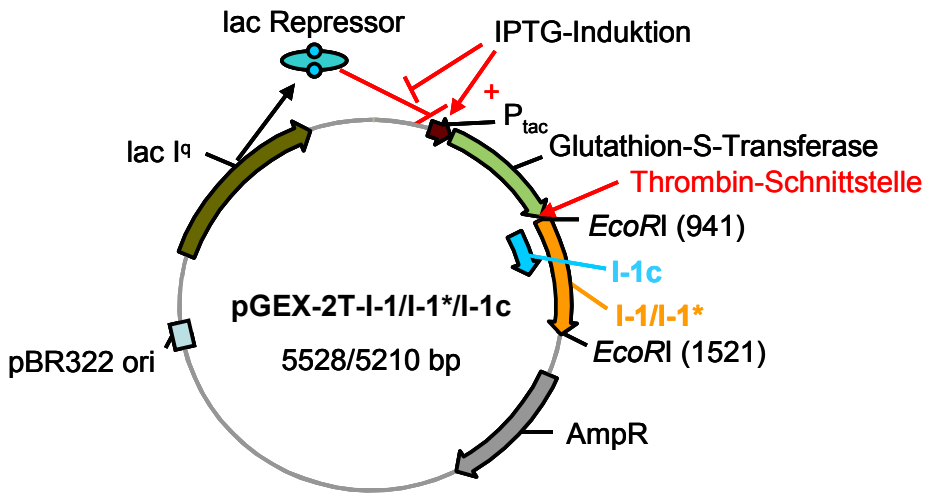


Abb. 2.4 Plasmidkarte des Expressionsvektors für GST-I-1-Fusionsproteine pGEX-2T. P_{tac}: IPTG-induzierbarer Promoter. lac I^q: lac I Gen, exprimiert den lac Repressor. Glutathion-S-Transferase (GST): Tag. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind eingezeichnet. Der Vektor verfügt über eine Sequenz, die für die Schnittstelle der Serin-Protease Thrombin kodiert.

Um eine Proteinexpression zu ermöglichen, wurden die I-1 enthaltenen pGEX-2T-Konstrukte in Protease-defiziente *E. coli* BL21 (DE3) Bakterien mittels Hitzeschock transformiert. Von einem positiven Klon wurde eine 3 ml Tages-Vorkultur (LB-Medium) bei 37 °C angezogen. 200 µl der Tageskultur wurde in eine 30 ml Vorkultur überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit 10 ml der über Nacht-Kultur wurden 500 ml LB-Medium angeimpft und weiter bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{595} von 0,6 erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit IPTG (Isopropyl-beta-D-Thiogalactosid) in einer Endkonzentration von 1 mM bei 37 °C für 4 h.

Zur Präparation und Reinigung wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 5000 x g) und das Pellet in 10 ml PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, pH 7,3) aufgenommen. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte mit einem Ultraschallstab (VirSonic®), wobei die groben Zellbestandteile anschließend abzentrifugiert (10 min, 5000 x g, 4 °C) wurden.

Die Aufreinigung des Bakterienlysats erfolgte über eine zuvor mit PBS äquilibrierte Glutathion-Sepharose 4B Säule (400 µl; Pharmacia). Die Bindung der Proteine an die Säule basierte auf einer Interaktion zwischen GST-Fusionsteil des rekombinanten Poteins und immobilisiertem Glutathion. Die Inkubation erfolgte für

2 h bei RT, der Überstand wurde nach Zentrifugation (10 min, 1500 rpm, 4 °C) verworfen. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit 4 ml PBS und anschließender Zentrifugation (10 min, 1500 rpm, 4 °C), wurde das Fusionsprotein mit 3 x 1 ml Elutionspuffer (10 mM Glutathion, 50 mM Tris-HCl, pH 8,8) eluiert. Zur Gewinnung des jeweiligen I-1 Proteins erfolgte die Elution mit 3 x 1 ml Thrombinelutionspuffer (1 U/µl Thrombin in PBS), wodurch das Fusionsprotein auf der Säule proteolytisch gespalten wurde. Die Reinheit wurde nach SDS-PAGE mittels Coomassie-Färbung bestimmt (siehe 2.9.4.1 und 2.9.4.2). Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.9.2 *In vitro* Bindungsassay (GST *Pull-down*)

Die Interaktionsstudie zwischen rekombinantem RyR2 und den jeweiligen rekombinanten GST-I-1 Fusionsproteinen wurde mittels GST *Pull-down* durchgeführt. Hierzu wurden die drei rekombinanten GST-I-1 Fusionsproteine hergestellt und aufgereinigt (siehe 2.9.1) sowie rekombinanter RyR2 aus einer stabilen Zelllinie isoliert und angereichert (siehe 2.9.3). Anschließend wurde das Fusionsprotein auf zuvor mit PBS äquilibrierter Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia) immobilisiert. Hierzu wurden 270 µg GST-I-1 Fusionsprotein in einem Volumen von 500 µl mit 250 µl Glutathion-Sepharose 4B auf einer Rollapparatur für 2 h bei RT inkubiert. Die Beads wurden durch Kurzzentrifugation zurückgewonnen und anschließend zweimal mit 500 µl PBS gewaschen. Durch Zugabe von 400 µl des RyR2-angereicherten Zelllysats und 18 h Inkubation (4 °C) auf einer Rollapparatur, sollte eine potentielle Komplexbildung ermöglicht werden. Zum Waschen wurde der Überstand vorsichtig durch Kurzzentrifugation entfernt und die Sepharose zweimal mit 500 µl PBS gewaschen. 50 µl der Beads wurden abgenommen und direkt mit 3 x SDS-Probenpuffer (30% Glycerin, 15% Mercaptoethanol, 9% SDS, 0,5 Tris-HCl, pH 6,8 und 0,01% Bromphenolblau) eluiert. Die restlichen Beads wurden durch kurzes zentrifugieren sedimentiert und der Überstand verworfen. Mit 3 x 150 µl Elutionspuffer (10 mM Glutathion, 50 mM Tris-HCl, pH 8,8) wurde GST-I-1 mit möglicherweise gebundenem RyR2 von der Glutathion-Sepharose eluiert. Die verbleibenden Beads wurden anschließend mit 100 µl 3 x SDS-Probenpuffer versetzt. Der Überstand nach Inkubation mit RyR2, die Überstände nach dem Waschen und das Eluat wurden anschließend zum

Nachweis einer Interaktion bzw. dem Verbleib von RyR2 einem [^{3}H]-Ryanodin-Bindungstest (siehe 2.9.6) unterzogen. Zusätzlich wurden die Fraktionen, genauso wie die mit 3 x SDS-Probenpuffer behandelten Beads, zum immunologischen Nachweis (siehe 2.9.4) von RyR2 bzw. I-1 verwendet.

2.9.3 Proteinisolierung aus Geweben

Homogenate für Western Blot Analysen

Pulverisiertes Ventrikelgewebe (30-40 mg) wurde mit einem Lysispuffer (3% SDS, 30 mM Tris-Base, pH 8,8, 5 mM EDTA, 30 mM NaF, 10% Glycerol) 1:10 versetzt und mit dem *TissueLyser* (Qiagen) homogenisiert. Grobe Gewebeteile wurden für 10 min (13200 rpm, RT) abzentrifugiert. Der Überstand wurde zum immunologischen Nachweis (siehe 2.9.4) von Proteinen verwendet.

Homogenate zum Nachweis von RyR2

Tiefgefrorenes Myokardgewebe der Maus (50-70 mg) wurde in Histidin/Sucrose-Puffer (0,25 M Sucrose, 30 mM Histidin, pH 7,4) 1:8 grob zerkleinert und anschließend mit einem Polytron homogenisiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Aliquots von diesem Homogenat wurden schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Alternativ wurde zum Nachweis der Phosphorylierung von RyR2 das Myokardgewebe in folgendem Lysispuffer: 10 mM $NaHCO_3$, 50 mM NaF, 5 mM $Na_4P_2O_7$ (pH 7,4) aufgenommen.

Präparation von Membranvesikeln

Tiefgefrorenes Myokardgewebe (100 mg) der Maus wurde in 2 ml Histidin/Sucrose-Puffer (0,25 M Sucrose, 30 mM Histidin, pH 7,4) grob zerkleinert, mit einem Polytron homogenisiert, für 3 x 5 sec sonifiziert und anschließend 10 min zentrifugiert (4000 rpm, 4 °C). Ein Aliquot des Überstandes wurde schockgefroren und bei -80 °C gelagert und das restliche Homogenat für 30 min zentrifugiert (45000 x g, 4 °C). Der Überstand enthielt die zytosolische Zellfraktion und wurde bei –80 °C gelagert. Das Pellet wurde in 2 ml eines 0,6 M KCl und 30

mM Histidin (pH 7,0) enthaltenden Puffer resuspendiert und erneut 45 min zentrifugiert (64000 x g, 4 °C). Der Überstand enthielt die kontraktilen Filamente und wurde ebenfalls bei –80 °C gelagert. Im Pellet blieben die vesikulären Membranstrukturen zurück, welche vorsichtig in 250 µl eines Puffers mit 0,25 M Sucrose und 10 mM Histidin (pH 7,0) resuspendiert und bei -80 °C gelagert wurden. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Isolierung und Anreicherung von RyR2 aus dem schweren sarkoplasmatischen Retikulum (HSR) aus humanem Herzgewebe

Die Isolierung des schweren sarkoplasmatischen Retikulums (HSR) aus menschlichem Herzgewebe über Sucrose Dichtegradienten Zentrifugation, wurde im Labor von Frau Dr. Magdolna Varsányi (Zentrum für physiologische Chemie, Abteilung für Biochemie Supramolekularer Systeme, Ruhr-Universität Bochum) nach einer Methode von Meissner et al. (1986) in modifizierter Form (Milting et al. 2006) bereits 2003 durchgeführt. Die Anreicherung des RyR2 aus dem schweren SR wurde von mir im obigen Labor durchgeführt. Die aus der HSR Präparation erhaltenen Fraktionen wurden mit dem doppelten Volumen Solubilisierungs-Puffer (2,1 M NaCl, 0,2 mM EGTA, 40 mM Na-PIPES, pH 7,2, 0,3 mM $CaCl_2$, 1,6% CHAPS, 5 mg/ml Phosphatidylcholin, 1 mM DTT, 0,1 mM Pefabloc, 100 nM Aprotinin, 1 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin, 1 mM Benzamidin, 1 µM Calpain I, 1 µM Calpain II) versetzt, erst 60 min auf Eis und anschließend 30 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde auf einem linearen Sucrose Gradienten (7-30%) aufgetragen und 16 h zentrifugiert (120000 x g, 4 °C). Die Gradienten wurden in 750 µl Fraktionen aliquotiert und die Sucrosekonzentrationen der einzelnen Fraktionen refraktometrisch bestimmt. Des Weiteren wurden die einzelnen Fraktionen einem [^{3}H]-Ryanodin-Bindungstest (siehe 2.9.6) unterzogen. Die [^{3}H]-Ryanodin-bindenden Fraktionen wurden schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Isolierung und Anreicherung von RyR2 aus einer stabilen Zelllinie

Die Isolierung von rekombinantem murinen RyR2 (ENSMUSG 00000021313) erfolgte aus einer stabil transfizierten Zelllinie, die im Labor von Frau Dr. Magdolna Varsányi (Zentrum für physiologische Chemie, Abteilung für Biochemie

Supramolekularer Systeme, Ruhr-Universität Bochum) generiert wurde. Die Zellen wurden mit 2,5 mM EDTA-haltigem PBS-Puffer gewaschen, anschließend in diesem Puffer geerntet und durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 2000 rpm, RT). Zur Solubilisierung von RyR2 aus den Zellmembranen, wurden die Zellen in Lysispuffer (2-faches Zellvolumen; 25 mM Tris-HCl, 50 mM HEPES, pH 7,4, 137 mM NaCl, 1% CHAPS, 0,5% Phosphatidylcholin) aufgenommen, dem 2,5 mM DTT und Proteaseinhibitoren (1 mM Benzamidin, 2 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin A, 2 µg/ml Aprotinin, 0,25 mM PMSF) zugesetzt wurden. Die Zellsuspension wurde für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend zweimal für 30 min zentrifugiert (20000 x g, 4 °C), um das Zelllysat von unsolubilisierten Zellrestbestandteilen zu trennen. Die weitere Aufreinigung des Zelllysats erfolgte über Sucrose Dichtezentrifugation (Sucrose Gradient: 7-25%; 16 h, 23000 rpm, 4 °C). Der Sucrosegradient wurde in 750 µl Aliquots fraktioniert und die Sucrosekonzentration der einzelnen Fraktionen refraktometrisch bestimmt. RyR2-haltige Fraktionen wurden mittels Radioliganden-Bindungstest (siehe 2.9.6) identifiziert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Präparation von Membranen zur β-Adrenozeptormessung

Pulverisiertes, gefrorenes Ventrikelgewebe (100 mg) wurde mittels Polytron bei 4 °C in 1,6 ml Puffer (50 mM Tris-Base, 5 mM $MgCl_2$) homogenisiert und anschließend 15 min zentrifugiert (500 x g, 4 °C). Der gesammelte Überstand wurde erneut für 20 min zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C) und das Pellet in 400 µl Puffer (100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris-Base, 5 mM $MgCl_2$, pH 7,5) resuspendiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Herstellung von TCA-Extrakten zum immunologischen Nachweis von I-1

Pulverisiertes, gefrorenes Ventrikelgewebe von drei vereinigten Herzen (300-320 mg) wurde mittels Mikro-Dismembrator (B. Braun) in gekühlter 1,5%iger Trichloressigsäure (TCA; plus 4 mM EDTA, 10 µg/ml Trypsininhibitor) 1:2 homogenisiert, dann 30 min auf Eis äquilibriert und anschließend 30 min zentrifugiert (12000 x g, 4 °C). Zur internen Kontrolle der Anreicherungseffizienz wurden dem Homogenat jeweils 5 µg rekombinantes I-1 Protein (siehe 2.9.1)

zugesetzt (rek. I-1* zum I-1c Homogenat und umgekehrt). Der Überstand wurde schrittweise auf einen Gehalt von 19% TCA adjustiert, dann bei 4 °C über Nacht inkubiert und wieder 30 min zentrifugiert (21000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde in 200 µl 0,5 M Tris-Base (pH 8,0) resuspendiert, dann bei 100 °C für 10 min gekocht und erneut 30 min zentrifugiert (12000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde dreimal in Centricons (Millipore; 10 kDa) 1:10 mit H_2O verdünnt und jeweils 15 min zentrifugiert (5000 x g, 4 °C). Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Proteinmenge aller Homogenate wurde nach der Methode von Bradford bestimmt, bei der die Absorption in einer Coomassie-Brilliantblau-Lösung (Bio-Rad) bestimmt wurde (Bradford 1976). Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen des Immunglobulins G (IgG) bestimmt.

2.9.4 Untersuchung der Proteinexpression

2.9.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)-PAGE wurde nach der Lämmli-Methode durchgeführt. Die Proben wurden in 6 x Probenpuffer (2% SDS, 10% Glycerol, 10 mM Tris-Base, pH 6,8, 100 mM DTT und 0,01% Bromphenolblau) 6:1 aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Abweichend davon wurden Proben für den Nachweis von RyR2 bzw. Phospho-RyR2 (Serin 2809/2815) für 10 min bei 30 °C inkubiert. Die Gelelektrophorese erfolgte mit 10-15% Polyacrylamidgelen, in Abhängigkeit des zu separierenden Protein-Molekulargewichtes (Trenngel: 375 mM Tris-Base, pH 8,8, 10-15% Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung: 29:1, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,03% TEMED; Sammelgel: 125 mM Tris-Base, pH 6,8, 5% Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung: 29:1, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,08% TEMED). Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 V für 10 min und anschließend bei 120 V in dem Mini Protean 3 Elektrophoresesystem (Bio-Rad) in einem Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS). Auf jedem Gel wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt (Precision Plus Protein Standard™, Bio-Rad). Für den Nachweis von RyR2 wurde ein 5%iges Trenngel ohne Sammelgel verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei

4 °C mit 60 mA pro Gel für 6 h. Es wurde ein Hochmolekulargewichtsstandard mitgeführt (HiMark™ *Pre-stained*, Invitrogen).

2.9.4.2 Coomassie-Färbungen

Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele 30 min in der Färbelösung (0,2% m/v Coomassie-Brilliantblau G250, 25% Isopropanol, 10% Essigsäure) gefärbt und mit Entfärbelösung (10% Essigsäure, 30% Methanol) durch mehrmaligen Wechsel entfärbt. Die entfärbten Gele wurden in destilliertem Wasser gewaschen und 2 h in einem Vakuum-Geltrockner (*SpeedGel*™ SG200, Savant) zwischen Cellophanpapier (Bio-Rad) getrocknet.

2.9.4.3 Western Blot Analyse

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden in dem Mini Trans-Blot Cell System (Bio-Rad) im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran (Protan® BA 85, Schleicher und Schuell) oder PVDF-Membran (Nachweis von PLB; Hybond-P PVDF, Amersham-Pharmacia) übertragen. Der Transfer wurde stromkonstant bei 400 mA für 90 min in Transferpuffer I (50 mM Tris-Base, 380 mM Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol) bzw. für den Nachweis von RyR2 bei 1 A und 4 °C für 16 h in folgendem Transferpuffer (42 mM Na_2HPO_4 x $2H_2O$, 8 mM NaH_2PO_4 x H_2O, pH 7,4) durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung (0,1 m/v Ponceau-S, 1% v/v Eisessig) angefärbt, um den Transfer zu kontrollieren. Die Membranen wurden vollständig in TBS-T Puffer (100 mM Tris-Base, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) entfärbt und anschließend, zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen, in einer 5%igen Milchpulver-Lösung (Milchpulver in TBS-T Puffer) für 1 h bei RT inkubiert. Abweichend wurde für den Nachweis von RyR2 und I-1 die Membran in 5%iger BSA-Lösung (BSA in TBS-T Puffer) über Nacht bei 4 °C blockiert.

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Anhang, Tab. 11.1) über Nacht bei 4 °C, wurde die Membran viermal mit TBS-T für jeweils 5 min gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (HRPO-konjugiert;

siehe Anhang, Tab. 2.1) inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch viermaliges Waschen mit TBST-T für jeweils 10 min entfernt und die Membran mit dem ECL-Substrat (*Enhanced Chemiluminescence,* Pierce) nach Angaben des Herstellers inkubiert. Das Chemilumineszenz-Signal wurde durch Fotofilme visualisiert. Abweichend hierfür wurde die Membran zum Nachweis von RyR2-gesamt mit einem AP-konjugierten (Alkalische Phosphatase) Zweitantikörper inkubiert und anschließend viermal für 10 min mit TBST-T 0,3% (TBST, 0,3% Tween 20) gewaschen und dann in AP-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$ x $6H_2O$, 100 ml Triethanolamin, pH 9,4) für 10 min äquilibriert. Die Membran wurde durch eine Farbreaktion mit 0,003% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-Toluidin-Salz-Lösung (BCIP; Stammlösung: 5% BCIP in DMF) und 0,006% Nitroblau-Tetrazolium-Lösung (NBT; Stammlösung: 5% NBT, 70% DMF) in AP-Puffer detektiert. Die Filme/Membranen wurden mit dem Chemie Genius^2 Bio-Imaging System fotographisch festgehalten und mittels *Gene Tool software* quantifiziert.

2.9.5 Bestimmung der Phosphatase Aktivität

Diese Versuche durfte ich freundlicherweise im Labor von Herrn PD Dr. Peter Boknik (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Münster) erlernen und durchführen.

2.9.5.1 Herstellung [^{32}P]-markierter Phosphorylase a

Das klassische *in vitro* Substrat der PP1 und PP2A ist die Phosphorylase a. Für die Herstellung von [^{32}P]-markierter Phosphorylase a (DePaoli-Roach et al. 1984) wurde Phosphorylase-Kinase-Lösung (20 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM ATP, 1 mM $CaCl_2$, 2,25% Mercaptoethanol, 0,25 g/l BSA, 5 g/l Phosphorylase b, 16,67 IU/ml Phosphorylase-Kinase) mit 2 mCi γ-[^{32}P]-ATP für 150 min bei 30 °C inkubiert. Die [^{32}P]-markierte Phosphorylase a wurde zweimal durch Zugabe von 3 Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und anschließend jeweils für 20 min zentrifugiert (12000 x g, 4 °C). Die gefällten Proteine wurden in 4 ml Dialysepuffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4) in einem semipermeablen Dialyseschlauch (Servapor®, Serva) zweimal gegen je 5 l Puffer für 8 h dialysiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.9.5.2 Phosphatase-Assay

Die Bestimmung der Phosphatase Aktivität (PP-Aktivität) wurde nach Neumann et al. (1991) durchgeführt. Als Substrat wurde [^{32}P]-markierte Phosphorylase a eingesetzt und die Freisetzung von radioaktivem Orthophosphat als Maß der PP-Aktivität ermittelt.

Die Bestimmung erfolgte in verschiedenen subzellulären Fraktionen von Ventrikelhomogenaten (Zytosol und Membranvesikel, siehe 2.9.3). Es wurden 30 µl der jeweiligen Fraktion (2 µg Protein der zytosolischen Fraktion oder 24 µg Protein der membranvesikulären Fraktion) für 10 min bei 30 °C inkubiert und die Reaktion mit Zugabe von 20 µl [^{32}P]-Phosphorylase a enthaltendem Reaktionsansatz (2,5 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM Koffein, 0,1 mM EDTA, 0,1% Mercaptoethanol, 25% [^{32}P]-Phosphorylase a) gestartet. Die eingesetzte Menge des Homogenates wurde jeweils durch Vorversuche optimiert. Es durften maximal 15-20% der Aktivität des Ansatzes umgesetzt werden, um die Freisetzungsgeschwindigkeit des Orthophosphates nicht durch eine abnehmende Substratmenge zu limitieren. Nach 20 min bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl Trichloressigsäure (50%) und 30 µl BSA (2%) beendet, wodurch sämtliche Proteine in der Lösung gefällt wurden. Das durch die Phosphatase abgespaltene radioaktive Phosphat verblieb in Lösung. Nach Fällung auf Eis (10 min) wurde die Suspension bei 14000 rpm für 5 min zentrifugiert und die Aktivität in 70 µl des Überstandes in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Zur Differenzierung zwischen PP1- und PP2A-Aktivität wurden die Homogenate einmal ohne und einmal unter Zugabe von 10 nM Okadasäure (OA) vermessen, da OA bereits im nanomolaren Bereich die PP2A hemmt, aber erst im mikromolaren Bereich die PP1. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Da die Proteinbestimmung der Phosphorylase a Lösung aufgrund fehlender technischer Möglichkeiten im Heißlabor nicht möglich war, wurden die ermittelten *counts* pro Minute (cpm) auf die Menge an Protein in den Proben bezogen. Die Messung der PP-Aktivität erfolgte dreimal je Probe.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Auswirkungen der rekombinanten I-1 Proteine, in phosphorylierter und auch unphosphorylierter Form, in aufsteigenden Konzentrationen gegenüber rekombinanter PP1c untersucht. Die rekombinanten I-1 Proteine wurden 1:1 mit einem Reaktionsmix (6 mM $MgCl_2$, 0,1 mM ATP), ohne oder mit 25 U Protein Kinase A (PKA), gemischt und 1 h bei 30 °C inkubiert. Die PKA wurde bei 95 °C für 5 min inaktiviert und der Reaktionsmix anschließend auf Eis abgekühlt und noch am selben Tag im PP-Assay verwendet. Zur Messung der PP1-Aktivität wurde wie zuvor beschrieben vorgegangen. Anstelle der Homogenate wurden 20 µl (2,5 ng) rekombinante PP1c und jeweils 10 µl des phosphorylierten bzw. unphosphorylierten rekombinanten I-1 Proteins in vier verschiedenen, aufsteigenden Konzentrationen zugesetzt.

2.9.6 [^{3}H]-Ryanodin-Bindungstest

25 µl der jeweiligen zu untersuchenden Probe (Fraktionen des Sucrose Gradienten bzw. nach GST *Pull-down* Assay) wurden mit 25 µl [^{3}H]-Ryanodin-haltigem Bindungspuffer (10 nM [^{3}H]-Ryanodin, 50 mM Na-PIPES, pH 7,4, 1,5 M KCl, 0,2 M Sucrose, 10 mM ATP, 0,8 mM $CaCl_2$, 0,25 mg/ml BSA + Proteaseinhibitorenauswahl) versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze in 5 ml Waschpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 250 mM KCl) aufgenommen und sofort über einen Glasfaserfilter (Whatman, Typ GF/B) filtriert. Die Filter wurden mit 3 x 5 ml Waschpuffer (0,2 M NaCl, 10 mM MOPS, 50 µM $CaCl_2$) gewaschen und getrocknet. Das Filterpapier wurde nach Trocknung in ein Szintillationsgefäß gegeben, mit *Safety-Szinti*-Lösung (Baker) überschichtet und die Menge an radioaktiv markiertem RyR2-[^{3}H]-Ryanodin-Komplex im Flüssigkeitsszintillator (1209 Rackbeta, LKBP Wallac) analysiert. Die unspezifische Bindung von [^{3}H]-Ryanodin wurde in Anwesenheit von 30 µM unmarkiertem Ryanodin bestimmt.

2.9.7 Bestimmung der β-Adrenozeptorendichte

Die Dichte der β-Adrenozeptoren wurde mit dem hydrophilen, nicht selektiven β-Adrenozeptor-Agonisten [^{3}H]-CGP 12177 in Ventrikelhomoganten (siehe 2.9.3) mittels Radioliganden-Bindungstest durchgeführt. Aufgrund der Hydrophilie des

Liganden wurden nur die Rezeptoren an der Zelloberfläche erfasst. Der Bindungsassay wurde in einer 96*well* PVDF-Filtrationsplatte (Millipore) durchgeführt. 100 µg Protein wurden zusammen mit dem Radioliganden [^{3}H]-CGP 12177 (3 nM) für 90 min inkubiert und anschließend mittels Vakuum abgesaugt, so dass lediglich der Liganden-Rezeptor-Komplex auf der Membran zurückblieb.

Jede Probe wurde zusätzlich mit dem Radioliganden in Anwesenheit des kompetitiven, nicht-radioaktiv markierten Antagonisten Nadolol (10 µM) inkubiert, um die unspezifische Bindung zu bestimmen. Anschließend wurden die Membranen zweimal mit 200 µl Assay-Puffer (100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$) gewaschen. Die Menge des gebundenen Liganden wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler (Counter Wallac 1409, Pharmacia Wallac Oy) bestimmt. Hierzu wurden die PVDF-Membranen mit dem Liganden-Rezeptor-Komplex ausgestanzt und mit Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold™, Packard) überschichtet. Die spezifische Bindung von [^{3}H]-CGP 12177 ergab sich aus der Differenz aus Gesamtbindung und unspezifischer Bindung (Anwesenheit von Nadolol). Die Bindung des Radioliganden wurde ausgedrückt als *counts* pro Minute (cpm) und ist direkt proportional zu der Anzahl an Rezeptorbindungsstellen. Über die Effektivität des Szintillationszählers, die spezifische Aktivität des Ligandens und die Proteinmenge können die Zerfälle pro Minute (DPM) und somit die Dichte der Bindungsstellen in fmol/mg Protein berechnet werden. Alle Bestimmungen wurden als Dreifachmessung durchgeführt.

2.10 Histologische Untersuchungen

2.10.1 Paraffineinbettungen für Mikrotomschnitte

Die entnommenen Herzen wurden über Nacht in 4%iger Paraformaldehydlösung inkubiert. Die fixierten Gewebe wurden 24 h in PBS gespült und in einer aufsteigenden Isopropanolreihe bei RT dehydriert: 70% (3 h), 80% (3 h), 96% (3 h), 96% (3 h), 100% (3 h), 100% (über Nacht) und in vorgewärmten (60 °C) Isopropanol (1 h). Im Anschluss erfolgten weitere Inkubationen für 4 h bei 60 °C in einer Isopropanol-Paraffinlösung (Verhältnis 1:1), in reinem Paraffin 2 x 2 h bei 60 °C und letztlich über Nacht in frischem Paraffin bei 60 °C. Das Gewebe wurde in

einer geeigneten Form mit Paraffin ausgegossen. Die Paraffinblöcke härteten bei 4 °C aus, bevor am Mikrotom (Leica RM 2125 RT, Leica) 5 µm dünne Schnitte angefertigt wurden, die in einem 37 °C warmen Wasserbad gestreckt und abschließend auf Objektträger (HistoBond®) gezogen wurden.

2.10.2 Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin (HE)

Für die Doppelfärbung mit Hämatoxylin (selektive Kernfärbung) und Eosin (Zytosolfärbung) wurden die Mikrotomschnitte mit RotiHistol® (Roth) entparaffiniert (2 x 15 min), in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100%, 2 x 96%, 80%, 70%) für jeweils 5 min rehydriert und bis zur Einstellung der Kernfärbung 20 min in Mayers Hämalaunlösung (1% Hämatoxylin, 0,2% $NaJO_3$, 50% $KAl(SO_4)_2$, 50% Chloralhydrat, 1% Zitronensäure) inkubiert. Nach Spülen in H_2O und Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min, wurden die Schnitte mäßig mit Eosinlösung (0,1% Eosin G, Merck) 10-20 min überfärbt, in H_2O 1-5 min ausgewaschen, in einer aufsteigenden Ethanolreihe (96%, 100%, je 2 x 2 min) dehydriert, 3-5 min in RotiHistol® inkubiert und mit Eukitt® (O. Kindler) Einschlussmedium für die Histologie eingebettet. Zur Morphometrie der Kardiomyozyten wurden die gefärbten Schnitte im Mikroskop (Zeiss-Axioplan IM-35) bei 40-facher Vergrößerung digital fotografiert (Zeiss-Axiocam) und die Querschnittsfläche orthograd geschnittener Kardiomyozyten mit einem Bildverarbeitungsprogramm (Axiovision) ausgemessen.

2.10.3 Übersichtsfärbungen mit Pikrinsäure/Siriusrot

Die Färbungen wurden bis zur zweiminütigen Kernfärbung in Mayers Hämalaunlösung, wie unter 2.10.2 beschrieben durchgeführt. Nach Spülen in H_2O und Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min wurden die Schnitte für 60 min mit Siriusrot (1% Direkt Rot 80, 500 ml Pikrinsäure, 100 mg phlegmatisierte Pikrinsäure) angefärbt. Anschließend zweimal kurz in 0,5%iger Essigsäure gespült, dann 1-5 min in H_2O ausgewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (96%, 100%, je 2 x 2 min) dehydriert, 3-5 min in RotiHistol® inkubiert und mit Eukitt® eingebettet. Die Quantifizierung kollagenhaltiger Areale erfolgte

aus definierten Arealen nach digitaler Aufnahme einer 10-fachen Vergrößerung mit einem Bildverarbeitungsprogramm (Axiovision).

2.10.4 X-Gal-Färbungen von Geweben und Gewebe-Kryoschnitten

Zur X-Gal-Färbung entnommene Gewebe, wurden nach Entnahme für 25 min in 1%iger Paraformaldehydlösung (PFA; pH 7,4) bei 4 °C fixiert, dann dreimal für 10 min bei 4 °C in PBS mit 2 mM $MgCl_2$ gewaschen und anschließend für 3 h in der X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid)-Färbe-Lösung (2 mM $MgCl_2$, 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$, 1 mg/ml X-Gal in PBS) bei 37 °C vor Licht geschützt inkubiert. Die Organe wurden zweimal 10 min bei 4 °C in PBS gewaschen und die Blaufärbung fotographisch festgehalten.

Zur Anfertigung von Kryodünnschnitten wurden die entnommenen Herzen in Isopentan gefroren und in Tissue-Tec (Sakura) eingebettet. Von den eingebetteten Proben wurden am Kryotom CM 3050S (Leica) bei -25 °C 5 µm Dünnschnitte angefertigt und die Schnitte auf SuperFrost-Plus-Objektträger (Menzel-Gläser) aufgenommen. Anschließend wurden sie 10 min in 1%iger PFA-Lösung fixiert, dann 3 x 10 min in PBS mit 2 mM $MgCl_2$ gewaschen und anschließend über Nacht bei 37 °C unter Lichtausschluss in einer feuchten Kammer mit X-Gal-Färbe-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 x 5 min in PBS gewaschen, getrocknet und dann in Mowiol-Einbettmedium (100 mM Tris-Base, pH 8,5, 10% Mowiol 4-88 (Calbiochem), 25% Glycerin) eingedeckelt. Die Dokumentation erfolgte am Mikroskop (Zeiss-Axioplan IM-35).

2.11 Physiologische Methoden

2.11.1 Messungen des diastolischen SR Ca^{2+}-Lecks (Ca^{2+}-Sparks) am konfokalen Mikroskop

Zur Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten wurde die Maus mittels Isofluran narkotisiert und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Das Herz wurde rasch entnommen und durch eine an der Aorta befestigte Kanüle für 4 min mit Ca^{2+}-freier Isolations-Tyrode (113 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,6 mM KH_2PO_4, 0,6

mM Na_2HPO_4 x $2H_2O$, 1,2 mM $MgSO_4$ x $7H_2O$, 12 mM $NaHCO_3$, 10 mM $KHCO_3$, 10 mM HEPES, 30 mM Taurin, 5,5 mM Glucose, 32 µM Phenolrot, pH 7,5) bei 37 °C an einer Langendorff-Perfusions-Analage retrograd perfundiert. Anschließend wurde der Tyrodelösung zum enzymatischen Verdau 7,5 mg/ml Liberase 1 (Roche), 0,6% Trypsin und 125 µM $CaCl_2$ zugesetzt und das Herz für weitere 3 min perfundiert. Anschließend wurden die Vorhöfe entfernt und das Ventrikelgewebe in der supplementierten Tyrodelösung unter Zusatz von 5% BSA zerschnitten und zur Trennung von Myozyten und Geweberesten gefiltert. Nach Sedimentationsanalyse der Myozyten wurde der Überstand entfernt und das Pellet in Isolations-Tyrode mit 100 µM Ca^{2+} aufgenommen und erneut sedimentieren gelassen. Dieser Schritt wurde mit 250, 500 und 800 µM Ca^{2+} wiederholt, so dass ein langsamer Ca^{2+}-Aufbau in den Myozyten stattfand. Die Myozyten wurden auf den mit Laminin-beschichteten Glasboden der Messkammer ausplattiert und für 15 min bei 37 °C und 5% CO_2 im Inkubator inkubiert.

Zur anschließenden Messung der subzellulären Ca^{2+}-Konzentration wurden die intakten Myozyten mit 10 µmol/l Fluo-4 AM (Teflabs) beladen und für 20 min bei RT inkubiert. Durch anschließendes Auswaschen mit Messtyrode (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$ x $7H_2O$, 5 mM HEPES, 10 mM Glucose, 1 mM $CaCl_2$, 10 nM Isoprenalin, pH 7,4), wurde überschüssiger extrazellulärer Farbstoff entfernt. Zudem konnte in dieser Zeit die vollständige De-Esterifizierung des in die Zellen aufgenommenen Farbstoffs erfolgen. Die Messungen der Ca^{2+}-Signale erfolgten bei RT unter kontinuierlicher Superinfusion im *Line-Scan* Modus des Laserscanning-Konfokalmikroskops (Zeiss LSM-5) und Feld-Stimulation mit 1 Hz. Fluo-4 wurde mittels Argon-Laser bei 488 nm angeregt und das emittierte Fluoreszenzlicht (F) bei >515 nm gemessen. Aus diesen Messungen wurde die Frequenz von diastolischen Ca^{2+}-Sparks bestimmt (Anzahl Sparks pro Messintervall). Weiterhin wurde aus Zellen mit repräsentativen Ca^{2+}-Sparks die Kinetik der Sparks (Amplitude, zeitlicher Verlauf) und damit deren jeweilige Größe bestimmt. Hierüber konnte das mittlere gesamte Ca^{2+}-Leck abgeschätzt werden, als Produkt aus Sparkfrequenz und Sparkgröße.

2.11.2 Echokardiographie

Alle echokardiographischen Untersuchungen wurden von Frau Birgit Geertz (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Hamburg) durchgeführt und von mir ausgewertet. Sowohl die Messungen als auch die Auswertungen erfolgten verblindet.

Die Ultraschalluntersuchungen wurde mit dem Vevo 770® System (Visual Sonics, Toronto) mit einem 30 MHz Schallkopf durchgeführt. Zur Einleitung der Narkose wurde die Maus in eine Induktionskammer mit Isofluran (3 vol%) gesetzt. Die anästhesierte Maus wurde in Rückenlage auf eine Wärmeplatte gebracht und mit den Pfoten auf EKG-Elektroden fixiert.

Die Messungen erfolgten bei einer Herzfrequenz von 450-550 Schläge/min und die Körpertemperatur wurde konstant bei 37 °C gehalten. Die Narkose wurde über eine Gesichtsmaske (1-2 vol% Isofluran, 1,5 l/min Carbogen) aufrechterhalten. Der Brustkorb wurde enthaart und mit vorgewärmtem Ultraschallgel (Sonogel, Bad Camberg) bedeckt. Mit einer *Frame rate* von 60 Hz wurde zunächst im B-Mode die parasternale lange Achse des Herzens dargestellt. Sichtbare Strukturen waren hierbei die Herzspitze, der linke Ventrikel und dessen Übergang in die Aorta, das interventrikuläre Septum und rechter bzw. linker Vorhof. Anschließend wurde der linke Ventrikel in der parasternalen kurzen Achse auf der mittleren Ebene der Papillarmuskeln aufgenommen. Die Ebene diente auch der Erstellung von M-Mode Aufnahmen. Zusätzlich wurden Kurz- und Langachse als EKV®-Mode aufgenommen. Bei dem EKV handelt es sich um eine Technik, bei der eine hohe Anzahl von Schlägen zu einem wird.

Die Darstellung der Pulmonararterie erfolgte im B-Mode. Dopplersonographisch mittels *continuous wave* (CW)-Doppler wurde die Flussgeschwindigkeit über die rechte Pulmonararterie bestimmt. Anschließend wurde der Maus 10 mg/kg Dobutamin i.p. (Carinopharm, Gronau) injiziert und die Aufnahmen, wie zuvor beschrieben, wiederholt. Gemessen wurden verschiedene Parameter sowohl in der Systole als auch in der Diastole (Tab. 2.1 und Abb. 2.5). Die Messungen erfolgten mit dem Vevo 770 V2.2.3 Messprogramm.

Tab. 2.1 Echokardiographisch gemessene Parameter.

Parameter	Abkürzung
Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. –systolischer Längendurchmesser	*Long* D d/s
Innere/äußere linksventrikuläre Fläche	*Area* endo/epi d/s
Linksventrikuläre enddiastolische bzw. -systolische Vorderwand- bzw. Hinterwandstärke	AwTh d/s bzw. PwTh d/s
Linksventrikulärer enddiastolischer bzw.- systolischer Durchmesser	LVEDD/LVESD

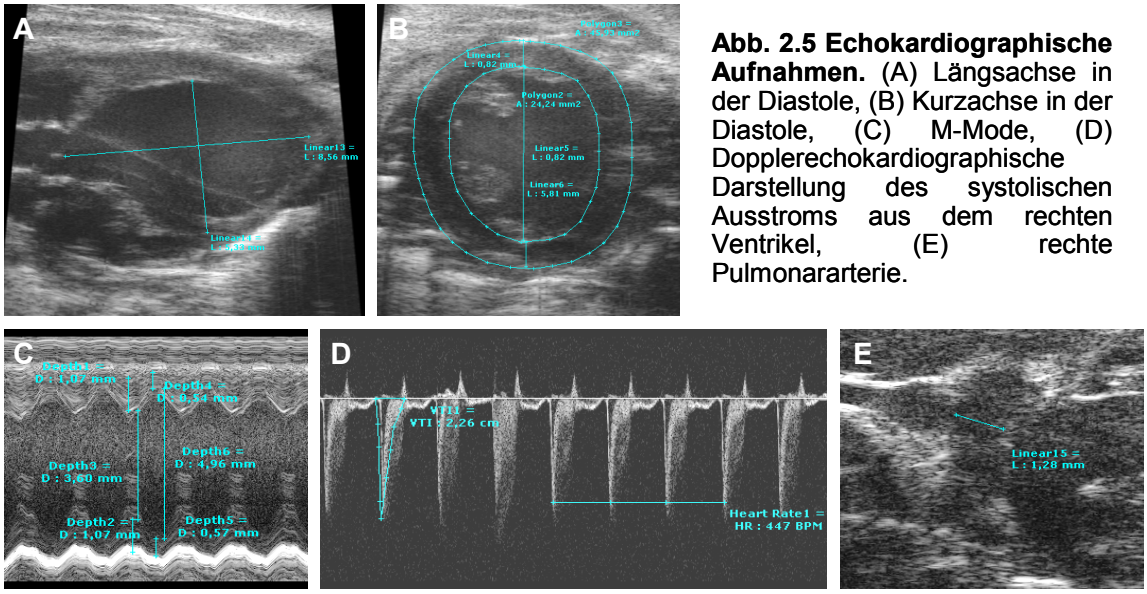


Abb. 2.5 Echokardiographische Aufnahmen. (A) Längsachse in der Diastole, (B) Kurzachse in der Diastole, (C) M-Mode, (D) Dopplerechokardiographische Darstellung des systolischen Ausstroms aus dem rechten Ventrikel, (E) rechte Pulmonararterie.

Aus den gemessenen Parametern wurden folgende Parameter berechnet:

Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion (FAS):

FAS (%) = (*Area* endo d - *Area* endo s) / *Area* endo d x 100

Linksventrikuläre Masse (LVM):

LVM (mg) = 1,05 x [5/6 x *Area* epi x (*long* D d + t) – 5/6 x *Area* endo d x *long* D d]

Hierbei stellt 1,05 das spezifische Gewicht des Muskels dar, t steht für die repräsentative myokardiale Wanddicke, gebildet aus dem Mittelwert der linksventrikulären enddiastolischen Vorderwand- und Hinterwandstärke.

Linksventrikuläres enddiastolisches bzw. –systolisches Volumen (LVEDV/LVESV):

LVEDV = 5/6 x *long* D d x *Area* endo d und LVESV = 5/6 x *long* D s x *Area* endo s

2.11.3 Implantation osmotischer Minipumpen

Zur chronischen Applikation von Isoprenalin (Sigma; 30 mg/kg*Tag) in der Maus, wurden osmotische Minipumpen des Modells 1007D (7 Tage) bzw. 2002 (14 Tage; beides ALZET®) mit einer Abgaberate von 0,5 µl/h verwendet. Isoprenalin wurde in 0,9% NaCl mit 0,2 mM HCl bei RT gelöst und anschließend wurde jede Pumpe individuell, dem Gewicht des Tieres entsprechend, befüllt. Um vor der Implantation eine konstante Abgaberate zu erzielen, wurden die Pumpen nach Befüllung für 10-14 h bei 37 °C in 0,9% NaCl vorinkubiert.

Zur Implantation der Minipumpen wurden die Mäuse mit Isofluran (3 vol%) anästhesiert. Die Minipumpen wurden subkutan über eine Hautinzision (0,7 cm) im Nacken, nach Mobilisierung der Haut, in den Lendenwirbelbereich implantiert. Die Haut wurde mit 2-3 Michel-Klammern verschlossen. Zur Analgesie erhielten die Tiere über 1 Woche lang 5,4 mg Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm®, Ratiopharm) pro Tag. Nach Ablauf der Behandlungsdauer wurden die Tiere getötet und jeweils Herz, Lunge und Leber (siehe 2.7) entnommen sowie die Tibialänge bestimmt.

2.11.4 Linksherzkatheterisierung

Die invasive Herzkatheteruntersuchung ermöglichte die *in vivo* Erfassung physiologischer Parameter wie Herzfrequenz, mittlerer arterieller Druck, systolischer und diastolischer linksventrikulärer Druck sowie daraus abgeleitet die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. Die zu untersuchenden Tiere wurden mit Isofluran narkotisiert. Die Anästhesie wurde über eine kontinuierliche Isofluraninhalation (1-2 vol%) aufrechterhalten. Die Tiere wurden auf einer Wärmeplatte und durch Rotlichtbestrahlung bei 37 °C Körpertemperatur gehalten und kontrolliert mit einem Hubvolumen von 150 µl und einer Frequenz von 150 Züge/min ventiliert (Minivent, Harvard Apparatus).

Durch eine zervikale Inzision wurde die rechte Arteria carotis freipräpariert und sowohl proximal als auch distal Blutsperren angelegt. Dann wurde eine kleine Inzisur in der Gefäßwand gesetzt und ein Vier-Elektroden-Druck-Volumen-Katheter (Model SPR-839, Millar Instruments) in das Gefäß eingebracht, danach retrograd über die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt und durch ständige Kontrolle der Druck-Volumen-Kurven optimal platziert. Die Bestimmung der Basalparameter erfolgte durch eine einminütige Registrierung des Druckverlaufs in der Aorta und anschließend im linken Ventrikel, wo die Parameter über 3 min aufgezeichnet wurden.

2.11.5 Telemetrische Messungen

Zur telemetrischen Datenerfassung wurden die Transmitter TA10ETA-F20-L20 (Data Science) abdominal nach Ketamin/Xylazin Anästhesie (50 mg/kg und 10 mg/kg i.p.) implantiert (Kirchhof et al. 2007). Nach einer Erholungsphase von 14 Tagen wurde mit den Messungen begonnen. Die vom schlagenden Mausherz erzeugten Potentialänderungen wurden von dem implantierten Transmitter registriert und in Radiofrequenzsignale konvertiert und an einen Receiver (Receiver RA1010, Data Science) gesandt, der in Form einer Platte unter dem Käfig stand. Die empfangenen Signale wurden von dem Receiver weiter an eine so genannte *Input Matrix* weitergeleitet, wo sie digital gefiltert und an einen Computer weitergeleitet wurden. Über das Computerprogramm der Firma *Data Science* konnten die Daten registriert und die Funktion der einzelnen Receiver *online* überwacht werden. Von hier wurden die Daten an die so genannte *Output Matrix* weitergeleitet. Dort wurden sie erneut analogisiert und anschließend an einen Computer, der die Daten mit Hilfe eines Programms aufzeichnete und *offline* digital auswertete, weitergegeben.

Die Elektrokardiogramme (EKGs) wurden mit einer *sampling rate* von 1000 Hz in sich frei bewegenden Mäusen, unter normalen Bedingungen und während akuter Stressbelastung, aufgenommen. Die Messungen wurden an aufeinander folgenden Tagen parallel an jeweils acht Tieren durchgeführt. Eine Stunde vor Belastungsbeginn wurden Ruhe-EKGs aufgezeichnet. Die Stresssituation wurde durch intraperitoneale Injektion von 2 mg/kg Isoprenalin, anschließenden

mentalem Stress mittels Fön (intermittierend 15 sec/min über einen Zeitraum von 15 min) und wiederholter Isoprenalin Injektion (2 mg/kg) erzeugt. Das Belastungs-EKG wurde während der Belastung und während der sich anschließenden einstündigen Erholungsphase aufgezeichnet. Im Anschluss bekamen die Tiere über 14 Tage Doxycyclin verabreicht und die Messungen wurden in denselben Tieren, wie zuvor beschrieben, wiederholt. Die EKGs wurden im Hinblick auf Arrhythmien manuell analysiert.

2.12 Statistische Auswertung

Die Daten werden präsentiert als arithmetischer Mittelwert±Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mit n wurde die Anzahl der Tiere bzw. Einzelversuche bezeichnet. Die statistische Signifikanz wurde, wenn nicht anders gekennzeichnet, mittels t-Test nach Student für unverbundene bzw. verbundene Stichproben ermittelt. Die Analysen wurden mit der *GraphPad Software* durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

Um eine sorgfältige I-1 Ursache-Wirkungsbeziehung unter Umgehung von Anpassungsreaktionen zu untersuchen, sollten doppelt-transgene Mausstämme auf einem I-1 KO Hintergrund generiert werden, die verschiedene I-1 Formen herzspezifisch unter Kontrolle des regulierbaren Tet-Off Systems überexprimieren. Diese Mäuse sollten auf funktioneller, histologischer und molekularer Ebene charakterisiert und unter Nutzung der Regulierbarkeit (mittels Doxycyclin) in einem experimentellen Herzinsuffizienzmodell (Überleben, Arrhythmieneigung, Remodeling) untersucht werden. Dabei stellte die Generierung der Mauslinien den Beginn der Arbeit dar.

3.1 Generierung der Inhibitor-1 Respondermauslinien auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund

3.1.1 Generierung der Inhibitor-1 Responderkonstrukte

Die Veränderungen zentraler Phosphorylierungsstellen von I-1 sollten zu folgenden Mutanten führen: (i) I-1-S67A (Serin gegen „nicht-phosphorylierbares“ Alanin substituiert) und (ii) den trunkierten I-1-T35D (N-terminal 65 statt 171 Aminosäuren und Threonin gegen „dauerphosphoryliertes“ Aspartat substituiert).

Zur Generierung der verschiedenen Respondervektoren wurde die cDNA des Gens *PPP1R1A* (ENSMUSG 00000022490*;* Genbezeichung für I-1) mittels RT-PCR aus muriner kardialer Gesamt-RNA amplifiziert und in den pCRII-Vektor kloniert. Mittels gerichteter *in vitro* Mutagenese wurde im Bereich der kodierenden Sequenz von I-1 jeweils ein gezielter Basenaustausch vorgenommen. Die mutierten cDNA-Fragmente wurden anschließend ebenfalls in den pCRII-Vektor kloniert (siehe 2.1.1, Abb. 2.2).

Die I-1-S67A Mutation (I-1*) wurde durch den Austausch von T → G (Nukleotid 199) generiert. Auf Proteinebene resultierte die Einführung der genetischen Veränderung in einem Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin an Position 67 (S67A). Die Generierung der I-1-T35D Mutation (I-1c) erfolgte durch einen

Austausch von AC → GA (Nukleotid 103 und 104). Dies führte an Position 35, der PKA Phosphorylierungsstelle, zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Aspartat. Gleichzeitig wurde I-1c N-terminal auf 65 Aminosäuren verkürzt.

Zur Verwendung des Tet-Off Systems wurden die jeweiligen I-1 cDNA-Fragmente aus dem pCRII-Vektor in das Antwort (*response)*-Plasmid (pTRE-Tight) subkloniert (siehe 2.2.1, Abb. 2.1 und Abb. 3.1). Die korrekte Klonierung und die Einführung des entsprechenden Basenaustausches wurden durch Sequenzierung verifiziert (Abb. 3.1).

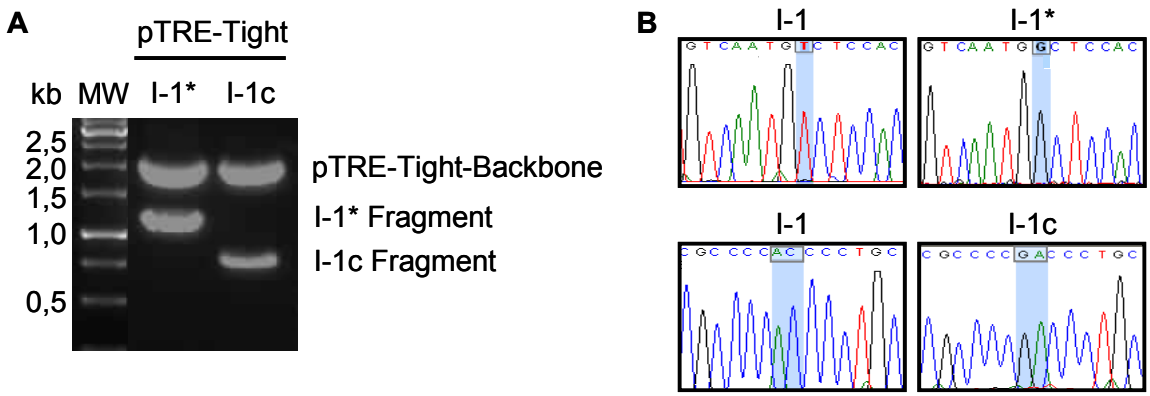


Abb. 3.1 Restriktionsanalyse der pTRE-Tight-I-1*/I-1c Vektoren und Sequenzierergebnisse für I-1* und I-1c. (A) Die *Xho*I-verdauten Proben zeigten jeweils das aus dem pTRE-Tight-Vektor herausgeschnittene Insert von ~1,1 kb (I-1*) bzw. ~0,8 kb (I-1c). (B) Dargestellt sind Ausschnitte der Chromatogramme von I-1* bzw. I-1c im Vergleich zum Wildtyp I-1. Die Sequenzierungen bestätigten den jeweiligen zur Mutation führenden Basenaustausch (blau unterlegt).

3.1.2 *In vitro* Expression und Regulierbarkeit der Inhibitor-1 Responderkonstrukte

Zur Überprüfung der *in vitro* Proteinexpression wurden HEK-293-Zellen mit den entsprechenden Responderkonstrukten transfiziert. Um Aussagen über die Regulierbarkeit treffen zu können, erfolgte eine Kotransfektion mit einem tTA-exprimierenden Vektor in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin (1 µg/ml).

Die Western Blot Analyse der Zelllysate zeigte erwartungsgemäß ausschließlich nach Kotransfektion und ohne Zusatz von Doxycyclin eine Detektion des entsprechenden I-1 Proteins (31 kDa für I-1 bzw. I-1* und 13 kDa für I-1c; Abb. 3.2). Aufgrund der eingefügten Mutationen konnte mittels phosphospezifischer

Antikörper für I-1* ausschließlich die PKA-Threonin-35-Phosphorylierungsstelle nachgewiesen werden. Eine Phosphorylierung an Serin 67 war erwartungsgemäß nicht detektierbar. Im Gegensatz zur Kontrolle konnte für I-1c, ebenfalls erwartungsgemäß, keine der beiden Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden. Diese Resultate bestätigten die Integrität der jeweiligen I-1 Mutation und die *in vitro* Regulierbarkeit durch Doxycyclin.

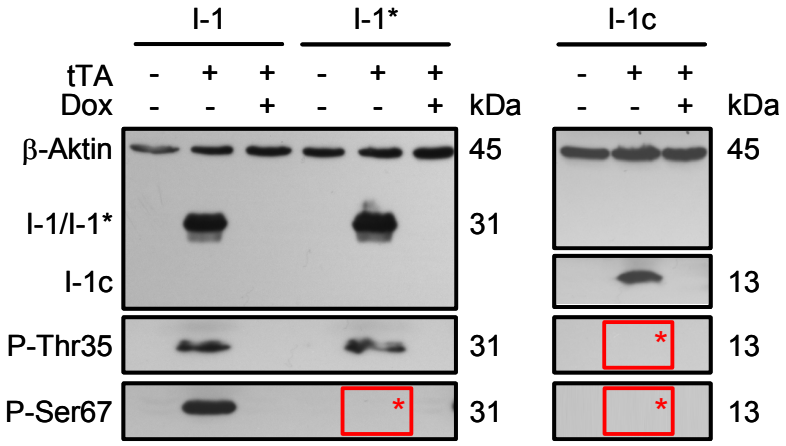


Abb. 3.2 Western Blot von I-1 bzw. mutiertem I-1 in transfizierten HEK-Zelllysaten. Die beiden I-1 Mutanten konnten ausschließlich in Anwesenheit von tTA und Abwesenheit von Doxycyclin immunologisch detektiert werden. Mittels phosphospezifischer Antikörper (P-Thr35 und P-Ser67) konnte das Fehlen der entsprechenden Phosphorylierungsstellen in beiden I-1 Mutanten nachgewiesen werden. *Kennzeichnet das jeweils fehlende Signal. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

3.1.3 *In vitro* Aktivitätsnachweis der rekombinanten Inhibitor-1 Proteine

Das endogene I-1 Protein ist aus einfachen Herzhomogenaten immunologisch nicht nachweisbar, da es mit einer Konzentration von 126 fmol/mg unterhalb der Nachweisgrenze liegt (El-Armouche et al. 2004). Eine C-terminale c-myc-Fusion sollte eine immunologische Detektion mit einem anti-c-myc Antikörper ermöglichen. Um die Funktionalität der C-terminal markierten I-1 Proteine zu untersuchen, wurden die entsprechenden rekombinanten Proteine generiert und deren Aktivität (IC_{50} = Konzentration, bei der 50% der rekombinanten PP1c gehemmt vorliegen) mittels Phosphatase-Assays (PP-Assay) bestimmt. Das I-1 Wildtyp Protein diente als Kontrolle.

Erwartungsgemäß konnte mittels Coomassie-Färbung (Abb. 3.3 A) vor dem Zeitpunkt der IPTG-Induktion (T_0) kein Protein detektiert werden, wohingegen nach vierstündiger Induktion (T_4) eine deutliche GST-I-1 Bande zu erkennen war. Nach proteolytischer Spaltung war I-1 im Eluat (E) als klare Bande nachweisbar. Die Ergebnisse konnten für die Mutanten unter Verwendung des anti-c-myc Antikörpers im Western Blot bestätigt werden (Abb. 3.3 B).

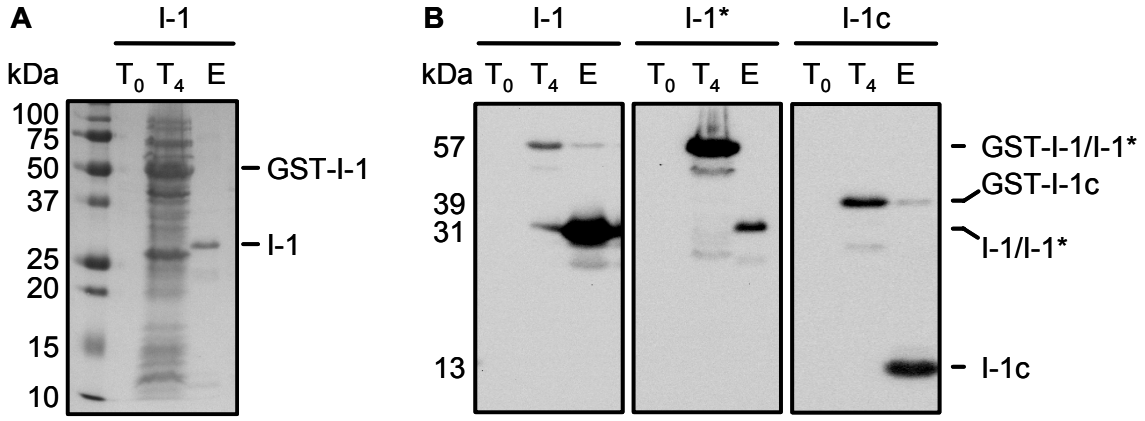


Abb. 3.3 Nachweis der rekombinanten I-1 Proteine. Expression von rekombinantem I-1 bzw. I-1 Mutanten in *E. coli.* T_0 entspricht dem Zeitpunkt vor IPTG-Zugabe und T_4 dem Zeitpunkt nach 4 h IPTG-Induktion. Durch (A) Coomassie-Färbung und (B) Western Blot waren zum Zeitpunkt T_4 die GST-Fusionsproteine bei 57 kDa (für GST-I-1/I-1*) bzw. 39 kDa (für GST-I-1c) detektierbar. Nach proteolytischer Spaltung konnte im Eluat (E) I-1/I-1* (31 kDa) bzw. der trunkierte I-1c (13 kDa) detektiert werden. Für T_0/T_4 wurden je Spur 5 µl der Bakteriensuspension geladen und vom Eluat jeweils 2 µg Gesamtprotein.

Im Folgenden wurde der inhibitorische Effekt der rekombinanten I-1 Proteine auf die PP1c-Aktivität untersucht. Mittels phosphospezifischer Antikörper konnte eine erfolgreiche *in vitro* PKA-Threonin-35-Phosphorylierung (Aktivierung) von I-1 bzw. I-1* nachgewiesen werden. I-1c hingegen war unabhängig von der PKA Zugabe, aufgrund der fehlenden Phosphorylierungsstelle, nicht detektierbar (Abb. 3.4 A). Die unteren Banden im Westen Blot stellten wahrscheinlich Degradationsprodukte von I-1/I-1* dar, die den N-terminalen Bereich mit der Phosphorylierungsstelle noch enthielten.

Wie den Konzentrations-Wirkungskurven zu entnehmen (Abb. 3.4 B), inhibierten I-1 und I-1* in ihrer phosphorylierten Form sehr potent und konzentrationsabhängig (IC_{50}: 36 nM bzw. 16 nM) die PP1c-Aktivität. Wie erwartet konnte im unphosphorylierten Zustand kein hemmender Effekt gemessen werden. Die IC_{50}

der I-1c Mutante nach PKA Inkubation lag bei 270 nM. Somit war dieses Protein ebenfalls funktionell aktiv, jedoch mit einer geringeren Potenz als der native I-1 (~7,5-fach) und I-1* (~17-fach). Unerwartet zeigte I-1c ohne vorherige PKA Inkubation einen schwächeren Effekt. Insgesamt konnte für beide I-1 Mutanten die biologische Aktivität bestätigt werden.

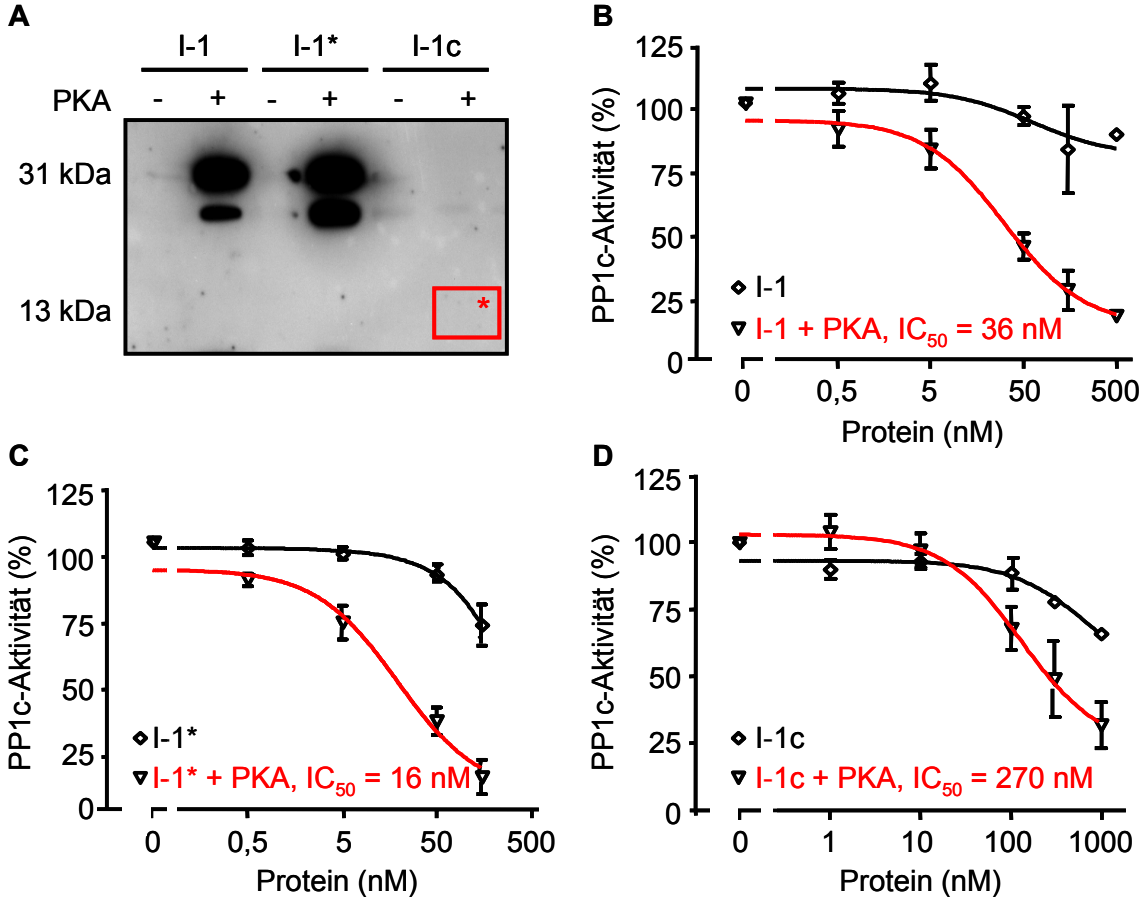


Abb. 3.4 Immunologischer Nachweis der PKA Phosphorylierung und biologische Aktivität der rekombinanten I-1 Proteine. (A) Zum Nachweis der *in vitro* PKA Phosphorylierung wurden jeweils 2 µg Protein geladen und mit einem phosphospezifischen Antikörper detektiert. (B-D) Mittels PP-Assay wurde der konzentrationsabhängige inhibitorische Effekt des (B) I-1, (C) I-1* und (D) I-1c Proteins gegenüber 2,5 ng rekombinanter PP1c gemessen (Dreifachbestimmung). Die IC_{50} Werte wurden aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Als Kontrolle wurde die Aktivität von 2,5 ng rekombinanter PP1c ohne I-1 Zusatz gemessen. Ordinate: PP1c-Aktivität in %. Abszisse: Konzentration (nM) an zugesetztem I-1/I-1*/I-1c. *Kennzeichnet das fehlende Signal.

3.1.4 Generierung der transgenen Inhibitor-1 Responderlinien

Die DNA der Responderkonstrukte (Abb. 3.5 A) wurde durch Mikroinjektion in den Vorkern muriner befruchteter Eizellen eingebracht und diese pseudoschwangeren

Ammen implantiert. Die Pronukleusinjektionen wurden von Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer (Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg) durchgeführt. Die Integration von I-1* und I-1c in das Genom der Maus wurde mittels Southern Blot und PCR überprüft.

Die Southern Blot Analyse der fragmentierten genomischen DNA ergab unter Verwendung radioaktiv markierter Sonden (Abb. 3.5 A) ein spezifisches Signal bei der erwarteten Fragmentgröße (1,1 kb für I-1* bzw. 0,8 kb für I-1c). Nicht-transgene Geschwistertiere (WT) zeigten kein Signal (Abb. 3.5 B). Für beide Responderlinien konnte jeweils ein Transgen-positiver Nachkomme (TG) identifiziert werden. Die transgenen Mauslinien wurden durch Rückkreuzung mit C57BL/6J Mäusen etabliert und weiterführend als I-1* bzw. I-1c Responderlinie bezeichnet.

Der Befund wurde mittels Multiplex-PCR bestätigt. Das jeweilige Transgen wurde durch spezifische Primer, die in den kodierenden Sequenzen lagen (Exon 1/Exon 5 für I-1* bzw. Exon 1/Exon 4 für I-1c), nachgewiesen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde jeweils ein DNA-Fragment der kalkulierten Länge von 304 bp bzw. 248 bp detektiert. Als zusätzliche „interne Kontrolle“ wurde der endogene I-1 ($I\text{-}1^{endogen}$) durch Primer nachgewiesen, die einerseits im nicht-kodierenden Bereich (Intron 4) und andererseits in der kodierenden Sequenz (Exon 5; Fragmentgröße: 395 bp) lagen (Abb. 3.5 C). Das Transgen wurde geschlechtsunabhängig und nach den Mendelschen Gesetzen stabil weitervererbt. Die Nachkommen wurden fortlaufend mittels PCR genotypisiert.

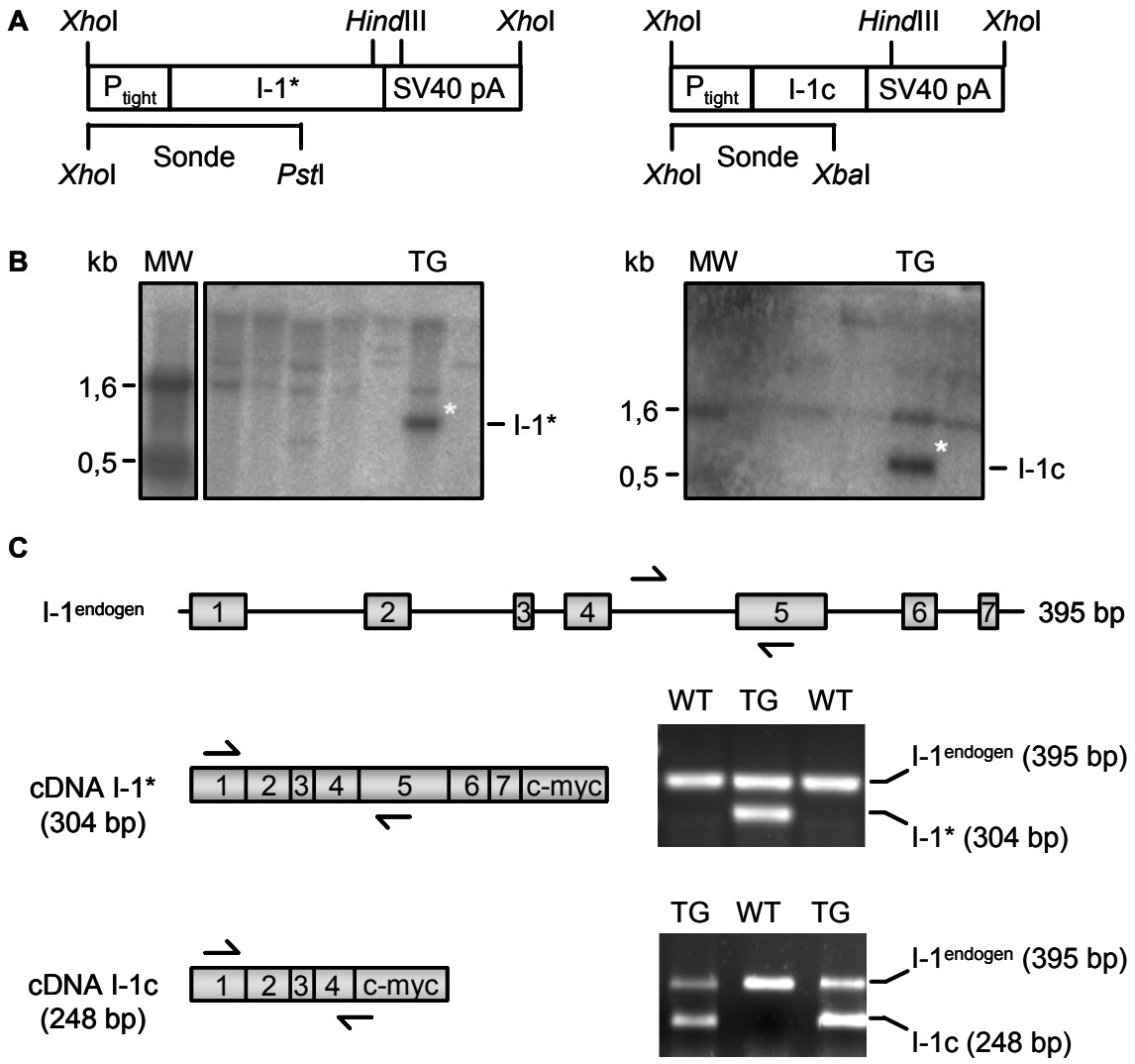


Abb. 3.5 Genotypisierung transgener I-1 Mäuse. (A) Schematische Darstellung der beiden I-1 Injektionsfragmente nach *Xho*I-Verdau der jeweiligen Responderkonstrukte (Abb. 2.1). (B) Southern Blot Analyse. Genomische DNA der durch Pronukleusinjektion generierten Mäuse wurde nach *Hind*III-Verdau mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Nachweis des Transgens (TG) erfolgte mit Hilfe einer [^{32}P]-markierten Sonde (*kennzeichnet die Transgen-spezifische Bande). (C) Genotypisierung des jeweiligen Transgens und der Nachkommen. Dargestellt sind die Produkte einer Duplex-PCR, die mit isolierter genomischer DNA als Matrize durchgeführt wurde. Schematische Darstellung der Lokalisation der verwendeten Primer.

3.1.5 Etablierung der Inhibitor-1 Responderlinien auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund

Vor Generierung der finalen doppelt-transgenen Mauslinien wurden sowohl die I-1 Responderlinien als auch die Transaktivatorlinie auf einem I-1 KO Hintergrund etabliert (siehe 3.3, Abb. 3.9). Die I-1* bzw. I-1c Transgenen wurden mit einer bereits generierten und bei uns etablierten I-1 KO Mauslinie (Allen et al. 2000)

gekreuzt. In den I-1 KO Mäusen wurde ein 400 bp großes Fragment, das das kodierende Exon 1 einschloss, durch einen Neomycin (Neo)-enthaltenen Vektor ersetzt (Abb. 3.6). Dadurch wurde sowohl die Initiationssequenz für die Transkription als auch Translation eliminiert, so dass in den I-1 KO Mäusen keine Proteinexpression stattfand (Allen et al. 2000, Carr et al. 2002, El-Armouche et al. 2004, El-Armouche et al. 2008). Die Genotypisierung auf Hetero-/Homozygotie (KO_{het}/KO) hinsichtlich des endogenen I-1 Gens erfolgte mittels Multiplex-PCR (Abb. 3.6). Im Folgenden wurden die Responderlinien auf einem I-1 KO Hintergrund mit I-1* und I-1c bezeichnet.

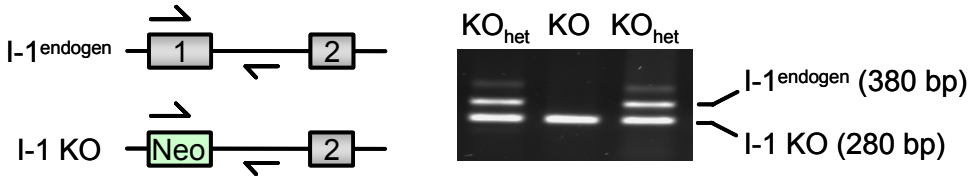


Abb. 3.6 I-1 KO Genotypisierung mittels PCR. In der F1-Generation waren alle Nachkommen heterozygot KO für den I-1 (KO_{het}). In der F2-Generation musste zwischen heterozygoten (KO_{het}) und homozygoten (KO) Nachkommen differenziert werden. Die Doppelbande bei 280/380 bp steht für einen heterozygoten Nachkommen, wohingegen ein einzelnes Signal bei 280 bp ein I-1* Transgen auf vollständigem I-1 KO Hintergrund identifiziert.

3.2 Die Transaktivatorlinie auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund

3.2.1 Charakterisierung von zwei verfügbaren Transaktivatorlinien

Neben der Responderlinie repräsentiert die Transaktivatorlinie die zweite Komponente des Tet-Off Systems. Zwei Linien, die das Transaktivatorprotein (tTA) herzspezifisch unter der Kontrolle des αMHC-Promoters exprimieren, stehen zur Verfügung. Die von Passman und Fishman (1994) generierte tTA Linie verwendet regulatorische Elemente des trunkierten Ratten αMHC-Promoters. Im Unterschied dazu exprimiert die von Sanbe und Robbins generierte Linie das tTA Protein unter Kontrolle des unprozessierten murinen αMHC-Promoters (Abb. 3.7 A; Sanbe et al. 2003). Zum indirekten Nachweis von Stärke und Homogenität der tTA Expression wurden beide Linien mit einer bidirektionalen GFP-/LacZ-exprimierenden Reportermaus gekreuzt (Abb. 3.7 B; $TetO_{bi}$-LacZ/GFP Linie; Krestel et al. 2001). Die aus der Kreuzung resultierende β-Galaktosidaseaktivität

wurde mittels enzymatischen Tests als Blaufärbung (X-Gal) nachgewiesen und war ein Indikator für die tTA Expression.

Von jeweils drei doppelt-transgenen Tieren ($tTA_{Fishman}XTetO_{bi}$-LacZ/GFP bzw. $tTA_{Robbins}XTetO_{bi}$-LacZ/GFP) und Kontrollmäusen (einfach-transgen für die $TetO_{bi}$-LacZ/GFP Linie) wurden Herz, Leber und Milz entnommen. Das Herz wurde longitudinal geteilt. Ein Teil wurde nach Anfertigung von Kryodünnschnitten für die histochemischen Untersuchungen verwendet und der andere Teil zusammen mit den weiteren entnommenen Organen einer direkten X-Gal-Färbung unterzogen.

Erwartungsgemäß war das Herz der Kontrolltiere ungefärbt (Abb. 3.7 D), während die Leber und Milz eine grünliche, unspezifische Färbung aufwiesen. Diese war aber auch in den doppelt-transgenen Tieren ersichtlich (Abb. 3.7 D). Die Herzen der doppelt-transgenen Tiere waren deutlich blau gefärbt. Beide Linien zeigten eine starke und homogene tTA Expression im Atrium. Im Ventrikel hingegen wiesen die $tTA_{Fishman}$ Tiere eine starke und homogene Expression auf, während die $tTA_{Robbins}$ Mäuse eine relativ schwache und mosaikförmige Verteilung zeigten (Abb. 3.7 D).

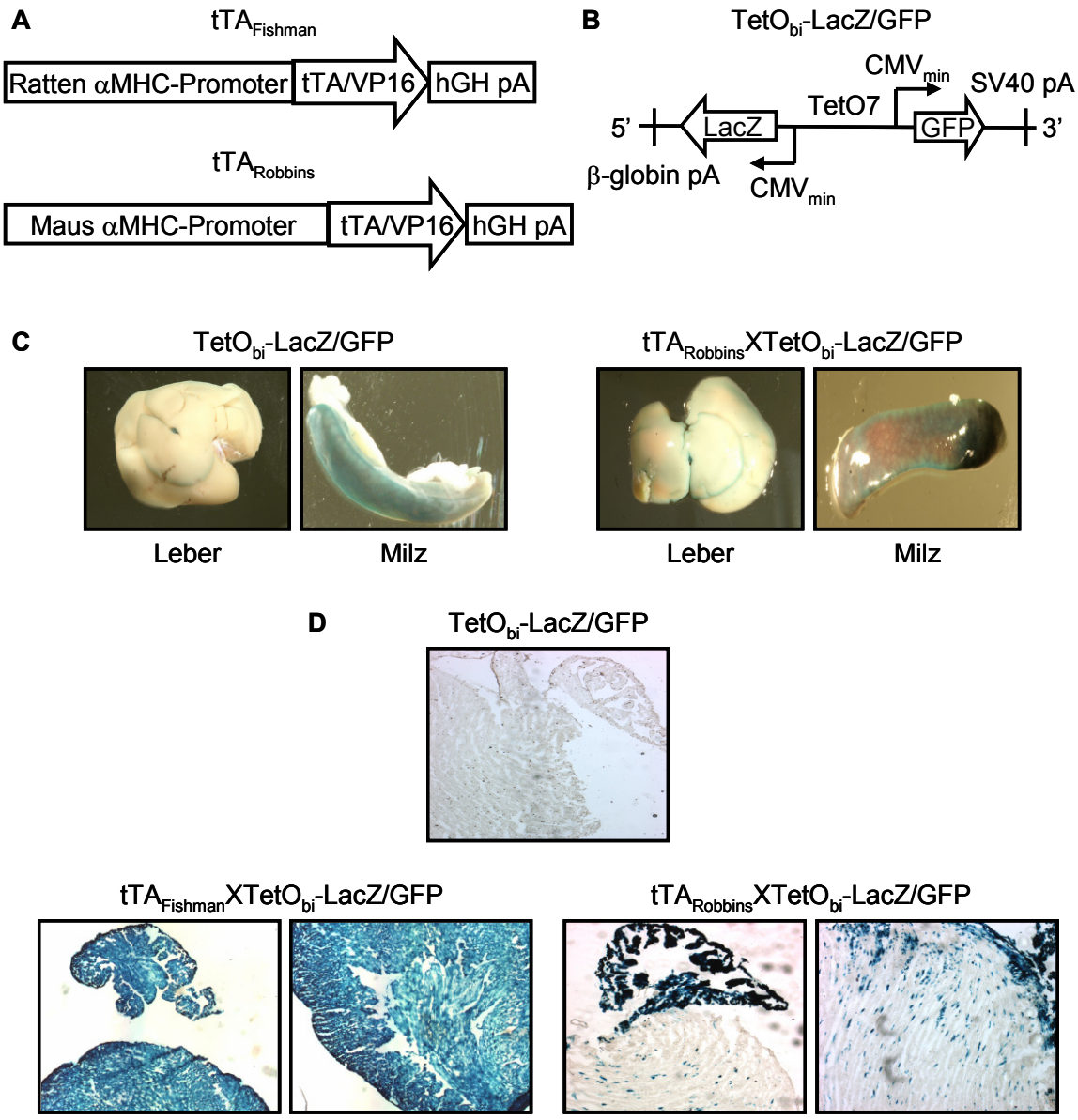


Abb. 3.7 Expressionsmuster nach Kreuzung mit zwei unterschiedlichen Transaktivatorlinien. (A) Die tTA Expression stand entweder unter Kontrolle eines verkürzten Ratten αMHC-Promoters (tTA$_{Fishman}$) oder eines unprozessierten αMHC-Promoters der Maus (tTA$_{Robbins}$). (B) Beide tTA Linien wurden mit einer bidirektionalen Reporterlinie gekreuzt (GFP und LacZ; TetO$_{bi}$-LacZ/GFP Linie). (C) Dargestellt ist der negative Farbtest in Leber und Milz einer Kontrollmaus (TetO$_{bi}$-LacZ/GFP) und einer doppelt-transgenen Maus (tTA$_{Robbins}$XTetO$_{bi}$-LacZ/GFP). (D) X-Gal-Färbungen von Herz-Kryoschnitten zeigten keine β-Galaktosidaseaktivität in den Kontrolltieren (TetO$_{bi}$-LacZ/GFP). In den tTA$_{Fishman}$XTetO$_{bi}$-LacZ/GFP Tieren konnte eine starke und homogene LacZ Expression im Atrium und Ventrikel detektiert werden, wohingegen die tTA$_{Robbins}$XTetO$_{bi}$-LacZ/GFP Mäuse ein sehr heterogenes Expressionsmuster zeigten. Alter 9 Wochen; Schnittdicke: 5 µm; Vergrößerung: 40x.

3.2.2 Etablierung der Transaktivatorlinie auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund

Als Konsequenz der vorherigen Analysen wurde die $tTA_{Fishman}$ Linie zur Generierung der doppelt-transgenen I-1 Tiere verwendet. Diese Mäuse exprimierten noch den endogenen I-1 und wurden als $tTA^{I\text{-}1(+/+)}$ geführt. Analog der Respondertiere wurde auch die tTA Linie auf einen I-1 KO Hintergrund gekreuzt (siehe 3.1.5, Abb. 3.6) und fortan als $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ geführt. Der Nachweis des tTA Transgens erfolgte auf DNA-Ebene mittels PCR (Abb. 3.8).

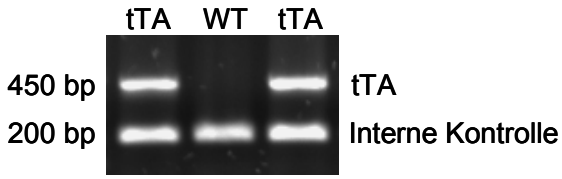


Abb. 3.8 Genotypisierung der tTA Mauslinie mittels PCR. Die genomische DNA der Mäuse wurde mittels Duplex-PCR unter Verwendung tTA-spezifischer Primer amplifiziert (Produktgröße: 450 bp).

3.3 Generierung der doppelt-transgenen Inhibitor-1 Linien auf einem Inhibitor-1 KO Hintergrund

Nach Etablierung der beiden Responderlinien und der Transaktivatorlinie auf einem I-1 KO Hintergrund sollte die I-1 Expression durch Verpaarung der Respondermäuse mit der Transaktivatorlinie induziert werden (Abb. 3.9). Die daraus resultierenden doppelt-transgenen Tiere (dTG) waren somit ebenfalls auf einem I-1 KO Hintergrund und im Folgenden Gegenstand der Experimente. Diese wurden fortlaufend als dTG I-1* und dTG I-1c bezeichnet. Doppelt-transgene Tiere, die Doxycyclin (0,2 mg/ml im Trinkwasser) bekamen, wurden als dTG I-1* +Dox und dTG I-1c +Dox bezeichnet. Die $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ Tiere wurden als Kontrollen geführt.

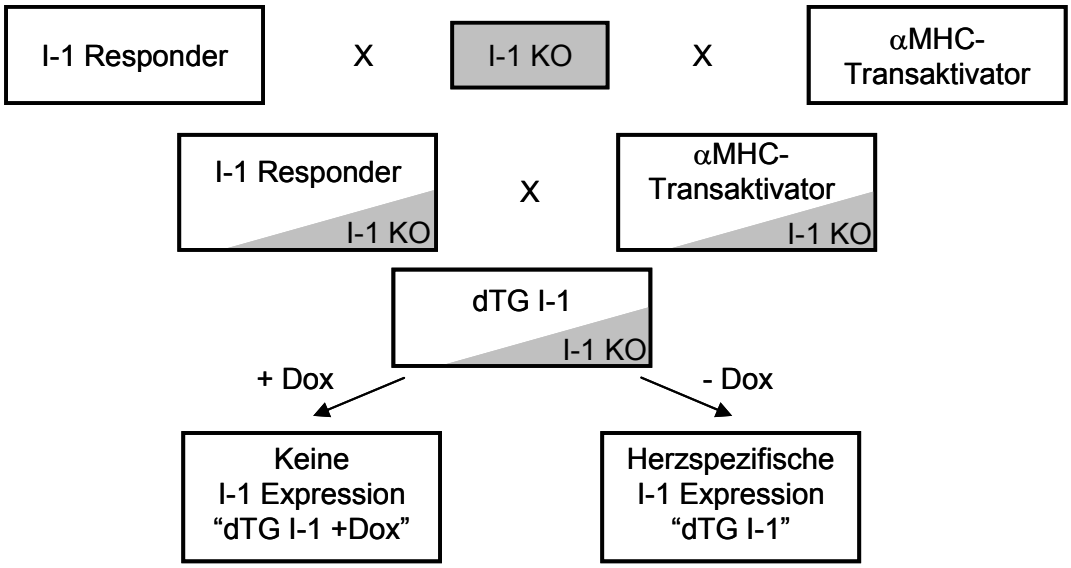


Abb. 3.9 Strategie zur Generierung der Doxycyclin-regulierbaren doppelt-transgenen Mauslinien. Durch Kreuzung der Transaktivator- und der Responderlinien mit I-1 KO Mäusen wurden diese Linien zunächst auf einem I-1 KO Hintergrund etabliert. Aus der nachfolgenden Kreuzung gingen die entsprechenden doppelt-transgenen Linien hervor (dTG I-1*/I-1c). Nur in den dTGs sollte der jeweilige I-1 in Abwesenheit von Doxycyclin herzspezifisch exprimiert werden.

3.4 Charakterisierung des Tet-Off Systems *in vivo*

Für die Verwendung des Tet-Off Systems ist die Charakterisierung der Funktionalität entscheidend. Folgende Punkte standen dabei im Vordergrund: (i) Analyse der tTA-abhängigen und herzspezifischen Induktion der Transgenexpression, (ii) Regulierbarkeit der Transgenexpression durch Doxycyclin, (iii) Quantifizierung der I-1*/I-1c Expression gegenüber endogenem I-1 und (iv) Analyse der Expressionskinetik in Abhängigkeit von Doxycyclin.

3.4.1 Herzspezifische Inhibitor-1 Expression auf mRNA-Ebene

Zum Nachweis der herzspezifischen I-1* bzw. I-1c Expression durch Verwendung des αMHC-Promoters wurden von je einer doppelt-transgenen Maus folgende Organe entnommen: Herz, Skelettmuskel, Niere, Lunge, Leber, Milz, Darm und Gehirn. Aus diesen Organen wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und mittels nicht-quantitativer RT-PCR amplifiziert. Das 119 bp große I-1*/I-1c Fragment konnte ausschließlich im Herzen amplifiziert werden (Abb. 3.10). Diese Daten bestätigten eine tTA-induzierte und herzspezifische Transgenexpression auf mRNA-Ebene. Folglich scheint der P_{tight}-Promoter in Abwesenheit von tTA

keine transkriptionelle Restaktivität aufzuweisen. Lediglich im Gehirn der I-1* Mutante konnte ein schwaches Signal detektiert werden. Vermutlich handelte es sich hierbei um das hirnspezifische I-1 Strukturhomologon DARPP-32 (Homologie der Struktur im Bereich der Primersequenzen: 70% für den *sense*-Primer und 50% für den *anti-sense*-Primer).

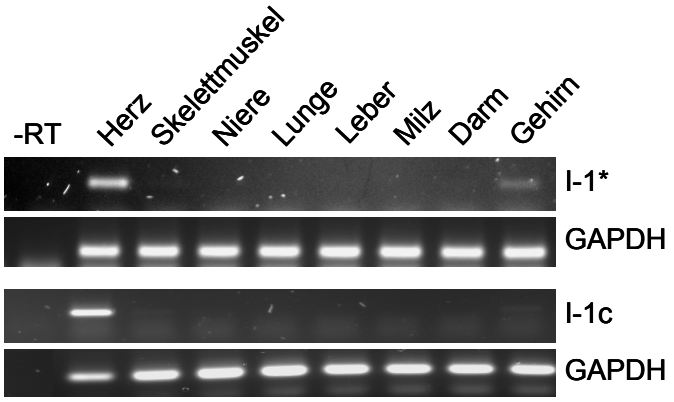


Abb. 3.10 Qualitative Analyse der I-1*/I-1c mRNA-Menge in verschiedenen Organen. Das I-1*/I-1c Transgen wurde auf mRNA-Ebene ausschließlich im Herzen amplifiziert. Dargestellt sind die Amplifikationsprodukte der Gene I-1*/I-1c und GAPDH nach jeweils 32 PCR-Zyklen aus verschiedenen Organen. Als Negativkontrolle wurde je Gen eine negativ-RT-Kontrolle mitgeführt.

Um die Menge der I-1* bzw. I-1c Transkripte mit der Anzahl der endogenen I-1 Transkripte zu vergleichen, wurde die mRNA-Konzentration von dTG I-1* bzw. dTG I-1c Tieren im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen (WT) mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dabei ergab die Analyse eine 8-fach bzw. 24-fach erhöhte Transkriptanzahl für I-1* bzw. I-1c (Abb. 3.11). Somit zeigten beide Mutanten eine klare Überexpression.

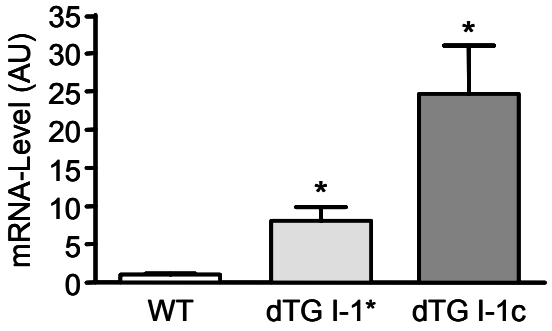


Abb. 3.11 Analyse der Transgen mRNA-Konzentration im Vergleich zum endogen exprimierten I-1. Die quantitative RT-PCR Analyse ergab eine 8-fache bzw. 24-fache Überexpression von I-1* bzw. I-1c im Vergleich zum endogenen I-1 (WT). Die Normalisierung erfolgte auf GAPDH. *p<0,05 vs. WT; n=5-7 pro Gruppe.

3.4.2 Analyse der Doxycyclin-abhängigen Inhibitor-1 Expressionskinetik

Die zeitliche Doxycyclin-abhängige Regulation der Transgenexpression sollte mittels Expressionskinetikstudien aufgeklärt werden. Diese Untersuchungen

wurden zuerst für die I-1* Linie durchgeführt und anschließend für die I-1c Mutante.

Über verschiedene Zeiträume (2, 4 und 8 Tage) wurden dTG I-1* Mäuse mit Doxycyclin behandelt (0,2 mg/ml). Zu den genannten Zeitpunkten wurde der kardiale I-1* mRNA-Gehalt im Vergleich zu einfach-transgenen I-1* (I-1*) und dTG I-1* Geschwistertieren bestimmt. Die Ergebnisse bestätigten, dass (i) der P_{tight}-Promoter in der I-1* Responderlinie keine basale Restaktivität zeigte und (ii) die I-1* mRNA-Transkripte bereits nach zwei Tagen Doxycyclin gegen Null gingen (Abb. 3.12 A).

Umgekehrt wurden dTG I-1* Tiere, die pränatal über die Plazenta und anschließend über das Trinkwasser kontinuierlich Doxycyclin erhielten, über 2, 4 und 6 Wochen „auf Wasser“ gesetzt. Die Analyse der I-1* mRNA-Menge ergab zunächst einmal, dass eine kontinuierliche Doxycyclinapplikation ab dem Zeitpunkt der Embryogenese effektiv die I-1* Expression hemmte (siehe Abb. 3.12 B, dTG I-1* +Dox Tiere). Allerdings konnte ein Doxycyclinentzug von bis zu sechs Wochen die Transgenexpression nicht induzieren (siehe Anhang, Abb. 11.2 A).

Im Folgenden wurde den Zuchtpärchen eine vierfach niedrigere Doxycyclinkonzentration verabreicht (statt 0,2 mg/ml nun 50 ng/ml im Trinkwasser; nach persönlicher Kommunikation mit Frau Prof. Eva-Maria Mandelkow, Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie, Hamburg), die ausreichend war, um die Transgenexpression zu inhibieren (Daten nicht gezeigt). Unter diesen Bedingungen war es tatsächlich möglich, die I-1* Expression nach einem vierwöchigen Doxycyclinentzug erfolgreich zu induzieren (Abb. 3.12 B).

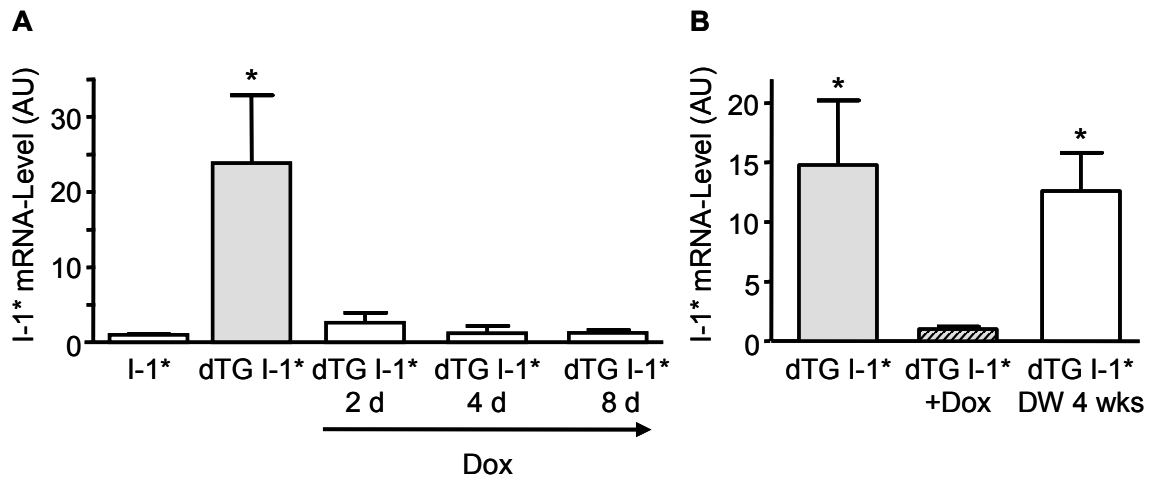


Abb. 3.12 Quantitative mRNA-Analyse der zeitabhängigen I-1* Expressionskinetik. (A) Bereits nach zwei Tagen Doxycyclin (0,2 mg/ml; dTG I-1* 2 d) waren keine I-1* mRNA-Transkripte in den dTG I-1* Tieren nachweisbar (n=2-4 pro Gruppe; *p<0,05). (B) Eine Induktion der Transgenexpression konnte nach vierwöchigem Doxycyclinentzug, im Zusammenhang mit einer zuvor geringeren Doxycyclinkonzentration (50 ng/ml), erreicht werden (dTG I-1* DW 4 wks, DW: Dox/Wasser; n=3-4 pro Gruppe; *p<0,05 vs. dTG I-1* +Dox). Alle Werte wurden auf GAPDH normalisiert.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei selber Vorgehensweise für die I-1c Mutante erzielt werden, allerdings mit folgenden Abweichungen.

Die einfach-transgenen I-1c Kontrollen zeigten bereits in der Abwesenheit von tTA eine I-1c mRNA-Expression (Abb. 3.13 A). Dies wurde auch in den Doxycyclin-behandelten doppelt-transgenen Tieren, sowohl nach kontinuierlicher Doxycyclingabe (Abb. 3.13 B) als auch nach acht Tagen Doxycyclinapplikation (Abb. 3.13 A), beobachtet. Folglich schien der P_{tight}-Promoter der I-1c Linie konstitutiv aktiv zu sein. Des Weiteren konnte, trotz niedrigerer Doxycyclinkonzentration, die I-1c Expression innerhalb von vier Monaten nicht induziert werden (siehe Anhang, Abb. 11.2 B).

Um dennoch eine Reinduktion zu ermöglichen, wurde den Tieren erst in einem Alter von drei Wochen für zehn Tage Doxycyclin verabreicht. Anschließend wurden die Tiere für mehrere Wochen „auf Wasser“ gesetzt. Tatsächlich war unter diesen Bedingungen eine erneute I-1c Induktion nach sieben Wochen Doxycyclinentzug möglich (Abb. 3.13 B).

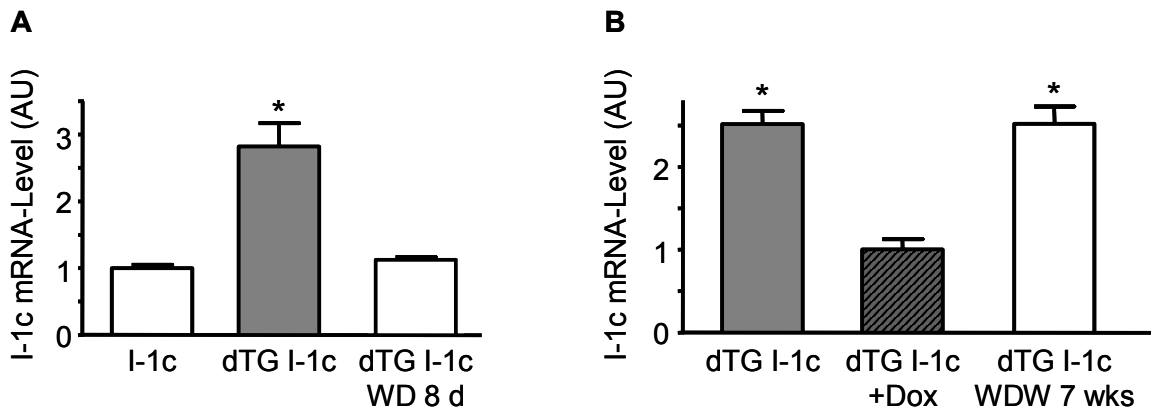


Abb. 3.13 Quantitative Analyse der I-1c Expressionskinetik in Abhängigkeit von Doxycyclin. (A) Acht Tage Doxycyclin (0,2 mg/ml) reduzierte die I-1c mRNA-Konzentration auf das Niveau der I-1c Kontrollgruppe (dTG I-1c WD 8 d; n=6-11; *p<0,05). (B) Eine erneute Induktion der I-1c Expression war nach sieben Wochen Doxycyclinentzug und vorangegangener zehntägiger Doxycyclinapplikation möglich (dTG I-1c WDW 7 wks; n=5-7, *p<0,05 vs. dTG I-1c +Dox). GAPDH diente als interner Standard. W: Wasser und D: Doxycyclin.

Somit war für beide Mutanten die Reversibilität des Tet-Off Systems gegeben. Für die Folgeuntersuchungen wurden die Tiere im *On-State* geboren und die Transgenexpression in Abhängigkeit der experimentellen Bedingungen durch Doxycyclin inhibiert.

3.4.3 Inhibitor-1 Expression auf Proteinebene

Erfahrungsgemäß ist es nicht möglich, das endogene I-1 Protein aus kardialen SDS-Standardhomogenaten zu detektieren, da es unterhalb der Nachweisgrenze liegt (El-Armouche et al. 2004). Auf Proteinebene wurden I-1* und I-1c aus I-1-angereicherten, gekochten Trichloressigsäure-Extrakten (TCA-Extrakten) nachgewiesen. Bei dieser Methode nutzt man die Hitze- und Säurestabilität von I-1 zur Proteinanreicherung. Mittels Western Blot konnten I-1* und I-1c ausschließlich in den tTA-induzierten Tieren detektiert werden, wohingegen in den beiden Kontrollen kein Nachweis möglich war. Diese Daten bestätigten die Befunde auf mRNA-Ebene, wobei eine Restaktivität des P_{tight}-Promoters der I-1c Linie hier nicht nachweisbar war. Als interne Kontrolle der Anreicherungseffizienz wurden jeweils 5 µg rekombinantes I-1*/I-1c Protein zu Beginn der TCA-Extraktion zugesetzt. Anhand der gleichen Signalintensitäten konnte eine vergleichbar effiziente TCA-Extraktion in den verschiedenen Gruppen angenommen werden (Abb. 3.14).

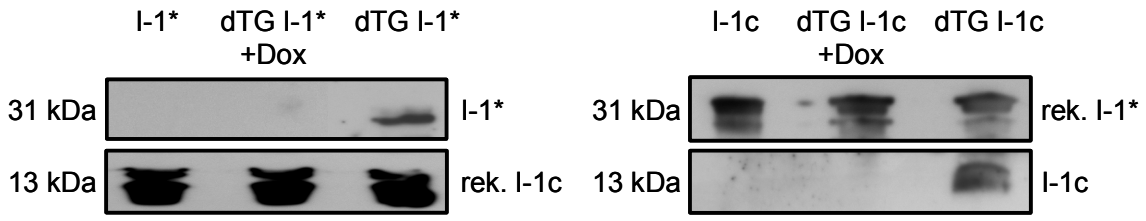


Abb. 3.14 Western Blot nach TCA-Extraktion. Die Western Blot Analyse der entsprechenden TCA-Extrakte (jeweils 40 µg) zeigte eine Transgenexpression in den dTG I-1* (Detektion mit dem polyklonalen anti-I-1 Antikörper) bzw. dTG I-1c Tieren (Detektion mit dem polyklonalen anti-c-myc Antikörper). Rekombinantes I-1* bzw. I-1c Protein diente als interne Kontrolle.

3.5 Kardiale Charakterisierung der beiden Inhibitor-1 Mutanten unter basalen Bedingungen

Zur kardialen Grundcharakterisierung wurden (i) gravimetrische Untersuchungen durchgeführt, (ii) molekulare Hypertrophiemarker bestimmt und (iii) potentielle kompensatorische Veränderungen auf molekularer Ebene analysiert. Als Kontrollen wurden $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ Tiere verwendet. Für zentrale Experimente wurden $tTA^{I\text{-}1(+/+)}$ Tiere (endogene I-1 Expression) als weitere Kontrollgruppe mit einbezogen. Die Experimente erfolgten jeweils an gleichaltrigen und –geschlechtlichen Geschwistertieren.

Die gravimetrischen Untersuchungen von Herz, Lunge und Leber vier Monate alter dTG I-1* bzw. sechs Monate alter dTG I-1c Mäuse wiesen keinerlei Unterschiede gegenüber den $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ Kontrollen auf (Abb. 3.15). Die I-1*/I-1c Mutanten zeigten weder Verhaltensauffälligkeiten noch eine erhöhte Sterblichkeit.

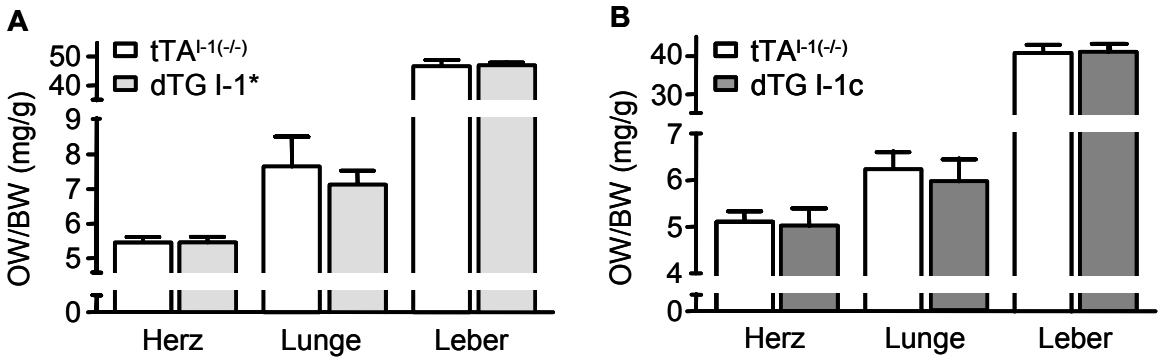


Abb. 3.15 Relative Organgewichte. Grafische Darstellung des relativen Herz-, Lungen- und Lebergewichts von dTG I-1* bzw. dTG I-1c im Vergleich zu $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$. Die Organgewichte (OW) wurden in Relation zum Körpergewicht (BW) dargestellt. (A) Daten der dTG I-1* (n=7 pro Gruppe) bzw. (B) I-1c Linie (n=8 pro Gruppe).

Auf molekularer Ebene wurde die Reexpression fetaler mRNA für ANP (atriales natriuretisches Peptid) und für das Strukturprotein β-MHC als etablierte Hypertrophiemarker untersucht. Beide Mutanten zeigten keinen Unterschied in der ANP mRNA-Menge gegenüber den beiden Kontrollgruppen (Abb. 3.16). Auch die Anzahl der β-MHC mRNA-Transkripte war nicht unterschiedlich (I-1* Linie: $tTA^{I-1(-/-)}$: 1,0±0,1 vs. dTG I-1*: 1,0±0,2; n=5 pro Gruppe bzw. I-1c Linie: $tTA^{I-1(-/-)}$: 1,0±0,2 vs. dTG I-1c: 1,2±0,2; n=6 pro Gruppe). Somit führte die I-1* bzw. I-1c Expression im Alter von fünf Monaten sowohl auf Organebene als auch auf molekularer Ebene zu keinen Anzeichen einer pathologischen Herzhypertrophie.

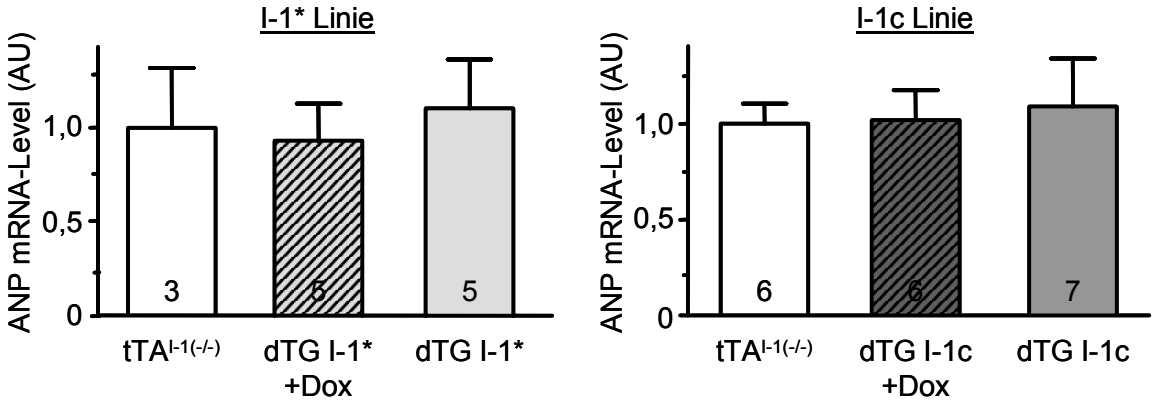


Abb. 3.16 Analyse der mRNA-Konzentration von ANP. Für beide Linien zeigte sich kein Unterschied in der ANP mRNA-Menge gegenüber den Kontrollen ($tTA^{I-1(-/-)}$ und dTG I-1*/I-1c +Dox). Die Werte wurden auf GAPDH normalisiert.

Wie in der Literatur beschrieben, kann die Überexpression einer regulatorischen Untereinheit der Protein-Phosphatase 1 (PP1) durch Stabilisierung zu einer erhöhten PP1 Proteinmenge führen (Kirchhefer et al. 2005, El-Armouche et al. 2008). Daher wurde mittels Western Blot die katalytische Untereinheit der PP1 (PP1c) analysiert. Wie in Abbildung 3.17 zu sehen, war die Transgenexpression mit keiner kompensatorisch veränderten PP1c Menge assoziiert.

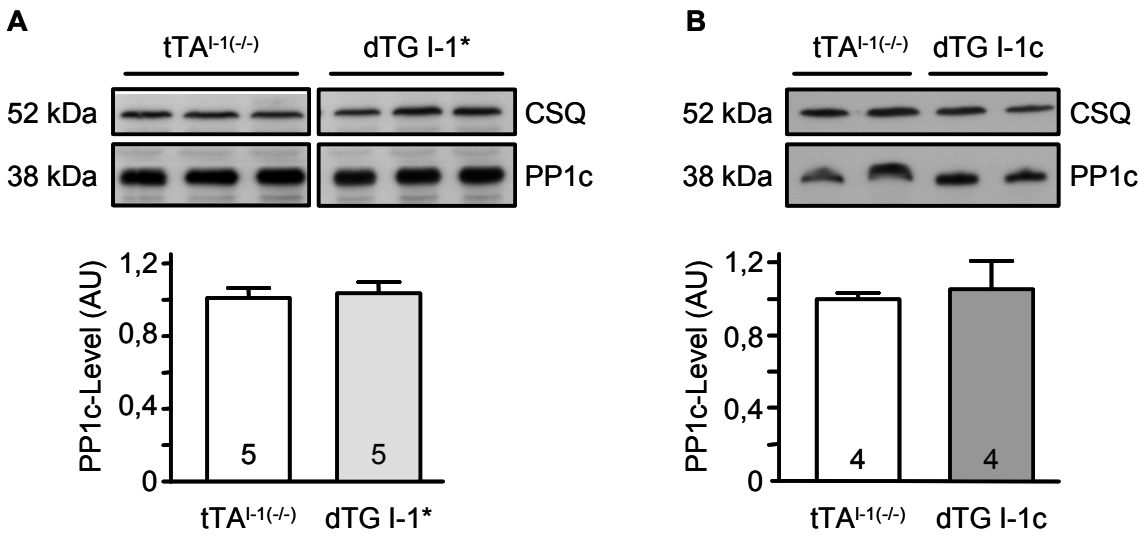


Abb. 3.17 Quantifizierung der katalytischen Untereinheit der PP1 (PP1c) mittels Western Blot. Die extrahierten Proteine aus (A) dTG I-1* bzw. (B) dTG I-1c Tieren wurden mittels Western Blot und PP1c-spezifischem Antikörper analysiert. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung auf Calsequestrin (CSQ).

Möglicherweise könnte I-1 als cAMP/PKA-abhängiges Element der β-adrenergen Signalskaskade in diesen transgenen Modellen zu einer kompensatorisch veränderten β-Adrenozeptordichte (β-AR-Dichte) führen. Um dies zu untersuchen, wurde (i) die β-Adrenozeptoren mRNA-Menge gemessen und (ii) ein Radioliganden-Bindungsassay an myokardialen Membranfraktionen durchgeführt. Sowohl die mRNA-Konzentration (I-1* Linie: tTA$^{I-1(-/-)}$: 1,0±0,1 vs. dTG I-1*: 1,1±0,3; n=5 pro Gruppe; I-1c Linie: tTA$^{I-1(-/-)}$: 1,0±0,2 vs. dTG I-1c: 1,0±0,1; n=6 pro Gruppe) als auch die β-Adrenozeptordichte war im Vergleich zu tTA$^{I-1(-/-)}$ Kontrolltieren nicht verändert (Abb. 3.18).

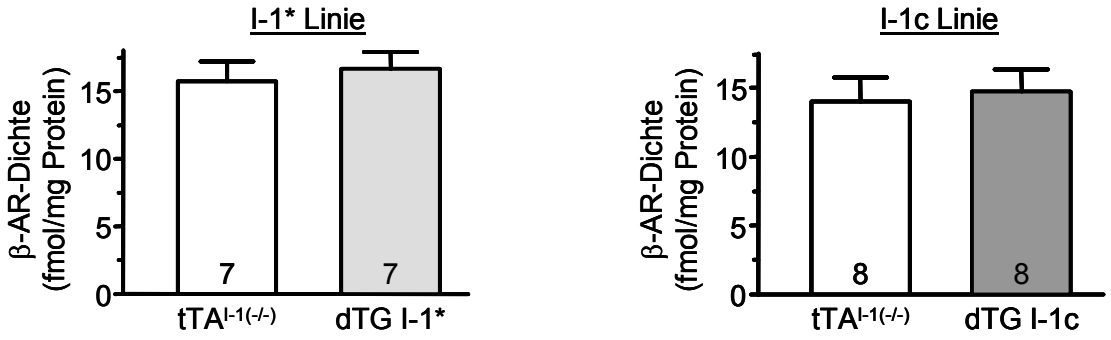


Abb. 3.18 Bestimmung der β-Adrenozeptordichte mit Hilfe eines Radioliganden-Bindungsassays. Jeweils 100 µg Membranprotein der beiden Mutanten wurden mit 3 nM des Radioliganden [^{3}H]-CGP 12177 inkubiert. Gleichaltrige tTA$^{I-1(-/-)}$ Tiere dienten als Kontrollen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10 µM Nadolol bestimmt.

3.6 Funktionelle Charakterisierung der beiden Inhibitor-1 Mutanten unter basalen Bedingungen

Welche Konsequenzen hat die Überexpression der beiden I-1 Mutanten für die Funktion des Herzens bzw. fungiert I-1*/I-1c tatsächlich auch *in vivo* als positiv inotropes und lusitropes Element der β-adrenergen Signalkaskade? Hierzu wurde die Herzfunktion der jeweiligen doppelt-transgenen Tiere einerseits nicht-invasiv mittels Echokardiographie und andererseits mittels invasiver linksventrikulärer Katheterisierung untersucht. Die Tiere waren gleichaltrig und –geschlechtlich. Sowohl die Untersuchungen als auch die Auswertungen erfolgten verblindet. Die Daten der beiden Mutanten werden nacheinander, beginnend mit der I-1* Linie, dargestellt.

3.6.1 Effekte von Inhibitor-1* auf die Herzfunktion

Als Maß für die Kontraktilität des Myokards wurde der Prozentsatz der linksventrikulären Flächenverkürzungsfraktion (FAS) bestimmt. Überraschenderweise zeigte sich hierbei kein Unterschied, weder unter basalen Bedingungen noch unter akuter maximaler Dobutaminstimulation (10 mg/kg; Abb. 3.19 A). Entscheidend für die Bewertung der Kontraktilität ist eine vergleichbare Herzfrequenz. Wie aus Abbildung 3.19 B ersichtlich, war die Herzfrequenz unter den jeweiligen Bedingungen für beide Gruppen gleich. Die Analyse weiterer Parameter ergab keine Unterschiede und deutete auf eine normale, vergleichbare Herzmorphologie hin (siehe Anhang, Tab. 11.12).

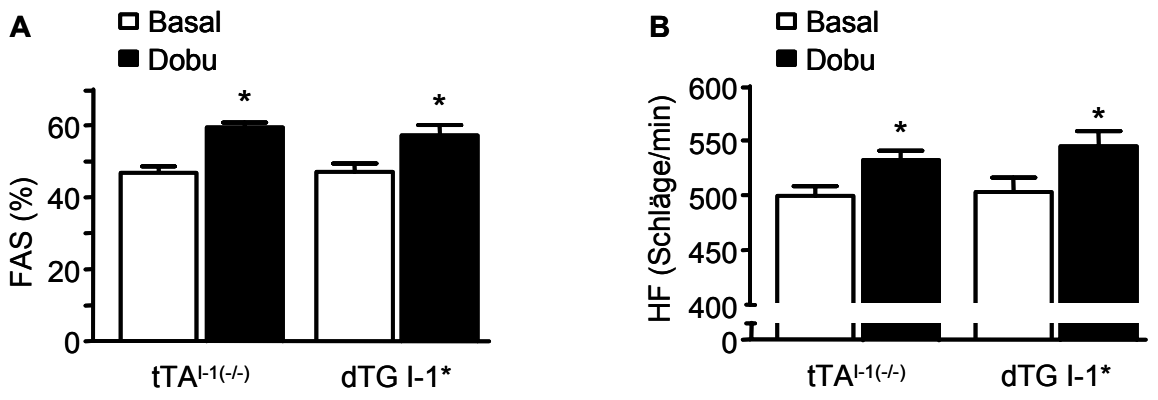


Abb. 3.19 Erfassung der echokardiographisch gemessenen Kontraktilität. (A) Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion (FAS) und (B) Herzfrequenz (HF) unter basalen Bedingungen (Basal) und nach maximaler Dobutaminstimulation (Dobu; 10 mg/kg, i.p.) in dTG I-1* und $tTA^{I-1(-/-)}$ Tieren (n=12 pro Gruppe; Alter 10 Wochen). *p<0,05 vs. Basal.

Die *in vivo* Herzkatheteruntersuchung stellt eine im Vergleich zur Echokardiographie sensitivere Methode dar, um die Kontraktilität des Herzmuskels zu untersuchen (Pacher et al. 2008). Sie ermöglicht sowohl kontinuierliche Messungen des systolischen und diastolischen Drucks in der Aorta als auch der Herzfrequenz und der Druckveränderungen im linken Ventrikel. Aus der linksventrikulären Druckkurve kann die maximale Druckanstiegs- bzw. Druckabfallsgeschwindigkeit des linken Ventrikels als Maß für die Kontraktilität bzw. Relaxation berechnet werden. Es wurden dTG I-1* Transgene im Alter von 12 Wochen mittels Katheter unter einer leichten Isoflurannarkose (1,5 vol%) untersucht. Die Untersuchungen wurden verblindet, in Kollaboration mit Herrn Dr. Bernhard Unsöld (Abteilung Kardiologie und Pneumologie im Herzzentrum Göttingen), durchgeführt.

Als entscheidender Befund konnte in dTG I-1* (i) eine erhöhte maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}; Abb. 3.20 A) und (ii) eine verringerte Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation (Tau; Abb. 3.20 B) im Vergleich zu $tTA^{I-1(-/-)}$ gemessen werden. Die maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) war nicht verändert (siehe Anhang, Tab. 11.13), jedoch nach Standardisierung auf den linksventrikulären minimalen Druck (LVEDP; siehe Anhang Tab. 11.13) tendenziell erhöht (dP/dt_{min}/LVEDP in sec^{-1}: $tTA^{I-1(-/-)}$: -1931±405,6 vs. dTG I-1*: -3106±6347; n.s.). Interessanterweise zeigte sich für die I-1*-exprimierenden Tiere eine erniedrigte Vorlast (enddiastolischer

linksventrikulärer Druck; LVEDP) und eine erniedrigte Nachlast (effektive arterielle Elastizität, Ea). Diese und weitere Parameter sind tabellarisch im Anhang (Tab. 11.13) dargestellt. Zusammenfassend belegen diese Daten eine gesteigerte systolische und diastolische kardiale Funktion in den dTG I-1* Mäusen.

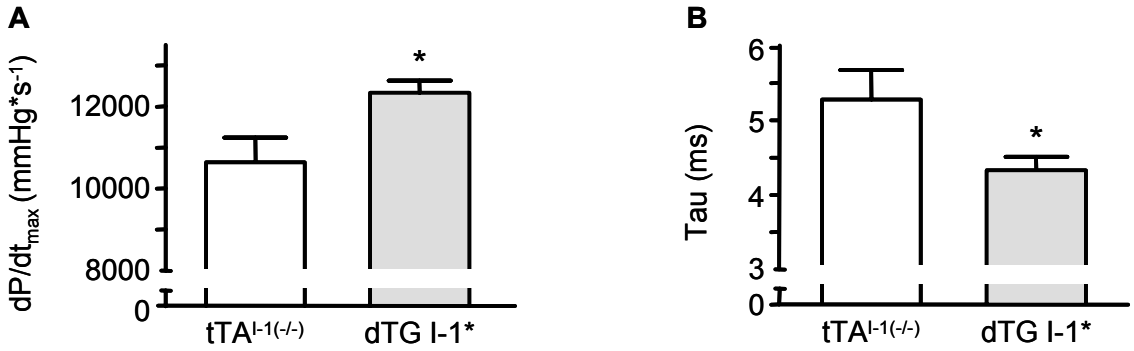


Abb. 3.20 Hämodynamische Parameter. Gezeigt sind die Ergebnisse der invasiven Hämodynamik in dTG I-1* und tTA$^{I-1(-/-)}$ Tieren. (A) Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt$_{max}$) und (B) Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation (Tau; n=6 pro Gruppe). *p<0,05 vs. tTA$^{I-1(-/-)}$.

3.6.2 Auswirkungen des trunkierten Inhibitor-1c auf die Kontraktiliät

Die echokardiographische Analyse der trunkierten I-1c Mutante zeigte einen hyperkontraktilen Phänotyp, charakterisiert durch eine erhöhte FAS (Abb. 3.21 A). Die Kontraktilität nach Dobutaminstimulation war für beide Gruppen gleich. Die Herzfrequenz unterschied sich unter basalen Bedingungen und nach maximaler Dobutaminstimulation nicht (Abb. 3.21 B). Die Analyse der morphologischen Parameter ergab eine vergleichbare Ventrikelgeometrie (siehe Anhang, Tab. 11.14).

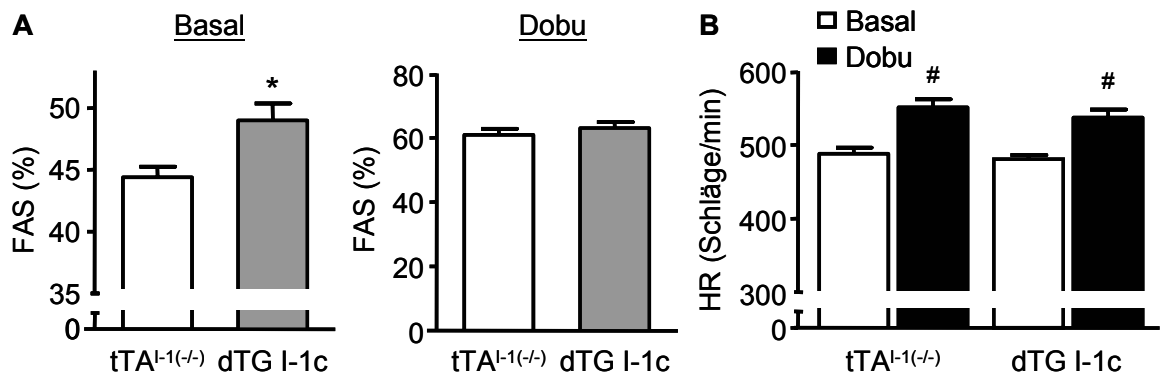


Abb. 3.21 Echokardiographische Darstellung des hyperkontraktilen Phänotyps der I-1c Mutante. (A) Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion (FAS) und (B) Herzfrequenz (HF) unter basalen Bedingungen (Basal) und nach β-adrenerger Stimulation (Dobu; 10 mg/kg; n=13 pro Gruppe; Alter 10 Wochen). *p<0,05 vs. $tTA^{I-1(-/-)}$; #p<0,05 vs. Basal.

Unterlag der hyperkontraktile Phänotyp einer Doxycyclin-abhängigen Regulation und war somit auf I-1c zurückzuführen? Um diese wichtige Frage zu beantworten, wurden dTG I-1c Tiere, nach vorheriger echokardiographischer Charakterisierung, für zehn Tage mit Doxycyclin behandelt und anschließend erneut echokardiographisch untersucht. Die Analyse der FAS ergab eine Abnahme um 12%. In Anlehnung an die Ergebnisse der Expressionskinetikstudien (siehe 3.4.2, Abb. 3.13) wurden dieselben Tiere wiederum für sieben Wochen „auf Wasser“ gesetzt und die Messungen wiederholt. Die dadurch induzierte I-1c Reexpression resultierte tatsächlich in einem Anstieg der FAS um 14% auf das ursprüngliche Niveau (Abb. 3.22 A). Somit war der hyperkontraktile Phänotyp *in vivo* Doxycyclin-abhängig reversibel (in vier von sechs Mäusen). Um unspezifische Doxycyclin-Effekte auszuschließen, wurden Wildtyp Kontrollmäuse (WT; endogene I-1 Expression) parallel und in gleicher Weise wie die dTG I-1c Tiere behandelt und echokardiographisch untersucht. Entgegen unserer Erwartungen zeigten die WT Tiere zum einen eine Doxycyclin-abhängige Reaktion und zum anderen ein gegensinniges Verhalten im Vergleich zu den dTG I-1c Mäusen (Abb. 3.22 B). Die stimulierende Wirkung von Doxycyclin auf die FAS erscheint zunächst paradox, spricht aber für einen echten Effekt der Doxycyclin-abhängigen Reversibilität des hyperkontraktilen Phänotyps der dTG I-1c Tiere. Wie viele andere Arzneimittel führt sicherlich auch Doxycyclin in höheren Dosen zu unspezifischen Nebenwirkungen, so dass dieser Befund nicht ungewöhnlich ist. So konnten Vinet

et al. (2008) eine stimulierende Wirkung von Doxycyclin auf das linksventrikuläre Remodeling im druckinduzierten Herzinsuffizienzmodell beobachten.

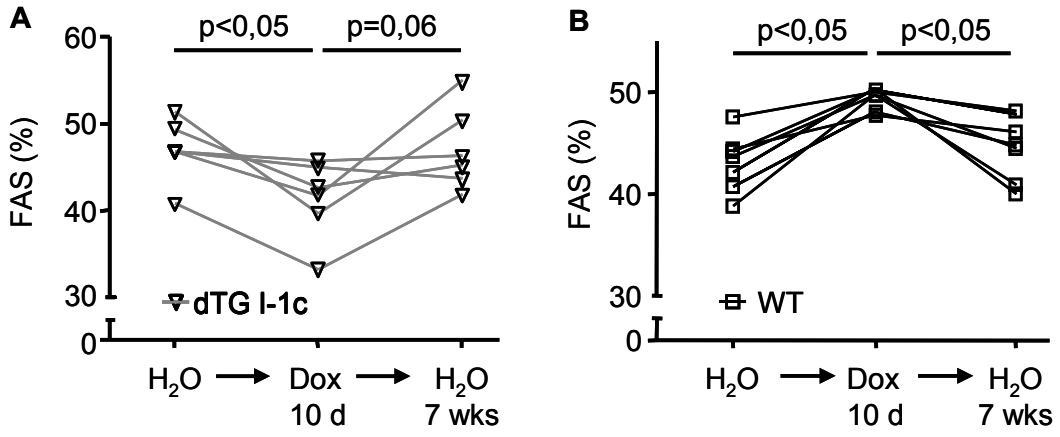


Abb. 3.22 Echokardiographische Analyse der linksventrikulären Flächenverkürzungsfraktion (FAS) in Abhängigkeit von Doxycyclin. Zehn Tage Doxycyclin (0,2 mg/ml) führten (A) zur Abnahme der FAS in den dTG I-1c Mutanten bzw. (B) zu einer Zunahme der FAS (14%) in den endogenen I-1-exprimierenden Wildtyp Mäusen (WT). (A-B) Nach sieben Wochen Doxycyclinentzug wurde das jeweilige ursprüngliche Niveau der FAS wieder erreicht (n=6 pro Gruppe).

Um die funktionelle Rolle von I-1c im Vergleich zum endogenen I-1 hinsichtlich des zuvor beschriebenen hyperkontraktilen Phänotyps zu untersuchen, wurden dTG I-1c Mäuse im Vergleich zu $tTA^{I\text{-}1(+/+)}$ Kontrollen echokardiographisch analysiert. Gegenüber dem endogenen I-1 führte die I-1c Expression zu keiner gesteigerten Kontraktilität. So zeigte die FAS weder unter basalen Bedingungen noch nach β-adrenerger Stimulation (Abb. 3.23 A) einen Unterschied. Auch die Herzfrequenz war unter beiden Bedingungen gleich (Abb. 3.23 B). Weitere Parameter sind im Anhang (Tab. 11.15) aufgelistet.

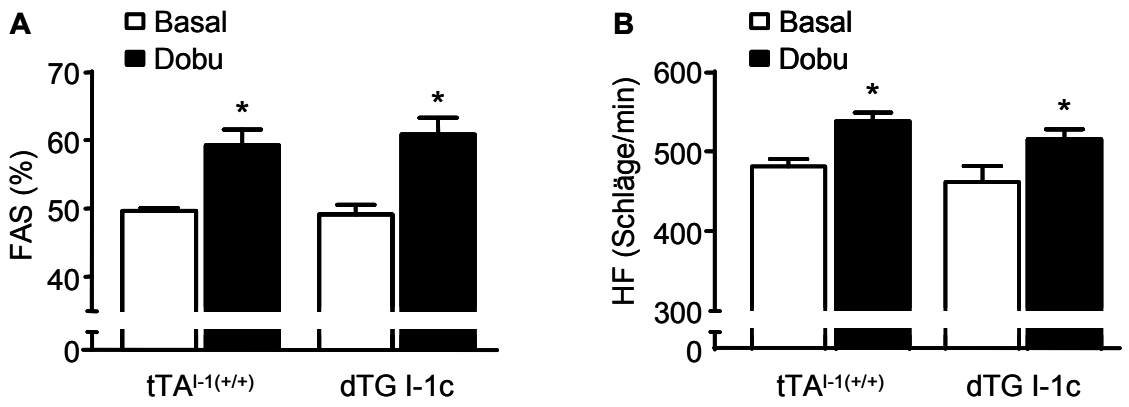


Abb. 3.23 Erfassung der echokardiographisch gemessenen Kontraktilität. (A) Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion (FAS) und (B) Herzfrequenz (HF) unter basalen Bedingungen (Basal) und nach maximaler Dobutaminstimulation (Dobu; 10 mg/kg) in dTG I-1c (n=11) und $tTA^{I\text{-}1(+/+)}$ Tieren (n=12; Alter 9 Wochen). *p<0,05 vs. Basal.

Um weitere Aufschlüsse über die Auswirkung der I-1c Expression im Vergleich zum endogen exprimierten I-1 zu erlangen, wurden dTG I-1c Tiere und $tTA^{I\text{-}1(+/+)}$ Kontrollen mittels Herzkatheters untersucht. Dabei zeigten die dTG I-1c Mäuse tatsächlich eine erhöhte maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit sowie eine verringerte Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation (Abb. 3.24 A). Da beide Parameter die diastolische Funktion charakterisieren, verbessert I-1c im Vergleich zum endogenen I-1 ($tTA^{I\text{-}1(+/+)}$) die diastolische Funktion. Ein zusätzlicher Einfluss auf die systolische Funktion, wie im Vergleich zu $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$, war nicht nachweisbar (Abb. 3.24 B). Die Abbildung 3.24 C stellt die Kinetik der linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit bzw. -abfallsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Zeit dar und veranschaulicht repräsentativ den kardialen Phänotyp einer beschleunigten Relaxation bei gleicher Kontraktilität. Die Analyse weiterer Parameter führte zu vergleichbaren Werten (siehe Anhang, Tab. 11.16).

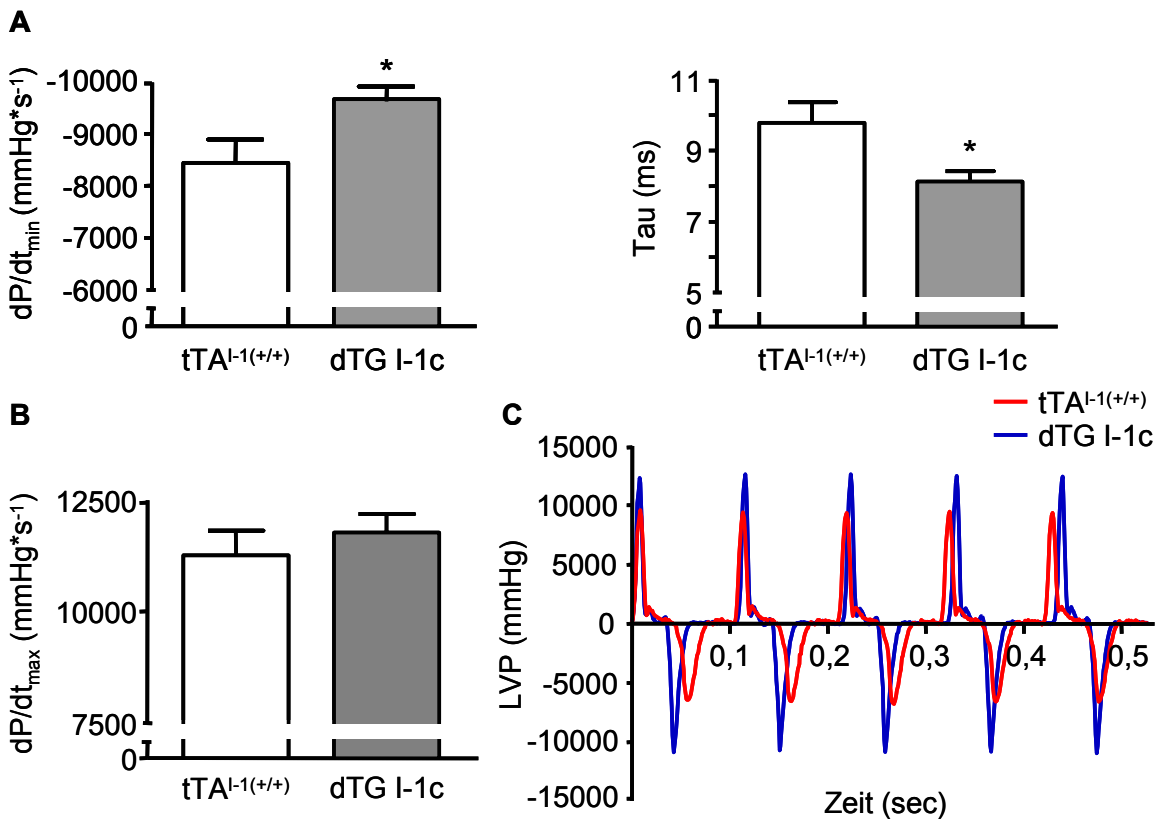


Abb. 3.24 Hämodynamische Parameter der I-1c Mutante. Kathetermessungen von dTG I-1c und tTA$^{I-1(+/+)}$ Mäusen. (A) Mittlere maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt$_{min}$) bzw. Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation (Tau). (B) Mittlere maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt$_{max}$). (C) Kinetik der linksventrikulären Druckanstiegs- bzw. Druckabfallsgeschwindigkeit (Ordinate) in Abhängigkeit der Zeit (Abszisse; n=7 pro Gruppe; Alter 13 Wochen). *p<0,05 vs. tTA$^{I-1(+/+)}$.

Zusammenfassend konnten in diesem Abschnitt folgende Ergebnisse erzielt werden:

- I-1*/I-1c dTGs zeigten im Alter von vier bis sechs Monaten keine erkennbare kardiale Pathologie und waren nicht mit einer kompensatorisch veränderten PP1c Proteinmenge oder β-Adrenozeptordichte assoziiert.
- I-1* dTGs zeigten in der invasiven Herzfunktionsanalyse eine verbesserte systolische und diastolische Herzfunktion gegenüber tTA$^{I-1(-/-)}$.
- I-1c dTGs zeigten eine gesteigerte Kontraktilität im Vergleich zu tTA$^{I-1(-/-)}$ sowie eine verbesserte diastolische Funktion in der invasiven Herzfunktionsanalyse gegenüber tTA$^{I-1(+/+)}$, bei gleichzeitig unveränderter Herzmorphologie.

3.7 Untersuchung der Arrhythmieneigung nach Provokation mittels akutem β-adrenergen Stress

Eine Überaktivität von Komponenten der β-adrenergen Signalkaskade war regelhaft mit einem gesteigerten Arrhythmierisiko assoziiert (Übersicht in El-Armouche und Eschenhagen 2008). Der hyperkontraktile Phänotyp könnte durch die andauernde I-1*-/I-1c-induzierte Inotropie mit einer erhöhten Arrhythmieneigung verbunden sein. Dazu wurde in Kollaboration mit Frau Dr. Larissa Fabritz und Herrn Prof. Paulus Kirchhof (Medizinische Klinik C, Universitätsklinikum Münster) mittels *in vivo* EKG-Telemetriemessungen ein Arrhythmie-Belastungsprotokoll an lebenden, wachen und sich frei bewegenden Mäusen durchgeführt. Die Versuche wurden verblindet und an gleichaltrigen und –geschlechtlichen Tieren durchgeführt.

I-1*- bzw. I-1c-exprimierende Tiere wurden im Vergleich zu $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ und $tTA^{I\text{-}1(+/+)}$ Kontrolltieren jeweils parallel belastet. Eine Stunde vor Belastungsbeginn wurde von jedem Tier ein Ruhe-EKG aufgezeichnet. Die extreme Stresssituation wurde durch Injektion von Isoprenalin (2 mg/kg; i.p.), anschließenden mentalen Stress mittels Fön (intermittierend 15 sec/min über einen Zeitraum von 15 min) und wiederholter Isoprenalininjektion (2 mg/kg; i.p.) erzeugt. Während einer einstündigen Nachbeobachtungszeit wurde das Belastungs-EKG weiter aufgezeichnet.

Die Analyse der EKGs (Abb. 3.25 B) ergab folgendes Bild: Interessanterweise konnte in den $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ Kontrolltieren trotz der hohen Isoprenalindosen keine einzige ventrikuläre Tachykardie (VT) induziert werden. Jedoch entwickelten ~55% der $tTA^{I\text{-}1(+/+)}$ (14 Ereignisse), ~40% der dTG I-1c (18 Ereignisse) und ~33% der dTG I-1* (4 Ereignisse) Tiere VTs. Per Definition wurde eine Aufeinanderfolge von mindestens fünf ventrikulären abnormen Depolarisationen als arrhythmisches Ereignis gewertet. Aus dem EKG war dies durch fehlende P-Wellen und einer veränderten QRS-Morphologie ersichtlich (Abb. 3.25 A). Diese Befunde zeigten, dass eine I-1 Expression, unabhängig von der exprimierten I-1 Form, unter akutem Stress mit einem gegenüber $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ Mäusen erhöhten Arrhythmierisiko assoziiert war. Anzumerken bleibt, dass eine $tTA^{I\text{-}1(+/+)}$ sowie eine dTG I-1c Maus während

der einstündigen Nachbeobachtungszeit nachweislich unter Arrhythmien verstarben (siehe hierzu auch Diskussionspunkte: 4.3 Arrhythmien und 4.4).

Um eine potentielle Reversibilität der VTs zu untersuchen, wurde die Transgenexpression beider Mutanten durch eine 14-tägige Doxycyclinapplikation inhibiert und dieselben Tiere erneut belastet. Hierbei ergab sich folgendes Bild: In keiner Maus der dTG I-1* und dTG I-1c Linie konnten VTs induziert werden. Jedoch wurden unerwarteterweise in zwei von zehn Mäusen der $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ Kontrollen (11 Ereignisse) und in einer von acht $tTA^{I\text{-}1(+/+)}$ Mäusen (11 Ereignisse) VTs beobachtet (siehe hierzu Diskussionspunkt 4.3, Arrhythmien).

Erfahrungen mit dem Arrhythmie-Provokationsmodell in normalen Wildtyp Mäusen zeigten, dass diese ähnlich reagierten wie die $tTA^{I\text{-}1(+/+)}$ und dTG I-1* bzw. dTG I-1c Mäuse (Knollmann et al. 2003, Kirchhof et al. 2007). Dies spricht dafür, dass der Schutz in den $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ Kontrollen der ungewöhnliche Befund war und nicht die Auslösung von Arrhythmien in den anderen Gruppen.

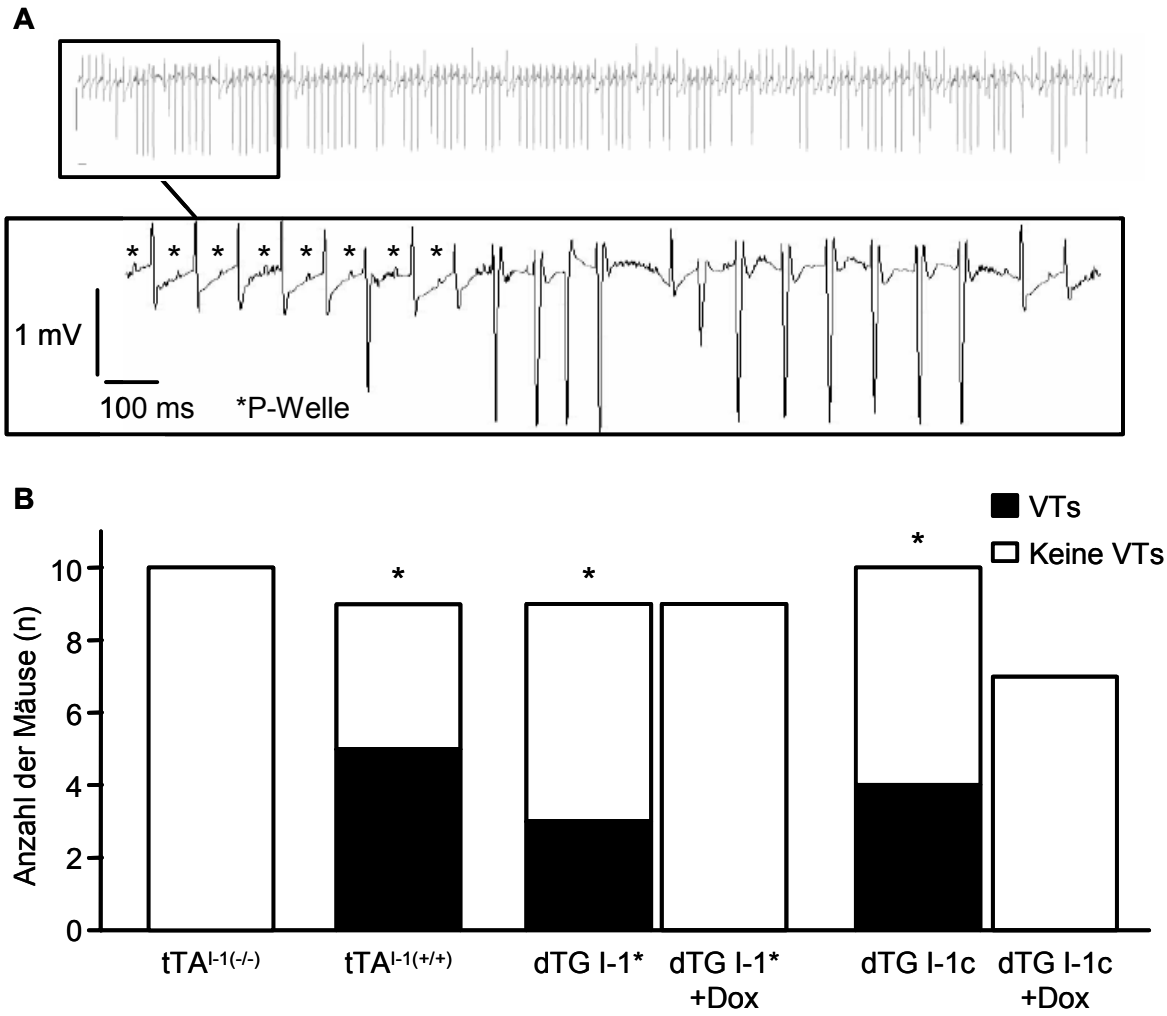


Abb. 3.25 Telemetrisch ermittelte ventrikuläre Tachykardien. (A) Repräsentatives telemetrisches EKG einer dTG I-1c Maus mit ventrikulären Tachykardien (VTs). *Kennzeichnet die P-Welle. (B) Vergleich der Isoprenalin-/Stress-induzierten VTs zwischen dTG I-1*/I-1c Tieren und den $tTA^{I-1(-/-)}$ bzw. $tTA^{I-1(+/+)}$ Kontrollen im Alter von 15 Wochen. Das Auftreten von VTs konnte durch eine Doxycyclin-abhängige Inhibition der I-1*/I-1c Expression vermieden werden. Dargestellt wird das Verhältnis zwischen dem Auftreten von VTs (schwarzer Balken) gegenüber Tieren ohne VTs (weißer Balken) in den vier Versuchsgruppen. *$p<0,05$ vs. $tTA^{I-1(-/-)}$, Fisher's Exact Test und Chi Quadrat Test.

3.8 Konsequenzen der Inhibitor-1 Expression auf molekularer Ebene

3.8.1 Phosphorylierung von zentralen Elementen in der kardialen Hypertrophie

Führt eine Expression von I-1* bzw. I-1c, als potente PP1 Inhibitoren, zu einer veränderten Phosphorylierung von Komponenten zentraler kardialer Signaltransduktionswege? Um dieser Frage nachzugehen, wurden mittels Western Blot folgende Phosphoproteine untersucht: (i) Akt (Proteinkinase B,

involviert in den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg) und (ii) ERK 1/2 (*extracellularly responsive kinases*; p42/44MAPK*)* und $p90^{RSK}$ (90 kDa Ribosomale S6 Kinase) als Elemente des Ras/MAPK-Signalweges. Die Quantifizierung ergab keine Unterschiede im Phosphorylierungsgrad (Abb. 3.26). Somit war ein Einfluss der Transgenexpression auf die genannten Phosphoproteine unwahrscheinlich.

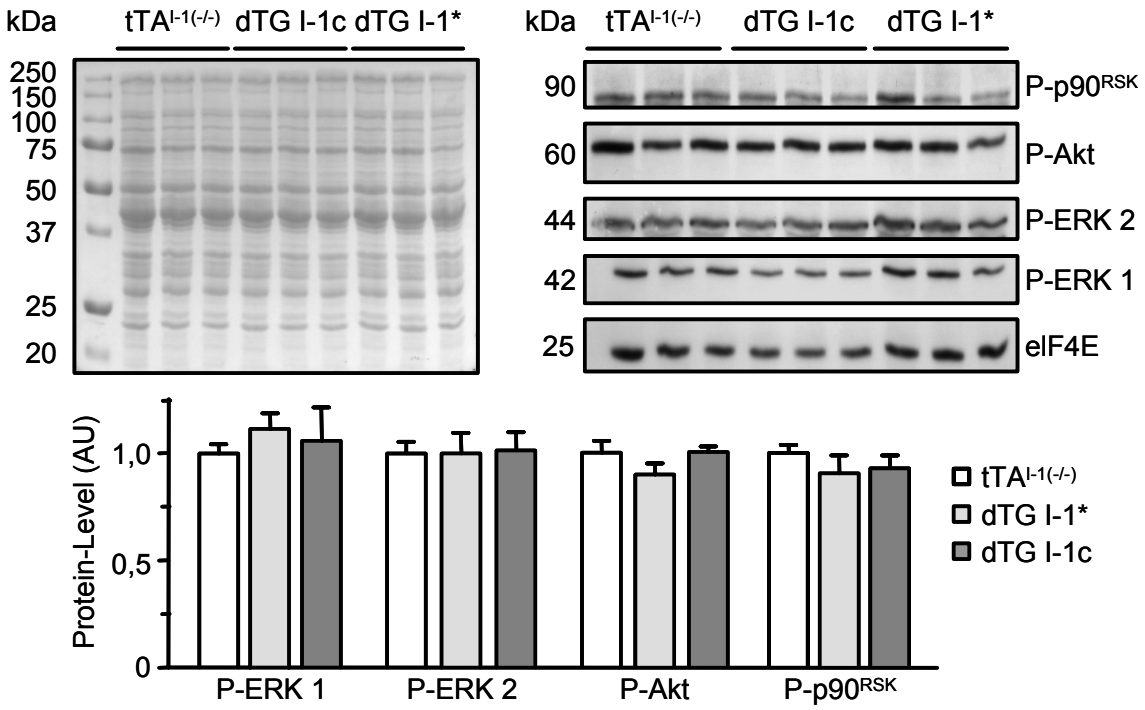


Abb. 3.26 Quantifizierung der Phosphorylierung von Substraten der Ras/MAPK- und PI3K/Akt-Signalwege in I-1*-/I-1c-exprimierenden Tieren mittels Western Blot. Zur Detektion wurde ein Mix aus verschiedenen polyklonalen Antikörpern verwendet (PathScan®), der Phospho-$p90^{RSK}$, Phospho-ERK 1/2, Phospho-Akt und eIF4E detektierte. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung auf die Ponceau-Färbung (links dargestellt). Es wurden pro Probe 30 µg Gesamtprotein geladen (n=6 pro Gruppe; Alter 16 Wochen). eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E)* diente als Ladekontrolle.

3.8.2 Expression und Phosphorylierung Calcium-regulierender Proteine

Die physiologischen Funktionen der PP1 werden nicht nur durch I-1 und I-2 kontrolliert, sondern großteils über ihre regulatorischen Untereinheiten (Oliver und Shenolikar 1998). Dabei stellt jedes PP1 Substrat über Hemmung der PP1 ein potentielles, nicht aber notwendiges I-1 Substrat dar. Die wichtigsten Ca^{2+}-regulierenden Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und der kontraktilen Filamente wurden mittels Western Blot untersucht.

Die I-1* bzw. I-1c Expression führte zu keinen Veränderungen in der Proteinkonzentration (i) der SR-Proteine Phospholamban (PLB), Ryanodin-Rezeptor (RyR2; Abb. 3.28), sarkoplasmatische Ca^{2+}-ATPase (SERCA2a), Calsequestrin (CSQ) und Junctin (JCN; Abb. 3.27), (ii) des Na^{+}/Ca^{2+}-Austauschers (NCX; Abb. 3.27) und (iii) der Myofilamentproteine Myosin-bindendes Protein C (C-Prot.), inhibitorische Untereinheit des Troponins (TnI) und ventrikuläre regulatorische Myosin Leichtkette (MLC2v; Abb. 3.29). Auch ein Einfluss von I-1*/I-1c auf die Phosphorylierung der Myofilamentproteine konnte nicht detektiert werden (Abb. 3.29).

Interessanterweise beschränkte sich der Einfluss von I-1* und I-1c auf zwei zentrale Kandidaten (RyR2 und PLB), die einerseits eine große Rolle in der Entstehung von Arrhythmien spielen und andererseits maßgeblich an der Regulation der Kontraktilität beteiligt sind. Die Ergebnisse zeigten eine um 40% erhöhte PLB Phosphorylierung an der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle Serin 16, bei gleichzeitig unveränderter Phosphorylierung an Threonin 17 (CaMKII-Stelle; Abb. 3.28 A). Für RyR2 konnte ebenfalls eine um 40% gesteigerte Phosphorylierung an der CaMKII-abhängigen Phosphorylierungsstelle Serin 2815, bei unveränderter Phosphorylierung an Serin 2809 (PKA-abhängig), nachgewiesen werden (Abb. 3.28 B).

Die erhöhte PLB Phosphorylierung könnte eine Erklärung für den Phänotyp einer basal erhöhten Kontraktiliät und Relaxation darstellen. Zusätzlich könnte die RyR2 Hyperphosphorylierung zu einer gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit und folglich erhöhten diastolischen Ca^{2+}-Entladungen führen. Das wiederum könnte die erhöhte Arrhythmieneigung erklären (siehe Diskussion 4.3).

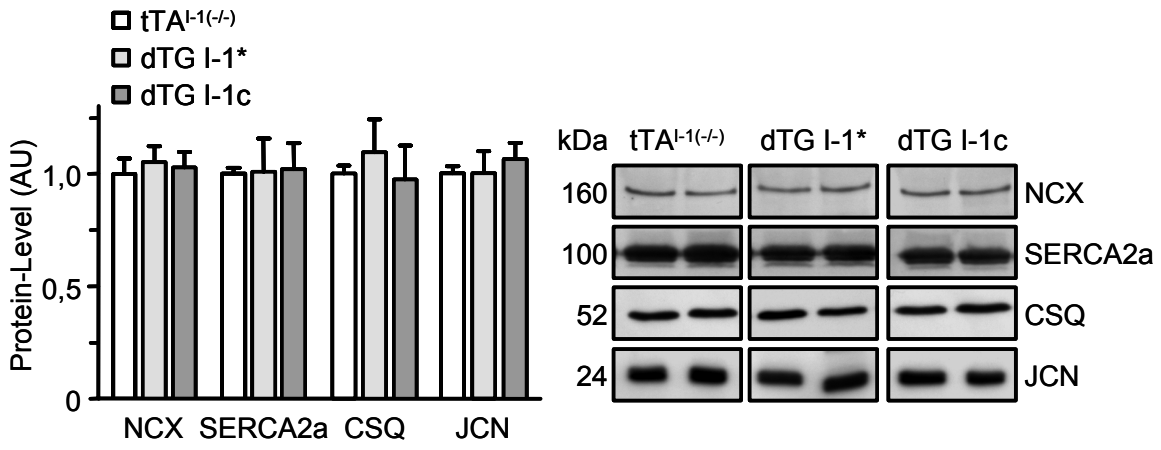


Abb. 3.27 Proteinmenge Ca^{2+}-regulierender Proteine. Proteingehalt von JCN, CSQ, SERCA2a und NCX, bestimmt aus SDS-haltigen Ventrikelhomogenaten (30 µg) von dTG I-1* bzw. dTG I-1c im Vergleich zu tTA$^{I-1(-/-)}$. Die Normalisierung erfolgte jeweils auf CSQ. Die gezeigten Proben der verschiedenen Gruppen liefen für das jeweilige Protein auf einem Gel (n=8 pro Gruppe).

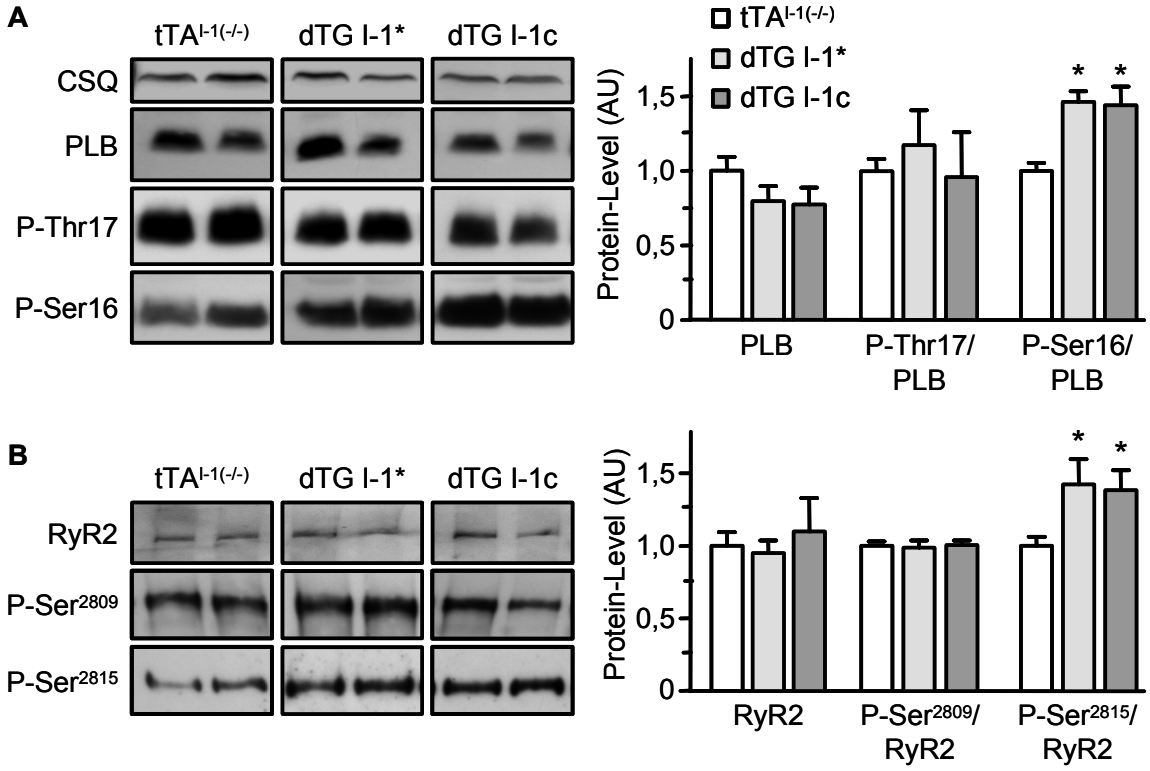


Abb. 3.28 Proteinkonzentration und Phosphorylierung von PLB und des RyR2. (A) Western Blot und Bestimmung der Proteinmenge und Phosphorylierung von PLB Serin 16 und Threonin 17 (8 kDa) aus 20 µg Ventrikelhomogenaten von dTG I-1* bzw. dTG I-1c gegenüber tTA$^{I-1(-/-)}$. Die Normalisierung erfolgte auf CSQ. (B) Proteinkonzentration und Phosphorylierung von RyR2 (564 kDa) an Serin 2809 bzw. 2815. Es wurden 150 µg Protein geladen. Die gezeigten Proben der verschiedenen Gruppen liefen für das jeweilige Protein auf einem Gel (n=8 pro Gruppe). *$p<0,05$ vs. tTA$^{I-1(-/-)}$.

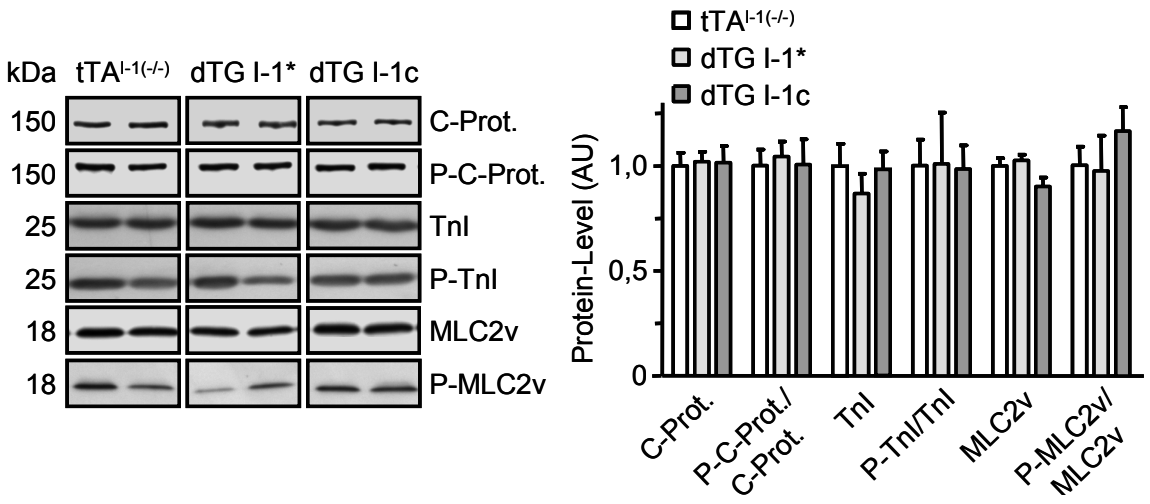


Abb. 3.29 Western Blot und Quantifizierung der Konzentration und Phosphorylierung kardialer Proteine der Myofilamente. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot der Proteinmenge und Phosphorylierung von C-Prot., TnI und MLC2v aus dTG I-1*, dTG I-1c und tTA$^{I-1(-/-)}$ Ventrikelhomogenaten (20 µg). Die gezeigten Proben der verschiedenen Gruppen liefen für das jeweilige Protein auf einem Gel. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung auf CSQ (n=6 pro Gruppe für C-Prot. und n=8 pro Gruppe für TnI und MLC2v).

3.8.3 Bestimmung der Protein-Phosphatase Aktivität

Die PP1-Aktivität sollte als Nachweis der inhibitorischen Aktivität von I-1*/I-1c *in vivo,* in besonderem Hinblick auf seinen Einfluss am SR, gemessen werden. Aus Erfahrung ist die Bestimmung aus Gesamthomogenaten schwierig, da die PP1 hauptsächlich durch regulatorische Untereinheiten reguliert wird und der Effekt durch I-1 somit relativ gering und schwer zu bestimmen ist. In der Vergangenheit konnten wir unter basalen Bedingungen aus Gesamthomogenaten von dTG I-1* bzw. dTG I-1c Tieren keine Veränderungen in der PP1-Aktivität nachweisen (Daten nicht gezeigt). Folglich sollte die PP1-Aktivität nach vorheriger β-adrenerger *in vivo* Stimulation (10 mg/kg Dobutamin, i.p.) und anschließender subzellulärer Fraktionierung im Zytosol und in Membranvesikeln gemessen werden. Western Blot Analysen bestätigten die erfolgreiche Fraktionierung (Daten nicht gezeigt).

Die gemessene Phosphatase Aktivität (PP-Aktivität) setzte sich, unter den gegebenen experimentellen Bedingungen (1 mM EDTA, Abwesenheit zweiwertiger Kationen), aus der PP1 und PP2A zusammen. Zur Differenzierung zwischen PP1 und PP2A wurde jede Probe zusätzlich mit 10 nM Okadasäure

(OA) versetzt. Die PP2A wird durch OA bereits in nanomolaren Konzentrationen gehemmt, die PP1 erst im mikromolaren Bereich. Somit wurde jede Probe zweimal (±OA) als Dreifachbestimmung vermessen.

Die Ergebnisse aus den Messungen der zytosolischen Fraktion zeigten keinen Unterschied in der Phosphatase Gesamtaktivität (PP-gesamt) beider I-1 Mutanten. Die unter dem Einfluss von OA bestimmte PP1-Aktivität war ebenfalls nicht unterschiedlich, so dass auch die PP2A-Aktivität unverändert blieb. Auch in der Membranvesikel Fraktion war zwischen den Gruppen kein Unterschied in der Phosphatase Gesamtaktivität, PP1- und PP2A-Aktivität messbar. In Abbildung 3.30 sind die Daten graphisch zusammenfassend als Aktivität in % von $tTA^{I-1(-/-)}$ dargestellt. Die Rohdaten der entsprechenden spezifischen PP-Aktivitäten sind im Anhang (Tab. 11.18) aufgelistet.

Ein Nachweis der inhibitorischen Aktivität von I-1*/I-1c gegenüber PP1 war mit dieser Methode, unter den gegebenen experimentellen Bedingungen, leider nicht möglich. Es wurde somit der Einfluss von I-1*/I-1c am SR durch die erhöhte Phosphorylierung von PLB als dem I-1-nachgeschalteten Element angenommen.

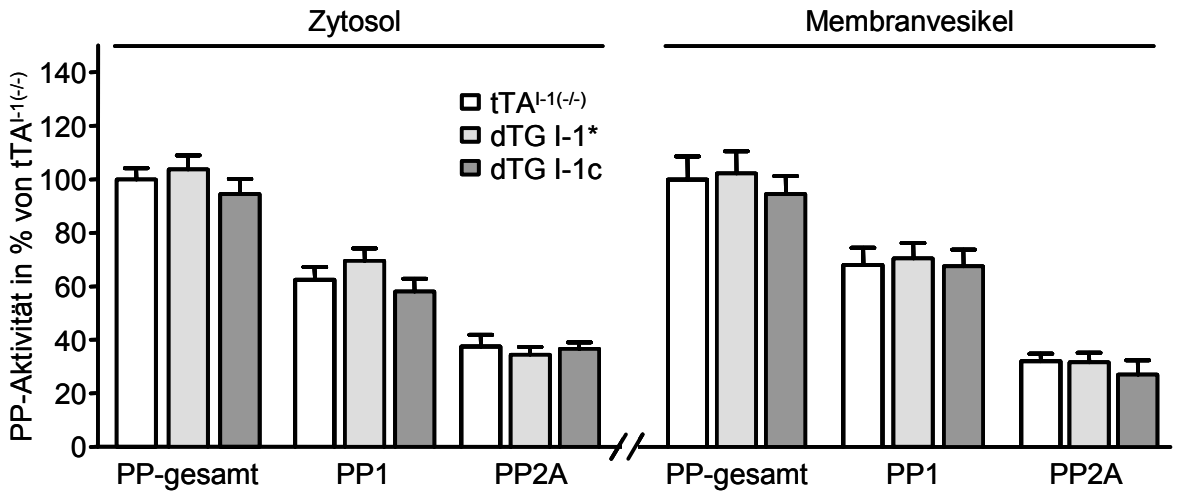


Abb. 3.30 PP-Aktivität und anteilige PP1- bzw. PP2A-Aktivität. Die PP-Aktivität wurde nach β-adrenerger *in vivo* Stimulation in verschiedenen Fraktionen (2 µg Zytosol und 24 µg Membranvesikeln) von Ventrikelhomogenaten zehn Wochen alter dTG I-1* bzw. dTG I-1c Tiere gegenüber $tTA^{I-1(-/-)}$ Kontrollen bestimmt. Durch Zugabe von 10 nM Okadasäure wurde der Anteil der PP1-Aktivität an der Gesamtaktivität ermittelt (n≥5). Ordinate: PP-Aktivität in % von $tTA^{I-1(-/-)}$.

3.8.4 Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Inhibitor-1 und dem Ryanodin-Rezeptor

Mittels *in vitro* Bindungsassay (GST *Pull-down*) sollten Interaktionsstudien durchgeführt werden, um eine mögliche Interaktion zwischen den beiden I-1 Mutanten und RyR2 zu untersuchen. Hierzu wurden die jeweiligen GST-I-1 Fusionsproteine, als entscheidende Komponenten des *Pull-down* Assays, generiert.

Zum Nachweis einer möglichen Interaktion musste RyR2 in ausreichend hohen Mengen vorliegen. RyR2 wurde zum einen frisch aus stabil transfizierten HEK-293-Zelllinien (muriner cDNA Klon) isoliert und zum anderen aus menschlichem Herzgewebe, aus dem das schwere SR von der Arbeitsgruppe Varsányi bereits 2003 angereichert wurde (siehe 2.9.3). Über Sucrose Dichtegradienten Zentrifugation erfolgte die weitere Anreicherung des jeweils solubilisierten RyR2. Aus den so gewonnenen Fraktionen wurde (i) die Sucrosekonzentration refraktometrisch ermittelt und (ii) der RyR2 Gehalt mittels [^{3}H]-Ryanodin-Bindungstest bestimmt. Dabei bildete sich zum Nachweis der Aufreinigungsqualität sowohl beim rekombinanten RyR2 als auch beim humanen RyR2 ein linearer Sucrosegradient aus. Bei einer Sucrosekonzentration von ~26% wurde der höchste Gehalt des rekombinanten RyR2 gemessen, so dass die Fraktion vier für den folgenden *Pull-down* Assay verwendet wurde. Eine RyR2 Isolierung aus dem humanen schweren SR war leider nicht mehr möglich (Abb. 3.31 A).

Zur Durchführung des *Pull-down* Assays wurden die zuvor an Glutathion-Sepharose immobilisierten GST-I-1 Fusionsproteine mit dem RyR2-angereicherten Zelllysat inkubiert. Die dabei möglicherweise gebildeten Komplexe wurden gewaschen und anschließend mittels Glutathion eluiert. Die erhaltenen Eluate, aber auch verschiedene Kontrollfraktionen, wurden mittels [^{3}H]-Ryanodin-Bindungstest und im Western Blot auf die Anwesenheit von RyR2 untersucht. RyR2 konnte mit beiden Nachweismethoden ausschließlich im Überstand detektiert werden (Abb. 3.31 B und C). Für die GST-I-1c Inkubation war noch ein

geringer Anteil in der ersten Durchlauffraktion und nach direkter Denaturierung der Glutathion-Sepharose immunologisch nachweisbar (Abb. 3.31 B).

Somit konnte keines der Fusionsproteine RyR2 binden, wodurch eine Interaktion, unter den gegebenen experimentellen Bedingungen, unwahrscheinlich war.

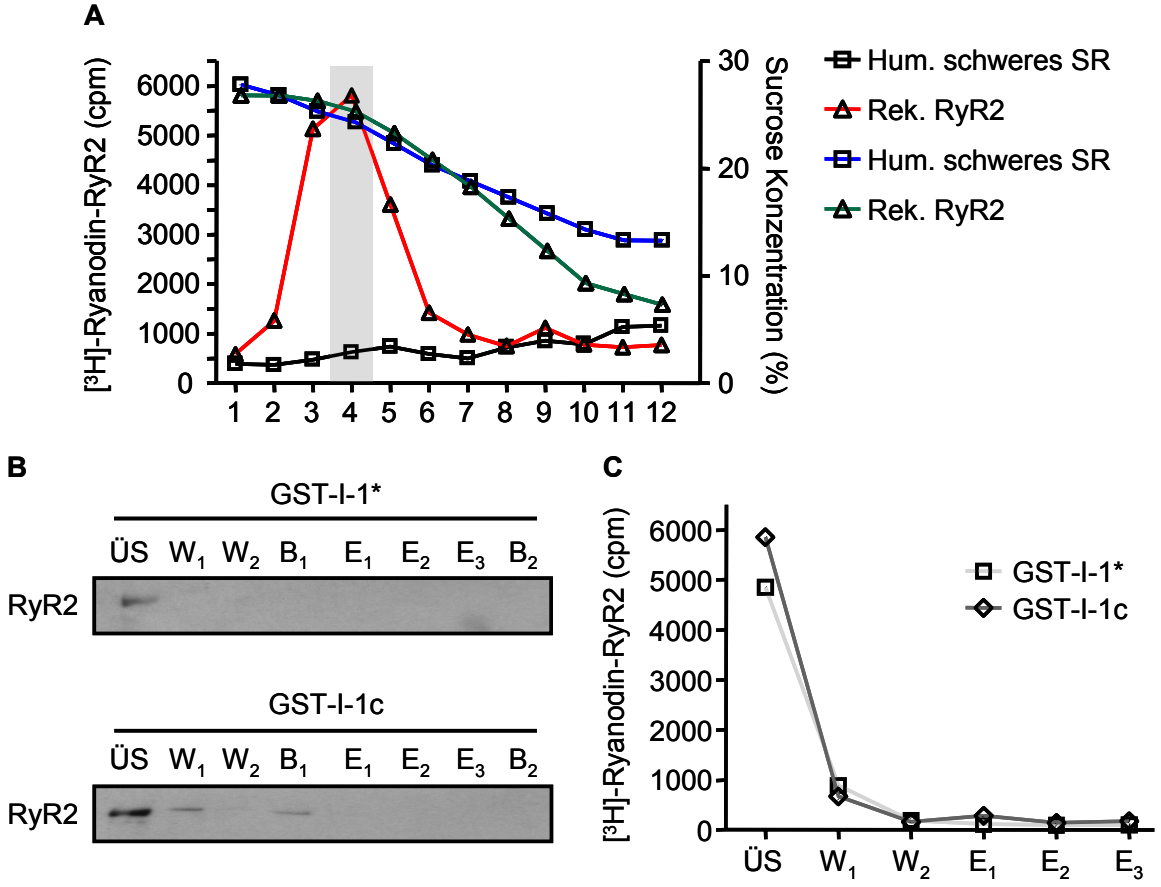


Abb. 3.31 *Pull-down Assay* von RyR2 mittels GST-I-1 Fusionsproteinen. (A) Sucrosegradient und [^{3}H]-Ryanodin-Bindungstest nach RyR2 Isolierung aus HEK-Zelllysaten bzw. humanem Herzgewebe. (B) Western Blot Analyse der verschiedenen Fraktionen mittels anti-RyR2 Antikörper (564 kDa). ÜS: Überstand nach vorheriger Adsorption von GST-I-1 an Glutathion-Sepharose und Inkubation mit RyR2, W_{1-2}: Überstand nach dem Waschen, E_{1-3}: Eluat, B_{1-2}: Glutathion-Sepharose vor bzw. nach der Elution. (C) [^{3}H]-Ryanodin-Bindungstest mit den jeweils beschriebenen Fraktionen. Ordinate: relative Menge des gebildeten [^{3}H]-Ryanodin-RyR2 Komplexes als Zerfälle pro Minute (cpm).

3.8.5 Die Isoprenalin-stimulierten SR Ca^{2+}-Entladungen (Ca^{2+}-Sparks)

Als Ursache für das Auftreten Stress-induzierter Arrhythmien in den I-1*-/I-1c-exprimierenden Tieren vermuteten wir, im Zusammenhang mit einer gesteigerten RyR2 Hyperphosphorylierung, ein erhöhtes diastolisches Ca^{2+}-Leck. Zur näheren

Charakterisierung wurde auf zellulärer Ebene die Funktion des RyR2 mittels konfokaler Laser-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Stefan Neef und Herrn Prof. Lars Maier (Abteilung Kardiologie und Pneumologie im Herzzentrum Göttingen) durchgeführt.

Frisch isolierte Myozyten von zehn Wochen alten Mäusen wurden mit dem Ca^{2+}-Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 beladen. Zur Simulation der *in vivo* Stresssituation wurden die Messungen in Gegenwart von Isoprenalin (10 nM) durchgeführt. Wie aus Abbildung 3.32 A und B ersichtlich, zeigte die Auswertung der *Line-Scans* eine höhere Spark-Frequenz in den I-1*/I-1c Mutanten im Vergleich zu den $tTA^{I-1(-/-)}$ Kontrollen. Die Größe der Ca^{2+}-Sparks wurde für jeweils 5-6 repräsentative Sparks pro Tier bestimmt. Hier ergab sich für die I-1* Mutante, zusätzlich zur erhöhten Spark-Frequenz, eine gesteigerte Spark-Größe (in F/F_0*ms: $tTA^{I-1(-/-)}$: 20,8±1,7, dTG I-1*: 31,2±2,7* und dTG I-1c: 25,2±3,1; *$p<0,05$ vs. $tTA^{I-1(-/-)}$). Folglich war das mittlere gesamte Ca^{2+}-Leck (berechnet aus Größe x Frequenz), im Zusammenhang mit einer I-1* bzw. I-1c Expression, erhöht (Abb. 3.32 C). Insgesamt implizierten diese Daten, dass das Auftreten der Arrhythmien sehr wahrscheinlich im Kontext mit einer erhöhten RyR2 Öffnungswahrscheinlichkeit stand.

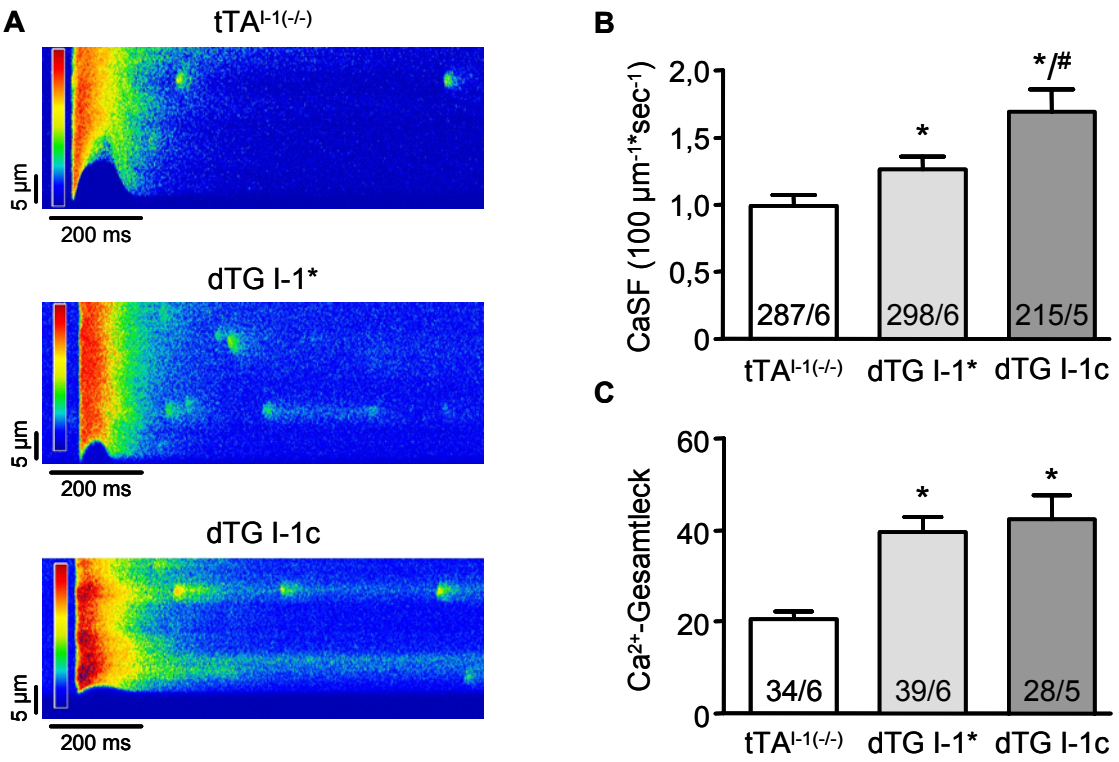


Abb. 3.32 Erhöhte Ca^{2+}-Spark-Frequenz und erhöhtes Ca^{2+}-Gesamtleck in dTG I-1* und dTG I-1c. (A) Repräsentative Ausschnitte aus Original-*Line-Scans*. Die Farbpalette übersetzt die Farbkodierung in die gemessene Intensität des Fluoreszenzsignals. Die dTG I-1* und dTG I-1c Mutanten zeigten im Vergleich zu tTA$^{I-1(-/-)}$ (B) erhöhte Ca^{2+}-Spark-Frequenzen (CaSF) und (C) ein berechnetes gesteigertes Ca^{2+}-Gesamtleck. Die Zahlen in den Säulen kennzeichnen die Anzahl untersuchter Myozyten bzw. charakterisierter Sparks aus jeweils 5-6 Mäusen pro Gruppe. *p<0,05 vs. tTA$^{I-1(-/-)}$ bzw. #p<0,05 vs. dTG I-1*.

3.9 Auswirkungen einer chronischen β-adrenergen Stimulation

Daten aus der Literatur belegen, dass eine chronische Überfunktion einzelner Elemente der β-adrenergen Signalkaskade im Zusammenhang mit pathologischen Hypertrophiemodellen zu einer verstärkten kardialen Dysfunktion führt (Übersicht in El-Armouche und Eschenhagen 2008). Welche Konsequenzen hat nun eine pathologische β-adrenerge Stimulation auf die I-1*- bzw. I-1c-exprimierenden Mäuse? Nach den Auswirkungen akuten β-adrenergen Stresses sollte diese Frage mittels kardiovaskulären Stressmodells beantwortet werden.

Folgendes Studiendesign wurde verwendet (Abb. 3.33). Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde den dTG I-1* bzw. dTG I-1c Tieren und den jeweils gleichaltrigen und –geschlechtlichen tTA$^{I-1(-/-)}$ Geschwistertieren mittels osmotischen Minipumpen Isoprenalin appliziert (30 mg/kg*Tag). Der Verlauf wurde an den Tagen 0, 4, 7,

und 14 echokardiographisch festgehalten. An Tag 4 wurden nach der echokardiographischen Untersuchung die Hälfte der I-1 Mutanten und der jeweiligen Kontrollen bis einschließlich Tag 14 zusätzlich mit Doxycyclin (0,2 mg/ml) behandelt. Dadurch entstanden ab Tag 4 jeweils zwei weitere Gruppen ($tTA^{I-1(-/-)}$ +Dox und dTG I-1* +Dox bzw. dTG I-1c +Dox). Im Anschluss an die echokardiographischen Messungen erfolgte an Tag 14 die Herzentnahme.

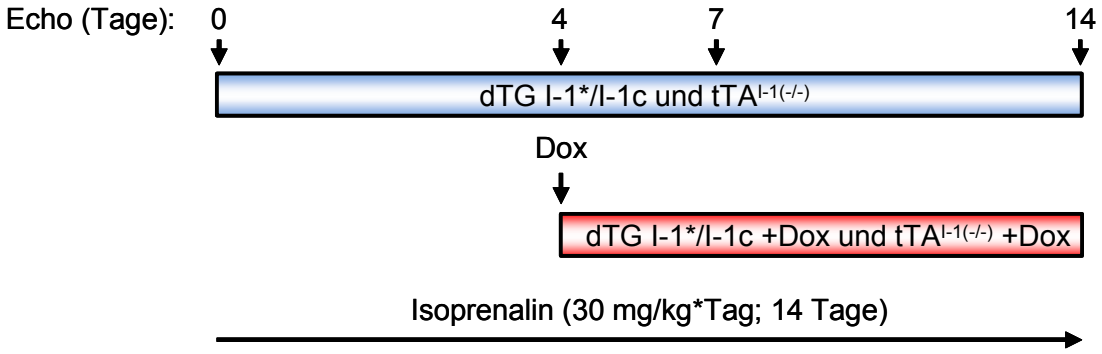


Abb. 3.33 Graphische Darstellung des Studiendesigns zur chronischen Isoprenalinbehandlung. Der Verlauf wurde zu vier Zeitpunkten echokardiographisch festgehalten (Tag 0, 4, 7 und 14). Die Anzahl der Mäuse setzte sich wie folgt zusammen: I-1* Linie (Alter 4 Monate): n=14-17 pro Gruppe bis Tag 4, anschließend n=7-9 pro Gruppe; I-1c Linie (Alter 3 Monate): n=13 pro Gruppe bis Tag 4, anschließend n=6-7 pro Gruppe.

Ein zuvor durchgeführter Testlauf (Isoprenalin, 30 mg/kg*Tag über sieben Tage) an Wildtyp Mäusen führte bereits nach drei Tagen zu einer deutlichen Hypertrophieentwicklung im Vergleich zu Tag 0 bzw. NaCl-behandelten Kontrollen (Daten siehe Anhang, Tab. 11.19). Folglich konnte nach viertägiger Isoprenalingabe ein pathologischer Phänotyp erwartet werden, so dass eine Doxycyclinapplikation, in dem zuvor vorgestellten Studiendesign (Abb. 3.33), ab Tag 4 sinnvoll war.

Die erhobenen Daten beider Linien werden getrennt voneinander vorgestellt. Die Datenanalyse ergab für die $tTA^{I-1(-/-)}$ Kontrollgruppe in Abhängigkeit von Doxycyclin keine Unterschiede. Folglich wurden die beiden Gruppen aus Gründen der Übersichtlichkeit zusammengefasst und als $tTA^{I-1(-/-)}$ -/+Dox bezeichnet. Die entsprechenden Rohdaten sind im Anhang für die jeweilige Linie und die entsprechenden Messparameter einzeln aufgelistet (siehe Tab. 11.20-21, Tab. 11.24-30 und Tab. 11.33-36). Die echokardiographisch erhobenen Daten an Tag 7

sind der Übersichtlichkeit halber in den Abbildungen nicht gezeigt, sondern ebenfalls im Anhang zusammengefasst (siehe Tab. 11.22 und 11.31).

3.9.1 Auswirkungen einer chronischen β-adrenergen Stimulation in den Inhibitor-1c Transgenen

3.9.1.1 Organgewichte nach chronischer β-adrenerger Stimulation

Nach 14-tägiger Isoprenalininfusion wurden die Gewichte von Herz, Lunge und Leber bestimmt und auf die Tibialänge (TL) normalisiert. Die Tibialänge blieb von den starken Gewichtsschwankungen über die 14 Tage unbeeinflusst (Abb. 3.34 B). Die Isoprenalingabe induzierte nachweislich eine Herzhypertrophie (Abb. 3.35 C; LVM/TL), wobei die relativen Herzgewichte der drei Gruppen keine Unterschiede aufwiesen (Abb. 3.34 A). Des Weiteren konnte in den I-1c-exprimierenden Tieren ein (i) höheres relatives Lungengewicht gegenüber den dTG I-1c +Dox Kontrollen und (ii) größeres relatives Lebergewicht gegenüber beiden Kontrollgruppen ($tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox und dTG I-1c +Dox) festgestellt werden (Abb. 3.34 A).

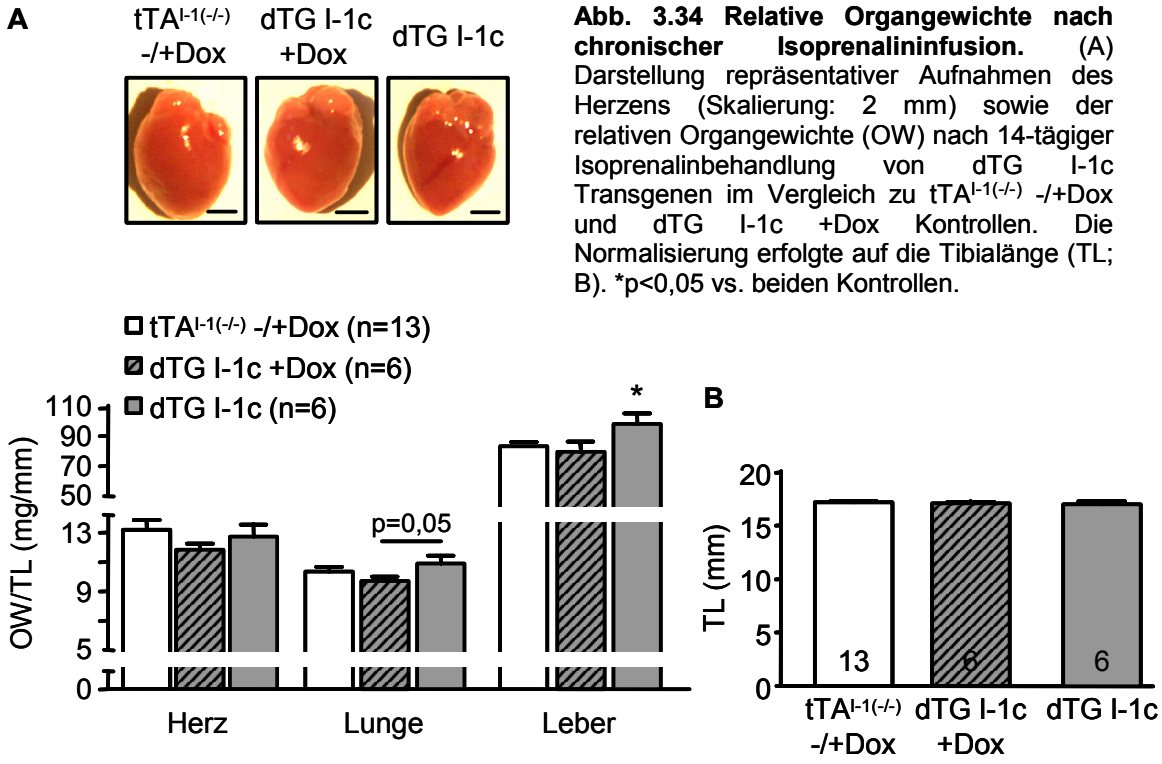


Abb. 3.34 Relative Organgewichte nach chronischer Isoprenalininfusion. (A) Darstellung repräsentativer Aufnahmen des Herzens (Skalierung: 2 mm) sowie der relativen Organgewichte (OW) nach 14-tägiger Isoprenalinbehandlung von dTG I-1c Transgenen im Vergleich zu $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox und dTG I-1c +Dox Kontrollen. Die Normalisierung erfolgte auf die Tibialänge (TL; B). *p<0,05 vs. beiden Kontrollen.

3.9.1.2 Echokardiographische Untersuchungen nach chronischer β-adrenerger Stimulation

Die echokardiographische Analyse ergab, wie zuvor gezeigt (siehe 3.6.2; Abb. 3.21), vor der Infusion an Tag 0 einen hyperkontraktilen Phänotyp für die dTG I-1c Tiere. Im weiteren Zeitverlauf führte die Isoprenalininfusion in den dTG I-1c Tieren bereits an Tag 4 zur Aufhebung der initial erhöhten Kontraktilität (Abnahme der FAS in % Tag 4 gegenüber Tag 0: $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$: 8,4±4,1 vs. dTG I-1c: 22,7±3,0; $p<0,05$). Im weiteren Verlauf nahm die Kontraktilität stärker in den dTG I-1c Transgenen im Vergleich zu $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox ab (Abnahme der FAS in % von Tag 0 bis Tag 14: $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox: 13,3±3,9 vs. dTG I-1c: 28,7±4,8; $p<0,05$) und ging in einen stark hypokontraktilen Phänotyp über (Abb. 3.35 A). Interessanterweise konnte durch die Doxycyclinapplikation ab Tag 4 die Progression der kontraktilen Dysfunktion in den dTG I-1c +Dox Tieren aufgehalten werden bzw. führte sogar zu einem Anstieg auf das Niveau der $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox Kontrollen (Veränderungen der FAS in % von Tag 4 bis Tag 14: dTG I-1c +Dox: +8,2±5,5 vs. dTG I-1c: -11,7±5,3; $p<0,05$).

Die graphische Darstellung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVEDD; Abb. 3.35 B) zeigte an Tag 4 nur für die $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ Tiere eine Zunahme. Allerdings nahm der Durchmesser im weiteren Verlauf in den I-1c-exprimierenden Tieren, auch gegenüber den Doxycyclin-behandelten Tieren (dTG I-1c +Dox), stärker zu. Insgesamt manifestierte sich eine ausgeprägte linksventrikuläre Dilatation (Zunahme LVEDD in %: $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox: 6,5±1,6 vs. dTG I-1c +Dox: 5,7±1,8 und dTG I-1c: 13,8±2,0; $p<0,05$ vs. beiden Kontrollgruppen). Auch hier war das Ausmaß unter Doxycyclin vermindert.

Des Weiteren nahm zu Beginn die linksventrikuläre Masse (LVM; Abb. 3.35 C) in den dTG I-1c Tieren tendenziell stärker zu. Dieser Befund kehrte sich im weiteren Verlauf um, so dass die linksventrikuläre Gewichtszunahme nach 14 Tagen in den $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox Tieren tendenziell ausgeprägter war. Durch Doxycyclin passte sich der Phänotyp in den dTG I-1c +Dox Mäusen den $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox Kontrollen an. Die Analyse der LVM Absolutwerte führte zu der gleichen Erkenntnis. Weitere Parameter sind im Anhang (Tab. 11.23) aufgelistet.

Insgesamt war die Entwicklung des Phänotyps, einer starken Kontraktilitätsabnahme und einer gesteigerten Dilatation, unter Doxycyclin schwächer ausgeprägt. Dies ließ darauf schließen, dass der Phänotyp durch I-1c induziert wurde.

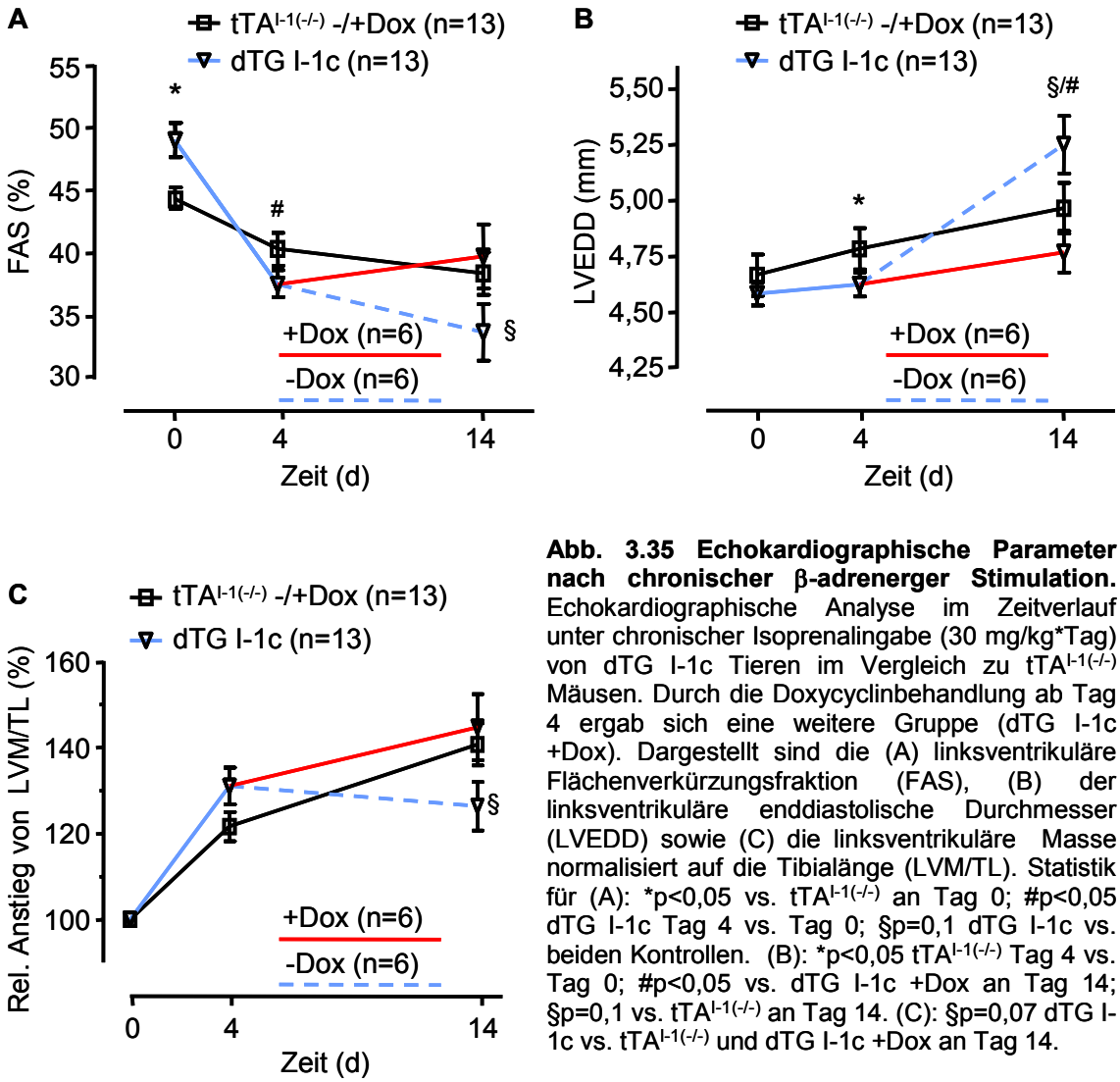


Abb. 3.35 Echokardiographische Parameter nach chronischer β-adrenerger Stimulation. Echokardiographische Analyse im Zeitverlauf unter chronischer Isoprenalingabe (30 mg/kg*Tag) von dTG I-1c Tieren im Vergleich zu tTA$^{I-1(-/-)}$ Mäusen. Durch die Doxycyclinbehandlung ab Tag 4 ergab sich eine weitere Gruppe (dTG I-1c +Dox). Dargestellt sind die (A) linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion (FAS), (B) der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) sowie (C) die linksventrikuläre Masse normalisiert auf die Tibialänge (LVM/TL). Statistik für (A): *p<0,05 vs. tTA$^{I-1(-/-)}$ an Tag 0; #p<0,05 dTG I-1c Tag 4 vs. Tag 0; §p=0,1 dTG I-1c vs. beiden Kontrollen. (B): *p<0,05 tTA$^{I-1(-/-)}$ Tag 4 vs. Tag 0; #p<0,05 vs. dTG I-1c +Dox an Tag 14; §p=0,1 vs. tTA$^{I-1(-/-)}$ an Tag 14. (C): §p=0,07 dTG I-1c vs. tTA$^{I-1(-/-)}$ und dTG I-1c +Dox an Tag 14.

3.9.1.3 Histologische Untersuchungen nach chronischer β-adrenerger Stimulation

Alle Gruppen waren über 14 Tage einer chronischen β-adrenergen Stimulation ausgesetzt. Aus der Literatur ist bekannt, dass dies mit strukturellen Veränderungen verbunden ist. Um genauere Aufschlüsse auf

Kardiomyozytenebene zu erhalten, wurden jeweils vier Herzen histologisch mittels Hämatoxylin/Eosin (HE)- und Siriusrot-Färbung analysiert.

Zunächst wurde die Größe der Kardiomyozyten in HE-gefärbten Präparaten beurteilt (Abb. 3.36). Hierbei konnten zwei deutliche Veränderungen festgestellt werden. Die dTG I-1c Tiere zeigten einerseits stärker hypertrophierte Kardiomyozyten (Abb. 3.36 A) und andererseits eine ausgeprägtere Vermehrung von interstitiellem Bindegewebe (Abb. 3.36 B und C). Die Myozytenhypertrophie wurde näher charakterisiert, indem die Querschnittsfläche der Kardiomyozyten morphometrisch ausgemessen wurde (Abb. 3.36 D). Tatsächlich konnte dabei ein höherer Hypertrophiegrad in den dTG I-1c Tieren im Vergleich zu beiden Kontrollen nachgewiesen werden. Trotz Inhibition der I-1c Expression war die Myozytenfläche der dTG I-1c +Dox Tiere im Vergleich zu $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ noch erhöht.

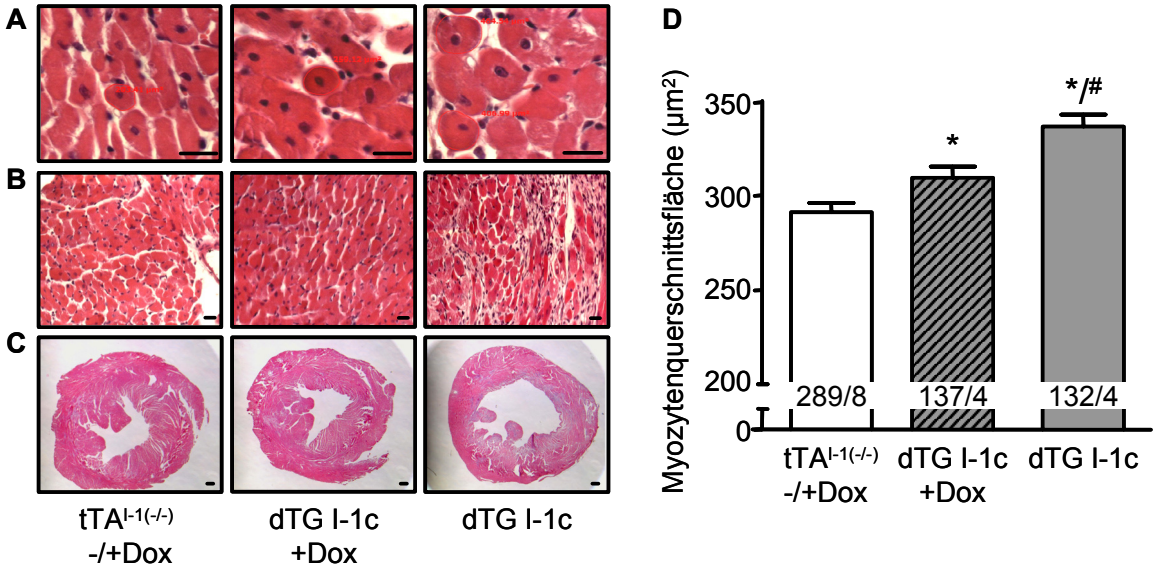


Abb. 3.36 HE-Färbung von linksventrikulärem Myokard nach chronischer β-adrenerger Stimulation. (A) Repräsentative Bestimmung der Myokardquerschnittsfläche mit stärker hypertrophierten Kardiomyozyten in den dTG I-1c Herzen (Skalierung: 20 µm). (B) Vermehrtes interstitielles Bindegewebe in den dTG I-1c Tieren (Skalierung: 20 µm), auch aus der Übersichtsaufnahme (C) ersichtlich, ebenso wie die erhöhte Dilatation in dTG I-1c (Skalierung: 200 µm). (D) Quantifizierung der Querschnittsfläche orthograd geschnittener Kardiomyozyten. Die Zahlen in den Säulen kennzeichnen die Anzahl untersuchter Myozyten aus jeweils 4 bzw. 8 verschiedenen Mäusen. *$p<0,05$ vs. $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox und #$p<0,05$ vs. dTG I-1c +Dox.

Anhand der Siriusrot-gefärbten Schnitte sollte die Vermehrung von interstitiellem Bindegewebe in den dTG I-1c Transgenen verifiziert werden. Die Quantifizierung des Fibroseanteils ergab einen deutlich erhöhten Fibrosegrad in den dTG I-1c

Herzen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen, der das gesamte linksventrikuläre Myokard durchzog (Abb. 3.37).

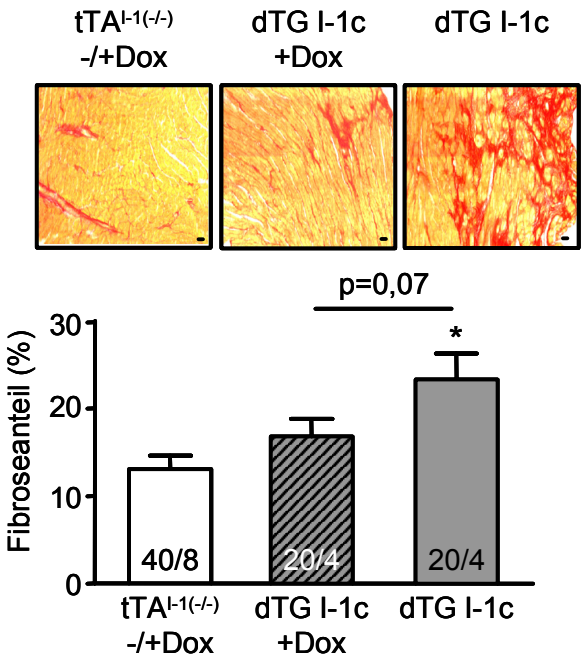


Abb. 3.37 Vermehrte interstitielle Fibrose in dTG I-1c nach chronischer Isoprenalingabe. Linksventrikuläre Paraffinschnitte der dTG I-1c Tiere und beider Kontrollen (tTA$^{I-1(-/-)}$ -/+Dox bzw. dTG I-1c +Dox) wurden mit Pikrinsäure/Siriusrot gefärbt. Kardiomyozyten sind gelb und kollagenes Bindegewebe ist rot gefärbt. Die Quantifizierung ergab ein vermehrtes Auftreten von fibrotischen Stellen im Interstitium der dTG I-1c Tiere (Skalierung: 20 µm). Die Zahlen in den Säulen kennzeichnen die Anzahl quantifizierter Areale aus 4 bzw. 8 Mäusen pro Gruppe. *p<0,05 vs. tTA$^{I-1(-/-)}$ -/+Dox.

Zusammenfassend potenzierte die I-1c Expression die Isoprenalin-Effekte sowohl auf Kardiomyozytenebene als auch auf die Fibrosierung. Die Doxycyclin-behandelten dTGs exprimierten I-1c nur innerhalb der ersten vier Tage der Isoprenalininfusion. Trotzdem führte dies bereits zu stärkeren, irreversiblen strukturellen Veränderungen im Vergleich zu tTA$^{I-1(-/-)}$ -/+Dox.

3.9.1.4 Untersuchungen auf mRNA-Ebene nach chronischer β-adrenerger Stimulation

Um auch unter chronischer Isoprenalinbehandlung den Nachweis zu erbringen, dass Doxycyclin effektiv die I-1c Expression inhibiert, wurde der I-1c mRNA-Gehalt in denselben, zuvor behandelten Tieren bestimmt. Zur Identifizierung einer nicht-physiologischen Hypertrophie auf molekularer Ebene wurden die mRNA-Mengen von ANP und BNP quantifiziert. Für diese Gene ist bekannt, dass sie aufgrund der Reexpression des fetalen Genprogrammes in der Herzinsuffizienz hochreguliert werden (Nishigaki et al. 1996; Abb. 3.38).

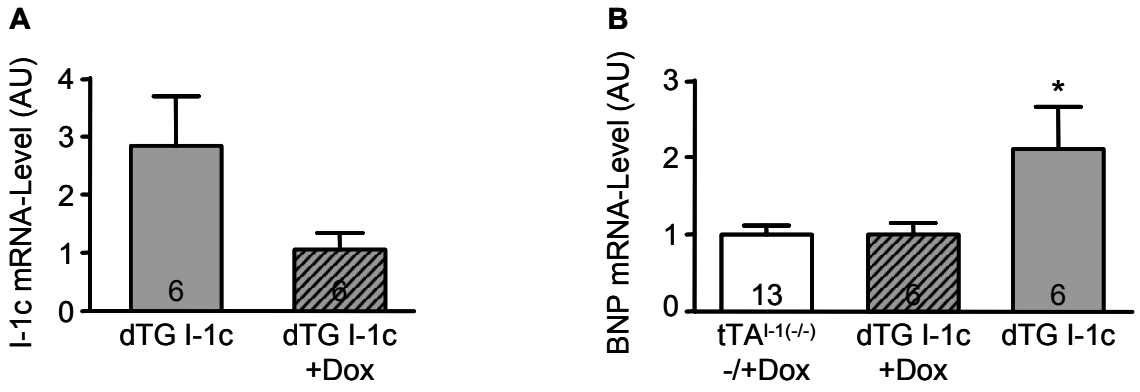


Abb. 3.38 Analyse der I-1c bzw. BNP mRNA-Konzentration. Die ventrikuläre Expression von I-1c und BNP wurde auf mRNA-Ebene nach 14 Tagen Isoprenalinapplikation untersucht. Dargestellt sind (A) die I-1c mRNA-Konzentration und (B) die BNP mRNA-Menge in den dTG I-1c Tieren gegenüber beiden Kontrollen. *p<0,05 vs. beiden Kontrollen.

Die Ergebnisse zeigten erwartungsgemäß eine Doxycyclin-induzierte Reduktion der I-1c Expression (Abb. 3.38 A). Somit war der beschriebene *„Rescue“*-Effekt des Phänotyps in den dTG I-1c +Dox Tieren auf die Inhibition der I-1c Expression zurückzuführen. Die BNP mRNA-Menge war in den dTG I-1c Transgenen erhöht (Abb. 3.38 B), wohingegen ANP mit einer starken Tendenz erhöht war (relativer ANP mRNA-Gehalt: $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox: 1,0±0,2 vs. dTG I-1c +Dox: 0,9±0,2 und dTG I-1c: 1,7±0,8; n.s.). Das Ergebnis unterstützte den histologischen Befund einer verstärkten zellulären Hypertrophie in den I-1c-exprimierenden Tieren.

3.9.1.5 Einfluss einer chronischen β-adrenergen Stimulation auf Phosphorylierungs-abhängige Regulatorproteine

Bleibt in diesem Endstadium der Hypertrophie die unter basalen Bedingungen gesteigerte PLB Phosphorylierung in den dTG I-1c Tieren erhalten? Der immunologische Nachweis ergab eine unveränderte PLB Proteinmenge für die dTG I-1c Transgenen im Vergleich zu den Kontrollen. Allerdings war die PLB Serin 16 Phosphorylierung um 40% gegenüber $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox vermindert und die PLB Threonin 17 interessanterweise um 40% erhöht (Abb. 3.39).

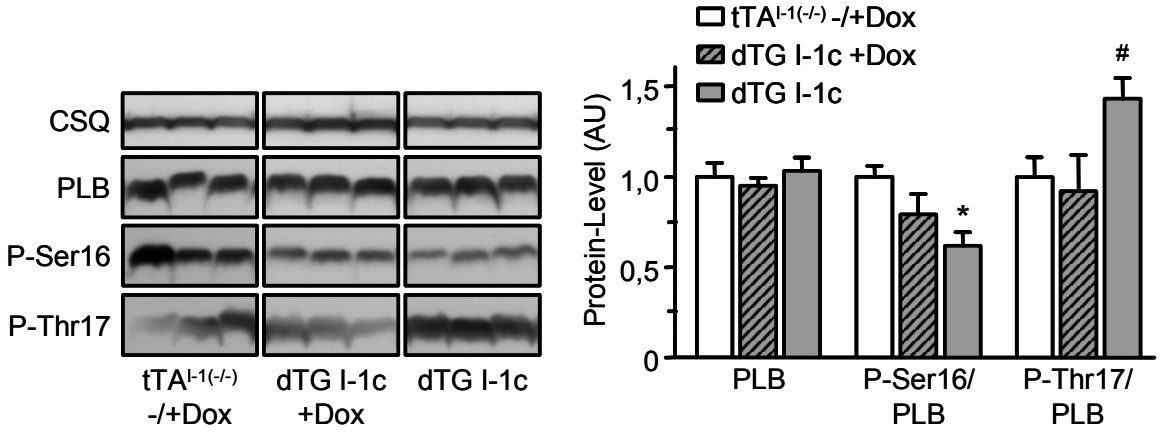


Abb. 3.39 Western Blot von PLB nach 14 Tagen Isoprenalin. Proteinmenge und Phosphorylierung von PLB (8 kDa; P-Ser16 bzw. P-Thr17) in Ventrikelhomogenaten von dTG I-1c Tieren (n=6) im Vergleich zu tTA$^{I-1(-/-)}$ -/+Dox (n=13) und dTG I-1c +Dox (n=6). Die gezeigten Proben liefen jeweils auf einem Gel. Die Normalisierung erfolgte auf CSQ (52 kDa). *p<0,05 vs. tTA$^{I-1(-/-)}$ -/+Dox; #p<0,05 vs. beiden Kontrollen.

Obwohl PLB als eindeutiges I-1 Substrat identifiziert wurde (siehe Abb. 3.28), nahm die PLB Serin 16 Phosphorylierung unter chronischer Gebe von Isoprenalin ab. Dies könnte auf eine allgemeine Stressreaktion zurückzuführen sein, die in den I-1c-exprimierenden Tieren aufgrund des stärkeren Phänotyps erhöht war. Folglich müsste die Phosphorylierung von TnI, als nicht-I-1-sensitives PP1 Substrat, ebenfalls in den I-1c-exprimierenden Tieren erniedrigt sein. Die Western Blot Analyse ergab tatsächlich in den dTG I-1c Mutanten eine um 30% erniedrigte TnI Phosphorylierung (Abb. 3.40).

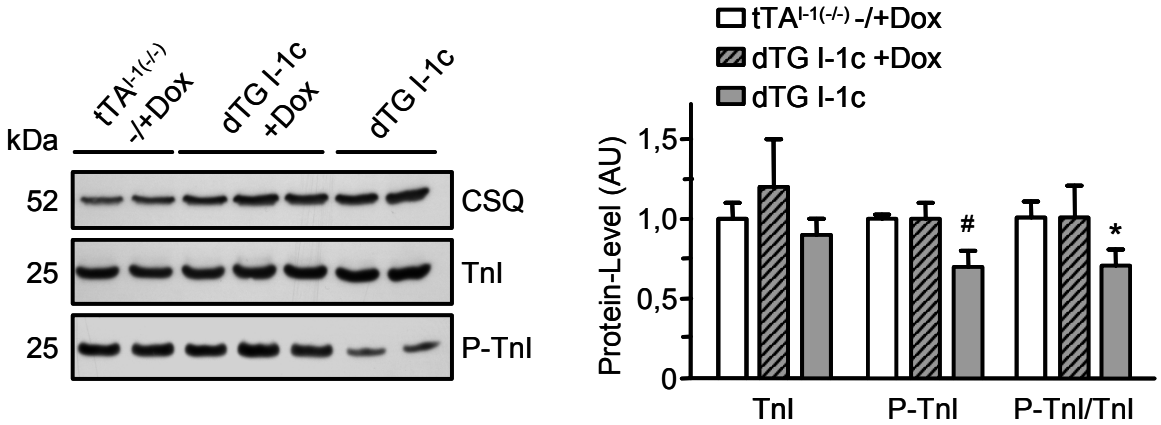


Abb. 3.40 Quantifizierung der Menge und Phosphorylierung von TnI. Immunologischer Nachweis der ventrikulären Proteinmenge und Phosphorylierung von TnI nach 14 Tagen Isoprenalingabe. Die Normalisierung erfolgte auf CSQ (n=13 für tTA$^{I-1(-/-)}$ -/+Dox bzw. n=6 für dTG I-1c und dTG I-1c +Dox). *p<0,05 vs. tTA$^{I-1(-/-)}$ -/+Dox; #p<0,05 vs. beiden Kontrollen.

Wie bereits im Rahmen der basalen Charakterisierung durchgeführt (siehe 3.8.1), sollte auch nach chronischer Isoprenalinbehandlung die Phosphorylierung zentraler Elemente von Hypertrophie-Signalwegen untersucht werden. Die immunologische Analyse zeigte keine Veränderung im Phosphorylierungsgrad von Akt, ERK 1/2 und der S6-ribosomalen Proteinkinase (Abb. 3.41).

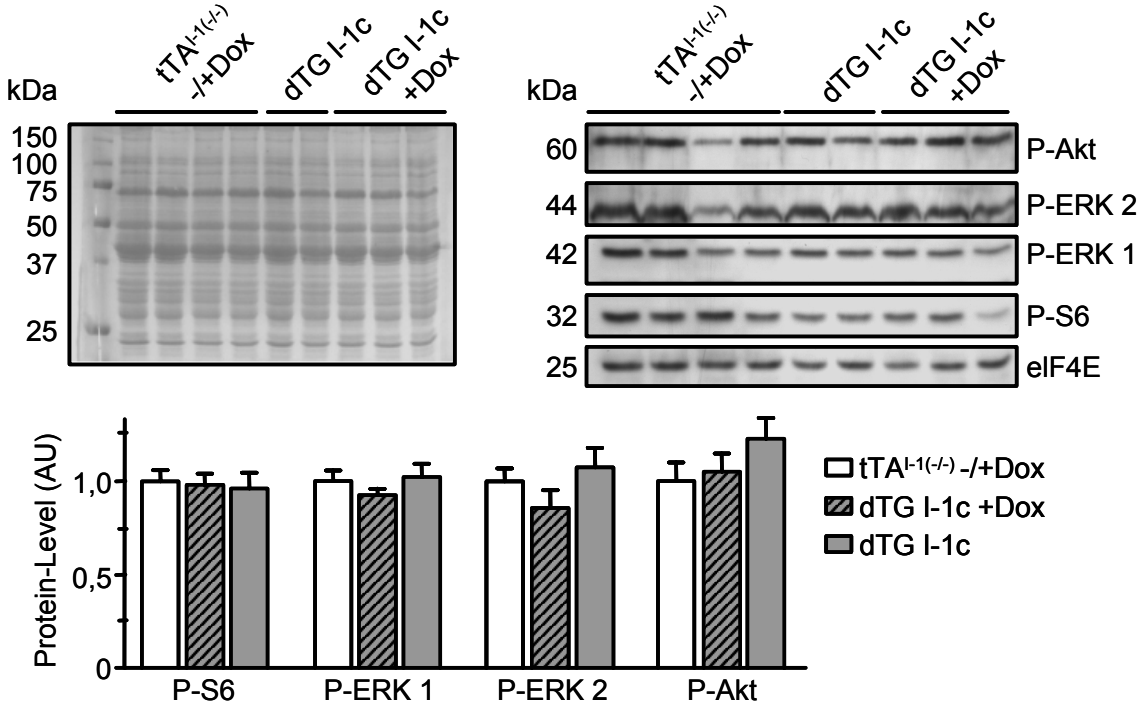


Abb. 3.41 Western Blot und Quantifizierung der Phosphorylierung von ERK 1/2, Akt und S6-ribosomaler Proteinkinase. Der immunologische Nachweis erfolgte aus ventrikulären Standardhomogenaten der dTG I-1c Tiere und der beiden Kontrollen nach chronischer Isoprenalingabe. Die Normalisierung erfolgte auf die Ponceau-Färbung (links dargestellt). Die dargestellten Proben liefen alle auf einem Gel (n=13 für $tTA^{I-1(-/-)}$ -/+Dox bzw. n=6 für dTG I-1c und dTG I-1c +Dox). eIF4E diente als Ladekontrolle.

Die Daten zeigen zusammenfassend für diesen Abschnitt, dass I-1c zu einem gesteigerten Katecholamin-induzierten kardialen Remodeling führte. Dies äußerte sich in (i) einer starken kardialen Dysfunktion auf funktioneller Ebene, (ii) einer erhöhten Kardiomyozytenhypertrophie und Fibrosierung auf zellulärer Ebene, (iii) einer vermehrten BNP mRNA-Menge und (iv) einer verminderten PLB Serin 16 und TnI Phosphorylierung sowie einer erhöhten PLB Threonin 17 Phosphorylierung. Die Doxycyclin-vermittelte Abschwächung des Phänotyps bzw. die Anpassung an die $tTA^{I-1(-/-)}$ -/+Dox Kontrollen implizierte einen I-1c-induzierten Phänotyp.

3.9.2 Auswirkungen einer chronischen β-adrenergen Stimulation in der Inhibitor-1* Mutante

Die I-1* Mutante wurde unter Verwendung des in Abbildung 3.33 beschriebenen Studiendesigns behandelt und untersucht. Die Analysen erfolgten in Anlehnung an die I-1c Linie.

3.9.2.1 Organgewichte nach chronischer Isoprenalinstimulation

Nach 14 Tagen Katecholamininfusion zeigten die dTG I-1* Tiere im Vergleich zu den beiden Kontrollen vergleichbare Organgewichte (Herz, Lunge und Leber; Abb. 3.42).

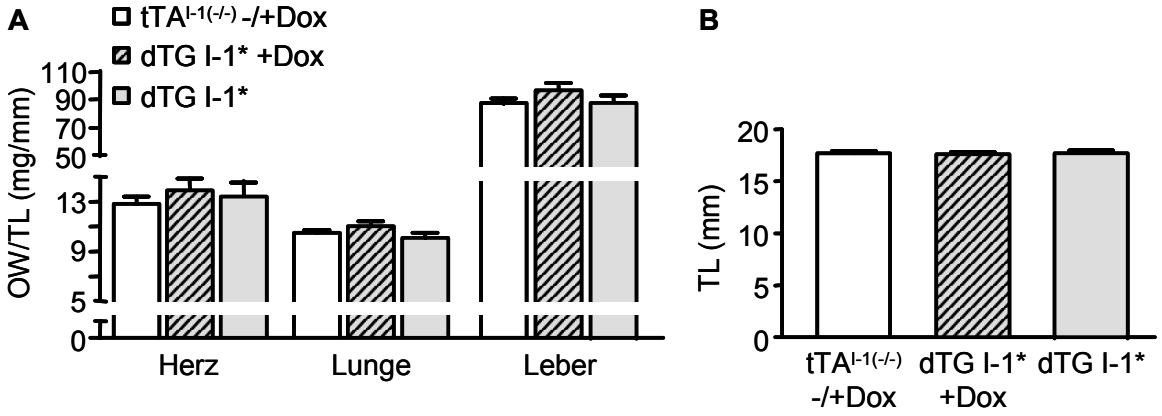
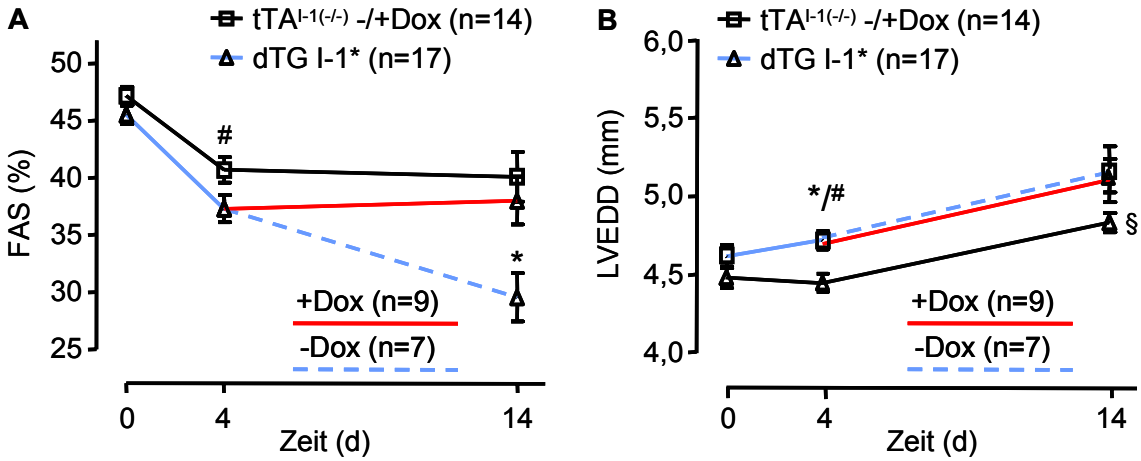


Abb. 3.42 Relative Organgewichte nach chronischer Isoprenalingabe. (A) Darstellung der relativen Organgewichte (OW) von vier Monaten alten dTG I-1* Transgenen (n=7) gegenüber tTA$^{I-1(-/-)}$ -/+Dox (n=12) und dTG I-1* +Dox (n=8) Kontrollen. Die Normalisierung erfolgte auf die Tibialänge (TL; B).

3.9.2.2 Echokardiographische Untersuchungen nach chronischer β-adrenerger Stimulation

Die echokardiographischen Analysen zeigten für die dTG I-1* Tiere bereits innerhalb der ersten 4 Tage eine stärkere Reduktion der Kontraktilität. Die Kontraktilitätsabnahme setzte sich für die dTG I-1* Tiere im weiteren Verlauf fort, wohingegen in den beiden Kontrollen ab Tag 4 keine weitere kontraktile Einschränkung beobachtet wurde. Insgesamt war die 14-tägige Isoprenalininfusion in den I-1*-exprimierenden Mäusen mit einer FAS Abnahme um 35% (±5; $p<0,05$

vs. tTA$^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox bzw. dTG I-1* +Dox) assoziiert, wohingegen sie in den beiden Kontrollgruppen zu einer Abnahme um 16% (±5 bzw. ±4) führte. Auch hier konnte durch Doxycyclin eine weitere Progression des Kontraktilitätsverlustes aufgehalten werden (3.43 A).



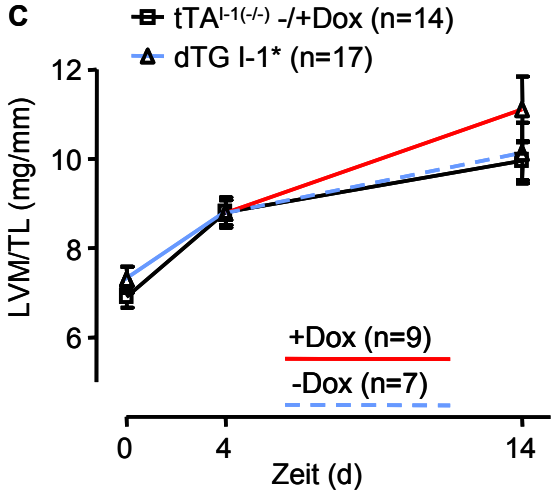


Abb. 3.43 Echokardiographische Parameter nach chronischer Isoprenalinzufuhr. Echokardiographische Analyse im Zeitverlauf der dTG I-1* Tiere im Vergleich zu den tTA$^{I\text{-}1(-/-)}$ Tieren. Durch die Doxycyclingabe ab Tag 4 ergab sich eine weitere Gruppe (dTG I-1* +Dox). Dargestellt sind die (A) linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion (FAS), (B) der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) sowie (C) die linksventrikuläre Masse normalisiert auf die Tibialänge (LVM/TL). Statistik für (A): *p<0,05 vs. tTA$^{I\text{-}1(-/-)}$ und dTG I-1* +Dox an Tag 14, #p<0,05 vs. tTA$^{I\text{-}1(-/-)}$ an Tag 4 und (B): *p<0,05 vs. tTA$^{I\text{-}1(-/-)}$ an Tag 4, #p<0,05 Tag 0 vs. Tag 4 für dTG I-1* und §p<0,05 vs. dTG I-1* und dTG I-1* +Dox.

Die dTG I-1* Tiere zeigten zunächst eine erhöhte Dilatation, die jedoch im weiteren Verlauf in einen vergleichbaren Anstieg innerhalb der drei Gruppen überging. Allerdings war die Dilatation zu milde, um eine potentielle Doxycyclin-induzierte Reversibilität zu detektieren (Abb. 3.43 B). Die linksventrikuläre Masse (normalisiert auf die Tibialänge; Abb. 3.43 C), als Maß der Hypertrophieentwicklung, nahm vergleichbar zwischen den dTG I-1* Transgenen und den Kontrollen zu (Zunahme der LVM/TL bis Tag 14 in %: tTA$^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox:

45,9±5,0 vs. dTG I-1* +Dox: 39,1±7,4 vs. dTG I-1*: 50,4±3,8). Zusätzliche echokardiographische Parameter sind im Anhang in Tab. 11.32 aufgelistet.

3.9.2.3 Untersuchungen auf mRNA-Ebene nach chronischer β-adrenerger Stimulation

Die Bestimmung der I-1* mRNA-Transkripte in den behandelten Tieren belegte, dass die I-1* Expression erwartungsgemäß durch Doxycyclin ab Tag 4 inhibiert wurde und somit auch unter Isoprenalinfusion eine Doxycyclin-abhängige Regulation möglich war (Abb. 3.44 A). Die Anwesenheit von I-1* führte nach chronischer β-adrenerger Stimulation zu einer tendenziell erhöhten BNP mRNA-Menge (Abb. 3.44 B), wobei der ANP Gehalt nicht erhöht war (relative ANP mRNA-Menge: $tTA^{I-1(-/-)}$ -/+Dox: 1,0±0,3 vs. dTG I-1* +Dox: 0,7±0,2 und dTG I-1c: 0,9±0,3).

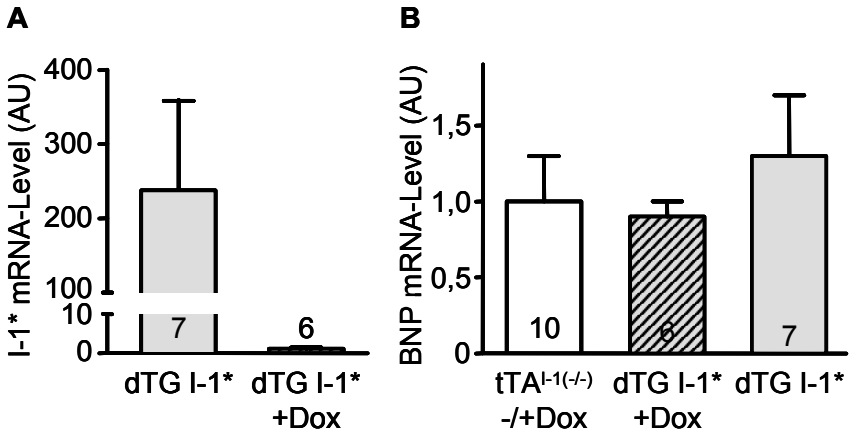


Abb. 3.44 Quantitative Analyse der I-1* und BNP mRNA-Konzentration nach chronischer Isoprenalingabe. (A) Doxycyclin ab Tag 4 inhibierte die I-1* Expression in den dTG I-1* +Dox Tieren. (B) BNP mRNA-Menge. Die Normalisierung erfolgte auf GAPDH.

3.9.2.4 Einfluss einer chronischen β-adrenergen Stimulation auf die Phosphorylierung von Regulatorproteinen

Wie wird die basal erhöhte PLB Phosphorylierung in den dTG I-1* Mäusen durch eine chronische Isoprenalinstimulation beeinflusst? Die Western Blot Analyse ergab keinen Unterschied, weder für die PLB Proteinmenge noch für die beiden Phosphorylierungen (Abb. 3.45 A). Auch die Phosphorylierung von TnI, als nicht-I-1-sensitives PP1 Substrat, war zwischen den drei Gruppen nicht verändert (Abb. 3.45 B). Für die Phosphorylierung von Akt, ERK 1/2, $p90^{RSK}$ und S6-ribosomaler

Proteinkinase konnte kein Unterschied detektiert werden, so dass ein Einfluss von I-1* auf zentrale Regulatoren von Hypertrophie-Signalwegen unwahrscheinlich war (Abb. 3.45 C).

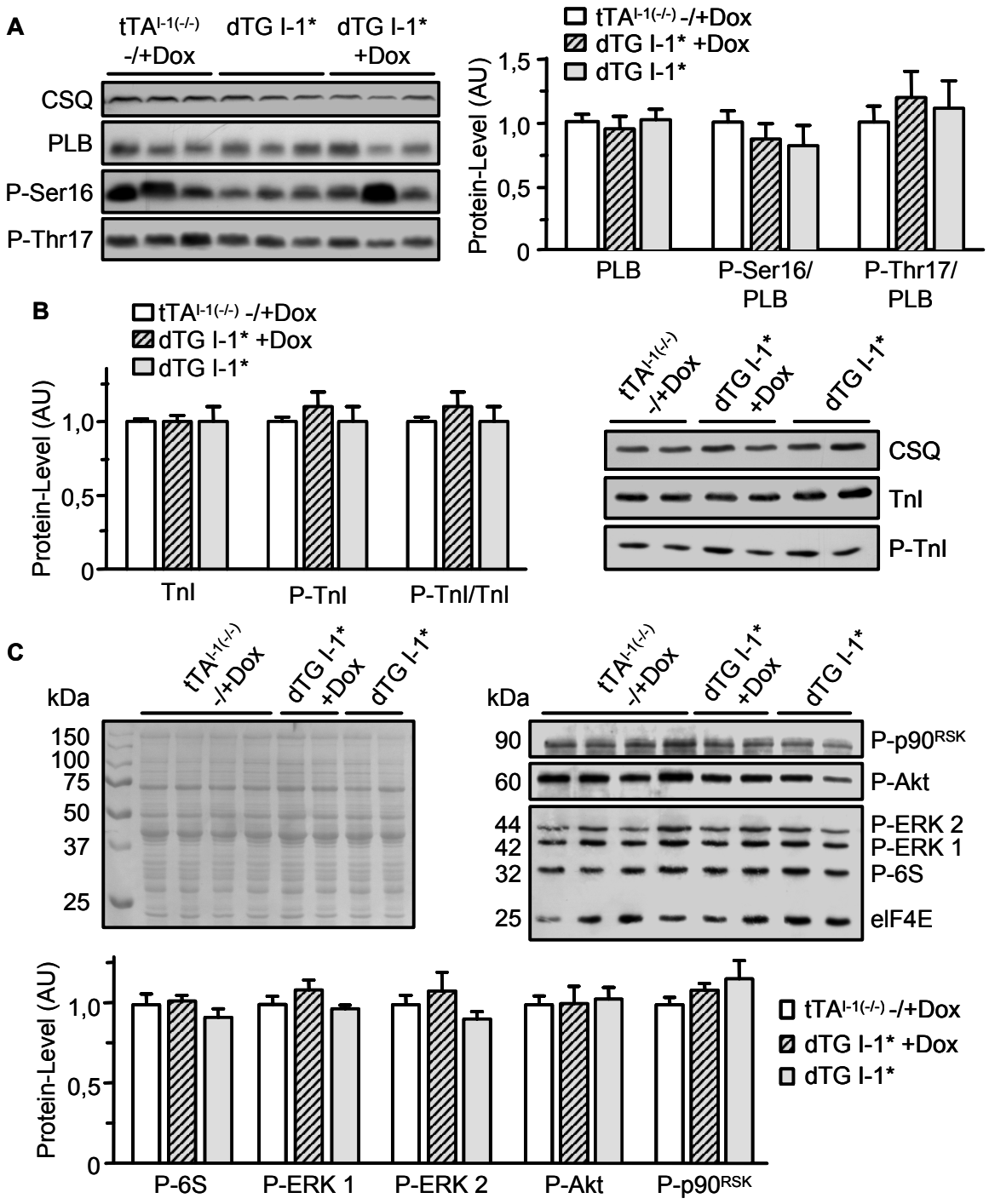


Abb. 3.45 Immunologischer Nachweis der Phosphorylierung von PLB, TnI, p90^{RSK}, Akt, ERK 1/2 und S6-ribosomaler Proteinkinase. Dargestellt sind die Phosphorylierungen von (A) PLB an Serin 16 und Threonin 17 und (B) TnI nach Normalisierung auf CSQ sowie (C) p90^{RSK}, Akt ERK 1/2 und S6-ribosomaler Proteinkinase nach Normalisierung auf die Ponceau-Färbung (links dargestellt; n=12 für tTA$^{I-1(-/-)}$ -/+Dox bzw. n=7 für dTG I-1* und dTG I-1* +Dox).

Auch in der I-1* Linie sprechen die vorläufigen Befunde, insbesondere die starke Abnahme der kardialen Kontraktilität, für einen ungünstigen Einfluss von I-1* unter pathologischem β-adrenergen Stress. Insgesamt war der Phänotyp schwächer ausgeprägt als in der I-1c Linie.

3.10 Langzeitfolgen einer Inhibitor-1 Überexpression

Die Langzeitexpression von Komponenten der β-adrenergen Signalkaskade in Mausmodellen führte oftmals zu einer starken kardialen Dysfunktion (Übersicht in El-Armouche und Eschenhagen 2008). In jungen Tieren war die I-1* bzw. I-1c Expression mit einem gesunden Phänotyp und einer verbesserten kardialen Funktion assoziiert. Doch was sind die Langzeitfolgen? Hierzu wurde die Herzfunktion von dTG I-1 * Tieren im Alter von 10 und 15 Monaten sowie dTG I-1c Tieren im Alter von 16, 18 und 20 Monaten echokardiographisch untersucht.

Bereits in einem Alter von zehn Monaten konnte in der dTG I-1* Linie eine starke Tendenz zu einer verminderten Kontraktilität im Vergleich zu $tTA^{I-1(-/-)}$ Geschwistertieren beobachtet werden (Abb. 3.46 A). Im weiteren Zeitverlauf setzte sich die Abnahme der Kontraktilität weiter fort und führte letztlich im Alter von 15 Monaten zu einer Abnahme von 23% (±2,6) im Vergleich zu 5% (±4,3) in den Kontrollen. Wie aus Abbildung 3.46 B ersichtlich, wurde der starke Kontraktilitätsverlust von einer erhöhten Dilatation begleitet (Zunahme LVEDD in % vom 10.-15. Monat: $tTA^{I-1(-/-)}$: 2,4±0,9 vs. dTG I-1*: 6,4±0,4*, *$p<0,05$).

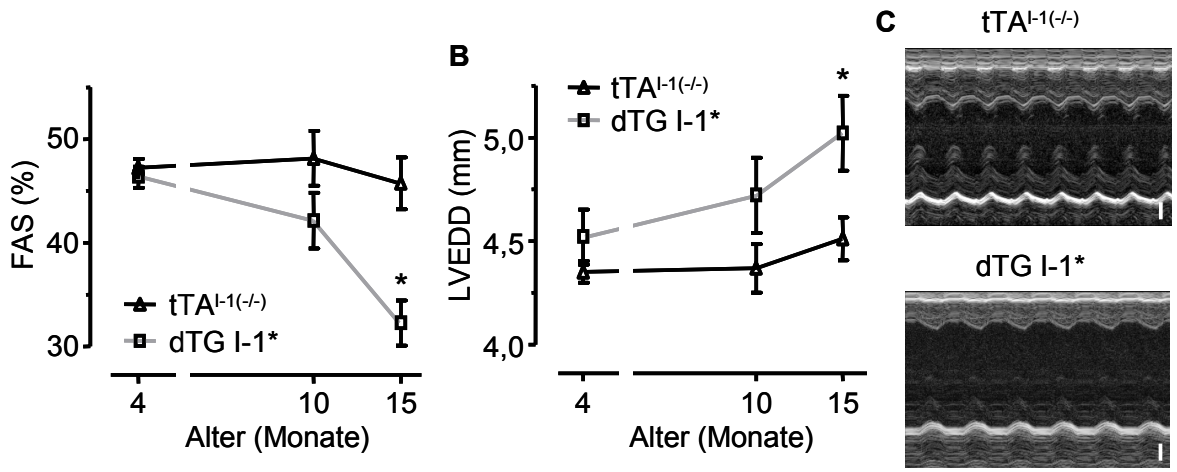
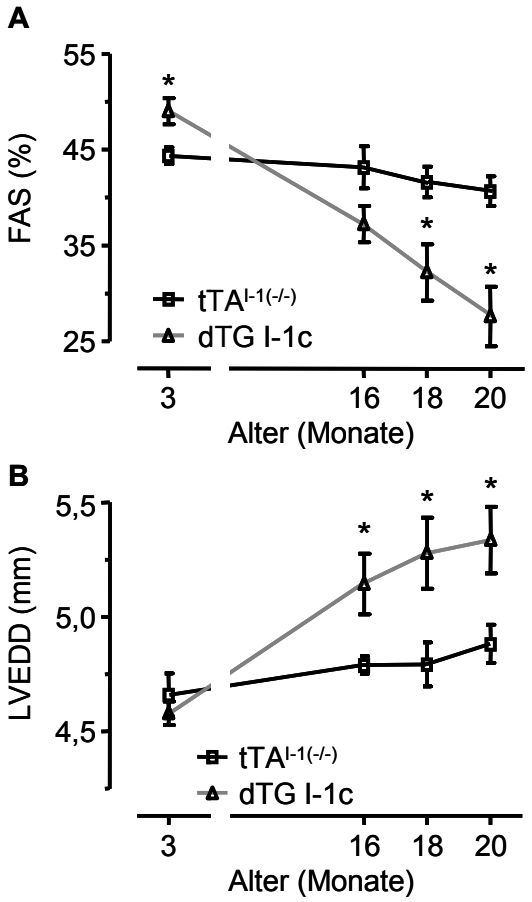


Abb. 3.46 Echokardiographische Parameter nach Langzeitexpression von I-1*. Dargestellt ist (A) die linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion (FAS), (B) der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) sowie (C) repräsentative M-Mode Aufnahmen, die durch die akinetische Vorder- bzw. Hinterwand und den vergrößerten Durchmesser den Phänotyp verdeutlichen (Skalierung: 1 mm; n≥5). *p<0,05 vs. tTA$^{I-1(-/-)}$; #p<0,05 15 Monate vs. 10 Monate.

Die echokardiographischen Daten der dTG I-1c Linie zeigten in einem Alter von 16 Monaten eine tendenziell eingeschränkte Kontraktilität gegenüber den tTA$^{I-1(-/-)}$ Kontrollen (Abb. 3.47 A). Im weiteren Zeitverlauf führte die I-1c Expression zu einem progressiven Kontraktilitätsverlust (Abnahme FAS in % vom 16.-20. Monat: tTA$^{I-1(-/-)}$: 5,3±1,6 vs. dTG I-1c: 26,3±8,9*; *p<0,05). Eine starke I-1c-induzierte Dilatation war bereits im Alter von 16 Monaten ersichtlich und nahm im weiteren Verlauf vergleichbar mit der tTA$^{I-1(-/-)}$ Linie zu (Anstieg LVEDD in % vom 16.-20. Monat: tTA$^{I-1(-/-)}$: 2,2±1,7 vs. dTG I-1c: 3,4±4,6; Abb. 3.47 B). Für beide Linien sind weitere Messparameter im Anhang in Tab. 11.37 bzw. 11.38 dargestellt.



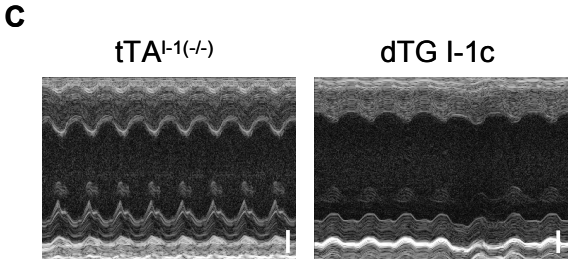


Abb. 3.47 Echokardiographische Analyse einer Langzeitexpression von I-1c. (A) Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion (FAS) sowie (B) linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser im Zeitverlauf von dTG I-1c Tieren gegenüber tTA$^{I-1(-/-)}$ Kontrollen. (C) Die repräsentative M-Mode Aufnahme unterlegt den starken Kontraktilitätsverlust (Skalierung: 1 mm; n≥5). *p<0,05 vs. tTA$^{I-1(-/-)}$.

4 Diskussion

4.1 Rationale und Hauptergebnisse

Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein dynamischer, reversibler Prozess der Proteinmodifikation assoziiert mit der Regulation zellulärer Prozesse. Im Herzen erfolgt die Feinregulation des Ca^{2+}-*Cyclings* und der Kontraktilität durch ein Gleichgewicht von Kinasen und Phosphatasen in Abhängigkeit von verschiedenen sekundären Botenstoffen. Durch die Aktivierung des β-adrenergen/cAMP/Proteinkinase A (PKA)-Systems kann das menschliche Herz in Stress-Situationen die kardiale Auswurfleistung innerhalb von Sekunden um das Fünffache steigern.

Eine charakteristische Veränderung des insuffizienten Herzens und der einzelnen Herzmuskelzelle ist die β-adrenerge Desensitivierung (Bristow et al. 1982, Harding et al. 1991). Sie ist unter anderem mit der Herunterregulation der β_1-Adrenozeptoren (Bristow et al. 1982) und mit einer Dysregulation von Effektoren der Phosphorylierung, insbesondere von Regulatorproteinen der Ca^{2+}-Homöostase, assoziiert. Diese Modifikationen sind am sarkoplasmatischen Retikulum (SR) besonders stark ausgeprägt. So trägt beispielsweise eine verminderte Phosphorylierung des zentralen Regulatorproteins Phospholamban (PLB) zu dem für die Herzinsuffizienz charakteristischen Relaxationsdefizit bei. Die Folgen sind u. a. eine verringerte diastolische SR Ca^{2+}-Aufnahme, so dass die SR Ca^{2+}-Beladung sinkt und die diastolische zytosolische Ca^{2+}-Konzentration steigt. Langfristig trägt dies zur kontraktilen Dysfunktion mit limitierter kontraktiler Reserve und zum Entstehen von Arrhythmien bei.

Die Tatsache, dass Inhibitor-1 (I-1) im menschlichen insuffizienten Herz stark herunterreguliert ist, impliziert, dass I-1 therapeutisch, im Hinblick auf die seit langem offen diskutierte Frage der Desensitivierung oder Resensitivierung in der Herzinsuffizienz, äußerst interessant sein könnte. Zusätzlich ist I-1 als Regulator der Typ-1 Phosphatase (PP1) und als PKA-abhängiges, distales Element der β-adrenergen Signalkaskade in besonderer Weise in das Kinase-/Phosphatase-Ungleichgewicht der Herzinsuffizienz involviert.

Zu Beginn dieser Arbeit waren weder die prinzipielle Rolle noch die Konsequenzen einer Modulation der kardialen I-1 Proteinmenge bzw. I-1 Phosphorylierung *in vivo* bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, (i) die physiologischen und molekularen Konsequenzen einer I-1 Modulation *in vivo* zu untersuchen, (ii) die Rolle von I-1 unter pathophysiologischen Bedingungen als ungünstiges oder günstiges Element der β-adrenergen Signalkaskade zu definieren und darüber hinaus (iii) I-1 als potentielles Zielprotein in der Therapie der Herzinsuffizienz zu bewerten.

Hierzu wurden zunächst zwei konditionale, doppelt-transgene Mausmodelle, im genetischen Hintergrund einer homozygoten I-1 Deletion, mit herzspezifischer Expression (Tet-Off System) von phosphospezifisch mutierten I-1 Formen generiert. Dieses Modell ermöglichte eine sorgfältige Analyse der I-1 Ursache-Wirkungsbeziehung unter Umgehung von phosphorylierungsabhängigen (PKCα/Calcineurin) Gegenregulationen innerhalb des I-1 Proteins.

Folgende Eingangsüberlegungen standen dabei im Vordergrund: Braz et al. (2004) konnten zeigen, dass Proteinkinase Cα (PKCα) KO Mäuse einen hyperkontraktilen Phänotyp bei gleichzeitig erhöhter PLB Serin 16 Phosphorylierung aufweisen. Weitere Elemente der β-adrenergen Signalkaskade sowie die PKA Aktivität waren unverändert, so dass die erhöhte PLB Phosphorylierung wahrscheinlich auf die erniedrigte PP1-Aktivität, hervorgerufen durch eine gesteigerte I-1 Aktivität, zurückzuführen war. Da die PKCα-abhängige I-1 Phosphorylierung den funktionell gegensinnigen Effekt einer PKA Phosphorylierung ausübt und sie insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen eine große Rolle spielt, wurde ihr Einfluss durch folgende herbeigeführte Mutationen ausgeschlossen. In der S67A Mutante (I-1*) wurde die Serin 67 Phosphorylierungsstelle gegen „nicht-phosphorylierbares“ Alanin substituiert. Dadurch blieben die PKA-/Calcineurin-abhängige Aktivierung bzw. Deaktivierung erhalten, bei gleichzeitigem Ausschluss einer PKCα-abhängigen Aktivitätsminderung, so dass die S67A Mutante im Vergleich zum endogenen I-1 „superaktiv“ sein sollte. In dem weiteren Modell wurde durch den Austausch von Threonin 35 gegen die phosphomimetische Aminosäure Aspartat und die

gleichzeitige Verkürzung auf 65 Aminosäuren eine nicht-regulierbare, konstitutiv aktive I-1 Form generiert (I-1-T35D; I-1c). Die Verkürzung an sich stellte eine Notwendigkeit dar, um die I-1 Aktivität zu gewährleisten (Endo et al. 1996), und führte ebenfalls zu einer PKCα-unabhängigen Aktivität. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Voruntersuchungen (siehe Abb. 3.4) sowie bereits publizierte Daten (Endo et al. 1996) zeigten für die T35D Mutante eine verminderte Potenz im Vergleich zum Wildtyp I-1. Ein direkter Rückschluss auf die *in vivo* Situation war aufgrund eines erhöhten Expressionsniveaus im Vergleich zur endogenen I-1 Expression nicht möglich.

Folgende Hauptergebnisse wurden erzielt und werden anschließend diskutiert: Im Alter von drei Monaten zeigten beide I-1 Mutanten (I-1-S67A und I-1-T35D) einen hyperkontraktilen Phänotyp. Des Weiteren war die I-1 Expression mit einem erhöhten Risiko für Katecholamin-/Stress-induzierte Arrhythmien verbunden. Unter der Bedingung einer chronischen Isoprenalininfusion und im Alterungsprozess war die Expression von I-1 mit einer kardialen Dysfunktion assoziiert, so dass I-1 als ein ungünstiges Element der β-adrenergen Signalkaskade demaskiert werden konnte. Die Herzen der beiden I-1 Mutanten zeigten unter basalen Bedingungen eine Hyperphosphorylierung des SR Ca^{2+}-ATPase-Inhibitors PLB und des SR Ca^{2+}-Freisetzungskanals (RyR2). Diese Veränderungen könnten einerseits den hyperkontraktilen Phänotyp und andererseits über ein erhöhtes diastolisches SR Ca^{2+}-Leck die gesteigerte Arrhythmieneigung erklären. In der Tat konnte in diesem Zusammenhang eine vermehrte diastolische Ca^{2+}-Spark-Frequenz in isolierten Kardiomyozyten beider Mutanten nachgewiesen werden.

4.2 Methodische Aspekte: Responderkonstrukte und das Tet-Off Maus-Modell

Die Verwendung des Tet-Off Systems ermöglicht *in vivo* eine konditionelle, gewebespezifische Regulation der Transgenexpression (Furth et al. 1994, Kistner et al. 1996). Anders als bei konventionellen Mausmodellen können Phänotyp und Genotyp aufgrund der Doxycyclin-abhängigen Regulation in direkten Zusammenhang gebracht werden.

In vitro Expression und Aktivität der Responderkonstrukte

Die zur Generierung der beiden I-1 Mauslinien verwendeten Responderkonstrukte enthielten den jeweiligen mutierten I-1 unter der Kontrolle eines tTA-sensitiven Promoters. *In vitro* Expressionsanalysen bestätigten eine stringente tTA- und Doxycyclin-abhängige Expression der jeweiligen I-1 Form. Ein prinzipieller Einfluss der C-terminalen c-myc-Markierung auf die Expression konnte folglich ausgeschlossen werden.

Die biologische Aktivität der korrespondierenden rekombinanten Proteine wurde *in vitro* mittels Phosphatase-Assay bestätigt. Überraschend war jedoch der aktivitätssteigernde Effekt einer PKA-Inkubation auf die konstitutiv aktive Mutante (siehe Abb. 3.4). Eine mögliche Erklärung wäre eine weitere, unidentifizierte PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle, die durch Phosphorylierung die inhibitorische Aktivität von I-1 beeinflusst. Dies könnte beim Wildtyp I-1 (Kontrolle) und der I-1-S67A Mutante, verglichen mit der dort aktiven Phosphorylierungsstelle (Threonin 35), einen nicht messbaren oder untergeordneten Effekt ausüben. Tatsächlich fanden wir mit Hilfe eines Prädiktionsprogrammes von Phosphorylierungswahrscheinlichkeiten (NetPhosK 2.0, *Center for Biological Sequenceanalysis, Technical University Denmark;* Blom et al. 2004) eine potentielle PKA Phosphorylierungsstelle an Serin 58 mit folgendem PKA Konsensusmotiv: R-X_2-pS/pT (Kennelly und Krebs 1991, Pearson und Kemp 1991). Die mögliche PKA Phosphorylierungsstelle stellt zwar einen interessanten Aspekt dar, müsste aber in weiteren Untersuchungen zunächst verifiziert werden. Die potentielle *in vivo* Bedeutung müsste dann gezielt evaluiert werden, welches aber nicht Fokus dieser Arbeit war.

Vergleicht man die inhibitorische Potenz der drei Konstrukte mit PKA-Zusatz, d.h. unter absolut identischen Bedingungen, so stimmen die Werte mit der Literatur überein (Endo et al. 1996, El-Armouche et al. 2003). Zudem wurde die T35D Mutante sequenziert und im Western Blot mittels phosphospezifischem Antikörper eine PKA-abhängige Phosphorylierung an Threonin 35 ausgeschlossen. Das Ziel, den Einfluss einer PKA-abhängigen Phosphorylierung an Threonin 35 zu eliminieren, wurde somit erreicht.

Die Identifizierung von einem Founder

Die Identifizierung von einem Founder pro Pronukleusinjektion, aus 81 (S67A Mutante) bzw. 52 (T35D Mutante) Tieren, lag unter der statistisch zu erwartenden Rate von 10-15% (Auerbach 2004). Dies kann mehrere Ursachen haben. So ist die Effizienz der Transgen-Integration von dem genetischen Hintergrund der Tiere, der DNA-Reinheit und –Konzentration abhängig. Auch die zufällige Integration in wichtige Genabschnitte kann zum Absterben der Zygote führen. Ein Einfluss durch den genetischen Hintergrund war unwahrscheinlich. In Übereinstimmung mit publizierten Daten wurde der für seine hohe Effizienz bekannte FVB/N Hintergrund verwendet (Auberbach et al. 2003). Eine Verunreinigung der DNA durch Ethidiumbromid und insbesondere bakterielle Endotoxine wurde durch die spezielle Aufreinigung der DNA (siehe 2.1.1) nahezu ausgeschlossen. Ein Grund könnte tatsächlich die injizierte DNA-Menge sein. Dabei scheint eine inverse Korrelation zwischen DNA-Konzentration und Integrationseffizienz zu bestehen (Auerbach 2004). In unserem Fall könnte die injizierte DNA-Konzentration zur niedrigen Integrationseffizienz beigetragen haben. Trotz einer sehr niedrigen und daher schwer messbaren Injektionsmenge (1-5 ng/µl DNA), wurden wahrscheinlich aufgrund der geringen Konstruktgröße (0,8 bzw. 1,1 kb) verhältnismäßig viele DNA-Moleküle in den Pronukleus transferiert. Diese bildeten möglicherweise zu große Konkatamere und konnten somit nicht stabil ins Genom integrieren (Brinster et al. 1981, Gordon und Ruddle 1985).

Die Charakterisierung von zwei tTA-exprimierenden Linien

Für die herzspezifische tTA Expression standen uns zwei Mauslinien zur Verfügung (Passman und Fishman 1994, *Jackson Laboratory Animals:* 003170, $tTA_{Fishman}$; Sanbe et al. 2003, $tTA_{Robbins}$). Um Aufschluss über das tTA Expressionsmuster dieser beiden Linien zu erhalten, wurden sie mit einer bidirektionalen Reportermauslinie (GFP/LacZ; Krestel et al. 2001) gekreuzt. Dabei zeigten beide Linien in den Vorhöfen eine starke und homogene tTA Expression. Im Ventrikel hingegen differierte das Expressionsmuster enorm mit einer akzeptablen, homogenen Expression in der $tTA_{Fishman}$ Linie und schwacher, mosaikförmiger Expression in den $tTA_{Robbins}$ Mäusen.

Die zwei Transaktivatorlinien exprimieren das gleiche tTA Fusionsprotein (TetR/VP16), so dass Unterschiede aufgrund von Veränderungen der VP16 Transaktivatorsequenz ausgeschlossen werden können. Ein entscheidender Unterschied liegt allerdings im Promoter, der in einem Falle ein verkürzter αMHC-Promoter der Ratte (Passman und Fishman 1994) und im anderen Falle ein ungekürzter αMHC-Promoter der Maus (Sanbe et al. 2003) ist. Dies könnte unterschiedliche tTA Expressionsmengen zur Folge haben. Ein direkter Nachweis der jeweiligen tTA Expression mittels Western Blot wurde nicht durchgeführt, da bereits für beide Linien beschrieben wurde, dass eine Detektion nicht möglich war. Interessanterweise konnten Sanbe et al. (2003) eindrucksvoll zeigen, dass eine erhöhte tTA Expression aufgrund eines mutierten tTA Polypeptids zu einem letalen Phänotyp führte. Das spricht insgesamt für eine enge Konzentrations-Wirkungsbeziehung des tTA Proteins. Die geringen tTA Mengen sind zwar einerseits ausreichend, um die Transgenexpression zu induzieren, können andererseits aber auch in den ungefärbten Zellen möglicherweise unterhalb der benötigten wirksamen Konzentration liegen. Eine Induktion des tTA-sensitiven Promoters wäre dann nicht möglich. Tatsächlich wurde das Phänomen einer mosaikförmigen Transgenexpression auch bei Verwendung des Tet-Systems (Furth et al. 1994, Hennighausen et al. 1995, Mayford et al. 1996, Yu et al. 1996, Redfern et al. 1999) im Zusammenhang mit unterschiedlichen intrazellulären tTA Konzentrationen diskutiert.

Weitere Gründe für die unterschiedliche Genexpression könnten (i) Positionseffekte, (ii) die integrierte Kopienzahl und (iii) lokale Veränderungen der Promoteraktivität durch Methylierungen sein (Dobie et al. 1997, Böger und Gruss 1999). Diese Einflüsse sind typisch für die Generierung transgener Tiere mittels Pronukleusinjektion und somit nicht steuerbar bzw. nicht abhängig vom verwendeten Promoter. Somit könnte jeder Founder ein anderes Expressionsmuster hervorrufen.

Auffällig war zunächst die ausgeprägte Diskrepanz der Blaufärbung zwischen den Vorhöfen und den Ventrikeln der $tTA_{Robbins}$ Mäuse. Die transkriptionelle Aktivität des murinen αMHC-Promoters ist bereits während der Embryogense vorhanden. Zu diesem Zeitpunkt ist sie allerdings sehr gering und auf die Vorhöfe beschränkt.

Erst unmittelbar nach der Geburt wird die Promoteraktivität in den Ventrikeln verstärkt (Gulick et al. 1991, Subramaniam et al. 1991). Vor diesem Hintergrund würde man zu dem Zeitpunkt der Herzentnahme (Alter neun Wochen) eine gleiche Expression in beiden Herzregionen erwarten, wie es auch für die $tTA_{Fishman}$ Linie gezeigt werden konnte. Die hier beobachteten Unterschiede zwischen Vorhöfen und Ventrikeln könnten bedeuten, dass die ventrikuläre αMHC-Promoteraktivität in der $tTA_{Robbins}$ Linie nach Geburt nicht genügend induziert wird. Somit könnte eine von vorneherein höhere atriale tTA Menge den Unterschied gegenüber der schwachen ventrikulären Expression erklären, wobei gerade diese für das weitere Vorgehen ausschlaggebend war. Allerdings beschreibt das hier beobachtete Phänomen eine Problematik, die im Zusammenhang mit konventionellen transgenen Mausmodellen bei Verwendung des murinen αMHC-Promoters bekannt ist. So war beispielsweise die kardiale Überexpression des Angiotensin (AT) 1-Rezeptors postnatal unter anderem mit einer massiven Vergrößerung der Vorhöfe assoziiert, bei unveränderter Morphologie der Ventrikel bzw. ventrikulären Kardiomyozyten (Hein et al. 1997). Die Autoren begründeten dies mit der unverhältnismäßig starken atrialen Transgenexpression während der Embryogenese.

Erstaunlicherweise werden beide Systeme jedoch gleich häufig zur herzspezifischen, induzierbaren Transgenexpression eingesetzt (Gao et al. 2002, Shiojima et al. 2005, Burkard et al. 2007, Yano et al. 2008, Gellen et al. 2008). Wir verwendeten konsequenterweise die $tTA_{Fishman}$ Linie zur Generierung der doppelt-transgenen I-1 Mutanten.

Es muss jedoch erwähnt werden, dass wir in diesem Experiment nur die tTA Linie des veränderten Tet-Off Systems untersuchten. Neben dem αMHC-Promoter im Transaktivatorarm veränderten Sanbe et al. (2003) auch den Responderarm. Das Zielgen steht neben dem tTA-abhängigen Promoter (TetO) unter Kontrolle eines modifizierten murinen αMHC-Promoters. Aus unserer Sicht ist es jedoch schwer vorstellbar, dass die Kombination mit dem entsprechenden Responder ein anderes Expressionsmuster hervorrufen würde.

Induzierbare und zeitlich regulierbare I-1 Expression

Wie erwartet, zeigten beide Linien eine herzspezifische Transgenexpression. Die Quantifizierung der mRNA-Transkripte ergab mit ~8- bzw. 24-facher Expression über dem endogenen I-1 eine moderate Überexpression. Dies war in unserem Sinne, da eine unphysiologische Überexpression oftmals in konventionellen Mausmodellen zu einer Genotyp-unabhängigen mechanistischen Antwort führt. In β_2-Transgenen konnte eine phänotypische Abhängigkeit der Gendosis eindrucksvoll gezeigt werden (Liggett et al. 2000).

Aus der Literatur ist auch bekannt, dass die Überexpression einiger regulatorischer Untereinheiten der PP1 mit einer kompensatorischen Zunahme der PP1 Menge und Aktivität assoziiert war. Dies wurde beispielsweise für die Glykogen-bindende Untereinheit, für I-2 und I-1 gezeigt, wobei in der I-1 Linie eine sehr hohe Transgenexpression (~200-fach) nachgewiesen wurde (Aschenbach et al. 2001, Kirchhefer et al. 2005, Yamada et al. 2006, El-Armouche et al. 2008; siehe Diskussionspunkt 4.4). *Vica Versa* war in unserem Modell eine physiologische PP1 Konzentration nachweisbar, wahrscheinlich aufgrund der moderaten Transgenexpression. Auch die β-Adrenozeptorendichte als prominentestes Element der β-adrenergen Signalkaskade war unverändert.

Ein wichtiger Faktor, der die Anwendung des Tet-Systems limitiert, ist eine basale Expression im nicht-induzierten Zustand (Fussenegger 2001, Link et al. 2001). In der Tat erhielten wir in einer Linie (T35D Mutante) Hinweise auf eine transkriptionelle Restaktivität des tTA-sensitiven Promoters (siehe 3.4.2). Interessanterweise war diese nur mit der sensitiven und spezifischen TaqMan®-Methode, ausschließlich für die konstitutiv aktive Mutante, nachweisbar. Die RNA beider Linien wurde zeitgleich und methodisch identisch aufgearbeitet, um technische Artefakte, wie eine genomische DNA-Kontamination, veränderte PCR-Bedingungen und Unterschiede in der Amplifikationseffizienz, auszuschließen. Die basale Restaktivität scheint jedoch so gering zu sein, dass sie unter der Nachweisgrenze für die nicht-quantitative PCR lag. Entscheidend war die Proteinexpression. Erfreulicherweise war die gebildete mRNA-Konzentration im

nicht-induzierten Zustand so gering, dass auf Proteinebene keine Detektion erfolgte. Eine funktionelle Auswirkung war somit unwahrscheinlich bzw. vernachlässigbar gering und das System konnte im Rahmen dieser Arbeit uneingeschränkt genutzt werden.

In Übereinstimmung mit der Literatur (Bockamp et al. 2002) zeigten Expressionskinetikstudien der beiden I-1 Mutanten eine in Abhängigkeit von Doxycyclin sehr schnelle und vollständige Transgenrepression. Im umgekehrten Fall war eine Induktion erst nach einem mehrwöchigen Doxycyclinentzug möglich. Dieses Phänomen war mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine niedrige Doxycyclin Clearance zurückzuführen.

Die Substanz zeichnet sich durch eine hohe Lipophilie aus. Hierdurch werden ein hohes Verteilungsvolumen, eine tiefe Gewebepenetration und ein langwieriger Verbleib im Organismus erreicht. Zusätzlich lagert sich Doxycyclin durch eine ausgeprägte Bildung Ca^{2+}-stabiler Chelatkomplexe in die Mineralisierungszone knochenbildender Gewebe und in die Zähne ein (Aktories et al. 2008; Lehrbuch der allgemeinen Pharmakologie und Toxikologie).

Die Reversibilität des Modells wird vielfach genutzt, um Transgen-bedingte phänotypische Auswirkungen während der Embryogenese, insbesondere letaler Art, zu verhindern (Mungrue et al. 2002, Funakoshi et al. 2006). Die kontinuierliche Applikation während der Embryonalphase führt allerdings zur Bildung von Wirkstoffdepots, aus denen Doxycyclin nur langsam ausgewaschen wird (siehe oben). Insbesondere die fehlende Blut-Hirn-Schranke in frühen Phasen der Embryonalentwicklung ist mit einer cerebralen Speicherung assoziiert. Die Blut-Hirn-Schranke in späteren Phasen der Embryogenese lässt Doxycyclin folglich nur langsam herausdiffundieren. Trotz seiner Lipophilie konnte gezeigt werden, dass Doxycyclin tatsächlich die Blut-Hirn-Schranke schwer passiert (Riond und Riviere 1988; Hillen und Berens 2002). Die Problematik der langwierigen Induktion wurde schon mehrfach als Nachteil des Tet-Off Systems beschrieben (Yu et al. 1996, A-Mohammadi et al. 1997).

In unserem Modell war die embryonale I-1 Expression weder letal noch mit Anzeichen einer Herzhypertrophie im juvenilen Alter assoziiert. Die Bestimmungen erfolgten auf Organebene und auf molekularer Ebene durch Messung des sensitiven Hypertrophiemarkers ANP. Deswegen waren wir in der Lage, die bereits diskutierten negativen Effekte der chronischen Doxycyclinapplikation zu umgehen, indem die Tiere im *On-State* geboren wurden. Lange Induktionszeiträume und variable Expressionsstärken innerhalb der Versuchsgruppe konnten somit vermieden werden. In unserem Studiendesign wurde die I-1 Expression sehr schnell in Abhängigkeit der entsprechenden Intervention inhibiert, so dass als Konsequenz der Genotyp-induzierte Phänotyp zeitnah verschwand (siehe Diskussionspunkte: Arrhythmien und chronische β-adrenerge Stimulation).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass transgene Mauslinien generiert wurden, die tTA-abhängig und herzspezifisch beide I-1 Formen exprimierten. Auch wenn das Tet-Off System geringe Schwachstellen aufweist, so hat es insgesamt sehr überzeugt. Insbesondere die Reversibilität der Transgenexpression war hier von unschätzbarem Vorteil, um die Aussagen über die (patho)physiologischen Funktionen von I-1 zu unterstreichen. Von Nachteil war der enorme Zeitaufwand, dieses Mausmodell zu generieren und etablieren und die für jede Linie individuelle Charakterisierung der Expressionskinetik.

4.3 Die Hauptergebnisse

Die tTA Transgenen als Kontrollen

In der Literatur wird beschrieben, dass die herzspezifische tTA Expression an sich die kardiale Morphologie und Funktion beeinflusst und somit zu einem milden kardialen Phänotyp führt (McCloskey et al. 2005). Auch eigene Daten (siehe Anhang, Tab. 11.39-41) bestätigten den Einfluss von tTA auf morphologische und funktionelle Parameter in den tTA Kontrollen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen und einfach-transgenen I-1 Geschwistertieren. Alle Untersuchungen wurden stets im Vergleich zu einfach-transgenen tTA Tieren durchgeführt. Generell handelte es sich hierbei immer um gleichaltrige und –geschlechtliche Geschwistertiere und

folglich Tiere mit gleichem genetischen Hintergrund (mindestens fünf Rückkreuzungen des ursprünglichen FVB/N Hintergrundes auf den C57BL/6J Hintergrund). Des Weiteren konnte in unseren Experimenten kein systemischer Effekt von Doxycyclin auf die Herzmorphologie, -funktion und molekulare Parameter beobachtet werden (siehe Anhang).

Verschieden starke Expressionen und Aktivitäten sowie das Fehlen des C-Terminus in der T35D Mutante mit möglicherweise veränderter Kompartimentierung, ließen einen direkten Vergleich der Mutanten nicht sinnvoll erscheinen. Des Weiteren war ein Vergleich auch nicht Ziel dieser Arbeit. Vielmehr sollte die grundlegende Rolle von I-1 unter Ausschluss seiner verschiedenen Regulationsmechanismen individuell evaluiert werden.

Inhibitor-1 führte in jungen Tieren zu einer verbesserten kardialen Funktion

In vitro Untersuchungen von Carr et al. (2002) und El-Armouche et al. (2003) zeigten, dass I-1 im Sinne seines postulierten Mechanismus (Neumann et al. 1991) als positives Rückkopplungselement der β-adrenergen Signalkaskade fungiert. Dies führte uns zur Hypothese, dass I-1 auch *in vivo* als positiv inotropes und lusitropes Element wirken könnte. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von I-1, unabhängig von der herbeigeführten Mutation, im juvenilen Alter mit einer verbesserten systolischen und diastolischen Herzfunktion assoziiert war, bei gleichzeitig unveränderter Herzmorphologie. Dieser Phänotyp einer verbesserten kardialen Funktion war in Einklang mit Daten anderer Mausmodelle. So führte die Überaktivität der β_1- bzw. β_2-Adrenozeptoren, Gαs oder der SERCA2a ebenfalls zu einer gesteigerten Kontraktilität (Luo et al. 1994, Milano et al. 1994, Gaudin et al. 1995, Engelhardt et al. 1999, Liggett et al. 2000).

Die zur Aufklärung des Phänotyps durchgeführten funktionellen Untersuchungen erfolgten durch Echokardiographie und invasive Hämodynamik. Mittels letztgenannter Methode konnte für beide Mutanten eine verbesserte kardiale Funktion nachgewiesen werden. Die konstitutiv aktive Mutante zeigte bereits in

der echokardiographischen Untersuchung eine gesteigerte Kontraktilität. Die Doxycyclin-abhängige Reversibilität der Hyperkontraktilität impliziert eine Gendosis-Wirkungsbeziehung. Die Tatsache, dass der Phänotyp für die S67A Mutante ausschließlich mittels hämodynamischer Messungen nachweisbar war, kann folgenderweise diskutiert werden. Die invasive Hämodynamik stellt im Vergleich zur Echokardiographie die deutlich sensitivere Methode dar (Georgakopoulos et al. 1998, Pacher et al. 2008). Zusätzlich könnten aber auch das höhere Expressionsniveau (24 vs. 8-fach) sowie das Fehlen des C-Terminus in der konstitutiv aktiven Mutante dafür verantwortlich gewesen sein.

Die Kontraktilität hängt entscheidend von der Herzfrequenz ab, und nur bei einer vergleichbaren Herzfrequenz ist eine zuverlässige Aussage über die Kontraktilität möglich (Kass et al. 1998). Beide Mutanten zeigten sowohl in den echokardiographischen Messungen als auch in der invasiven Hämodynamik vergleichbare Herzfrequenzen gegenüber den Kontrollen. Zusätzlich wurden durch eine milde inhalative Isoflurannarkose annähernd physiologische Herzfrequenzwerte von 480-600 Schlägen pro Minute erreicht (Pacher et al. 2008), so dass es sich bei den erhöhten Kontraktilitätsparametern um echte Effekte handelte. Dies spricht gegen einen Einfluss der I-1 Expression auf die Herzfrequenz und tatsächlich konnte dies auch durch die *in vivo* EKG-Telemetriemessungen bestätigt werden (siehe Anhang, Tab. 11.17). Das wurde auch nicht erwartet, da I-1 mechanistisch unterhalb der kardialen cAMP-abhängigen „Schrittmacher“-Kanäle eingreift (Kaupp und Seifert 2002). Die Überaktivität der β_1-Adrenozeptoren und von Gαs, oberhalb von cAMP, war in den entsprechenden Transgenen, neben der veränderten Kontraktilität, auch mit einer erhöhten Herzfrequenz assoziiert (Iwase et al. 1997, Engelhardt et al. 1999). Die PKA Expression, unterhalb von cAMP, führte im Mausmodell als Folge eines starken Kontraktilitätsverlustes im Alter von acht Wochen zu einer Abnahme der Herzfrequenz im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus (Antos et al. 2001).

Des Weiteren besteht eine positive Korrelation zwischen Kontraktilität und Vorlast im Sinne des Frank-Starling-Mechanismus. Zusätzlich zeigen systolische Funktion und Nachlast eine gleichsinnige Abhängigkeit. Eine erhöhte Kontraktilität aufgrund

einer erhöhten Vor- bzw. Nachlast konnte ausgeschlossen werden, da in dieser Studie beide Parameter in den I-1 Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen unverändert oder sogar tendenziell erniedrigt waren.

Mechanistische Aspekte der Hyperkontraktilität

In Übereinstimmung mit den bereits erwähnten *in vitro* Daten (Carr et al. 2002, El-Armouche et al. 2003) vermittelt I-1 auch *in vivo* mit großer Wahrscheinlichkeit seine positiv inotrope und lusitrope Wirkung primär über eine gesteigerte PLB Phosphorylierung. In dieser Arbeit konnte tatsächlich für beide I-1 Mutanten eine gesteigerte Phosphorylierung von PLB Serin 16 nachgewiesen werden, während die PLB Threonin 17 Phosphorylierung unbeeinflusst war.

Dieser selektive Einfluss von I-1 auf die PLB Serin 16 dephosphorylierende PP1c war überraschend. Zumal *in vitro* Untersuchungen belegten, dass PLB Serin 16 und Threonin 17 zu ~70% durch die PP1c dephosphoryliert wurden (MacDougall et al. 1991). Zwei potentielle Erklärungen sind denkbar, die zur präferentiellen PLB Serin 16 Phosphorylierung führen könnten: (i) I-1 inhibiert ausschließlich das für die PLB Serin 16 Dephosphorylierung verantwortliche PP1 Holoenzym oder (ii) die PP1c dephosphoryliert doch, entgegen der *in vitro* Untersuchungen, primär PLB Serin 16. Transgene Mausmodelle favorisieren den letzteren Mechanismus. So zeigten PP1 Transgene eine selektiv an Serin 16 verminderte PLB Phosphorylierung (Carr et al. 2002) und I-2-(ebenfalls selektiver PP1 Inhibitor) transgene Mäuse eine selektive PLB Serin 16 Hyperphosphorylierung (Kirchhefer et al. 2005).

Daten aus der Literatur zeigen einheitlich, dass eine gesteigerte PLB Phosphorylierung die Relaxation beschleunigt und nachfolgend über einen erhöhten SR Ca^{2+}-Gehalt zu einer gesteigerten Kontraktilität führt (Bers 2002, MacLennan und Kranias 2003). Untersuchungen an PLB KO Mäusen zeigten eindrücklich eine verbesserte kardiale Funktion, die sich durch β-adrenerge Stimulation nicht weiter steigern ließ (Luo et al. 1994, Luo et al. 1996, Li et al. 1998).

Gleichzeitig wurde in dieser Studie in beiden Mutanten eine RyR2 Hyperphosphorylierung nachgewiesen. Ähnlich wie für die PLB Phosphorylierung, wurde hier das gleiche Phänomen einer präferentiellen Beeinflussung einer Phosphorylierungsstelle durch I-1 beobachtet, während die benachbarte unverändert blieb. Allerdings spiegelte sich der Effekt nicht wie erwartet an der PKA-Stelle (Serin 2809) wider, sondern die CaMKII-abhängige Stelle (Serin 2815) wurde I-1-vermittelt hyperphosphoryliert. In Anbetracht der postulierten Funktion von I-1 als Verstärker PKA-vermittelter Effekte, erscheint dies zunächst widersprüchlich. Allerdings bleibt zu bedenken, dass die PKA über I-1 auch den Phosphorylierungszustand von nicht-PKA-Substraten kontrollieren kann und somit jedes PP1 Substrat theoretisch auch I-1-sensitiv sein könnte. Dennoch gilt auch der für PLB bereits diskutierte Mechanismus, dass I-1 selektiv das RyR2-(2815) dephosphorylierende PP1 Holoenzym inhibiert bzw. PP1c ausschließlich die CaMKII-Stelle dephosphoryliert. Leider existieren von den oben zitierten Studien der PP1 und I-2 Transgenen (Carr et al. 2002, Kirchhefer et al. 2005) keine Daten bezüglich des RyR2 Phosphorylierungsstatus.

Die Komplexität steigert sich in unserem Fall durch einen potentiellen Einfluss von I-1 auf die CaMKII. So führt die Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Aktivierung der CaMKII über Autophosphorylierung (Threonin 286) zu einer autonomen, anhaltenden Aktivität der CaMKII (Übersicht in Maier und Bers 2007). In diesem Kontext könnte I-1 nun die PP1-vermittelte Dephosphorylierung und somit Inaktivierung der CaMKII inhibieren und würde somit letztlich einen *cross-talk* zwischen den beiden Signal-transduzierenden Enzymen PKA und CaMKII vermitteln. Hinweise für den hier diskutierten Mechanismus erbrachten Blitzer et al. (1998) indem sie zeigten, dass I-1 auf neuronaler Ebene über eine Hemmung der CaMKII-dephosphorylierenden PP1c tatsächlich einen *cross-talk* zwischen den beiden Signalwegen vermitteln kann. Inwieweit dieser Mechanismus im Herzen eine Rolle spielt ist noch unklar. In diesem Zusammenhang haben wir erste Hinweise für den zuvor postulierten Mechanismus. Nach β-adrenerger Stimulation, somit erhöhter zytosolischer Ca^{2+}-Konzentration und infolgedessen erhöhter CaMKII-Aktivität, scheinen die I-1 Mutanten in den Membranfraktionen eine erhöhte CaMKII Phosphorylierung aufzuweisen (nicht dargestellt). Diese

vorläufigen Daten werden über zurzeit laufende Messungen der CaMKII-Aktivität weiter verifiziert.

Welche Bedeutung hat nun die erhöhte CaMKII-abhängige Phosphorylierung in den Mutanten? Eine Hyperphosphorylierung von RyR2 könnte, wenn überhaupt, einen untergeordneten mechanistischen Aspekt für die erhöhte Kontraktilität repräsentieren. Möglicherweise könnte das Zusammenspiel in den I-1 Mutanten von erhöhtem SR-Ca^{2+}-Gehalt *via* PLB Hyperphosphorylierung und einer gesteigerten RyR2 Öffnungswahrscheinlichkeit in der nächsten Systole zu einer vermehrten Ca^{2+}-Freisetzung führen und so zumindest partiell zu einer Erhöhung der Ca^{2+}-Transienten-Amplitude beitragen. Die Inotropie wird jedoch primär über die PKA Phosphorylierung des L-Typ-Ca^{2+}-Kanals, PLB und TnI determiniert (Bers 2002, Eisner et al. 2009).

Klar ist, dass die RyR2 Öffnungswahrscheinlichkeit primär über die intrazellulären Ca^{2+}-Konzentrationen bestimmt wird, jedoch auch über seinen Phosphorylierungszustand. Allerdings bleibt der Einfluss der verschiedenen RyR2 Phosphorylierungsstellen unklar bzw. wird kontrovers diskutiert. So galt die von Marx et al. (2000) postulierte PKA-Stelle (2809) lange als der Mechanismus, wurde aber dann vielfach angefochten und mittlerweile von mehreren Gruppen durch *State of the art* Mausmodelle eindeutig widerlegt (Stange et al. 2003, Benkusky et al. 2007, MacDonnell et al. 2008). Zunehmend rückt die CaMKII-abhängige RyR2 Phosphorylierungsstelle (Serin 2815), die auch in dieser Arbeit durch I-1 beeinflusst wurde, in den Fokus vieler Untersuchungen und wird für eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit verantwortlich gemacht (Wehrens et al. 2004, Ai et al. 2005, Guo et al. 2006, Kohlhaas et al. 2006, Curran et al. 2007). Die erhöhte RyR2 Öffnungswahrscheinlichkeit wurde dabei mit der Entstehung von Ca^{2+}-Freisetzungsereignissen in Verbindung gebracht. So zeigten CaMKII Transgene eine gesteigerte Anzahl von Ca^{2+}-Sparks (Maier et al. 2003), die durch den CaMKII-spezifischen Inhibitor KN93 reduziert werden konnten. Untersuchungen an Kaninchen Myozyten, entweder nach adenoviraler CaMKII Überexpression (Kohlhaas et al. 2006) oder nach Isoprenalinstimulation (Curran et al. 2007), zeigten eine erhöhte Ca^{2+}-Spark-Frequenz, die wiederum durch KN93 vermindert wurde. Obwohl es, wie zuvor beschrieben, starke Hinweise auf einen

Zusammenhang zwischen einer Hyperphosphorylierung und einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit gibt, konnte dieser durch entsprechende *Knockin* Mausmodelle an der 2815-CaMKII-Stelle bis heute nicht eindeutig bestätigt werden. Auch in dieser Studie konnten wir in isolierten Myozyten der I-1 Mutanten nach Isoprenalinstimulation eine erhöhte Ca^{2+}-Spark-Frequenz messen (siehe unten).

Wir vermuten folgenden, durch Eisner und Kollegen (Eisner 2009) gestützten Zusammenhang in den I-1 Mutanten. Eine gesteigerte diastolische Ca^{2+}-Freisetzung aufgrund sensitivierter RyR2 Kanäle müsste normalerweise als isoliertes Ereignis betrachten werden, das sofort durch die Aktivierung des Na^{+}/Ca^{2+}-Austauschers (NCX) ausgeglichen werden würde. Die Konsequenz wäre eine sinkende SR Ca^{2+}-Beladung. Folglich würde bei jedem Spark weniger Ca^{2+} freigesetzt und RyR2 desensitiviert werden, so dass die initial erhöhte Ca^{2+}-Freisetzung selbstlimitierend wäre. Doch eine β-adrenerge Stimulation würde (i) zu einem gesteigerten Ca^{2+}-Einstrom über die L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle und somit erhöhter zytosolischer Ca^{2+}-Konzentration und (ii) über die gesteigerte PLB Phosphorylierung zu einer Zunahme des SR Ca^{2+}-Gehalts führen. Diese in unserem Modell zutreffenden Umstände in Kombination mit einem über Phosphorylierung sensitivierten RyR2 Kanal könnten tatsächlich durch eine positive Rückkopplung zur weitreichenden Aktivierung von benachbarten RyR2 Kanälen führen und somit anhaltende oszillierende, pro-arrhythmogene Ca^{2+}-Wellen auslösen.

Inhibitor-1 erhöhte das Arrhythmierisiko im Zusammenhang mit einer akuten β-adrenergen Stimulation

Die Anwendung eines Katecholamin-/Stress-induzierten Arrhythmie-Provokationsprotokolls an wachen, sich frei bewegenden Mäusen ergab folgende Hauptbefunde: In der Kontrollgruppe, ohne endogene I-1 Expression, konnten keine Arrhythmien induziert werden. Die Überexpression von I-1 bzw. die endogene I-1 Expression war hingegen mit dem Auftreten von Arrhythmien assoziiert. Nach Transgenrepression war ebenfalls keine Arrhythmieinduktion mehr möglich. Dies impliziert eine Genotyp-abhängige Pathogenese der

Arrhythmien. Allerdings zeigten nach Doxycyclinapplikation zwei Kontrollmäuse ohne endogene I-1 Expression ($tTA^{I\text{-}1(-/-)}$) und eine Kontrollmaus mit endogener I-1 Expression ($tTA^{I\text{-}1(+/+)}$) Arrhythmien.

Die hier erzielten Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass das Fehlen von I-1 vor dem Entstehen von Arrhythmien schützen könnte bzw. im umgekehrten Fall die I-1 Expression, unabhängig der exprimierten Form, für die Entstehung von induzierbaren Arrhythmien notwendig ist. Dabei war zunächst das Entstehen der Arrhythmien unabhängig von der exprimierten I-1 Form überraschend. Dies ist aber wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei den I-1 Mutanten zwar um eine I-1 Überexpression, jedoch um keine *Add-On* Expression zum endogenen Wildtyp I-1 handelte. Parallel zu dieser Arbeit konnten wir in I-1 KO Mäusen ebenfalls zeigen, dass das Fehlen von I-1 vor dem Entstehen von Arrhythmien schützt (El-Armouche et al. 2008; siehe Diskussionspunkt 4.4). In der zitierten Studie konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Phänotyp möglicherweise aus dem Fehlen von I-1 während der Embryogenese resultierte. Die Daten dieser Arbeit zeigen aber eindeutig, dass der Schutz vor getriggerten Arrhythmien tatsächlich im Fehlen von I-1 begründet liegt, da auch die Doxycyclin-induzierte Repression von I-1 vor dem Auftreten von Arrhythmien schützte.

Das Auftreten von Arrhythmien in den Kontrollen mit endogener I-1 Expression nach Doxycyclinapplikation war nicht verwunderlich. So unterliegt die endogene I-1 Expression keiner Doxycyclin-abhängigen Regulation und der endogene I-1 wurde auch bei den Messungen unter Doxycyclin exprimiert. Paradox waren allerdings die arrhythmogenen Ereignisse nach Doxycyclinbehandlung in den Kontrollen ohne endogene I-1 Expression. Denn gerade das Fehlen von I-1 schützte zuvor, trotz der massiven Stressbedingungen, vor dem Entstehen der getriggerten Arrhythmien. Dieser Befund würde für einen pro-arrhythmogenen Effekt von Doxycyclin sprechen. Dafür gibt es bis dato aber keine Befunde. Einzig in Kombination mit Digoxin führte Doxycyclin zum Anstieg der Bioverfügbarkeit von Digoxin und somit zu einem erhöhten Arrhythmierisiko (Plumb 2008). Folglich müsste Doxycyclin dann zu einer Potenzierung der arrhythmischen Ereignisse in den I-1 Mutanten führen, was hier aber eindeutig nicht der Fall war. Vielmehr erinnert dieses Phänomen an die unter 3.6.2 (Abb. 3.22) beschriebene „positiv

inotrope“ unspezifische Nebenwirkung von Doxycyclin. Auch dieser Befund ist mit großer Wahrscheinlichkeit als unspezifischer Doxycyclin-Effekt einzuordnen, unterstreicht aber die Echtheit der Arrhythmien im Zusammenhang mit einer I-1 Expression und die Reversion unter Doxycyclin.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass I-1 unter akuter β-adrenerger Stimulation das Risiko für Arrhythmien begünstigt. Diese Befunde sind in Einklang mit anderen Mausmodellen, die zeigten, dass die Überaktivität von Komponenten der β-adrenergen Signalkaskade z.B. Gαs, PKA bzw. cAMP häufig die Entstehung von Arrhythmien triggert (Iwase et al. 1997, Antos et al. 2001, Lehnart et al. 2005, Übersicht in El-Armouche und Eschenhagen 2008).

Mechanistische Aspekte in der Pathogenese der Arrhythmien

Die Entstehung getriggerter Aktivitäten beruht auf Nachdepolarisationen. Formal unterscheidet man frühe (EAD, *early after depolarisation*) und späte Nachdepolarisationen (DAD, *delayed after depolarisation*), je nachdem ob sie aus dem Aktionspotential hervorgehen oder mit Abstand auf ein solches folgen. EADs werden durch eine stark verzögerte Repolarisation begünstigt. Sie beruhen meistens auf einer Abnahme repolarisierender K^+-Ströme, aber auch auf einer pathologischen Zunahme von depolarisierenden Na^+-Einwärtsströmen (Näbauer und Kääb 1998). DADs hingegen treten nach der Repolarisation des Aktionspotentials auf. Nach intrazellulärer Ca^{2+}-Überladung setzt das SR spontan Ca^{2+} frei, so dass der elektrogene NCX aktiviert wird und eine frühzeitige Depolarisation auslöst (Übersicht in Bers 2008).

Für das Auftreten von Arrhythmien könnte in unserem Modell der zytosolische bzw. SR Ca^{2+}-Gehalt von ganz zentraler Bedeutung sein, so dass es sich mechanistisch wahrscheinlich um DADs handelte. Dafür sprechen im Zusammenhang mit einer Isoprenalinstimulation (i) die in den I-1 Mutanten auftretenden Arrhythmien *in vivo* und (ii) insbesondere die mittels konfokaler Laser-Fluoreszenzmikroskopie bestimmte erhöhte SR Ca^{2+}-Spark-Frequenz, bei unveränderter Spark-Kinetik. Ca^{2+}-Sparks sind auf Zellebene ein guter Indikator für die Aktivität des RyR2, d.h., dass vermehrt spontane SR Ca^{2+}-Entladungen

durch gehäuft öffnende RyR2 Kanäle auftreten. Tatsächlich könnte die gemessene CaMKII-abhängige RyR2 Hyperphosphorylierung in den I-1 Mutanten hierfür der Auslöser sein (siehe oben). Ob diese allerdings die alleinige Ursache war, erscheint fraglich. Bis zum jetzigen Zeitpunkt existiert kein RyR2 (Serin 2815) *Knockin* Mausmodell, um einen direkten Zusammenhang zwischen gesteigerter RyR2 Serin 2815 Phosphorylierung und dem Auftreten von vermehrten diastolischen Ca^{2+}-Entladungen und Arrhythmien nachzuweisen.

Wie bereits oben diskutiert, könnte die Katecholamin-/Stress-induzierte β-adrenerge Stimulation in den I-1 Mutanten (i) zu einem gesteigerten Ca^{2+}-Einstrom und somit erhöhter zytosolischer Ca^{2+}-Konzentration führen und (ii) über die gesteigerte PLB Phosphorylierung zu einer Zunahme des SR Ca^{2+}-Gehalts beitragen. In Kombination mit dem über Phosphorylierung sensitivierten RyR2 könnte das erhöhte diastolische Ca^{2+}-Leck tatsächlich durch eine positive Rückkopplung ursächlich für anhaltende oszillierende, pro-arrhythmogene Ca^{2+}-Wellen sein.

Unsere Hypothese wird durch das klinische Bild der CPVT (Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardien) verstärkt. So entwickeln CPVT-Patienten vorrangig unter dem Einfluss von Katecholaminen oder emotionalem Stress Arrhythmien. Diese zeigen keine RyR2 Hyperphosphorylierung, sondern Mutationen, die mit einer erhöhten Ca^{2+}-Sensitivität von RyR2 assoziiert sind (Marks et al. 2002, Lehnart et al. 2008, Györke 2009). Auch eine Destabilisierung von RyR2 durch das Fehlen von Calstabin 2 (FKBP12.6) führte erst nach β-adrenerger Stimulation zu Arrhythmien (Wehrens et al. 2003).

Lokalisation von I-1

Sowohl die Hyperphosphorylierung von PLB als auch RyR2 sprechen für eine SR-spezifische Wirkung von I-1, gestützt durch einen nicht-nachweisbaren Einfluss von I-1 auf Phosphoproteine der Myofilamente. Das I-1-assoziierte Auftreten von Arrhythmien und diastolischen Ca^{2+}-Freisetzungsereignissen bestärkte die Hypothese. Potentielle Effekte auf die Phosphorylierungszustände anderer Phosphoproteine können trotzdem nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die

Western Blot Methode ist limitierend, so dass möglicherweise physiologisch relevante Veränderungen von 10-20% biochemisch nicht nachweisbar waren. Ein zukünftiger Ansatz könnte die Quantifizierung der Proteinmenge bzw. Phosphorylierung mittels Proteomanalyse beispielsweise unter Verwendung des SILAC (*stable isotope labelling with amino acids in cell culture)*-Verfahrens darstellen (Ong et al. 2002).

Passend zu unseren Daten konnten aber auch andere Gruppen eine Präferenz von I-1 am SR detektieren (Carr et al. 2002, Gupta et al. 2002, Gupta et al. 2003, Pathak et al. 2005). Klar ist, dass sich die PP1 nicht frei im Zytosol aufhält, sondern über regulatorische Untereinheiten ihren Substraten zugeführt wird. I-1 als zytosolisches Protein könnte allerdings zusammen mit der PP1 am SR in AKAPs-*(A-kinase anchoring proteins)* basierenden Komplexen verankert sein (El-Armouche und Eschenhagen 2008). Gupta und Kollegen zeigten, dass (i) die PP1 nach β-adrenerger Stimulation am SR gebunden bleibt und (ii) eine hohe lokale PP1 Konzentration am SR auch zu einer Kolokalisation von I-1 führt (Gupta et al. 2002, Gupta et al. 2003). Zum indirekten Nachweis der I-1 Lokalisation wurde die inhibitorische Aktivität der beiden I-1 Mutanten, indirekt über die PP1-Aktivität (Phosphatase-Assay) nach vorheriger β-adrenerger *in vivo* Stimulation in Membranvesikeln und im Zytosol bestimmt. Entgegen unserer Erwartungen war ein Nachweis der I-1-Aktivität in keiner der beiden Fraktionen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen möglich.

Wahrscheinlich stellte der Phosphatase-Assay aus Ventrikelhomogenaten eine zu unsensitive Methode dar, um die inhibitorische Aktivität der Mutanten zu erfassen. Als kritisch war sicherlich die indirekte Bestimmung anzusehen. So wurde die I-1-Aktivität indirekt aus der Phosphatase-Gesamtaktivität in Abhängigkeit der zur Differenzierung zwischen PP1 und PP2A zugesetzten Okadasäure bestimmt. Die vorherige Fraktionierung war wahrscheinlich mit einem hohen Verlust von PP1 und I-1 mit anschließenden Auswirkungen auf die Bestimmung der I-1-Aktivität verbunden. Letztendlich würde der Verlust die geringe Überexpression überwiegen. Des Weiteren reflektiert die *in vitro* Enzymaktivität sicherlich nicht die *in vivo* Aktivität. Dieser Aspekt wird verstärkt durch den Einsatz von Phosphorylase a als ein Modellsubstrat der PP1. Die Entwicklung eines

sensitiveren Assays stellt möglicherweise eine vielversprechende Alternative dar und wird momentan in unserem Labor etabliert.

Glücklicherweise bietet der Phosphorylierungsgrad von PLB, als I-1 nachgeschalteter Effektor, einen hervorragenden Indikator für die I-1-Funktion und -Aktivität. Dies wurde bereits *in vitro* als auch *in vivo* übereinstimmend von verschiedenen Gruppen gezeigt (Gupta et al. 2002, Pathak et al. 2005, El-Armouche et al. 2003). Folglich wurde in dieser Arbeit der Einfluss von I-1 am SR durch die Hyperphosphorylierung von PLB bestätigt.

Als nächster Schritt wurde mittels *in vitro* Bindungsassay (GST *Pull-down*) untersucht, ob I-1 möglicherweise über eine direkte Interaktion mit RyR2 im RyR2 Komplex verankert war bzw. indirekt über die PP1. Die Interaktionsstudie wurde mit RyR2 aus einer stabil transfizierten Zelllinie durchgeführt, wobei eine Interaktion zwischen RyR2 und dem jeweiligen GST-I-1 Fusionsprotein nicht nachweisbar war. Somit galt eine direkte bzw. indirekte Interaktion unwahrscheinlich, konnte aber aus folgenden Gründen nicht ausgeschlossen werden: (i) Es handelte sich sowohl bei I-1 als auch RyR2 um rekombinante Proteine, wobei I-1 zusätzlich als Fusionsprotein vorlag. Somit waren zwei Faktoren im Vergleich zur *in vivo* Situation verändert. (ii) RyR2 wurde aus einer stabilen RyR2-überexprimierenden Zelllinie isoliert. Dieser Aspekt deutete auf eine nicht-physiologische bzw. –stöchiometrische Expression von RyR2 zusammen mit PP1 bzw. den im Komplex verankerten AKAPs hin, über die wiederum I-1 gebunden sein könnte. Des Weiteren konnte das Protein, das die CaMKII am RyR2 Komplex verankert, bis dato noch nicht nachgewiesen werden (Grueter et al. 2007).

Die Folgen einer pathologischen β-adrenergen Stimulation und die Auswirkungen in alternden Mäusen

Die Anwendung des Isoprenalin-Infusions-Modells demaskierte I-1 als ein ungünstiges Element der β-adrenergen Signalkaskade. Die trunkierte Mutante potenzierte dabei die im Zusammenhang einer pathologischen β-adrenergen

Stimulation auftretenden strukturellen und funktionellen Veränderungen enorm, während die S67A Mutante einen etwas schwächer ausgeprägten Phänotyp zeigte.

Wir entschieden uns in dieser Arbeit für das Isoprenalin-Infusions-Modell, da es (i) einfach in der Anwendung und günstig ist, (ii) eine geringe Variabilität sowie Mortalität im Vergleich zum TAC (*transverse aortic constriction*)- und MI (Myokardinfarkt)-Modell aufweist und (iii) die Situation in der menschlichen Herzinsuffizienz simuliert und dort ein klarer positiver Zusammenhang zwischen Prognose und Katecholaminspiegeln besteht. Des Weiteren weisen die auf molekularer Ebene induzierten Veränderungen große Ähnlichkeiten mit der menschlichen Herzinsuffizienz auf. So führte die chronische Isoprenalininfusion in der Ratte zu (i) einer Reduktion der β-Adrenozeptordichte (Mende et al. 1992), (ii) einer verminderten PLB und SERCA2a Expression (Linck et al. 1998), (iii) einer Hochregulation des kardialen Gi-Proteins (Eschenhagen et al. 1991, 1992a) und (iv) einer Reexpression des fetalen Genprogramms (Boluyt et al. 1995). Interessanterweise waren die Veränderungen auch mit einer erhöhten PP-Aktivität (Boknik et al. 2000), bei gleichzeitig verminderter I-1 mRNA- und Proteinmenge, assoziiert (El-Armouche et al. 2007a). Ein weiterer reizvoller Aspekt stellt dabei die direkte Involvierung von I-1, als PKA-abhängiges Element, in das veränderte β-adrenerge/cAMP/PKA-System dar. Bis heute ist das Modell für die Ratte sehr gut beschrieben, wohingegen von Mäusen weniger Daten existieren. In der Ratte führte die chronische Isoprenalinapplikation bereits nach drei Tagen zu einem ausgeprägten Phänotyp (Takeshita et al. 2008). In Vorversuchen konnten wir auch in der Maus nach drei Tagen funktionelle Auswirkungen der Isoprenalininfusion nachweisen.

In dieser Studie wurde das Remodeling unter folgenden zwei Situationen induziert: (i) Tiere, denen I-1 fehlte und (ii) Tiere, die verschiedene Formen von I-1 exprimierten. In der konstitutiv aktiven Mutante führte die Isoprenalininfusion bereits nach vier Tagen zur Aufhebung der initial erhöhten Kontraktilität (Abb. 3.35). Im weiteren Verlauf nahm die Kontraktiliät im Vergleich zu den Kontrollen deutlich stärker ab und ging in einen stark hypokontraktilen Phänotyp über. Interessanterweise konnte durch die Transgenrepression (ab Tag vier) in einer

Subgruppe der Mutanten die Progression der kontraktilen Dysfunktion auf das Niveau der Kontrollen abgeschwächt werden. In diesem Kontext könnte die Doxycyclinapplikation ab Tag vier, d.h. die Inhibition der Expression, eine mögliche „Therapie“ simulieren. Die „therapierten“ Tiere erholten sich im weiteren Verlauf, wohingegen sich die kardiale Funktion der nicht-reprimierten Mutanten weiter verschlechterte. Dieser Phänotyp wurde von einer starken Dilatation begleitet, die für eine exzentrische Hypertrophie spricht.

Bemerkenswert waren die starken strukturellen Veränderungen wie eine erhöhte Kardiomyozytenhypertrophie und ein gesteigerter Fibrosegrad in der konstitutiv aktiven Mutante. Dies verdeutlichte die Schwere des Phänotyps, denn bereits die viertägige Isoprenalingabe war ausreichend, um in diesem Zeitraum eine signifikante Fibrose in den überexprimierenden Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen hervorzurufen. Da die Fibrose kaum reversibel ist, konnte sie sich in den „therapierten“ Mutanten über den weiteren Zeitraum der Isoprenalininfusion nicht zurückbilden.

Dass dieses Modell prinzipiell eine Hypertrophie induzierte, war anhand der Zunahme der linksventrikulären Masse (LVM) ersichtlich (≥32%). Interessanterweise ergaben die morphologischen Untersuchungen innerhalb der Gruppen keinen Unterschied im relativen Herzgewicht nach 14-tägiger Infusion. Auf Kardiomyozytenebene zeigte sich eine klare Hypertrophie in der konstitutiv aktiven Mutante bzw. auch in den nur vier Tage überexprimierenden Tieren als Indikator der Schwere des Phänotyps. Dies erscheint zunächst widersprüchlich, lässt sich aber wahrscheinlich durch einen Kardiomyozytenverlust erklären. Der höhere Fibrosegrad und das innerhalb der Gruppen gleiche Herzgewicht, trotz nachweisbarer zellulärer Hypertrophie, sprechen stark für einen hohen Kardiomyozytenverlust. In Übereinstimmung mit unseren Daten führte auch die Überexpression der β_1-Adrenozeptoren und von Gαs auf zellulärer Ebene zu einer starken Hypertrophieentwicklung, ohne messbare Auswirkungen auf das Herzgewicht (Iwase et al. 1997, Engelhardt et al. 1999). Die Autoren führten dies auch auf den hohen Zellverlust zurück.

Andererseits ist auch dieses Modell mit Limitationen verbunden. So ist die Ätiologie der menschlichen Herzinsuffizienz eine multifaktorielle Störung und für jedes Individuum einmalig. Das Isoprenalin-Infusions-Modell hingegen berücksichtigt nur einen Faktor, die erhöhten Katecholaminspiegel. Des Weiteren kann der natürliche Zeitverlauf in der menschlichen Pathogenese der Herzinsuffizienz nicht nachgeahmt werden und die Isoprenalineffekte sind zumindest teilweise reversibel (Osadchii 2007). Auch die klinische Relevanz ist nicht gleichbedeutend mit der des Myokardinfarkt-Modells. Der Myokardinfarkt als Auslöser für reaktiv erhöhte Katecholaminspiegel wäre der Klinik eindeutig näher.

Wie oben erwähnt, zeigte die S67A Mutante in Bezug auf die kontraktile Dysfunktion und Dilatation einen etwas schwächeren Phänotyp. Folgender Mechanismus liegt nahe, aus der die verminderte I-1* Funktion und somit der schwächere Phänotyp resultiert: Aus der stereotypischen Desensitivierung des β-adrenergen/cAMP/PKA-Systems mit verminderter PKA-Aktivität und gleichzeitiger Überaktivität der PP2B, resultiert eine verminderte I-1* Phosphorylierung (Aktivität) und somit Abschwächung der I-1-vermittelten Effekte.

Zusammenfassend scheint die Kombination aus genetischer und pathologischer Aktivierung der cAMP/PKA-Achse, *via* I-1 Expression und Isoprenalininfusion, die Auswirkungen zu potenzieren.

In verschiedenen Mausmodellen führte die langfristige Überexpression einzelner Elemente der β-adrenergen Signalkaskade zu ausgeprägten funktionellen und strukturellen Veränderungen, wie die Beispiele der β_1-, β_2-, Gαs- und PKA-Transgenen zeigten (Gaudin et al. 1995, Iwase et al. 1997, Engelhardt et al. 1999, Liggett et al. 2000, Antos et al. 2001). Auch die Expression der beiden I-1 Formen war im Alter mit einer starken Abnahme der Kontraktilität und einer ausgeprägten Dilatation assoziiert. Eine erhöhte Übersterblichkeit als Folge der kardialen Dysfunktion konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht beobachtet werden, wahrscheinlich weil der Phänotyp erst so spät auftrat. Der pathophysiologische Phänotyp äußerte sich erst ab dem 15. Lebensmonat, was im Vergleich zu den oben genannten Transgenen sowie der Lebenserwartung einer Maus im

Allgemeinen sehr spät ist. Dies könnte durch die distale Lage von I-1 unterhalb der PKA und somit einer Dissektion bzw. Abschwächung von pathologischen PKA-Signalwegen erklärt werden.

Schlussbemerkung zu den Hauptbefunden

Unsere Daten sind in Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen zur transgenen Überexpression von Elementen der β-adrenergen Signalkaskade (Iwase et al. 1996, Engelhardt et al. 1999, Du et al. 2000, Liggett et al. 2000, Antos et al. 2001, Lehnart et al. 2005). So war die Überexpression der β_1-Adrenozeptoren initial mit einer gesteigerten Kontraktilität assoziiert, führte aber bereits ab dem Alter von 10 Wochen zum starken Remodeling und im Alter von 20 Wochen zur starken Abnahme der Kontraktilität (Engelhardt et al. 1999). Auch PKA Transgene zeigten im Alter von 8 Wochen starke Fibrose, Dilatation, einen starken Kontraktilitätsverlust und eine Abnahme der Herzfrequenz, Arrhythmien und eine erhöhte Mortalität (Antos et al. 2001). Iwase et al. (1995) zeigten, dass die Überexpression von Gαs zwar die Ansprechbarkeit gegenüber akuter β-adrenerger Stimulation erhöhte, aber die langfristige Überaktivierung, hier im Alter von 16 Monaten, zu starken funktionellen und strukturellen Veränderungen, einem gesteigerten Arrhythmierisiko und erhöhter Mortalität führte. Interessanterweise konnten die Auswirkungen der β_1- und Gαs-Transgene durch die chronische Gabe des β-Adrenozeptorantagonists Propanolol aufgehoben werden. Dies impliziert, dass der pathologische Phänotyp tatsächlich auf die chronische Überaktivierung der β-adrenergen Signalkaskade zurückzuführen war (Asai et al. 1999, Engelhardt et al. 2001).

4.4 Vergleich mit anderen transgenen I-1 Mausmodellen

Bereits vor Beginn dieser Studie wurden in unserem Labor die kardiovaskulären Auswirkungen einer transgenen Überexpression von Wildtyp I-1 (~200-fach) in Mäusen untersucht. Die Tiere entwickelten im Alter von drei Monaten eine spontane Herzhypertrophie und kardiale Dysfunktion. Die massive I-1 Überexpression wurde durch eine erhöhte PP1c Menge und Aktivität kompensiert.

Wie bereits diskutiert, ist die Kompensation beispielhaft für unüberschaubare Anpassungsreaktionen im Rahmen konventioneller Mausmodelle. Die Ursache der Hypertrophie war nicht eindeutig auf die PP1c Menge oder die I-1 Überexpression zurückzuführen. Eine abschließende Bewertung der (patho)physiologischen Funktion von I-1 *in vivo* war somit nicht möglich (El-Armouche et al. 2008).

Zur weiteren Evaluierung der *in vivo* Funktion von I-1 wurden in unserer Arbeitsgruppe auch I-1 KO Mäuse (Allen et al. 2000) kardiovaskulär charakterisiert (El-Armouche et al. 2008).

Die Daten der I-1 KO Mäuse stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie, indem sie das funktionelle Gegenteil zeigten: (i) Einen Schutz vor Isoprenalin-induzierten, tödlichen Arrhythmien, ohne die Herzfrequenz zu beeinflussen und (ii) nach chronischer Isoprenalininfusion (sieben Tage; 15 mg/kg*Tag) eine geringere Hypertrophie-Entwicklung, linksventrikuläre Dilatation und interstitielle Fibrose im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen. Die Veränderungen waren mit einer Hypophosphorylierung von PLB Serin 16 und RyR2 Serin 2815 assoziiert. Die Tiere zeigten im Alter (>1 Jahr) keine strukturellen Herzveränderungen, so dass das Fehlen von I-1 langfristig gut verträglich zu sein scheint und unter Bedingungen von erhöhtem adrenergen Stress protektiv wirkt. Die Überexpression der mutierten I-1 Formen und das Fehlen von I-1 führten somit zu einer ähnlichen Kernaussage.

Die Verwendung des Tet-Off Systems jedoch stellte durch die spezifischere Zuordnung des Phänotyps zur I-1* bzw. I-1c Expression eine eindeutige Verbesserung dar. Auch die Arrhythmieinduktion erfolgte in dieser Studie in wachen, sich frei bewegenden Mäusen und somit unter physiologischen Bedingungen. Im Gegensatz dazu wurden den I-1 KO Tieren unter einer kardiodepressiv wirkenden und gegenüber Katecholaminen sensibilisierenden Narkose (Ketamin/Xylazin), aufsteigende und letztlich tödliche arrhythmogene Isoprenalindosen appliziert.

Den Schlussfolgerungen unserer Studie stehen zurzeit laufende Gentherapieversuche mit einem konstitutiv aktiven I-1 (I-1c; siehe oben) diametral

entgegen. Die Arbeitsgruppe um Frau Prof. Kranias konnte zeigen, dass die herzspezifische Überexpression von I-1c, mittels konventioneller transgener Maustechnologie, unter basalen Bedingungen die kardiale Funktion verbessert. Zugleich korrelierte die I-1c Expression mit einer selektiven PLB Hyperphosphorylierung bei gleichzeitig unveränderter Phosphorylierung von RyR2. Im druckinduzierten Insuffizienzmodell schwächte die I-1c Expression das kardiale Remodeling im Vergleich zu Wildtyp Tieren deutlich ab. Dies äußerte sich durch (i) den Erhalt der kardialen Funktion und einer nur geringfügig ausgeprägten linksventrikulären Dilatation, (ii) eine geringere Hypertrophie-Entwicklung auf Organebene und zellulärer Ebene und (iii) einen verminderten Fibrosierungsgrad. Zusätzlich war es möglich, bei Ratten mit experimentellen Aortenstenosen die Progression der Herzinsuffizienz mittels adenoviralem Gentransfers (über sieben Tage) von I-1c zu reduzieren. Hieraus leiten die Autoren einen nutzbringenden Effekt von I-1c in der Herzinsuffizienz ab (Pathak et al. 2005).

In Bezug auf die Kernaussage wirken die Daten kontrovers gegenüber unseren, wobei die Ergebnisse im Prinzip sehr ähnlich sind. So konnten beide Studien zeigen, dass die I-1c Expression über eine erhöhte PLB Phosphorylierung mit einer verbesserten kardialen Funktion assoziiert war und die PKA-abhängige RyR2 Phosphorylierungsstelle nicht durch I-1c beeinflusst wurde. Allerdings wurde die von uns erhöht vorgefundene CaMKII-abhängige Phosphorylierungsstelle in der eben zitierten Studie nicht untersucht. Das Auftreten von Arrhythmien konnten wir erst unter starken Stressbedingungen beobachten. In Übereinstimmung zu Pathak et al. (2005) war die I-1c Expression unter basalen Bedingungen nicht mit Arrhythmien assoziiert.

Es muss hervorgehoben werden, dass das Tet-Off System im Vergleich zum konventionellen Mausmodell sicherlich die bessere Alternative darstellte. Durch die Kreuzung auf den I-1 KO Hintergrund vereinten wir letztlich beide Modelle miteinander. Dies ermöglichte uns, die tatsächlichen Auswirkungen des konstitutiv aktiven I-1 zu untersuchen und nicht in Form einer Überexpression zusätzlich zum endogenen Wildtyp I-1. Diese Komponente könnte aber natürlich auch eine mögliche Erklärung für die genannten Unterschiede sein. Des Weiteren kam durch das Tet-Off System eine zusätzliche genetische Variable ins Spiel, die tTA

Expression. Wie bereits diskutiert (siehe 4.3: Die tTA Transgenen als Kontrollen), führte die tTA Expression unter basalen Bedingungen zu einer milden Kardiomyopathie bzw. verstärkte die Auswirkungen im Alterungsprozess (McCloskey et al. 2005 sowie Anhang, Tab. 11.39-41). Der Einfluss sollte durch die Verwendung der entsprechenden tTA Tiere als Kontrollen ausgeschlossen werden und somit die Interpretation der Daten nicht beeinflussen. Betrachtet man diesen Aspekt jedoch besonders kritisch, so kann nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass der I-1-induzierte Phänotyp in dieser Studie auf das gemeinsame Wirken von I-1 und tTA zurückzuführen ist bzw. die tTA Expression das Herz für mögliche I-1 Effekte sensibilisiert. In der Tat waren die Auswirkungen der chronischen Isoprenalininfusion bereits in den Kontrolltieren stärker ausgeprägt, als es oftmals in der Literatur beschrieben wurde (Kudej et al. 1997, Faulx et al. 2005, El-Armouche et al. 2008). Insbesondere die starke Fibrose und die bereits nach vier Tagen ausgeprägte Kontraktilitätsabnahme waren auffallend. Es ist aber möglich, dass der tTA Hintergrund letztendlich den pathologischen Phänotyp von I-1 unter akuten und chronischen Stresssituationen sowie im Alter demaskierte bzw. verschlimmerte. Dies spricht aber keinesfalls gegen die Relevanz dieser Ergebnisse, weil die Reversibilität unter Doxycyclin Spezifität beweist und weil man davon ausgehen muss, dass es beim Patienten eine Vielzahl von Faktoren gibt, die den Herzphänotyp ebenfalls kritisch beeinflussen (Hypertonus, Klappenfehler, virale Entzündungen etc.). Des Weiteren sprechen die Daten der I-1 KO Studie (El-Armouche et al. 2008; siehe weiter oben), mit einem Schutz vor Isoprenalin-induzierten, tödlichen Arrhythmien sowie den Auswirkungen einer chronischen Isoprenalininfusion, welches dem Spiegelbild dieser Studie entspricht, gegen das Auftreten des I-1-induzierten Phänotyps ausschließlich aufgrund der additiven tTA Expression.

Zusätzlich wurden in beiden Studien verschiedene Mausstämme verwendet, was eine Vergleichbarkeit deutlich einschränkt. So zeigten Kadambi et al. (1999), dass die kontraktilen Parameter von WT Mäusen verschiedener Stämme erheblich differierten. Faulx et al. (2005) zeigten, dass es sich bei dem von uns verwendeten C57BL/6J Stamm in Bezug auf das Isoprenalinmodell, um einen sehr robusten Stamm handelte. Analog zur menschlichen Herzinsuffizienz schützte sich dieser Stamm vor den toxischen Wirkungen der chronischen β-adrenergen Stimulation

durch Herunterregulation der β-Adrenozeptoren. Auch die Narkosetiefe, die Haltungsbedingungen und Futterzusammensetzungen können die Ergebnisse beeinflussen (Reliene und Schiestl 2006). Die Unterschiede zwischen den I-1 KO Tieren (El-Armouche et al. 2008) und den I-1c Transgenen (Pathak et al. 2005) wurden ursprünglich u. a. auf den fehlenden C-Terminus von I-1c und den daraus resultierenden strukturellen und funktionellen Veränderungen zurückgeführt. Die Daten in dieser Studie belegen allerdings, dass der I-1c gemeinsam mit der I-1-S67A Mutante, die nicht trunkiert ist, das funktionelle Gegenteil der I-1 KO Mäuse repräsentieren.

Ein weiterer bedeutender Unterschied, der möglicherweise zu einer unterschiedlichen Auswirkung der I-1c Expression in der Herzinsuffizienz führen könnte, ist die Anwendung zweier grundlegend verschiedener Herzinsuffizienzmodelle. In dem von uns verwendeten Isoprenalinmodell spielen Katecholamine, wie auch in der menschlichen Herzinsuffizienz, die entscheidende Rolle. In dem von Pathak und Kollegen angewandten TAC-Modell ist primär die akut, sehr stark erhöhte Nachlast entscheidend, die eine konzentrische Hypertrophie hervorruft und folglich andere Sekundärmechanismen induzieren kann. Doch auch im TAC-Modell scheinen Katecholamine eine zentrale Rolle in der Hypertrophieentstehung zu spielen. So führte das Fehlen von Noradrenalin bzw. Adrenalin in Dopamin-β-Hydroxylase KO Mäusen im druckinduzierten Herzinsuffizienzmodell zu einer verringerten Hypertrophieentwicklung und einer unveränderten kardialen Funktion (Esposito et al. 2002). Auch β_1- und β_2-Adrenozeptor KOs zeigten eine abgeschwächte Hypertrophie im Zusammenhang mit einer chronischen Druckbelastung (Kiriazis et al. 2008). Es könnte durchaus möglich sein, dass das Fehlen von I-1 im TAC-Modell ungünstige Auswirkungen auf die Kontraktilität hätte (z.B. akutes Pumpversagen, erhöhte Mortalität), da eine erforderliche kontraktilitätssteigernde Wirkung durch I-1 auf die plötzlich stark erhöhte Nachlast nicht mehr möglich wäre. Allerdings bleibt anzumerken, dass ein solcher Zustand im Menschen in dieser Form nicht auftreten würde. Wie bereits diskutiert und anhand der I-1c Kurzzeitgentherapie (über sieben Tage) der Ratte in der druckinduzierten Herzhypertrophie gezeigt, könnte I-1c kurzfristig die Kontraktilität verbessern, aber auf Kosten eines höheren Arrhythmierisikos und

einer kardialen Dysfunktion nach Langzeittransfer. Möglicherweise ist letztendlich das Modell zur Induktion von Herzhypertrophie entscheidend für die Auswirkungen von I-1c.

4.5 Ausblick

Die Schlussfolgerung dieser Arbeit führt zu den seit langem diskutierten Fragen, ob die β-adrenerge Desensitivierung als Konsequenz oder Ursache der Herzinsuffizienz zu bewerten ist bzw. ob sie einen Schutzmechanismus vor potentiell toxischen Wirkungen der chronischen β-adrenergen Stimulation darstellt oder einen pathologischen Prozess mit Verschlechterung der hämodynamischen Situation. Im Hinblick auf die therapeutische Intervention in der Herzinsuffizienz ist diese Frage von entscheidender Bedeutung.

Mehr als 20 Jahre sind seit der ersten Pioniersarbeit vergangen (Waagstein et al. 1975, Swedberg et al. 1979), bis sich die Anwendung von β-Blockern in der Therapie der Herzinsuffizienz von der Kontraindikation hin zur Standardtherapie entwickelt hat (Bristow 2000). Lange war man auf der Suche nach dem idealen positiv inotrop wirkenden Arzneimittel, um die abnehmende Kontraktionsfähigkeit des Herzens zu verbessern. Dabei zeigte sich allerdings, dass eine positiv inotrope Therapie mit Phosphodiesterasehemmstoffen oder β-Sympathomimetika kurzfristig zu einer Besserung des klinischen Bildes führte, aber bei chronischer Applikation mit einer erhöhten Mortalität assoziiert war. Im Gegensatz dazu verschlechterten β-Adrenozeptorblocker anfänglich die hämodynamische Situation. Langfristig zeichneten sie sich aber durch eine deutlich lebensverlängernde Wirkung aus, indem sie die pro-arrhythmischen, -apoptotischen, -hypertrophen und energieverbrauchssteigernden Effekte der Katecholamine abschwächten und letztendlich zu einer verbesserten kontraktilen Funktion führten. Dies impliziert, dass sich das Herz den gegebenen Umständen anpasst und die Desensitivierung bei dauerhafter Stimulation protektiver Natur ist.

Auch Einblicke auf intrazellulärer Ebene durch verschiedene Mausmodelle bestätigten, dass Versuche, cAMP-abhängige Signalwege in der Herzinsuffizienz

chronisch zu stimulieren, mit einer Übersterblichkeit einhergingen bzw. einen krankhaften kardialen Phänotyp induzierten. Zugleich ist bis heute kein Mausmodell bekannt, in dem eine primäre Desensitivierung des β-adrenergen Systems zu einem pathologischen Phänotyp führt (Übersicht in El-Armouche und Eschenhagen 2008).

Das erfolgreiche Prinzip der neurohumoralen Blockade durch Anwendung von ACE-Hemmern, β-Blockern, Aldosteron-Antagonisten und Diruetika ist etabliert. Der Erfolg der β-Blocker legt nahe, Therapieprinzipien zu testen, die ihren primären Angriffspunkt im Kardiomyozyten selbst haben und die β-adrenerge Signalkaskade im Sinne einer „intrazellulären β-Blockade“ hemmen. Die Ergebnisse dieser Arbeit implizieren im weiteren Sinne, dass eine Herunterregulation von I-1 ein interessantes therapeutisches Wirkprinzip in der Herzinsuffizienz darstellen könnte. Dabei ist von besonderem Interesse, dass I-1 cAMP-abhängige Effekte vermittelt, ohne aber die cAMP-Spiegel (Carr et al. 2002, Pathak et al. 2005) bzw. Herzfrequenz selbst zu beeinflussen (El-Armouche et al. 2008).

Aufgrund der in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse wurden zwei neue therapeutische Ansätze initiiert, die sich mit I-1 als zukünftigem Zielprotein in der Herzinsuffizienz befassen. Diese beinhalten das Ausschalten von I-1 auf gentherapeutischem bzw. pharmakologischem Wege. Zur herzspezifischen Genabschaltung von I-1 wird ein Adeno-Assoziiertes Viren-(AAV) System verwendet, dass zur Langzeitexpression von I-1-spezifischer shRNA geeignet ist. Der I-1 *Knockdown* Gentransfer soll in einem experimentellen Herzinsuffizienzmodell mit der Genabschaltung des β_1-Adrenozeptors verglichen werden (laufende Dissertation von Christiane Neuber). Des Weiteren ermöglicht ein neuer, sehr sensitiver *in vitro* Phosphatase-Assay, die potentielle inhibitorische Wirkung chemischer Substanzen gegenüber I-1 im großen Maßstab zu testen (*Drug Screening*) und somit einen neuen pharmakologischen I-1 Inhibitor zu identifizieren (laufende Dissertation von Hannie Sotoud). Sollten sich unsere bisherigen Befunde bestätigen, könnte für beide Ansätze langfristig eine therapeutische Hoffnung bestehen.

Allerdings ist klar, dass die Situation in der Maus nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar ist. So wurden hier die Konsequenzen der I-1 Expression im Modell der Herzinsuffizienz nur zwei Wochen nach Intervention untersucht und anhand von Surrogat-Parametern definiert. In der menschlichen Herzinsuffizienz würden die Auswirkungen der I-1 Herunterregulation primär anhand der Überlebensrate beurteilt werden. Die Bewertung an sich erfolgt in einem anderen Kontext als in der Maus. Die Patienten sind vorerkrankt und werden bereits „optimal“ therapiert. Trotz der genannten Einschränkungen und der kontroversen Daten (Pathak et al. 2005), sind es die hier erbrachten Ergebnisse in hohem Maße wert, sie im Hinblick auf ihr zukünftiges therapeutisches Potential weiter zu verfolgen.

4.6 Nachträgliche Anmerkung

Nach der Fertigstellung der ersten Version dieser Arbeit, wurde von der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Kranias eine weitere Studie zum konstitutiv aktiven I-1 veröffentlicht (Nicolaou et al. 2009). In einem transgenen Mausmodell, welches dem unserer Studie ähnlich war (Tet-Off System unter Verwendung des Transaktivator- und Responderarms von Sanbe et al. (2003) und endogener I-1 Expression), wurden die Auswirkungen von I-1c auf die Entstehung des Ischämie-/Reperfusionsschadens im Infarktmodell der Maus untersucht. Wie zuvor von dieser Arbeitsgruppe beschrieben, verbesserte die I-1c Expression unter basalen Bedingungen die kardiale Herzfunktion und war mit einer erhöhten PLB Phosphorylierung assoziiert. Phospho-Proteomanalysen zeigten einen Einfluss von I-1c auf die Phosphorylierung von Proteinen, die in die Proteinsynthese bzw. die Energieproduktion involviert sind. Im Ischämie-/Reperfusionsmodell verbesserte I-1c *in vivo* im Vergleich zu WT Mäusen die kardiale Funktion. Des Weiteren führte die I-1c Expression zu einer Abschwächung der Infarktgröße sowie der Entstehung von apoptotischen und nekrotischen Schäden. Auch *ex vivo* wirkte sich I-1c positiv auf die postischämische kardiale Funktion aus und führte zu einer erhöhten PLB Threonin 17 Phosphorylierung. Anhand dieser Daten sprechen die Autoren der I-1c Expression im Ischämie/Reperfusionsmodell einen kardioprotektiven Effekt zu.

Die Untersuchungen wurden im Vergleich zu WT Tieren durchgeführt, ein möglicher tTA-induzierter Effekt konnte in dieser Studie nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde der Vorteil des Tet-Systems, die Reversibilität und somit Kontrolle im selben Tier, nicht vollends genutzt. Ein Nachweis, dass die kardiale Verbesserung tatsächlich I-1c-induziert ist, wurde nicht erbracht. So könnte eine Doxycyclin-induzierte Repression der I-1c Expression nach erfolgter Ischämie/Reperfusion und anschließendem echokardiographischen Monitoring über einen längeren Zeitraum, die Auswirkungen gegenüber den I-1c-exprimierenden Tieren sowie die Auswirkungen einer Langzeitexpression evaluieren. Auffallend ist, dass diese Studie die Konsequenzen der I-1c Expression nur kurzfristig untersuchte. So wurde die invasive Herzfunktionsanalyse nach einer 30-minütigen Ischämie und einer 60-minütigen Reperfusion durchgeführt. Die Frage der Auswirkungen einer I-1c Langzeitexpression bleibt somit in dieser zitierten Arbeit unbeantwortet, so dass hierfür sicherlich weitere Studien nötig sind.

5 Zusammenfassung

Neben morphologischen Auffälligkeiten weist das insuffiziente Herz charakteristische funktionelle Störungen auf. Hierbei steht die Desensitivierung des β-adrenergen/cAMP/Proteinkinase A (PKA)-Systems im Zentrum. Zum einen bietet sie Schutz vor pro-arrhythmischen, -apoptotischen und energieverbrauchssteigernden Effekten exzessiv erhöhter Katecholamin-Spiegel, zum anderen limitiert sie über eine Verringerung der Phosphorylierung zentraler Ca^{2+}-Homöostase Regulatorproteine die Belastbarkeit herzinsuffizienter Patienten.

Das Phosphatase-Inhibitor-1 Protein (I-1) ist ein distales Verstärkerelement des β-adrenergen/cAMP/PKA-Systems, das nach PKA Phosphorylierung an Threonin 35 die im Herzen dominierenden Typ-1 Phosphatasen potent und selektiv hemmt und so den erhöhten Phosphorylierungszustand von Regulatorproteinen stabilisiert. Eine Phosphorylierung an Serin 67 durch die Proteinkinase Cα (PKCα) hat funktionell den gegensinnigen Effekt, d.h. eine Serin 67 Phosphorylierung bewirkt eine Abnahme der I-1 Aktivität. Des Weiteren wird I-1 von der Ca^{2+}/Calmodulin-abhängigen Phosphatase (Calcineurin) an Threonin 35 dephosphoryliert (deaktiviert). Im Sinne seines postulierten Mechanismus belegten *in vitro* Untersuchungen, dass I-1 als konditionelles, positiv inotropes Element der β-adrenergen Signalkaskade mit einer doppelten endogenen negativen Rückkopplung (PKCα/Calcineurin) wirken könnte. Eigene Befunde zeigten, dass I-1 im insuffizienten Myokard stark erniedrigt ist und dies zur β-adrenergen Subsensitivität beiträgt. Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine *in vivo* Modulation der I-1 Expression die kontraktile Funktion und/oder die Neigung zu Arrhythmien beeinflusst und somit einen potentiellen Angriffspunkt in der Therapie der Herzinsuffizienz darstellen könnte.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden zunächst zwei doppelt-transgene Mausmodelle mit herzspezifischer und zeitlich regulierbarer I-1 Überexpression (Tet-Off System) generiert. Um zusätzlich eine bidirektionale Ursache-Wirkungsbeziehung zu ermöglichen und unüberschaubare phosphorylierungsabhängige Gegenregulationen (PKCα/Calcineurin) innerhalb

des komplex phospho-regulierten I-1 zu überschauen, wurden die beiden Linien zum einen auf einen I-1 *Knockout* Hintergrund gekreuzt und zum anderen folgende Mutationen mittels PCR-Mutagenese vorgenommen: (i) Die Serin 67 Phosphorylierungsstelle wurde gegen „nicht-phosphorylierbares“ Alanin (I-1-S67A) ausgetauscht, um bei erhaltener PKA-abhängiger Aktivierbarkeit eine potentielle Aktivitätsminderung durch die PKCα auszuschließen. (ii) Der Austausch von Threonin 35 gegen phosphomimetisches Aspartat und die gleichzeitige Verkürzung auf 65 Aminosäuren (I-1-T35D) ergaben eine nicht-regulierbare, konstitutiv aktive I-1 Form.

Die Charakterisierung des kardialen Phänotyps beider Linien sowohl basal als auch im Modell der chronischen Isoprenalininfusion bildete unter Nutzung der Regulierbarkeit der I-1 Expression das Herzstück dieser Arbeit. Einfach-transgene Transaktivator Geschwistertiere dienten hierbei als Kontrolle. Im Alter von drei Monaten zeigten beide Mutanten bei unveränderter Herzmorphologie einen hyperkontraktilen Phänotyp, der Doxycyclin-abhängig und damit I-1-bedingt war. Mittels telemetrischer *in vivo* EKG-Messungen konnte gleichzeitig jedoch ein signifikant erhöhtes Risiko für Katecholamin-getriggerte Arrhythmien bewiesen werden. Die Herzen zeigten auf molekularer Ebene eine gesteigerte Phosphorylierung des SR Ca^{2+}-ATPase-Inhibitors Phospholamban, welche mechanistisch den hyperkontraktilen Phänotyp erklären könnte, und eine gesteigerte Phosphorylierung des SR Ca^{2+}-Freisetzungskanals, was über ein gesteigertes diastolisches Ca^{2+}-Leck möglicherweise gegenüber Arrhythmien sensitiviert. Diese Annahme konnte durch den Befund einer erhöhten diastolischen Ca^{2+}-Spark-Frequenz in isolierten Kardiomyozyten untermauert werden.

Im Isoprenalin-Infusions-Modell potenzierte die Expression beider Formen, trotz initialer Hyperkontraktilität, die kontraktile Dysfunktion und Dilatation. Eine Doxycyclin-induzierte Repression der I-1 Expression stoppte eindrücklich die Zunahme des pathologischen Phänotyps. Beide I-1 transgenen Mauslinien zeigten im Alter (>15 Monate) eine starke kardiale Dysfunktion und Dilatation.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass eine I-1 Überaktivität in jungen Tieren zu einer verbesserten kardialen Funktion führt, gleichzeitig aber gegenüber Katecholamin-getriggerten Arrhythmien sensitiviert. Auch im Kontext einer chronischen β-adrenergen Überstimulation sowie im hohen Alter konnte I-1 als ein ungünstiges Element der β-adrenergen Signalkaskade demaskiert werden. Diese Daten sprechen gegen eine therapeutische Überexpression von I-1 in der Herzinsuffizienz, wie sie derzeit bereits an Großtiermodellen getestet wird. Sie favorisieren vielmehr eine gentherapeutische bzw. pharmakologische Inhibition von I-1 als therapeutische Option.

5 Summary

Subsensitivity of the β-adrenergic/cAMP/protein kinase A (PKA) system is a hallmark of heart failure. On the one hand, it is a beneficial mechanism protecting the heart against the pro-arrhythmogenic, -apoptotic and energy-consuming effects of the excessively increased catecholamine-levels. On the other hand, it may be a contributing factor to the decreased phosphorylation state of major Ca^{2+}-handling proteins and therefore to the limited exercise-tolerance of heart failure patients.

Phosphatase-inhibitor-1 (I-1) is a distal element of the β-adrenergic cascade, which inhibits potently and selectively the dominating cardiac type-1 phosphatase (PP1) only in its PKA-phosphorylated form at threonine 35. This pathway allows amplification of PKA-mediated effects on the phosphorylation state of regulatory proteins. In contrast, phosphorylation at serine 67 by protein kinase Cα (PKCα) attenuates I-1's inhibitory activity on PP1. Furthermore, I-1 is dephosphorylated at threonine 35 and thus deactivated by Ca^{2+}/calmoduline-dependent type-2 phosphatase calcineurin. Indeed, consistent with I-1's proposed function, *in vitro* studies revealed that I-1 acts as a conditional, positive inotropic element of β-adrenergic signalling. Moreover, we could demonstrate that I-1 is markedly downregulated in human failing hearts and thus likely contributes to β-adrenergic desensitization. The aim of this project was to evaluate, whether modulating I-1's expression level *in vivo* influences contractile function and/or the propensity to

arrhythmias and thus whether I-1 may represent a potential target in the treatment of heart failure.

To address this hypothesis, we generated two double-transgenic mouse models with cardiac-specific and temporally regulated I-1 expression (Tet-Off system). To allow a bidirectional cause-effect-relationship analysis, both lines were crossed on a complete I-1 knockout background. To avoid phosphorylation-dependent counter regulation (PKCα/calcineurin) within I-1, the following mutations were introduced by PCR mutagenesis: (i) Serine 67 was replaced by “non-phosphorylatable” alanine (I-1-S67A) to exclude potential I-1 deactivation by PKCα. (ii) The replacement of threonine 35 by phosphomimetic aspartic acid and truncation to 65 amino acids (I-1-T35D) resulted in a non-regulatable, constitutively active I-1 form.

The main part of this project was the characterisation of the cardiac phenotype of both lines by using the regulatability of I-1 expression under basal conditions and in response to chronic isoprenaline-infusion. Littermates expressing only the tTA-transactivator served as controls. At the age of three months, both mutants revealed a doxycycline-dependent and thus I-1-induced hypercontractile phenotype but normal heart morphology. In addition, *in vivo* telemetric ECG-recordings in freely moving mice revealed a higher risk for catecholamine-triggered arrhythmias. At the molecular level, these hearts showed a higher phosphorylation of the SR Ca^{2+}-ATPase inhibitor phospholamban, which could mechanistically explain the hypercontractile phenotype, and of the SR Ca^{2+}-release channel indicating a higher propensity for diastolic Ca^{2+}-leak and thus potentially for triggered arrhythmias. Indeed, isolated cardiac myocytes showed a higher Ca^{2+}-spark-frequency.

Under stress-conditions induced by chronic isoprenaline-infusion, both I-1 mutants markedly exaggerated cardiac contractile dysfunction as well as dilation. Notably, the doxycycline-induced repression of I-1 expression could arrest the augmentation of the pathological phenotype. Moreover, aging mice (>15 months) of both transgenic I-1 lines developed strong contractile dysfunction and left ventricular dilation.

Taken together, this study shows that overexpression of I-1 improves cardiac contractile function in young animals but sensitizes the hearts for catecholamine-triggered arrhythmias. Exaggerated pathology after chronic β-adrenergic overstimulation and in normal aging implicate I-1 as a pathophysiologically detrimental element of the β-adrenergic pathway. These data suggest fundamental risks of gene-therapeutical I-1 overexpression in heart failure, which is currently under investigation in a large animal model. In fact, these data favour a gene-therapeutical or pharmacological I-1 inhibition as a therapeutically approach.

6 Literaturverzeichnis

Aggen JB, Nairn AC, Chamberlin R. Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol* 2000;7:R13-23

Ai X, Curran JW, Shannon TR, et al. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak in heart failure. *Circ Res* 2005;97:1314-22

Aitken A, Cohen P. Isolation and characterisation of active fragments of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 1982;147:54-8

Aktories K, Hofmann F, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel. URBAN & Fischer, 2008.

Allen PB, Hvalby O, Jensen V, et al. Protein phosphatase-1 regulation in the induction of long-term potentiation: heterogeneous molecular mechanisms. *J Neurosci* 2000;20:3537-43

A-Mohammadi S, Alvarez-Vallina L, Ashworth LJ, et al. Delay in resumption of the activity of tetracycline-regulatable promoter following removal of tetracycline analogues. *Gene Ther* 1997;4:993-7

Antos CL, Frey N, Marx SO, et al. Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res* 2001;89:997-1004

Asai K, Yang GP, Geng YJ, et al. Beta-adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic G(salpha) mouse. J Clin Invest 1999;104:551-8

Aschenbach WG, Suzuki Y, Breeden K, et al. The muscle-specific protein phosphatase PP1G/R(GL)(G(M))is essential for activation of glycogen synthase by exercise. *J Biol Chem* 2001;276:39959-67

Auerbach AB, Norinsky R, Ho W, et al. Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production. *Transgenic Res* 2003;12:59-69

Auerbach AB. Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochim Pol* 2004;51:9-31

Bartel S, Stein B, Eschenhagen T, et al. Protein phosphorylation in isolated trabeculae from nonfailing and failing human hearts. *Mol Cell Biochem* 1996;157:171-9

Benkusky NA, Weber CS, Scherman JA, et al. Intact beta-adrenergic response and unmodified progression toward heart failure in mice with genetic ablation of a major protein kinase A phosphorylation site in the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 2007;101:819-29

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415:198-205

Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:417-29

Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 2008;70:23-49

Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:206-12

Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, et al. Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 1998;280:1940-2

Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 2004;4:1633-49

Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, et al. Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* 2002;11:115-32

Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, et al. Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 1997;96:1495-500

Böger H, Gruss P. Functional determinants for the tetracycline-dependent transactivator tTA in transgenic mouse embryos. *Mech Dev* 1999;83:141-53

Boguski MS. Comparative genomics: the mouse that roared. *Nature* 2002;420:515-6

Boluyt MO, Long X, Eschenhagen T, et al. Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat heart. *Am J Physiol* 1995;269:H638-47

Boknik P, Fockenbrock M, Herzig S, et al. Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;362:222-31

Boshart M, Weber F, Jahn G, et al. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 1985;41:521-30

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54

Braz JC, Gregory K, Pathak A, et al. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 2004;10:248-54

Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, et al. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 1981;27:223-31

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, et al. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982;307:205-11

Bristow MR. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 2000;101:558-69

Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 1999;51:651-90

Burkard N, Rokita AG, Kaufmann SG, et al. Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. *Circ Res* 2007;100:e32-44

Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989;244:1288-92

Carr AN, Sutliff RL, Weber CS, et al. Is myosin phosphatase regulated in vivo by inhibitor-1? Evidence from inhibitor-1 knockout mice. *J Physiol* 2001;534:357-66

Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, et al. Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 2002;22:4124-35

Carrier L. Cardiac myosin-binding protein C in the heart. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2007;100:238-43

Chien KR. To Cre or not to Cre: the next generation of mouse models of human cardiac diseases. *Circ Res* 2001;88:546-9

Cohen P, Rylatt DB, Nimmo GA. The hormonal control of glycogen metabolism: the amino acid sequence at the phosphorylation site of protein phosphatase inhibitor-1. *FEBS Lett* 1977;76:182-6

Cohen P, Cohen PT. Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem* 1989;264:21435-8

Cohen P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 2000;25:596-601

Cohen PT. Two isoforms of protein phosphatase 1 may be produced from the same gene. *FEBS Lett* 1988;232:17-23

Cohen PT. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* 1997;22:245-51

Cohen PT. Protein phosphatase 1-targeted in many directions. *J Cell Sci* 2002;115:241-56

Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1984;311:819-23

Connor JH, Quan HN, Ramaswamy NT, et al. Inhibitor-1 interaction domain that mediates the inhibition of protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 1998;273:27716-24

Curran J, Hinton MJ, Rios E, et al. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res* 2007;100:391-8

Depaoli-Roach AA, Park IK, Cerovsky V, et al. Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Adv Enzyme Regul* 1994;34:199-224

Despa S, Bossuyt J, Han F, et al. Phospholemman-phosphorylation mediates the beta-adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes. *Circ Res* 2005;97:252-9

Dobie K, Cummins P. Changes in transforming growth factor beta (TGF-beta) expression in the myocardium. *Biochem Soc Trans* 1997;25:443S

Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, et al. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 1987;330:576-8

Du GG, Sandhu B, Khanna VK, et al. Topology of the Ca2+ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (RyR1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16725-30

Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, et al. Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J* 1997;16:1876-87

Eisner DA, Trafford AW. Heart failure and the ryanodine receptor: does Occam's razor rule? *Circ Res* 2002;91:979-81

Eisner DA, Kashimura T, O'Neill SC, et al. What role does modulation of the ryanodine receptor play in cardiac inotropy and arrhythmogenesis? *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:474-81

El-Armouche A, Rau T, Zolk O, et al. Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *Faseb J* 2003;17:437-9

El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, et al. Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 2004;61:87-93

El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, et al. Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:700-6

El-Armouche A, Gocht F, Jaeckel E, et al. Long-term beta-adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart. *Eur J Heart Fail* 2007;9:1077-80

El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, et al. Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:223-9

El-Armouche A, Eschenhagen T. beta-Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* 2008

El-Armouche A, Wittköpper K, Degenhardt F, et al. Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2008;80:396-406

Elbrecht A, DiRenzo J, Smith RG, et al. Molecular cloning of protein phosphatase inhibitor-1 and its expression in rat and rabbit tissues. *J Biol Chem* 1990;265:13415-8

Elison C, Jenden DJ. The effect of ryanodine on model systems derived from muscle. I. Glycerol-extracted muscle fibers. *Biochem Pharmacol* 1967;16:1339-45

Endo S, Zhou X, Connor J, et al. Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry* 1996;35:5220-8

Engelhardt S, Bohm M, Erdmann E, et al. Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:146-54

Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, et al. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7059-64

Engelhardt S, Grimmer Y, Fan GH, et al. Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. *Mol Pharmacol* 2001;60(4):629-31

ESC Guidelines for the treatment of acute and chronic heart failure 2008. *Eur Heart J* 2008;29:2388-2442

Eschenhagen T, Mende U, Nose M, et al. Isoprenaline-induced increase in mRNA levels of inhibitory G-protein alpha-subunits in rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1991;343:609-15

Eschenhagen T, Mende U, Diederich M, et al. Long term beta-adrenoceptor-mediated up-regulation of Gi alpha and G(o) alpha mRNA levels and pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins in rat heart. *Mol Pharmacol* 1992a;42:773-83

Eschenhagen T, Mende U, Nose M, et al. Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein alpha subunit Gi alpha-2 in human end-stage heart failure. *Circ Res* 1992;70:688-96

Eschenhagen T. G proteins and the heart. *Cell Biol Int* 1993;17:723-49

Eschenhagen T. Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nat Med* 2008;14:485-7

Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, et al. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* 2002;105:85-92

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-6

Faulx MD, Ernsberger P, Vatner D, et al. Strain-dependent beta-adrenergic receptor function influences myocardial responses to isoproterenol stimulation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H30-6

Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 2002;82:893-922

Foulkes JG, Jefferson LS, Cohen P. The hormonal control of glycogen metabolism: dephosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 in vivo in response to insulin. *FEBS Lett* 1980;112:21-4

Funakoshi H, Chan TO, Good JC, et al. Regulated overexpression of the A1-adenosine receptor in mice results in adverse but reversible changes in cardiac morphology and function. *Circulation* 2006;114:2240-50

Furth PA, St Onge L, Boger H, et al. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9302-6

Fussenegger M. The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnol Prog* 2001;17:1-51

Gao MH, Bayat H, Roth DM, et al. Controlled expression of cardiac-directed adenylylcyclase type VI provides increased contractile function. *Cardiovasc Res* 2002;56:197-204

Gaudin C, Ishikawa Y, Wight DC, et al. Overexpression of Gs alpha protein in the hearts of transgenic mice. *J Clin Invest* 1995;95:1676-83

Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, et al. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 1998;102:1377-84

Gellen B, Fernandez-Velasco M, Briec F, et al. Conditional FKBP12.6 overexpression in mouse cardiac myocytes prevents triggered ventricular tachycardia through specific alterations in excitation-contraction coupling. *Circulation* 2008;117:1778-86

Genoux D, Haditsch U, Knobloch M, et al. Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* 2002;418:970-5

Georgakopoulos D, Mitzner WA, Chen CH, et al. In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry. *Am J Physiol* 1998;274:H1416-22

Gheorghiade M, Gattis WA, Klein L. OPTIME in CHF trial: rethinking the use of inotropes in the management of worsening chronic heart failure resulting in hospitalization. *Eur J Heart Fail* 2003;5:9-12

Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 2003;426:895-9

Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:7380-4

Gordon JW, Ruddle FH. DNA-mediated genetic transformation of mouse embryos and bone marrow--a review. *Gene* 1985;33:121-36

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5547-51

Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 1995;268:1766-9

Greengard P, Allen PB, Nairn AC. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 1999;23:435-47

Grimm M, Mahnecke N, Soja F, et al. The MLCK-mediated alpha1-adrenergic inotropic effect in atrial myocardium is negatively modulated by PKCepsilon signaling. *Br J Pharmacol* 2006;148:991-1000

Grueter CE, Colbran RJ, Anderson ME. CaMKII, an emerging molecular driver for calcium homeostasis, arrhythmias, and cardiac dysfunction. *J Mol Med* 2007;85:5-14

Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, et al. Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem* 1991;266:9180-5

Guo T, Zhang T, Mestril R, et al. Ca2+/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 2006;99:398-406

Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM, et al. Evidence for presence and hormonal regulation of protein phosphatase inhibitor-1 in ventricular cardiomyocyte. *Am J Physiol* 1996;270:H1159-64

Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM, et al. Inhibition of type 1 protein phosphatase activity by activation of beta-adrenoceptors in ventricular myocardium. *Biochem Pharmacol* 2002;63:1069-76

Gupta RC, Mishra S, Rastogi S, et al. Cardiac SR-coupled PP1 activity and expression are increased and inhibitor 1 protein expression is decreased in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H2373-81

Györke S. Molecular basis of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Heart Rhythm* 2009;6:123-9

Harding SE, MacLeod KT, Jones SM, et al. Contractile responses of myocytes isolated from patients with cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1991;12 Suppl D:44-8

Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;37:279-89

Hein L, Stevens ME, Barsh GS, et al. Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6391-6

Hennighausen L, Wall RJ, Tillmann U, et al. Conditional gene expression in secretory tissues and skin of transgenic mice using the MMTV-LTR and the tetracycline responsive system. *J Cell Biochem* 1995;59:463-72

Heubach JF, Rau T, Eschenhagen T, et al. Physiological antagonism between ventricular beta 1-adrenoceptors and alpha 1-adrenoceptors but no evidence for beta 2- and beta 3-adrenoceptor function in murine heart. *Br J Pharmacol* 2002;136:217-29

Higuchi E, Nishi A, Higashi H, et al. Phosphorylation of protein phosphatase-1 inhibitors, inhibitor-1 and DARPP-32, in renal medulla. *Eur J Pharmacol* 2000;408:107-16

Hillen W, Berens C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:345-69

Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, et al. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 1993;88:107-15

Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, et al. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:6A-13A

Huang FL, Glinsmann WH. Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 1976;70:419-26

Ingebritsen TS, Cohen P. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 1983;221:331-8

Ito M, Nakano T, Erdodi F, et al. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem* 2004;259:197-209

Iwase M, Uechi M, Vatner DE, et al. Cardiomyopathy induced by cardiac Gs alpha overexpression. *Am J Physiol* 1997;272:H585-9

Johnson DF, Moorhead G, Caudwell FB, et al. Identification of protein-phosphatase-1-binding domains on the glycogen and myofibrillar targetting subunits. *Eur J Biochem* 1996;239:317-25

Jones LR, Zhang L, Sanborn K, et al. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1995;270:30787-96

Kadambi VJ, Ball N, Kranias EG, et al. Modulation of force-frequency relation by phospholamban in genetically engineered mice. *Am J Physiol* 1999;276:H2245-50

Kass DA, Hare JM, Georgakopoulos D. Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circ Res* 1998;82:519-22

Kaupp UB, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 2002;82:769-824

Kennelly PJ, Krebs EG. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 1991;266:15555-8

Kirchhefer U, Baba HA, Boknik P, et al. Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2. *Cardiovasc Res* 2005;68:98-108

Kirchhof P, Klimas J, Fabritz L, et al. Stress and high heart rate provoke ventricular tachycardia in mice expressing triadin. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:962-71

Kiriazis H, Wang K, Xu Q, et al. Knockout of beta(1)- and beta(2)-adrenoceptors attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis. *Br J Pharmacol* 2008;153:684-92

Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, et al. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10933-8

Knollmann BC, Kirchhof P, Sirenko SG, et al. Familial hypertrophic cardiomyopathy-linked mutant troponin T causes stress-induced ventricular tachycardia and Ca2+-dependent action potential remodeling. *Circ Res* 2003;92:428-36

Kobayashi T, Solaro RJ. Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. *Annu Rev Physiol* 2005;67:39-67

Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, et al. Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* 2006;98:235-44

Koller BH, Hagemann LJ, Doetschman T, et al. Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:8927-31

Krestel HE, Mayford M, Seeburg PH, et al. A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E39

Kuehn MR, Bradley A, Robertson EJ, et al. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* 1987;326:295-8

Kudej RK, Iwase M, Uechi M, et al. Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2735-46

Le Peuch CJ, Haiech J, Demaille JG. Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry* 1979;18:5150-7

Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, et al. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 2005;123:25-35

Lehnart SE, Mongillo M, Bellinger A, et al. Leaky Ca2+ release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice. *J Clin Invest* 2008;118:2230-45

Lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2001;2:743-55

Li L, Chu G, Kranias EG, et al. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol* 1998;274:H1335-47

Li Y, Kranias EG, Mignery GA, et al. Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 2002;90:309-16

Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, et al. Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* 2000;101:1707-14

Linck B, Boknik P, Baba HA, et al. Long-term beta adrenoceptor-mediated alteration in contractility and expression of phospholamban and sarcoplasmic reticulum Ca(++)-ATPase in mammalian ventricle. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286:531-8

Link D, Irintchev A, Knauf U, et al. A model system for studying postnatal myogenesis with tetracycline-responsive, genetically engineered clonal myoblasts in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 2001;270:138-50

Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 2003;93:896-906

Luo W, Grupp IL, Harrer J, et al. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 1994;75:401-9

Luo W, Wolska BM, Grupp IL, et al. Phospholamban gene dosage effects in the mammalian heart. *Circ Res* 1996;78:839-47

Lüss H, Klein-Wiele O, Boknik P, et al. Regional expression of protein phosphatase type 1 and 2A catalytic subunit isoforms in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:2349-59

MacDougall LK, Campbell DG, Hubbard MJ, et al. Partial structure and hormonal regulation of rabbit liver inhibitor-1; distribution of inhibitor-1 and inhibitor-2 in rabbit and rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1989;1010:218-26

MacDougall LK, Jones LR, Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 1991;196:725-34

MacDonnell SM, Garcia-Rivas G, Scherman JA, et al. Adrenergic regulation of cardiac contractility does not involve phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine 2808. *Circ Res* 2008;102:e65-72

Mack V, Burnashev N, Kaiser KM, et al. Conditional restoration of hippocampal synaptic potentiation in Glur-A-deficient mice. *Science* 2001;292:2501-4

MacLennan DH, Asahi M, Tupling AR. The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin. *Ann N Y Acad Sci* 2003;986:472-80

MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:566-77

Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:919-39

Maier LS, Zhang T, Chen L, et al. Transgenic CaMKIIdeltaC overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca2+ handling: reduced SR Ca2+ load and activated SR Ca2+ release. *Circ Res* 2003;92:904-11

Maier LS, Bers DM. Role of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* 2007;73:631-40

Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 1988;336:348-52

Marks AR, Priori S, Memmi M, et al. Involvement of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Cell Physiol* 2002;190:1-6

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7634-8

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 2000;101:365-76

Mayford M, Bach ME, Huang YY, et al. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 1996;274:1678-83

McCloskey DT, Turnbull L, Swigart PM, et al. Cardiac transgenesis with the tetracycline transactivator changes myocardial function and gene expression. *Physiol Genomics* 2005;22:118-26

McMurray JJ, Stewart S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 2000;83:596-602

Meissner G, Henderson JS. Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca2+ and is modulated by Mg2+, adenine nucleotide, and calmodulin. *J Biol Chem* 1987;262:3065-73

Mende U, Eschenhagen T, Geertz B, et al. Isoprenaline-induced increase in the 40/41 kDa pertussis toxin substrates and functional consequences on contractile response in rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1992;345:44-50

MERIT-HF-Study. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999;353(9169):1988-9

Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 2001;24:71-80

Milano CA, Allen LF, Rockman HA, et al. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* 1994;264:582-6

Milting H, Lukas N, Klauke B, et al. Composite polymorphisms in the ryanodine receptor 2 gene associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2006;71:496-505

Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, et al. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 1994;369:486-8

Mungrue IN, Gros R, You X, et al. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J Clin Invest* 2002;109:735-43

Näbauer M, Kääb S. Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;37:324-34

Nagy A, Perrimon N, Sandmeyer S, et al. Tailoring the genome: the power of genetic approaches. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:276-84

Nakai J, Imagawa T, Hakamat Y, et al. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett* 1990;271:169-77

Nakielny S, Campbell DG, Cohen P. The molecular mechanism by which adrenalin inhibits glycogen synthesis. *Eur J Biochem* 1991;199:713-22

Neumann J, Schmitz W, Scholz H, et al. Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. *Lancet* 1988;2:936-7

Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, et al. Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res* 1991;69:1450-7

Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, et al. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:265-72

Nicolaou P, Rodriguez P, Ren X, et al. Inducible expression of active protein phosphatase-1 inhibitor-1 enhances basal cardiac function and protects against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2009;104(8):1012-20

Nishigaki K, Tomita M, Kagawa K, et al. Marked expression of plasma brain natriuretic peptide is a special feature of hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1234-42

Oliver CJ, Shenolikar S. Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci* 1998;3:D961-72

Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:376-86

Osadchii OE. Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail Rev* 2007;12:66-86

Otsu K, Willard HF, Khanna VK, et al. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca2+ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1990;265:13472-83

Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, et al. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc* 2008;3:1422-34

Packer M. Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. *Circulation* 1988;77:721-30

Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, et al. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med* 1991;325:1468-75

Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982;300:611-5

Passman RS, Fishman GI. Regulated expression of foreign genes in vivo after germline transfer. *J Clin Invest* 1994;94:2421-5

Pathak A, del Monte F, Zhao W, et al. Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ Res* 2005;96:756-66

Pearson RB, Kemp BE. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* 1991;200:62-81

Plumb DC. Plumb's Veterinary Drug Handbook: Desk Edition (Plumb's Veterinary Drug Handbook). Wiley & Sons, 2008.

Port JD, Bristow MR. Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:887-905

Redfern CH, Coward P, Degtyarev MY, et al. Conditional expression and signaling of a specifically designed Gi-coupled receptor in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 1999;17:165-9

Reliene R, Schiestl RH. Differences in animal housing facilities and diet may affect study outcomes-a plea for inclusion of such information in publications. *DNA Repair (Amst)* 2006;5:651-3

Ringer S. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol* 1883;4:29-42 3

Riond JL, Riviere JE. Pharmacology and toxicology of doxycycline. *Vet Hum Toxicol* 1988;30:431-43

Rodriguez P, Bhogal MS, Colyer J. Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *J Biol Chem* 2003;278:38593-600

Rodriguez P, Mitton B, Waggoner JR, et al. Identification of a novel phosphorylation site in protein phosphatase inhibitor-1 as a negative regulator of cardiac function. *J Biol Chem* 2006;281:38599-608

Rodriguez P, Mitton B, Nicolaou P, et al. Phosphorylation of human inhibitor-1 at Ser67 and/or Thr75 attenuates stimulatory effects of protein kinase A signaling in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H762-9

Sahin B, Shu H, Fernandez J, et al. Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by protein kinase C. *J Biol Chem* 2006;281:24322-35

Sanbe A, Gulick J, Hanks MC, et al. Reengineering inducible cardiac-specific transgenesis with an attenuated myosin heavy chain promoter. *Circ Res* 2003;92:609-16

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-7

Sasaki K, Shima H, Kitagawa Y, et al. Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1990;81:1272-80

Schönig K, Schwenk F, Rajewsky K, et al. Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e134

Schröder F, Handrock R, Beuckelmann DJ, et al. Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* 1998;98:969-76

Scrimgeour AG, Allen PB, Fienberg AA, et al. Inhibitor-1 is not required for the activation of glycogen synthase by insulin in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1999;274:20949-52

Shenolikar S, Nairn AC. Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1991;23:1-121

Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, et al. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:2108-18

Simmerman HK, Jones LR. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 1998;78:921-47

SOLVD-Study. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. The SOLVD Investigattors. *N Engl J Med* 1992;327(10):725-7

Stange M, Xu L, Balshaw D, et al. Characterization of recombinant skeletal muscle (Ser-2843) and cardiac muscle (Ser-2809) ryanodine receptor phosphorylation mutants. *J Biol Chem* 2003;278:51693-702

Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, et al. Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 1991;266:24613-20

Swedberg K, Hjalmarson A, Waagstein F, et al. Prolongation of survival in congestive cardiomyopathy by beta-receptor blockade. *Lancet* 1979;1:1374-6

Tada M, Kirchberger MA, Repke DI, et al. The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1974;249:6174-80

Takasago T, Imagawa T, Shigekawa M. Phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor by cAMP-dependent protein kinase. *J Biochem* 1989;106:872-7

Takasago T, Imagawa T, Furukawa K, et al. Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation. *J Biochem* 1991;109:163-70

Takeshita D, Shimizu J, Kitagawa Y, et al. Isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts: does short-term treatment correspond to long-term treatment? *J Physiol Sci* 2008;58:179-88

Triezenberg SJ, Kingsbury RC, McKnight SL. Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev* 1988;2:718-29

Ungerer M, Böhm M, Elce JS, et al. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 1993;87:454-63

Valencik ML, McDonald JA. Cardiac expression of a gain-of-function alpha(5)-integrin results in perinatal lethality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H361-7

Vinet L, Rouet-Benzineb P, Marniquet X, et al. Chronic doxycycline exposure accelerates left ventricular hypertrophy and progression to heart failure in mice after thoracic aorta constriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H352-60

Waagstein F, Hjalmarson A, Varnauskas E, et al. Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *Br Heart J* 1975;37:1022-36

Wegener AD, Simmerman HK, Lindemann JP, et al. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 1989;264:11468-74

Wehrens XH, Lehnart SE, Huang F, et al. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* 2003;113:829-40

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, et al. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 2004;94:e61-70

Weiser DC, Sikes S, Li S, et al. The inhibitor-1 C terminus facilitates hormonal regulation of cellular protein phosphatase-1: functional implications for inhibitor-1 isoforms. *J Biol Chem* 2004;279:48904-14

Williams KR, Hemmings HC, Jr., LoPresti MB, et al. DARPP-32, a dopamine- and cyclic AMP-regulated neuronal phosphoprotein. Primary structure and homology with protein phosphatase inhibitor-1. *J Biol Chem* 1986;261:1890-903

Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, et al. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem* 1991;266:11144-52

Xiao B, Sutherland C, Walsh MP, et al. Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca2+-release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ Res* 2004;94:487-95

Xiao B, Jiang MT, Zhao M, et al. Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circ Res* 2005;96:847-55

Xiao B, Zhong G, Obayashi M, et al. Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem J* 2006;396:7-16

Yamada M, Ikeda Y, Yano M, et al. Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 gene delivery ameliorates heart failure progression in genetic cardiomyopathy. *Faseb J* 2006;20:1197-9

Yano N, Tseng A, Zhao TC, et al. Temporally controlled overexpression of cardiac-specific PI3Kalpha induces enhanced myocardial contractility--a new transgenic model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1690-4

Yu Z, Redfern CS, Fishman GI. Conditional transgene expression in the heart. *Circ Res* 1996;79:691-7

7 Lebenslauf

Name	Katrin Wittköpper
Geburtstag	18. November 1979
Geburtsort	Düsseldorf

Ausbildung

1990 bis 1991	Suitbertus-Gymnasium, Düsseldorf
1991 bis 1999	Gymnasium Vaterstetten
1999 bis 2004	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Mai 2004 bis April 2005	Praktisches Jahr: • Wittelsbacher Apotheke, München • Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Hamburg, Eppendorf
Juli 2005	Approbation zur Apothekerin
Seit Sept. 2005	Dissertation am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg, Eppendorf

Berufstätigkeit

Juli 2005 bis Aug. 2005	Wittelsbacher Apotheke, München

Auszeichnung

April 2009	Rudi-Busse-Young Investigator Award für Experimentelle Kardiologie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie

8 Veröffentlichungen

Originalarbeiten

El-Armouche A, Singh J, Naito H, **Wittköpper K**, Didié M, Laatsch A, Zimmermann WH, Eschenhagen T. Adenovirus-delivered short hairpin RNA targeting PKCalpha improves contractile function in reconstituted heart tissue. *J Mol Cell Cardiol* 2007 Sep;43(3):371-6

El-Armouche A, Gocht F, Jaeckel E, **Wittköpper K**, Peeck M, Eschenhagen T. Long-term beta-adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart. *Eur J Heart Fail* 2007 Nov;9(11):1077-80

El-Armouche A, **Wittköpper K**, Degenhardt F, Weinberger F, Didié M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsöld B., Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T. Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2008 Dec 1;80(3):396-406

Wittköpper K, Fabritz L, Kirchhof P, Neef S, Maier LS, Unsöld B, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T, El-Armouche A. Conditional overexpression of constitutive active phosphatase-1-inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious with aging and after catecholaminergic stress. *in Vorbereitung*

Übersichtsartikel

Wittköpper K, El-Armouche A, Eschenhagen T. Olanzapin. *Dtsch Med Wochenschr* 2008 Sep;133(39):1958-62

Kongressbeiträge

El-Armouche A, Degenhardt F, Weinberger F, Gocht F, **Wittköpper K**, Melnychenko I, Didié M, Zimmermann WH, Grimm M, Eschenhagen T. Phosphatase Inhibitor-1 is Critically Involved in Acute and Chronic Catecholamine Stress Responses. *American Heart Association Scientific Session*, Chicago, November 2006

El-Armouche A, Degenhardt F, Weinberger F, Gocht F, **Wittköpper K**, Melnychenko I, Didié M, Zimmermann WH, Grimm M, Eschenhagen T. Phosphatase inhibitor-1 is critically involved in acute and chronic catecholamine stress responses. *Winter Meeting on Translational Basic Science of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology*, Garmisch-Partenkirchen, Januar 2007

Wittköpper K, El-Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T. Inducible and cardiac-specific expression of wild-type and phospho-site mutated protein phosphatase inhibitor-1 (I-1) on an I-1 knockout background. *48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie*, Mainz, März 2007

Wittköpper K, El-Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T. Conditional heart-specific expression of wild-type and phosphosite mutated protein phosphatase inhibitor-1. *73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie*, Mannheim, April 2007

El-Armouche A, Degenhardt F, Weinberger F, Gocht F, **Wittköpper K**, Melnychenko I, Didié M, Zimmermann WH, Grimm M, Eschenhagen T. Der Phosphatase Inhibitor-1 spielt eine entscheidende Rolle in akuten und chronischen Katecholamin-induzierten Stressreaktionen. *73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie*, Mannheim, April 2007

Wittköpper K, Unsöld B, Boknik P, Hasenfuss G, Eschenhagen T, El-Armouche A. Effects of inducible and myocyte-specific inhibitor-1 overexpression on contractility in the murine heart. *49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie*, Mainz, März 2008

Wittköpper K, Unsöld B, Boknik P, Hasenfuss G, Eschenhagen T, El-Armouche A. Consequences of inducible and myocyte-specific inhibitor-1 overexpression on contractile performance in the murine heart. *74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie*, Mannheim, März 2008

Wittköpper K, Unsöld B, Boknik P, Hasenfuss G, Eschenhagen T, El-Armouche A. Inducible and cardiac specific inhibitor-1 overexpression enhances contractile performance in the murine heart. *28th annual meeting, European Section of the International Society for Heart Research*, Athen, Mai 2008

Wittköpper K, Fabritz L, Kirchhoff P, Unsöld B, Boknik P, Hasenfuss G, Eschenhagen T, El-Armouche A. Phosphatase-1-inhibitor-1 improves contractile performance but increases propensity toward arrhythmias and contractile dysfunction after pathological beta-adrenergic stimulation in mice. *American Heart Association Scientific Session*, New Orleans, 2008

Drzewiecki K, Fabritz L, Fortmüller L, Kirchhof P, Laakmann S, El-Armouche A, **Wittköpper K**, Zimmermann N, Müller FU, Schmitz W, Boknik P. β-Adrenergic Signalling in A_{2A}-Adenosine Receptor Overexpressing Mice. *50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie*, Mainz, März 2009

Wittköpper K, Fabritz L, Kirchhof P, Unsöld B, Hasenfuss G, Dobrev D, Geertz B, Eschenhagen T, El-Armouche A. Conditional overexpression of constitutive active phosphatase-inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious with aging and after catecholaminergic stress. *75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie*, Mannheim, April 2009

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Generierung und kardiale Phänotypisierung von Mäusen, die phospho-mutierte Formen des Phosphatase-Inhibitor-1 herzspezifisch und konditional überexprimieren

in der Abteilung Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen und der Anleitung von Herrn PD Dr. med. Ali El-Armouche und der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. med. Michael Korth für den Fachbereich Chemie ohne fremde Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht habe.

Hamburg, Mai 2009 ……..

Katrin Wittköpper

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen für die Vergabe der Promotionsarbeit sowie die Anleitung und Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion wie auch von wissenschaftlichen Beiträgen. Des Weiteren danke ich besonders für die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen und für die äußerst schnelle Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Michael Korth danke ich ausdrücklich für die Übernahme des zweiten Gutachtens und für die Betreuung meiner Promotionsarbeit für den Fachbereich Chemie.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Ali El-Armouche für die Vergabe dieses sehr interessanten und herausfordernden Promotionsthemas und für die Betreuung der Arbeit bedanken. Sein ungebrochener Optimismus, das in mich gesetzte Vertrauen und die gewährten Freiheiten waren sehr motivierend für mich. Durch zahlreiche Anregungen und Diskussionen entstand ein sehr produktives Arbeitsklima, in dem ich mich als Naturwissenschaftlerin entscheidend weiterentwickeln konnte. Des Weiteren bin ich ihm sehr dankbar für die Möglichkeit, an zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen teilnehmen zu dürfen.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen des Instituts danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, das hervorragende Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft. Vor allem möchte ich mich bei Christiane Neuber, Hannie Sotoud, Jutta Starbatty und Thomas Schulze für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und für viele Aufmunterungen innerhalb unserer Arbeitsgruppe bedanken. Bei Jutta Starbatty bedanke ich mich besonders für die liebe Einarbeitung in Labortechniken zu Beginn meiner Arbeit, bei Dr. Saskia Schlossarek für die tolle freundschaftliche Bürogemeinschaft und das gewissenhafte Korrekturlesen der Arbeit. Mein großer Dank gilt auch Birgit Geertz für die Durchführung zahlreicher Echos und die freundschaftliche und engagierte Zusammenarbeit. June Uebeler möchte ich besonders für die tatkräftige Unterstützung bei der Genotypisierung danken. Mein ganz besonderer Dank gilt

Dr. Ariane Schmechel für eine außergewöhnliche Freundschaft und die vielen gemeinsamen Stunden außerhalb des Labors.

Für fruchtvolle Kollaborationen danke ich Dr. Larissa Fabritz und Prof. Dr. Paulus Kirchhof (Münster), Dr. Stefan Neef und Prof. Dr. Lars Maier (Göttingen) sowie Dr. Bernhard Unsöld und Prof. Dr. Gerd Hasenfuss (Göttingen). Herrn PD Dr. Peter Boknik und Frau Dr. Magdolna Varsányi danke ich für die Möglichkeit, in ihren Laboren Versuche erlernen und durchführen zu dürfen. Bei Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Herstellung meiner transgenen Mauslinien bedanken. Besonders danken möchte ich auch Dr. Jacqueline Alig für die wertvollen Ratschläge bezüglich des Tet-Systems gerade zu Beginn der Arbeit und den Tierpflegern, insbesondere Susanne Conrad, für eine ausgezeichnete und zuverlässige Arbeit.

Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG-FOR-604) durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern und meinen beiden Schwestern für ihre immerwährende, uneingeschränkte Unterstützung danken sowie Peter für seine Liebe und Geduld.

11 Anhang

11.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AmpR	Ampicillin Resistenz
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AU	*arbitrary units,* willkürliche Einheiten
AwThd/s	Linksventrikuläre enddiastolische bzw. –systolische Vorderwandstärke
β-AR	β-Adrenozeptor
BNP	*Brain natriuretic peptide*
bp	Basenpaare
BW	Körpergewicht
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamidoproyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CMV	Cytomegalovirus
CO	Herzminutenvolumen
Col E1 ori	*E. coli* Replikationsursprung
CSQ	Calsequestrin
DARPP-32	Dopamin- und cAMP-reguliertes Phosphoprotein-32
dTG	doppelt-transgen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DW	Dox-Wasser
Ea	Arterielle Elastizität
ECL	*enhanced Chemiluminescence*
E. coli	*Escherichia coli*
EF	Ejektionsfraktion
eIF4E	*eukaryotic translation initiation factor 4E*
ERK1/2	*extracellularly responsive kinases* 1/2
f1 ori	Replikationsursprung des Phagen f1
FAS	Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion
for	*forward,* 5'-3' Primer
g	Erdschwerebeschleunigung (9,8 m/s^2)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	*Green fluorescence protein,* grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HF	Herzfrequenz
hGH	*human growth hormone*
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK	*Human Embryonic Kidney*
HW	Herzgewicht

I-1	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1
I-1c	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1-T35D
I-1*	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1-S67A
IC_{50}	Mittlere inhibitorische Konzentration
i.p.	Intraperitoneal
KanaR	Kanamycin Resistenz
kDa	Kilodalton
KO	*Knockout*
LVEDD/S	Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. –systolischer Durchmesser
LVEDV/SV	Linksventrikuläres enddiastolisches bzw. –systolisches Volumen
LVEDP/SP	Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. –systolischer Druck
LVM	Masse des linken Ventrikels
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
αMHC	α*Myosin heavy chain*
β-MHC	β*Myosin heavy chain*
M	Mol/l
min	Minute
MW	*Molecular Weight Marker,* Protein- bzw. DNA-Größenstandard
mRNA	*messenger* Ribonukleinsäure
n.s.	Nicht signifikant
NeoR	Neomycin Resistenz Gen
$p90^{RSK}$	90 kDa ribosomale S6 Kinase
pA	Polyadenylierungsstelle
pBR322	Replikationsursprung
PBS	*phosphate buffered saline*, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	*polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
PI3	Phosphatidylinositol-3
PKA	Protein Kinase A
PKCα	Protein Kinase C Isoform α
PP1	Serin/Threonin Protein-Phosphatase vom Typ 1
PP1c	Katalytische Untereinheit der PP1
PP2A	Serin/Threonin Protein-Phosphatase vom Typ 2A
pUC ori	Replikationsursprung des Plasmids pUC
PwThd/s	Linksventrikuläre enddiastolische bzw. –systolische Hinterwandstärke
rev	*reverse*, 3'–5' Primer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*rounds per minute*, (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SDS	*Sodiumdodecylsulfat*, Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SV40	Simianes Virus 40

TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TetR	Tet-Repressor
TL	Tibialänge
T_m	Schmelztemperatur
TRE	*Tetracycline Responsive Element,* (Tetrazyklin-ansprechendes Element)
tTA	Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator
$tTA^{I\text{-}1(-/-)}$	αMHC-Transaktivator-Maus auf einem I-1 KO Hintergrund
$tTA^{I\text{-}1(+/+)}$	αMHC-Transaktivator-Maus mit endogener I-1 Expression
U	*Units*; Enzymeinheit
üN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol	Volumen
VP16	Virales Protein 16
WD	Wasser-Dox
WDW	Wasser-Dox-Wasser
wks	Wochen
w/v	Gewicht/Volumen

Si-Einheiten

k	Kilo (10^3)
m	Milli (10^{-3})
µ	Micro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
p	Pico (10^{-12})
f	Femto (10^{-15})

11.2 Aminosäuren

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Aspartat	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutamat	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
L	Leu	Leucin			
M	Met	Methionin	X	beliebige Aminosäure	

11.3 Material

11.3.1 Substanzen

Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (29:1)	R: 45-46-20/21-23/24/25-43-48; S: 36/37/39-45-60	Bio-Rad
Adenosin 5'-Triphosphat (ATP)		Sigma
Agarose		Invitrogen
alpha-32P-dCTP		Amersham-Biosciences
Ammoniumpersulfat (APS)	R: 8-22-36/37/38-42/43 S: 22-24-26-37	Bio-Rad
Ampicillin Trihydrat	R: 36/37/38-42/43 S: 22-26-36/37	Serva
Aqua ad injectabilia		Baxter GmbH
Bacto™ Tryptone		Becton Dickinson
Bacto™ Hefextrakt		Becton Dickinson
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-Toluidin-Salz (BCIP)	R: 36/37/38 S: 26	Biomol
Bromphenolblau	S: 22-24/25	Merck
Calciumchloridhexahydrat ($CaCl_2$ x $6H_2O$)	R: 36 S: 22-24/25	Sigma
Calf Intestine alkalische Phosphatase (CIP)		New England Biolabs
Coomassie Brilliant Blau G-250 Lösung	R: 20/21/22-34-68 S: 26-36/37/39-45	Bio-Rad
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 x $2H_2O$)	S: 22-24/25	Merck
Dimethylformamid (DMF)	R: 61-20/21-36; S: 53-45	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	R: 36/37/38; S: 23-26-36	Sigma
1,4-Dithiothreitol (DTT)	R: 22-36/37/38; S: 26-36	Sigma
ECL Western blotting detection system	R: 11-19-36/37-40-66	Pierce
Ethanol (96%)	R: 11; S: 7-16	Geyer
Ethidiumbromid	R: 23-68; S: 36/37-45	Fluka
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	R: 36-52/53 S: 26-61	Sigma
Glucose		Sigma
Glutathion		Sigma
Glycerol		Merck
Glycin	S: 22-24/25	Roth

[^{3}H]-CGP 12177		Affinity BioReagents
[^{3}H]-Ryanodin		NEN-DuPont
Hämatoxylin		Sigma
HEPES		Sigma
Histidin		Sigma
Hydrochloridsäure (HCl)	R: 34-37; S: 26-36/37/39-45	Merck
Isoprenalin Hydrochlorid	R: 36/37/38; S: 26-36	
Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG)		Sigma
Isopropanol	R: 11-36-37 S: 7-16-24/25-26	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	S: 22-24/25	Merck
Kaliumhydrogencarbonat ($KHCO_3$)		Merck
Kaliumdihydrogenphosphophat (KH_2PO_4)		Merck
Kaliumhexacyanoferrat II ($K_4[Fe(CN)_6]$)	R: 52/53 S: 50-61	Sigma
Kaliumhexacyanoferrat III ($K_3[Fe(CN)_6]$)		Sigma
Koffein	R: 20; S: 2	Sigma
Magnesiumchloridhexahydrat ($MgCl_2$ x $6H_2O$)	R: 36/37	Roth
Magnesiumsulfathexahydrat ($MgSO_4$ x $7H_2O$)		Merck
Mercaptoethanol	R: 23/24/25; S: 45	Gibco
Methanol	R: 11-23/24/25-39/23/24/25 S: 7-16-36/37-45	J.T. Baker
Mowiol 4-88		Hoechst
Nitroblau-Tetrazolium (NBT)		Biomol
Nadolol		Sigma
Natriumacetat		Merck
Natriumchlorid (NaCl)		J.T. Baker
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	R: 11-21/22-36/37/38 S: 26-36/37	Roth
Natriumfluorid (NaF)	R: 25-32-36/38	Merck
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)		Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	R: 35; S: 26-37/39-45	Merck
Piperazin-1,4-bis		AppliChem

(2-ethansulfonsäure) (PIPES)		
Okadasäure	R: 23/24/25-38 S: 26-36/37-455	ICN Biomedicals
Oligonukleotide		MWG
Paraformaldehyd (PFA)	R: 20/22-36/37/38-40-43 S: 22-26-36/37	Sigma
Phosphorylase b		Sigma
Phosphorylase-Kinase		Sigma
Pikrinsäure	R: 3-4-23/24/25 S: (1/2)-28-35-36/37-45	Merck
Ponceau-S	R: 36/37/38-51/53; S: 2-25-26-29/56-37-46-57-60-64	Serva
PP1, katalytische Untereinheit (rek. aus *E. coli*)		Sigma
Protein Kinase A, katalytische Untereinheit		Sigma
Sucrose		Merck
TaqMan® Universal PCR Master Mix		Applied Biosystems
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	R: 11-20/22-34 S: 16-26-36/37/39-45-60	Bio-Rad
Thrombin		Sigma
Triethanolamin	R: 20/21/22-36/37/38 S: 26-36/37/39	Roth
Trichloressigsäure	R:35-50/53 S: 26-36/37/39-45-60-61	Merck
Trishydroxymethylaminomethan-(Tris) Base	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma
Tris Hydrochlorid (Tris-HCl)	R: 36/37/38; S: 26-36	Promega
Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween® 20)		Sigma
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid)		Sigma
γ-[^{32}P]-ATP		NEN-DuPont

11.3.2 Hilfsmittel und Geräte

Agarose *GEL Electrophoresis System Sub-Cell* GT	Bio-Rad
Analytikwaage	Sartorius AG
Biosphere® Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt

Brutschrank (Bakterien)	Hereaus
Chemie Genius^2 *Bio Imaging System*	Syngene
Chromatographiepapier (Whatman 3 MM)	Sarstedt
Deckgläser 24 x 60 mm	Marienfeld
Digitalwaage Ohaus *Precision Advanced*	Ohaus
Einwegspritzen, Injekt 10 ml, 20 ml	B. Braun
Elektrophorese-Spannungsgerät *PowerPac Basic*	Bio-Rad
Elektrophoresesystem (Mini Protean® *electrophoresis cell*)	Bio-Rad
Eppendorf *Safe Lock* Reaktionsgefäße	Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop, *Axioplan* mit Kamera	Zeiss
Fotometer, *Smart Spec*™ 3000	Bio-Rad
Gewebekulturplatten, 6-*well*	Nunc
Horizontalschüttler Polymax 1040	Heidolph
Hybridization Bottles HB-OV-BM	Thermo EC
Hybridization mini oven MKIi HYBAID	Thermo EC
Kühlzentrifuge Modell J-6B	Beckman Instruments
Küvetten (10 x 4 x 45)	Sarstedt
Magnetrührer COMBIMAG RET	Janke & Kunkel
PCR-Gerät *GeneAmp® PCR System 9700*	Applied Biosystems
pH-Meter	Knick GmbH
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt
Pipetten (serologisch), 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polytron Stativ-Dispergiergerät	Kinematica
Thermomixer	Eppendorf
Ultrazentrifuge Centricon T-2170	Kontron Instruments
Vortex *Reax 200*	Heidolph
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt
Zentrifuge *Centrifuge* 5415 C	Eppendorf

11.3.3 Antikörper

Tab. 11.1 Verwendete Antikörper zum immunologischen Nachweis von Proteinen im Western Blot (pk: polyklonal; mk: monoklonal; Anti-m: Anti-Maus; Anti-rab: Anti-Kaninchen; Anti-g: Anti-Ziege; IgG: Immunglobulin G; -AP: konfugiert an alkalische Phosphatase; -HRPO: konjugiert an Merrettich-Peroxidase).

1. Antikörper	Verd.	Firma/Referenz	2. Antikörper	Verd.
β-Aktin (mk)	1:5000	Sigma	Anti-m-IgG-HRPO	1:5000
CaMKII (mk)	1:2500	Affinity Bioreagents	Anti-m-IgG-HRPO	1:10000
CaMKII Threonin 286 (mk)	1:2000	BD Biosciences	Anti-m-IgG-HRPO	1:10000

c-myc (pk)	1:2500	Sigma	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
C-Prot. (pk)	1:1000	El-Armouche et al. 2007b	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
C-Prot. Serin 282	1:2500	El-Armouche et al. 2007b	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
CSQ (pk)	1:2500	Dianova	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
cTnI (pk)	1:30000	Chemicon	Anti-rab-IgG-HRPO	1:30000
cTnI Serin 22/23 (pk)	1:1000	*Cell Signaling*	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
DARPP-32 (pk)	1:2000	*Cell Signaling*	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
I-1 (pk)	1:1000	El-Armouche et al. 2003	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
I-1 Serin 67 (pk)	1:200	El-Armouche et al. 2006	Anti-rab-IgG-HRPO	1:20000
Junctin (pk)	1:1000	Jones et al. 1995	Anti-rab-IgG-HRPO	1:1000
MLC2v (mk)	1:5000	Alexis	Anti-m-IgG-HRPO	1:5000
MLC2v Serin 22/23 (pk)	1:5000	Grimm et al. 2006	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
NCX	1:1000	*Affinity BioReagents*	Anti-m-IgG-HRPO	1:5000
PathScan® (pk)	1:500	*Cell Signaling*	Anti-rab-IgG-HRPO	1:2000
PLB (mk)	1:5000	Badrilla	Anti-m-IgG-HRPO	1:5000
PLB Serin 16 (pk)	1:5000	Badrilla	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
PLB Threonin 17 (pk)	1:5000	Badrilla	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
PP1α (pk)	1:500	Upstate	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
RyR (mk)	1:1000	Acris	Anti-m-IgG-AP	1:1000
RyR Serin 2809 (pk)	1:2500	Badrilla	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
RyR Serin 2815 (pk)	1:2500	Wehrens et al. 2004	Anti-rab-IgG-HRPO	1:5000
SERCA2a (pk)	1:500	Santa Cruz	Anti-g-IgG-HRPO	1:10000

Alle Sekundärantikörper wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogene.

11.4 Primer und PCR-Bedingungen

Tab. 11.2 Gerichtete *in vitro* Mutagenese zur Erzeugung von I-1*.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94	10:00	1
Denaturierung	94	00:30	
Hybridisierung	55	00:45	35
Elongation	72	00:45	
Elongation	72	07:00	1

Ansatz	Primer	Primersequenz (5'-3')	Fragment-größe (bp)	T_m (°C)
A	Kpn I-1-for	GGTACCGCCATGGAGCCCGACAACGTT	210	70
	MutS67A-rev	GCCGTGGAGCCATTGAC		62
B	MutS67A-for	GTCAATGGCTCCACGGCAACATCTAGA	364	62
	Xba I-1-rev	TCAATTCAGATCTTCCGCTAATAAGCTT TTGCTCGACCAATGGCTCCCTGGGA		75
Fusion	Kpn I-1-for	Siehe Ansatz A	555	70
	Xba I-1-rev	Siehe Ansatz B		75

Tab. 11.3 Gerichtete *in vitro* Mutagenese zur Erzeugung von I-1c.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94	10:00	1
Denaturierung	94	00:30	
Hybridisierung	64	00:45	35
Elongation	72	01:00	
Elongation	72	07:00	1

Ansatz	Primer	Primersequenz (5'-3')	Fragment-größe (bp)	T_m (°C)
A	Kpn I-1-for	Siehe Tab. 11.2	120	70
	MutT35D-rev	GGCAGGGTCGGGGCGGC		67
B	MutT35D-for	GCCGCCCCGACCCTGCC	481	67
	Xba I-1-rev	Siehe Tab. 11.2		75
Fusion	Kpn I-1-for	Siehe Ansatz A	248	70
	Not I-1-rev	GCGGCCGCTCAATTCAGATCTTCGCTA ATAAGCTTTTGCTCTGACAGTGGACTTG AG		75

Tab. 11.4 Sequenzierung von I-1/I-1*/I-1c im pCRII-/pTRE-Tight-/pGEX-2T-Vektor.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	96	01:00	1
Denaturierung	96	00:30	
Hybridisierung	50	00:15	25
Elongation	60	04:00	

Vektor/Zielgen	Primer	Primersequenz (5'-3')	T_m (°C)
pCRII-I-1/I-1*/I-1c	+40-for	GAGCGGATAACAATTTCACACAG	55
	-40-rev	AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT	55
pTRE-Tight-I-1*	Kpn I-1-for	Siehe Tab. 11.2	70
	Xba I-1-rev	Siehe Tab. 11.2	75
pTRE-Tight-I-1c	Kpn I-1-for	Siehe Tab. 11.2	70
	Not I-1c-rev	Siehe Tab. 11.3	75
pGEX-2T-I-1/I-1*/I-1c	Kpn I-1-for	Siehe Tab. 11.2	70
	I-1*-rev	CAATTCAGATCTTCCTCGCTAA	57

Tab. 11.5 Genotypisierung der I-1* Responderlinie.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94	10:00	1
Denaturierung	94	00:30	
Hybridisierung	55	00:30	32
Elongation	72	00:45	
Elongation	72	07:00	1

Primer	Primersequenz (5'-3')	Fragmentgröße (bp)	T_m (°C)
I-1-Intr4-for	TAACCTCATCAGCACAGCTCA	395	58
I-1-Ex5-rev	CCCTTGTTTCTGTTGCCCTA		58
Kpn I-1-for	Siehe Tab. 11.2	304	70

Tab. 11.6 Genotypisierung der I-1c Responderlinie.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94	10:00	1
Denaturierung	94	00:30	
Hybridisierung	64	01:00	32
Elongation	72	00:45	
Elongation	72	07:00	1

Primer	Primersequenz (5'-3')	Fragmentgröße (bp)	T_m (°C)
I-1-Intr4-for	Siehe Tab. 11.5	395	58
I-1-Ex5-rev	Siehe Tab. 11.5		58

Kpn I-1-for	Siehe Tab. 11.2	248	70
Not I-1c-rev	Siehe Tab. 11.3		75

Tab. 11.7 Genotypisierung der I-1 KO Mauslinie.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94	10:00	1
Denaturierung	94	00:30	
Hybridisierung	56	00:45	35
Elongation	72	00:45	
Elongation	72	10:00	1

Primer	Primersequenz (5'-3')	Fragmentgröße (bp)	T_m (°C)
I-1-Ex1-for	CCCACGGAAGATCCAGTTTA	380	57
KO-Intr1-rev	CACTTAGCCGGGAAACTCTG		59
KO-neo-for	TAAAGCGCATGCTCCAGACT	280	57

Tab. 11.8 Genotypisierung der tTA Mauslinie.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94	03:00	1
Denaturierung	94	00:34	
Hybridisierung	64	00:45	12
Elongation	72	00:45	
Denaturierung	94	00:35	
Hybridisierung	58	00:30	25
Elongation	72	00:45	
Elongation	72	02:00	1

Primer	Primersequenz (5'-3')	Fragmentgröße (bp)	T_m (°C)
tTA_6c-for	CGCTGTGGGGCATTTTACTTTAG	450	61
tTA_7nc-rev	CATGTCCAGATCGAAATCGTC		58
Terd_1-for	CAAATGTTGCTTGTCTGGTG	200	55
Terd_2-rev	GTCAGTCGAGTGCACAGTTT		57

Tab. 11.9 Qualitative RT-PCR von I-1 zur Einführung von neuen Restriktionsschnittstellen.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94	10:00	1
Denaturierung	94	00:30	
Hybridisierung	58	01:00	40
Elongation	72	01:40	
Elongation	72	07:00	1

Primer	Primersequenz (5'-3')	Fragmentgröße (bp)	T_m (°C)
Kpn I-1-for	Siehe Tab. 11.2	525	70
Xba I-1-rev	Siehe Tab. 11.2		75

Tab. 11.10 Qualitative RT-PCR von I-1*/I-1c und GAPDH.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94	10:00	1
Denaturierung	94	00:30	32
Hybridisierung	58	00:45	
Elongation	72	00:45	
Elongation	72	07:00	1

Primer	Primersequenz (5'-3')	Fragmentgröße (bp)	T_m (°C)
I-1-Ex1-for	CCACGGAAGATCCAGTTTACG	119	66
I-1-Ex2-rev	GACTGATCACTGGTCAGCACAA		60
GAPDH-for	ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG	171	63
GAPD-rev	GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA		65

Tab. 11.11 Quantitative RT-PCR.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Schritt 1	50	02:00	1
Schritt 2	95	10:00	1
Schritt 3	95	00:15	40
	60	01:00	

Primer/Sonde	Primer-/Sondensequenz (5'-3')	T_m (°C)
ANP-for	GTGCGGTGTCCAACACAGAT	59
ANP-rev	GCTTCCTCAGTCTGCTCACTCA	62
ANP-Sonde	TGATGGATTTCAAGAACCTGCTAGACCACCTG	68
β-AR-for	CGCCTCTTCGTCTTCTTCA	57
β-AR-rev	GGCAGTAGATGATGGGGTTGA	60
β-AR-Sonde	CTGGGCTACGCCAACTCGGCC	68
β-MHC-for	GACCAGACCCCAGGCAAGGG	65
β-MHC-rev	GCCAACTTTCCTGTTGCCCC	61
β-MHC-Sonde	ACAACTCCTCTCGATTTGGGAAATTCA	62
BNP-for	CCAGTCTCCAGAGCAATTCAA	58
BNP-rev	AGCTGTCTCTGGGCCATTTC	59
BNP-Sonde	TGCAGAAGCTGCTGGAGCTGATAAGAGA	67
GAPDH-for	Siehe Tab. 11.10	63
GAPD-rev	Siehe Tab. 11.10	65

GAPDH-Sonde	AAGCCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGA	70
I-1-Ex1-for	Siehe Tab. 11.10	60
I-1-Ex2-rev	Siehe Tab. 11.10	60
I-1-Sonde	AGGCGGCGGAGCAGATTCGGAG	68

11.5 Weitere Abbildungen

Zu 2.1.1 Generierung der Inhibitor-1 Responderkonstrukte

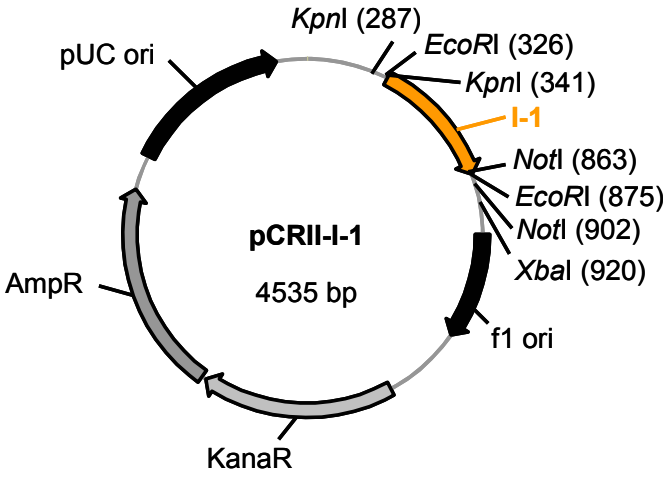


Abb. 11.1 Schematische Darstellung des pCRII-Vektors mit I-1 cDNA. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind eingezeichnet.

Zu 3.4.2 Analyse der Doxycyclin-abhängigen Inhibitor-1 Expressionskinetik

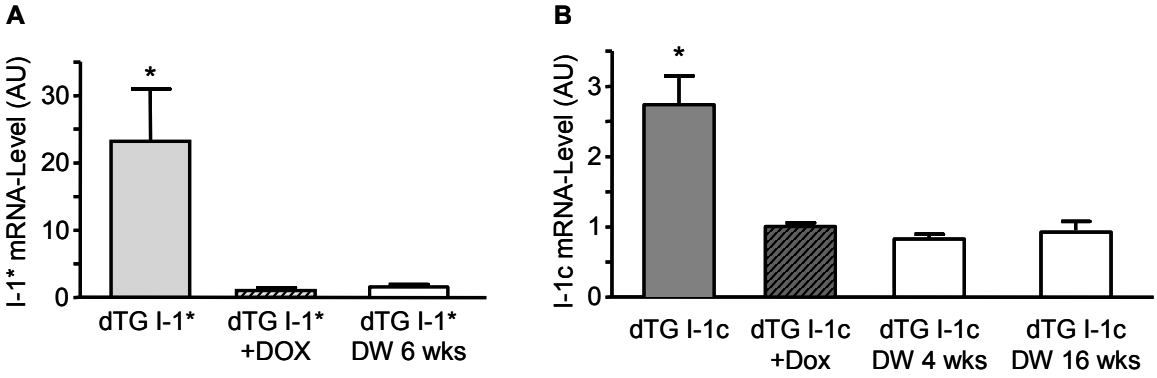


Abb. 11.2 Quantitative Analyse der I-1*/I-1c mRNA-Konzentration. (A) Sechs Wochen Doxycyclinentzug konnten keine I-1* Expression induzieren (dTG I-1* DW 6 wks; n=4-7 pro Gruppe). (B) Nach 4 bzw. 16 Wochen Doxycyclinentzug, bei zuvor niedrigerer Doxycyclinkonzentration (50 µg/ml), war keine I-1c Expression nachweisbar (dTG I-1c DW 4 bzw. 16 wks; n=6-11 pro Gruppe). Die Standardisierung erfolgte auf GAPDH. *p<0,05.

11.6 Ergebnistabellen

Alle Werte werden angegeben als arithmetischer Mittelwert±Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mit n wurde die Anzahl der Tiere bezeichnet.

Zu 3.6.1 Effekte von Inhibitor-1* auf die Herzfunktion

Tab. 11.12 Echokardiographieergebnisse (n=12 pro Gruppe).

Messparameter	$tTA^{I-1(-/-)}$	dTG I-1*
BW (g)	27,9±0,9	26,4±0,9
PwThs (mm)	1,1±0,03	1,1±0,04
PwThd (mm)	0,7±0,02	0,7±0,02
LVEDS (mm)	3,6±0,1	3,6±0,2
LVEDD (mm)	4,8±0,1	4,8±0,2
EF (%)	52,1±1,8	52,8±2,3
LVM (mg)	136,0±5,7	133,6±10,4
LVM/BW (mg/g)	4,9±0,2	5,0±0,3
LVESV (µl)	58,1±3,2	58,4±7,1
LVEDV (µl)	121,2±4,8	122,7±10,5
LVEDV/BW (µl/g)	4,4±0,11	4,6±0,3
CO (ml/min)	13,3±1,0	12,4±1,0

Tab. 11.13 Ergebnisse der Herzkathetermessung (n=6 pro Gruppe). *p<0,05.

Messparameter	$tTA^{I-1(-/-)}$	dTG I-1*
HF (Schläge/min)	590,5±20,2	580,3±11,5
dP/dt_{min} ($mmHg*s^{-1}$)	-9861,0±652,4	-10024,0±416,3
LVESV (µl)	7,1±1,6	9,3±0,3
LVEDV (µl)	17,5±1,5	21,5±1,5
LVESP (mmHg)	93,4±2,2	85,0±3,0*
LVEDP (mmHg)	6,0±0,9	4,0±0,9
EF (%)	65,3±5,6	62,4±3,8
CO (µl/min)	6976,7±485,9	8263,0±478,3
Ea (mmHg/ml)	8,1±0,5	6,1±0,6*

Zu 3.6.2 Auswirkungen des trunkierten Inhibitor-1c auf die Kontraktilität

Tab. 11.14 Echokardiographieergebnisse von dTG I-1c im Vergleich zu $tTA^{I-1(-/-)}$. #p=0,05.

Messparameter	$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=13)	dTG I-1c (n=13)
BW (g)	26,0±0,6	27,6±1,0
PwThs (mm)	1,0±0,03	1,0±0,02

PwThd (mm)	0,7±0,01	0,7±0,01
LVEDS (mm)	3,4±0,1	3,3±0,1
LVEDD (mm)	4,7±0,1	4,6±0,1
EF (%)	52,6±1,2	56,3±1,4#
LVM (mg)	124,2±8,7	120,8±4,1
LVM/BW (mg/g)	4,4±0,2	4,4±0,1
LVESV (µl)	53,7±3,8	47,7±2,9
LVEDV (µl)	112,4±6,0	108,1±3,6
LVEDV/BW (µl/g)	4,0±0,1	3,9±0,1

Tab. 11.15 Echokardiographieergebnisse von dTG I-1c gegenüber $tTA^{I\text{-}1(+/+)}$.

Messparameter	$tTA^{I\text{-}1(+/+)}$ (n=12)	dTG I-1c (n=11)
BW (g)	23,0±0,8	24,7±1,3
PwThs (mm)	1,0±0,03	1,0±0,02
PwThd (mm)	0,7±0,02	0,7±0,9
LVEDS (mm)	2,9±0,1	3,0±0,1
LVEDD (mm)	4,1±0,1	4,3±0,1
EF (%)	56,4±0,6	56,2±1,9
LVM (mg)	100,1±5,3	107,1±6,3
LVM/BW (mg/g)	4,3±0,1	4,4±0,2
LVESV (µl)	35,8±1,8	40,3±3,6
LVEDV (µl)	82,1±4,0	90,4±4,6
LVEDV/BW (µl/g)	3,6±0,1	3,7±0,1
CO (ml/min)	15,7±1,1	17,3±1,2

Tab. 11.16 Ergebnisse der Herzkathetermessung (n=7 pro Gruppe).

Messparameter	$tTA^{I\text{-}1(+/+)}$	dTG I-1c
HW/BW (mg/g)	4,9±0,1	4,9±0,2
HF (Schläge/min)	543,3±9,0	547,0±21,5
LVESV (µl)	9,99±1,6	10,6±1,5
LVEDV (µl)	22,6±1,5	23,6±1,3
LVESP (mmHg)	93,8±2,2	95,5±2,1
LVEDP (mmHg)	7,0±0,6	7,0±0,8
EF (%)	62,2±4,1	60,3±4,6
CO (µl/min)	7854,8±441,2	8033,6±439,5
Ea (mmHg/ml)	6,7±0,4	6,4±0,3

Zu 3.7 Untersuchung der Arrhythmieneigung nach Provokation mittels akutem β-adrenergen Stress

Tab. 11.17 *In vivo* EKG-Telemetriemessungen der Herzfrequenz (n≥9 pro Gruppe). #n.s. aber p<0,09 vs. $tTA^{I-1(-/-)}$.

Herzfrequenz	$tTA^{I-1(-/-)}$	$tTA^{I-1(+/+)}$	dTG I-1*	dTG I-1c
Basal	414±14,6	378±11,5#	374±13,3#	378±13,3#
Unter Stress	685±7,9	701±8,7	693±8,5	686±7,7
Unter Stress +Dox	679±9,5	696±10,3	700±8,2	686±11,7

Zu 3.8.3 Bestimmung der Protein-Phosphatase Aktivität

Tab. 11.18 Phosphatase Aktivität und anteilige PP1- bzw. PP2A-Aktivität. Die spezifische PP-Aktivität wird in einer Minute umgesetzte Phosphorylase a pro mg eingesetztes Protein angegeben (nm/mg/min; n≥5).

	[nm/mg/min]	$tTA^{I-1(-/-)}$	dTG I-1*	dTG I-1c
Zytosol	PP-gesamt	1,6±0,1	1,7±0,1	1,6±0,1
	PP1	1,0±0,1	1,2±0,1	1,0±0,1
	PP2A	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,04
Membranvesikel	PP-gesamt	0,07±0,006	0,07±0,006	0,07±0,005
	PP1	0,05±0,050	0,05±0,004	0,05±0,004
	PP2A	0,02±0,002	0,02±0,003	0,02±0,004

Zu 3.9 Auswirkungen einer chronischen β-adrenergen Stimulation; Testlauf

Tab. 11.19 Echokardiographieparameter nach chronischer Isoprenalingabe; Testlauf.

	Tag	WT-NaCl (n=3)	WT-Iso (n=3)
FAS (%)	0	47,7±5,3	47,5±3,5
	3	47,7±2,4	48,3±4,8
	7	46,1±1,2	44,6±5,7
LVEDD (mm)	0	4,9±0,04	4,7±0,1
	3	4,8±0,1	5,0±0,1
	7	4,8±0,1	5,2±0,1
AwThs (mm)	0	1,2±0,81	1,2±0,04
	3	1,2±0,06	1,3±0,06
	7	1,2±0,07	1,4±0,04
AwThd (mm)	0	0,8±0,81	0,8±0,01
	3	0,8±0,80	0,9±0,04
	7	0,8±0,78	0,9±0,07

LVM/BW (mg/g)	0	4,0±0,3	3,6±0,5
	3	4,1±0,4	4,8±0,6
	7	4,2±0,4	5,7±0,4

Zu 3.9.1 Auswirkungen einer chronischen β-adrenergen Stimulation in den Inhibitor-1c Transgenen

Ta. 11.20 Relative Organgewichte der $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ Tiere in Abhängigkeit von Doxycyclin.

	$tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ (n=6)	$tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ +Dox (n=7)
TL (mm)	17,3±0,1	17,0±0,2
HW/TL (mg/mm)	13,4±1,3	13,0±0,6
Lungengewicht/TL (mg/mm)	10,2±0,2	10,5±0,6
Lebergewicht/TL (mg/mm)	84,1±4,9	82,4±2,7

Tab. 11.21 Echokardiographische Messparameter an Tag 7 und 14 der $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ Tiere in Abhängigkeit der Doxycyclingabe ab Tag 4.

	Tag	$tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ (n=6)	$tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ +Dox (n=7)
FAS (%)	7	38,4±2,3	37,4±3,4
	14	38,7±2,8	38,2±2,3
LVEDD (mm)	7	5,1±0,2	4,9±0,1
	14	5,1±0,2	4,8±0,2
LVEDS (mm)	7	4,0±0,2	3,8±0,1
	14	3,9±0,2	3,7±0,2
FAS Dobu (%)	7	40,5±2,9	37,9±2,9
	14	40,1±2,7	40,7±3,0
LVM/TL (mg/mm)	7	10,9±0,9	10,8±0,5
	14	10,8±1,1	10,9±0,7
HR (Schläge/min)	7	579,8±31,2	592,4±21,0
	14	576,2±14,0	622,9±14,8
LVEDV/TL (µl/mm)	7	8,6±1,0	7,9±0,4
	14	8,9±0,9	8,1±0,6
AwThs (mm)	7	1,14±0,03	1,21±0,04
	14	1,19±0,04	1,26±0,05
AwThd (mm)	7	0,87±0,02	0,91±0,02
	14	0,84±0,03	0,93±0,03

Tab. 11.22 Echokardiographische Messparameter an Tag 7.

Tag 7	$tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ -/+Dox (n=13)	dTG I-1c +Dox (n=6)	dTG I-1c (n=6)
FAS (%)	37,8±2,0	38,6±1,3	35,5±2,3
LVEDD (mm)	5,0±0,1	4,9±0,1	5,0±0,1

LVEDS (mm)	3,9±0,1	3,9±0,1	3,9±0,1
FAS Dobu (%)	39,1±2,0	38,3±1,7	45,0±4,5
LVM/TL (mg/mm)	10,8±0,5	10,3±0,2	10,1±0,7
HR (Schläge/min)	586,6±17,0	580,3±26,9	575,2±18,8
LVEDV/TL (µl/mm)	8,2±0,5	7,9±0,3	8,3±0,5
AwThs (mm)	1,18±0,03	1,16±0,05	1,12±0,03
AwThd (mm)	0,89±0,02	0,86±0,02	0,84±0,02

Tab. 11.23 Echokardiographische Messparameter an Tag 0, 4 und 14. *p<0,05 vs. dTG I-1c +Dox; §<0,06 vs. $tTA^{I-1(-/-)}$ -/+Dox; #p<0,05 vs. $tTA^{I-1(-/-)}$ -/+Dox; †p<0,07 vs. dTG I-1c +Dox.

	Tag	$tTA^{I-1(-/-)}$ -/+Dox (n=13)	dTG I-1c +Dox (n=6)	dTG I-1c (n=6)
FAS Dobu (%)	0	61,4±1,5	----------	63,1±1,9
	4	46,9±2,1	----------	41,7±1,7
	14	40,4±2,0	39,5±2,8	35,1±3,8
LVESD (mm)	0	3,5±0,1	----------	3,3±0,1
	4	3,7±0,1	----------	3,6±0,1
	14	3,8±0,1	3,6±0,1	4,2±0,2*/§
HR (Schläge/min)	0	487,8±8,4	----------	482,5±5,8
	4	531,2±13,9	----------	527,0±10,2
	14	601,3±11,9	607,0±14,7	585,7±9,6
LVM/TL (mg/mm)	0	7,7±0,4	----------	7,1±0,2
	4	9,3±0,5	----------	9,2±0,3
	14	10,7±0,6	9,8±0,3	9,4±0,8
LVEDV/TL (µl/mm)	0	6,6±0,3	---------	6,4±0,2
	4	6,8±0,4	----------	6,5±0,2
	14	8,5±0,5	7,7±0,3	9,1±0,6†
AwThs (mm)	0	1,04±0,30	----------	1,05±0,02
	4	1,14±0,03	----------	1,11±0,03
	14	1,22±0,03	1,17±0,06	1,02±0,06#/†
AwThd (mm)	0	0,72±0,01	----------	0,71±0,01
	4	0,87±0,03	----------	0,86±0,02
	14	0,89±0,02	0,86±0,02	0,74±0,03#

Tab. 11.24 Histologische Daten von $tTA^{I-1(-/-)}$ in Abhängigkeit von Doxycyclin ab Tag 4.

	$tTA^{I-1(-/-)}$	$tTA^{I-1(-/-)}$ +Dox
Zellfläche (μm^2)	296,7±6,7 (n=140)	285,7±6,3 (n=149)
Fibrose (%)	11,2±1,9 (n=20)	15,0±2,3 (n=20)

Tab. 11.25 mRNA-Menge von $tTA^{I-1(-/-)}$ in Abhängigkeit von Doxycyclin ab Tag 4.

	$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=6)	$tTA^{I-1(-/-)}$ +Dox (n=7)
ANP	1,0±0,4	1,0±0,3
BNP	1,0±0,2	0,7±0,1

Tab. 11.26 Proteinexpression und Phosphorylierung von PLB in den $tTA^{I-1(-/-)}$ Kontrollen in Abhängigkeit von Doxycyclin ab Tag 4.

	$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=6)	$tTA^{I-1(-/-)}$ +Dox (n=7)
PLB/CSQ	1,0±0,1	1,0±0,1
P-Ser16/PLB	1,0±0,1	0,9±0,1
P-Thr17/PLB	1,0±0,1	1,2±0,1

Tab. 11.27 Quantifizierung der Phosphorylierung von TnI in $tTA^{I-1(-/-)}$ in Abhängigkeit von Doxycyclin ab Tag 4.

	$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=6)	$tTA^{I-1(-/-)}$ +Dox (n=7)
P-TnI	1,0±0,02	1,1±0,04
TnI/CSQ	1,0±0,02	1,2±0,20
P-TnI/TnI	1,0±0,02	0,9±0,10

Tab. 11.28 Quantifizierung von ERK 1/2, Akt und S6-ribosomaler Proteinkinase in den $tTA^{I-1(-/-)}$ Tieren in Abhängigkeit von Doxycyclin ab Tag 4. *p<0,05 vs. $tTA^{I-1(-/-)}$.

	$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=6)	$tTA^{I-1(-/-)}$ +Dox (n=7)
Phospho-S6	1,0±0,10	0,9±0,10
Phospho-ERK 1	1,0±0,02	0,8±0,10*
Phospho-ERK 2	1,0±0,04	0,7±0,10*
Phospho-Akt	1,0±0,10	0,9±0,20

Zu 3.9.2 Auswirkungen einer chronischen β-adrenergen Stimulation in den Inhibitor-1* Transgenen

Tab. 11.29 Relative Organgewichte der $tTA^{I-1(-/-)}$ Tiere in Abhängigkeit von Doxycyclin.

	$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=4)	$tTA^{I-1(-/-)}$ +Dox (n=8)
TL (mm)	17,6±0,4	17,8±0,2
HW/TL (mg/mm)	12,0±0,6	13,2±0,8
Lungengewicht/TL (mg/mm)	10,7±0,3	11,0±0,3
Lebergewicht/TL (mg/mm)	79,5±4,7	90,3±4,9

Tab. 11.30 Echokardiographische Messparameter an Tag 7 und 14 der $tTA^{I-1(-/-)}$ Tiere in Abhängigkeit von Doxycyclin ab Tag 4. #p=0,06 vs. $tTA^{I-1(-/-)}$.

	Tag	$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=4)	$tTA^{I-1(-/-)}$ +Dox (n=8)
FAS (%)	7	37,1±2,2	38,2±2,7
	14	39,7±5,1	40,3±2,4

LVEDD (mm)	7	4,7±0,1	4,9±0,1
	14	4,8±0,1	4,9±0,1
LVESD (mm)	7	3,8±0,1	3,9±0,1
	14	3,8±0,3	3,8±0,1
FAS Dobu (%)	7	41,6±3,1	39,3±3,0
	14	42,3±7,2	44,2±3,4
LVM/TL (mg/mm)	7	9,3±0,3	10,2±0,6
	14	8,9±0,1	10,5±0,6
HR (Schläge/min)	7	572,4±18,7	562,6±19,9
	14	613,0±10,3	576,4±10,6
LVEDV/TL (µl/mm)	7	7,2±0,2	7,8±0,4
	14	7,8±0,3	7,6±0,5
AwThs (mm)	7	1,12±0,03	1,20±0,04
	14	1,05±0,06	1,25±0,06#
AwThd (mm)	7	0,86±0,01	0,90±0,02
	14	0,84±0,02	0,91±0,02

Tab. 11.31 Echokardiographische Messparameter an Tag 7. *p<0,05 vs. dTG I-1* +Dox; #p=0,05 vs. $tTA^{I-1(-/-)}$; §p=0,06 vs. dTG I-1* +Dox; †p<0,05 vs. $tTA^{I-1(-/-)}$.

Tag 7	$tTA^{I-1(-/-)}$ -/+Dox (n=12)	dTG I-1* +Dox (n=7)	dTG I-1* (n=8)
FAS (%)	37,6±1,7	36,9±2,1	32,8±1,4*
LVEDD (mm)	4,8±0,1	5,0±0,1	5,1±0,1
LVESD (mm)	3,9±0,7	3,9±0,1	4,1±0,1#
FAS Dobu (%)	40,7±2,2	41,8±2,4	40,5±3,1
LVM/TL (mg/mm)	9,7±0,3	10,6±0,5	10,1±0,7
HR (Schläge/min)	567,8±13,2	582,5±13,4	564,2±12,1
LVEDV/TL (µl/mm)	7,5±0,2	8,3±0,4	7,8±0,4§
AwThs (mm)	1,16±0,02	1,23±0,02	1,12±0,03*
AwThd (mm)	0,88±0,01	0,90±0,01	0,83±0,02*/†

Tab. 11.32 Echokardiographische Messparameter an Tag 0, 4 und 14. *p<0,05 vs. $tTA^{I-1(-/-)}$; §<0,05 vs. dTG I-1* +Dox; #p=0,06 vs. dTG I-1c +Dox.

	Tag	$tTA^{I-1(-/-)}$ -/+Dox (n=12)	dTG I-1* +Dox (n=7)	dTG I-1* (n=8)
FAS Dobu (%)	0	61,2±1,1	----------	57,8±1,4
	4	48,2±2,9	----------	44,2±1,6
	14	43,5±3,1	43,4±3,1	40,1±3,4
LVESD (mm)	0	3,3±0,1	----------	3,4±0,1
	4	3,4±0,1	----------	3,7±0,1*
	14	3,8±0,1	4,0±0,1	4,2±0,2

HR (Schläge/min)	0	493,4±5,8	----------	506,7±6,4
	4	481,5±40,7	----------	519,1±19,9
	14	588,6±9,2	485,4±70,4	590,1±11,4
LVEDV/TL (µl/mm)	0	5,8±0,2	----------	6,5±0,3
	4	5,9±0,2	----------	6,6±0,2*
	14	7,7±0,3#	8,7±0,5	8,2±0,7
AwThs (mm)	0	1,10±0,03	----------	1,06±0,03
	4	1,20±0,03	----------	1,17±0,03
	14	1,19±0,05	1,21±0,03	1,05±0,04§
AwThd (mm)	0	0,73±0,01	----------	0,74±0,02
	4	0,92±0,03	----------	0,87±0,02
	14	0,89±0,02	0,88±0,04	0,81±0,02*

Tab. 11.33 ANP/BNP mRNA-Menge in $tTA^{I-1(-/-)}$ in Abhängigkeit von Doxycyclin ab Tag 4.

	$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=4)	$tTA^{I-1(-/-)}$ +Dox (n=6)
ANP	1,0±0,6	0,7±0,3
BNP	1,0±0,4	0,5±0,1

Tab. 11.34 PLB Phosphorylierung in $tTA^{I-1(-/-)}$ in Abhängigkeit von Doxycyclin ab Tag 4.

		$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=4)	$tTA^{I-1(-/-)}$ +Dox (n=8)
P-Ser16	P-Ser16	1,0±0,1	0,9±0,1
	PLB/CSQ	1,0±0,1	0,9±0,1
	P-Ser16/PLB	1,0±0,1	1,0±0,2
P-Thr17	P-Thr17	1,0±0,2	1,2±0,1
	PLB/CSQ	1,0±0,1	0,9±0,1
	P-Thr17/PLB	1,0±0,2	1,3±0,2

Tab. 11.35 Quantifizierung von TnI in $tTA^{I-1(-/-)}$ in Abhängigkeit von Doxycyclin ab Tag 4.

	$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=4)	$tTA^{I-1(-/-)}$ +Dox (n=7)
P-TnI	1,0±0,04	1,1±0,10
TnI/CSQ	1,0±0,02	1,0±0,10
P-TnI/TnI	1,0±0,10	1,0±0,04

Tab. 11.36 Quantifizierung der Phosphorylierung von $p90^{RSK}$, ERK 1/2, Akt und S6-ribosomaler Proteinkinase in $tTA^{I-1(-/-)}$ Tieren in Abhängigkeit von Doxycyclin ab Tag 4.

	$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=4)	$tTA^{I-1(-/-)}$ +Dox (n=7)
Phospho-S6	1,0±0,1	1,0±0,1
Phospho-ERK 1	1,0±0,1	0,9±0,1
Phospho-ERK 2	1,0±0,1	0,9±0,1
Phospho-Akt	1,0±0,1	1,0±0,1
Phospho-$p90^{RSK}$	1,0±0,1	1,0±0,1

Zu.3.10 Langzeitfolgen einer Überexpression der beiden Inhibitor-1 Mutanten

Tab 11.37 Echokardiographische Messparameter der dTG I-1* Tiere gegenüber $tTA^{I-1(-/-)}$ Kontrollen im Alter von 10 bzw. 15 Monaten. *p<0,05 vs. $tTA^{I-1(-/-)}$.

	Monate	$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=6)	dTG I-1* (n=5)
BW (g)	10	23,4±1,8	33,5±1,1
	15	35,9±2,0	35,2±1,9
LVESD (mm)	10	3,2±0,1	3,5±0,2
	15	3,3±0,1	3,9±0,2*
AwThs	10	1,09±0,05	1,11±0,03
	15	1,12±0,02	1,07±0,04
AwThd	10	0,80±0,02	0,84±0,02
	15	0,77±0,02	0,80±0,03
LVM (mg)	10	121,4±4,8	149,3±13,6
	15	117,9±4,8	140,3±13,5
LVEDV (µl)	10	93,1±4,8	114,6±11,8
	15	96,0±3,4	112,2±12,8
FAS Dobu (%)	10	65,6±1,4	59,1±3,4
	15	56,5±1,4	49,5±3,2
HR (Schläge/min)	10	481,3±16,6	514,0±12,4
	15	446,7±12,2	457,0±10,4

Tab 11.38 Echokardiographische Messparameter der dTG I-1c Tiere gegenüber $tTA^{I-1(-/-)}$. *p<0,05 vs. $tTA^{I-1(-/-)}$.

	Monate	$tTA^{I-1(-/-)}$ (n=5)	dTG I-1c (n=5-6)
BW (g)	16	37,6±2,6	43,4±5,5
	18	37,5±2,4	47,6±5,2
	20	36,3±1,3	46,6±3,7*
LVESD (mm)	16	3,6±0,1	4,0±0,1
	18	3,7±0,1	4,3±0,2*
	20	3,7±0,1	4,4±0,2*
AwThs	16	1,21±0,04	1,13±0,04
	18	1,23±0,08	1,17±0,04
	20	1,25±0,08	1,15±0,03
AwThd	16	0,85±0,04	0,79±0,03
	18	0,89±0,03	0,88±0,05
	20	0,94±0,05	0,92±0,05
LVM (mg)	16	144,6±11,1	149,5±11,4
	18	160,4±7,7	179,4±15,8
	20	171,4±16,2	191,4±20,2

LVEDV (µl)	16	111,0±7,0	131,1±11,7
	18	123,7±9,2	142,0±13,9
	20	126,7±8,6	147,5±16,2
FAS Dobu (%)	16	54,0±3,8	49,5±3,3
	18	50,7±5,2	43,7±6,1
	20	46,5±1,3	39,8±5,2
HR (Schläge/min)	16	499,2±20,5	477,7±6,9
	18	494,4±17,4	505,2±11,7
	20	446,6±26,6	472,8±8,8

Zu 4.3 Die tTA Transgenen als Kontrollen

Tab 11.39 Relatives Herzgewicht der einfach-transgenen I-1* Respondertiere (I-1*) im Vergleich zu $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ und dTG I-1* im Alter von 9 Wochen. *p<0,05 vs. I-1*.

	I-1* (n=10)	$tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ (n=19)	dTG I-1* (n=19)
HW/BW (mg/g)	5,0±0,1	5,6±0,1*	5,6±0,1*

Tab 11.40 Echokardiographieergebnisse von WT Mäusen gegenüber dTG I-1c (Alter 3 Monate). *p<0,05 vs. WT.

	WT (n=7)	dTG I-1c (n=6)
BW (g)	27,8±1,5	28,9±1,5
AwThs (mm)	1,1±0,03	1,1±0,05
AwThd (mm)	0,7±0,02	0,7±0,03
LVESD (mm)	3,3±0,1	3,6±0,1
LVEDD (mm)	4,4±0,1	4,8±0,1*
LVEDV/BW (µl/g)	3,5±0,1	4,3±0,1*
HR (Schläge/min)	543±12,4	496±13,1*
FAS (%)	43,0±1,0	47,0±1,5*

Tab 11.41 Echokardiographieergebnisse der einfach-transgenen Respondertiere (I-1c) gegenüber $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$ und dTG I-1c (18 Monate; n≥5). *p<0,05 vs. I-1c; #p<0,05 vs. $tTA^{I\text{-}1(-/-)}$.

	I-1c	$tTA^{I\text{-}1(-/-)}$	dTG I-1c
BW (g)	34,7±1,3	37,5±2,4	47,6±5,2*
AwThs (mm)	1,1±0,04	1,2±0,08	1,2±0,04
AwThd (mm)	0,8±0,03	0,9±0,03	0,9±0,05
LVESD (mm)	3,3±0,1	3,7±0,1	4,3±0,2*/#
LVEDD (mm)	4,4±0,1	4,8±0,1*	5,3±0,2*/#
LVEDV (µl)	100,0±4,3	123,7±9,3*	142,0±14,0*
LVM (mg)	112,8±8,7	160,4±7,7*	179,4±15,9*
HR (Schläge/min)	566±10,1	494±17,4*	505±11,7*