

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Prof. Dr. med. T. Eschenhagen

Über die Effekte einer herzspezifischen Überexpression des Proteinphosphatase-Inhibitor-1 im transgenen Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Florian Weinberger
aus Kempten

Hamburg 2009

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03.11.2009**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. T. Eschenhagen

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. H. Emcke

Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: PD. Dr. I. Hermans-Borgmeyer

1	Einleitung.....	8
1.1	Herzinsuffizienz.....	8
1.1.1	Epidemiologie.....	8
1.1.2	Ätiologie, Klinik und Therapie.....	8
1.2	Physiologie und Pathophysiologie	9
1.2.1	Physiologie der Herzaktion	9
1.2.2	Beta-adrenerge Signalkaskade.....	10
1.2.3	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz.....	11
1.3	Serin-/Threoninphosphatasen.....	13
1.3.1	Einteilung der Proteinphosphatasen.....	13
1.3.2	Proteinphosphatase-1.....	13
1.3.3	Regulation und Funktion der Proteinphosphatase-1 im Herzen	14
1.4	Proteinphosphatase-Inhibitoren	14
1.4.1	Einteilung der Phosphatase-Inhibitoren.....	14
1.4.2	Proteinphosphatase-Inhibitor-1	15
1.4.3	Proteinphosphatase-Inhibitor-1 als Element der β -adrenergen Signalkaskade	15
1.4.4	Proteinphosphatase-Inhibitor-1 in der Herzinsuffizienz	17
1.5	Transgene Mäuse als Modell.....	17
1.5.1	Generierung transgener Mäuse	17
1.5.2	Herzkreislaufphysiologie der Maus	18
1.6	Fragestellung und Zielsetzung.....	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Inhibitor-1 transgene Mäuse	20
2.2	Genotypisierung der transgenen Mäuse	20
2.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Gewebe	20
2.2.2	Herstellung einer DNA-Sonde.....	21
2.2.3	Southern Blot	21
2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	22
2.3	Erfassung biochemischer Parameter	25
2.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	25
2.3.2	Proteinextraktion	26
2.3.3	Gelelektrophorese	26
2.3.4	Immunoblot	28
2.3.5	Erfassung und Verarbeitung der Daten	31
2.3.6	TCA-Extraktion.....	32

2.3.7	Messung der Phosphatase-Aktivität	33
2.3.8	Langendorffperfusion.....	34
2.4	Modell der Isoprenalininduzierten Herzhypertrophie.....	35
2.4.1	Behandlung der Tiere	35
2.5	Erfassung physiologischer Parameter.....	36
2.5.1	Transthorakale Echokardiographie	36
2.5.2	Auswertung	38
2.6	Histologie	39
2.6.1	Fixation und Kryokonservierung.....	39
2.6.2	Paraffinschnitte.....	39
2.6.3	Poly-L-Lysin-Beschichtung	40
2.6.4	Hämatoxylin & Eosin-Färbung und Lichtmikroskopie	40
2.6.5	Immunhistologie und konfokale Laserscanning Mikroskopie.....	41
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Generierung Inhibitor-1 transgener Mäuse.....	43
3.2	Nachweis Inhibitor-1 transgener Tiere.....	45
3.2.1	Sondenkonstruktion.....	45
3.3	Genotypisierung	47
3.3.1	Southern Blot	47
3.3.2	Polymerasekettenreaktion	48
3.4	Inhaltliche Ergebnisse	48
3.4.1	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 Überexpression	48
3.4.2	Inhibitor-1 mRNA-Konzentration	51
3.4.3	Lokalisation von Inhibitor-1	52
3.5	Auswirkungen der Inhibitor-1 Überexpression	53
3.5.1	Phosphorylierungszustand von Zielproteinen	53
3.5.2	Auswirkung der Inhibitor-1 Überexpression auf die Proteinphosphatase-1	55
3.5.3	Phänotypisierung.....	58
3.5.4	Echokardiographie.....	59
3.6	Modell der chronischen Isoprenalininfusion.....	62
3.7	Ketamin/Xylazin-Narkose	63
4	Diskussion	66
4.1	Inhibitor-1 in der Herzinsuffizienz.....	66
4.2	Inhibitor-1-Überexpression	67
4.3	Die Inhibitor-1-Phosphorylierungsstellen Threonin 35 und Serin 67	67
4.4	Inhibitor-1-Lokalisation	67

4.5	Phosphatase-1 Konzentration und Aktivität.....	68
4.6	Auswirkungen auf Zielproteine.....	69
4.7	Morphologische und funktionelle Untersuchungen	70
4.8	Herzinsuffizienzmodell der chronischen Isoprenalininfusion	73
4.9	Ketamin/Xylazin-Narkose	75
5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	81
7	Anhang	90
7.1	Ergebnistabellen des Modells der chronischen Isoprenalininfusion.....	90
7.2	Ergebnistabellen des Herz-zu-Körpergewichtverhältnis nach 10 Monaten	93
8	Danksagung	95
9	Eidesstattliche Versicherung	96

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyclase
ACE	Angiotensinogen-Converting-Enzyme
β-ARK	Beta-Adrenorezeptorkinase
CaMK II	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat
CSQ	Calsequestrin
DARPP	Dopamin und cAMP-reguliertes Phosphoprotein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GFP	Green Fluorescent Protein
G _i	inhibitorisches G-Protein
G _s	stimulatorisches G-Protein
kb	Kilobase
KG	Körpergewicht
MHC	Myosin Heavy Chain
MLC	Myosin Light Chain
MyBPC	Myosin Binding Protein C
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NIPP-1	Nukleärer Phosphataseinhibitor
PCR	Polymerasekettenreaction
PKA	Proteinkinase A

PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
RyR	Ryanodinrezeptor
SERCA	SR-Calcium-ATPase 2a
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamid
Tnl	Troponin I

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

1.1.1 Epidemiologie

Herz-Kreislaufkrankungen sind inzwischen die häufigste Todesursache der Welt (Pearson 1999). Vor allem in den Industrienationen führen sie die Todesursachenstatistik an. 2007 waren sie in Deutschland für 43,4% der Todesfälle verantwortlich. Unter allen Herzerkrankungen belegen chronisch ischämische Myokarderkrankungen den Spitzenplatz (9,3%), gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (7,0%) und der Herzinsuffizienz (6,0%) (Bundesamt 2007). 2007 starben in Deutschland knapp 50.000 Menschen aufgrund einer Herzinsuffizienz. Weltweit leiden ca. 15 Millionen Menschen unter Symptomen der Herzinsuffizienz (Eriksson 1995). Auffallend ist hierbei, dass im Gegensatz zur koronaren Herzerkrankung die Prävalenz der Herzinsuffizienz in den letzten Jahren zugenommen hat und zunehmend ein Gesundheitsproblem in den westlichen Industrienationen darstellt (Stewart et al. 2003). Da die Herzinsuffizienz eine Erkrankung des älteren Menschen ist, kann man dies zum einen durch die Zunahme des durchschnittlichen Lebensalters in den letzten Jahrzehnten erklären, zum anderen durch die effektiveren Behandlungsmöglichkeiten und damit längeren Überlebenszeiten des akuten Myokardinfarkts und der chronisch ischämischen Herzerkrankung.

1.1.2 Ätiologie, Klinik und Therapie

Die chronische Herzinsuffizienz ist ein pathophysiologischer Zustand, bei dem die notwendige Perfusion der Organe nur bei erhöhtem enddiastolischem Druck gewährleistet ist. Die häufigsten Ursachen sind Hypertonie und ischämische Herzerkrankungen. Viel seltener sind Myokarditiden und Kardiomyopathien für eine eingeschränkte Herzfunktion verantwortlich (Ho et al. 1993a, Ho et al. 1993b).

Letztlich kommt es einerseits zu einer systolischen Ventrikelfunktionsstörung mit verringerter Auswurfleistung. Zum anderen kommt es zu einer diastolischen Ventrikelfunktionsstörung, die über eine verminderte Compliance zu ungenügender Füllung des Ventrikels führt. Häufig findet sich eine Kombination aus systolischer und diastolischer Funktionsstörung.

Zu den typischen klinischen Symptomen gehören Dyspnoe, Schwäche, Müdigkeit und Flüssigkeitsretention. Nach der Klassifikation der New York Heart Association teilt man den Schweregrad anhand des Leitsymptoms Dyspnoe in 4 Klassen ein.

Die leitliniengerechte Therapie besteht in der Gabe von β -Blockern, ACE-Hemmern, Diuretika und Aldosteronantagonisten. Durch diese medikamentösen Therapieoptionen

wurde die Lebenserwartung bei Patienten mit Herzinsuffizienz in den letzten 20 Jahren verdoppelt. Die 1-Jahresletalität liegt je nach NYHA-Stadium zwischen 10% (NYHA I) bis über 50% (NYHA IV). Viele neuere Therapieansätze für die chronische Herzinsuffizienz blieben jedoch erfolglos. Dabei handelt es sich zum einen um positiv inotrope Substanzen wie Phosphodiesterasehemmer und Katecholamine. Sie bleiben der kurzfristigen Therapie einer akuten dekompensierten Herzinsuffizienz und des kardiogenen Schocks vorbehalten. Die chronische Gabe führt nur kurzzeitig zu einer Verbesserung der Situation. Langfristig verschlechtert sich das Krankheitsbild. Zum anderen zeigten auch weitere Medikamentengruppen wie Endothelin-Rezeptorantagonisten, neutrale Endopeptidase-Hemmer, Vasopeptidase-Inhibitoren und Medikamente, die in die Signaltransduktion des Tumor-Nekrose-Faktors α eingreifen, keine Wirksamkeit in Bezug auf das Überleben der Patienten (Coletta et al. 2002, Packer et al. 2002, Weber et al. 2001).

1.2 Physiologie und Pathophysiologie

1.2.1 Physiologie der Herzaktion

Die elektrische Erregung des Sarkolemm, die sich über die Zelloberfläche ausbreitet, löst die Kontraktion des Kardiomyozyten aus. Dieser Vorgang wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet. Während eines Aktionspotentials gelangt Calcium zunächst über den spannungsabhängigen L-Typ-Calcium-Kanal in die Zelle. Der rasche Calciumeinstrom triggert die Freisetzung von Calcium über den Ryanodinrezeptor (RyR) aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und dient somit als Verstärker des extrazellulären Calciumeinstroms.

Die Calcium-Ionen binden intrazellulär an den Troponin/Tropomyosin-Komplex und bewirken hier eine Konformationsänderung, die eine Interaktionsstelle zwischen Aktin- und Myosinfilamenten freilegt und damit die Kontraktion ermöglicht.

Die Relaxation erfolgt über die schnelle Eliminierung des Calciums aus dem Zytosol während der Diastole. Beim Menschen wird etwa 70% des Calciums über die SR Calcium-ATPase-2a (SERCA-2a) unter ATP-Verbrauch in das SR transportiert und steht dort für die nächste Kontraktion zur Verfügung. Die restlichen 30% werden durch den Natrium/Calcium-Austauscher (NCX) und zu einem geringen Anteil durch langsame Calcium-ATPasen im Sarkolemm in den Extrazellulärraum befördert. Bei Ratten und Mäusen werden 92% des Calciums über die SERCA-2a zurück in das SR und nur 8% in den Extrazellulärraum befördert (Bers 2008). Die SERCA-2a wird unter basalen Bedingungen reversibel von Phospholamban (PLB) gehemmt. Es bindet im unphosphorylierten Zustand an die SERCA-2a und setzt deren Calcium-Affinität herab.

1.2.2 Beta-adrenerge Signalkaskade

Die funktionelle Anpassung der Herzleistung an den peripheren Bedarf wird zu einem wesentlichen Teil durch den Sympathikus gewährleistet. Die sympathischen Transmitter Noradrenalin und Adrenalin aktivieren über α - und β -Adrenozeptoren intrazelluläre Signalkaskaden, die über Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen zu Funktionsveränderungen von regulatorischen Phosphoproteinen führen. Es werden drei Arten der β -Adrenozeptoren am menschlichen Herzen exprimiert, wobei die β_1 -Adrenorezeptoren mit 75-80% den größten Anteil ausmachen. 20% der Adrenozeptoren sind β_2 -Adrenozeptoren. Der β_3 -Adrenozeptor wird hauptsächlich von Adipozyten exprimiert. Es wurde jedoch auch mRNA des β_3 -Adrenozeptors im Myokard gefunden. Seine Rolle bleibt jedoch weiterhin unklar (Gauthier et al. 2000, Brodde et al. 2006). Die Ligandenbindung führt am β_1 -Rezeptor über ein stimulierendes GTP-abhängiges Protein (G_s) zur Aktivierung der membranständigen Adenylylcyclase (AC), wobei im Herzen die Isoformen AC 5 und AC 6 vorherrschen (Pierre et al. 2009). Diese katalysiert die Bildung des *second messengers* zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat (cAMP) aus ATP. Dieser aktiviert die Proteinkinase A (PKA) (Lohse et al. 2003). Die PKA phosphoryliert verschiedene regulatorische Proteine, wie z.B. den sarkolemmalen, spannungsabhängigen L-Typ Calcium-Kanal, den Troponin Inhibitor I (TnI), das Myosin-Binding-Protein C (MyBP-C), Phospholamban (PLB) und den Proteinphosphatase-Inhibitor-1 (Inhibitor-1). Die PKA vermittelt somit die Steigerung der Kontraktionskraft (Inotropie), der Herzfrequenz (Chronotropie, hauptsächlich durch cAMP abhängige HCN-Kanäle) sowie der Beschleunigung der Relaxation (Lusitropie).

Eines der wichtigsten dieser Zielproteine ist PLB. Es wird durch zwei Kinasen, die PKA und die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase-II (CaMK-II) phosphoryliert. Dies führt zu einer zwei- bis dreifachen Steigerung der SERCA-2a-Aktivität (MacLennan und Kranias, 2003, Simmerman und Jones 1998, Tada et al. 1998). Die PKA-Phosphorylierung erfolgt an Serin 16 und vermindert die benötigte Calciumkonzentration für die halbmaximale Aktivierung (K_{Ca}) der SERCA-2a um die Hälfte (Simmerman und Jones 1998). Die steigende intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert die CaMK-II (Maier und Bers 2002), die ihrerseits Threonin 17 phosphoryliert und dadurch die K_{Ca} weiter senkt (Simmerman und Jones, 1998). Sie trägt damit zum einen zur schnelleren Relaxation bei. Zum anderen füllt sie das SR verstärkt mit Calcium auf und bewirkt somit eine stärkere Calcium-Freisetzung während der nächsten Systole. PLB wird vorwiegend durch die Proteinphosphatase-1 (Phosphatase-1) (Brittsan und Kranias 2000, Kranias und Di Salvo 1986) und in geringerem Maße durch die Proteinphosphatase-2A (Phosphatase-2A) dephosphoryliert (Gergs et al. 2004).

Mit dem MyBP-C und Troponin I werden aber auch Proteine des kontraktiles Apparates der Herzmuskelzelle reguliert. So wird durch eine Phosphorylierung von MyBP-C der Zugang von Calcium zum Sarkomer verbessert und die Kontraktilität erhöht (Carrier 2007, Solaro 2008).

1.2.3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Die gestörte Pumpfunktion des Herzens führt zur Minderperfusion des Organismus und wird mit der Aktivierung neurohumoraler Anpassungsmechanismen (Bristow et al. 1982), darunter die Aktivierung des Sympathikus, des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sowie einer vermehrten Ausschüttung von antidiuretischem Hormon beantwortet. Diese primär als Kompensationsmechanismen des Körpers gedachten Reaktionen haben langfristig negative Auswirkungen und münden schließlich in einer sich selbstverstärkenden Verschlechterung der Herzpumpfunktion.

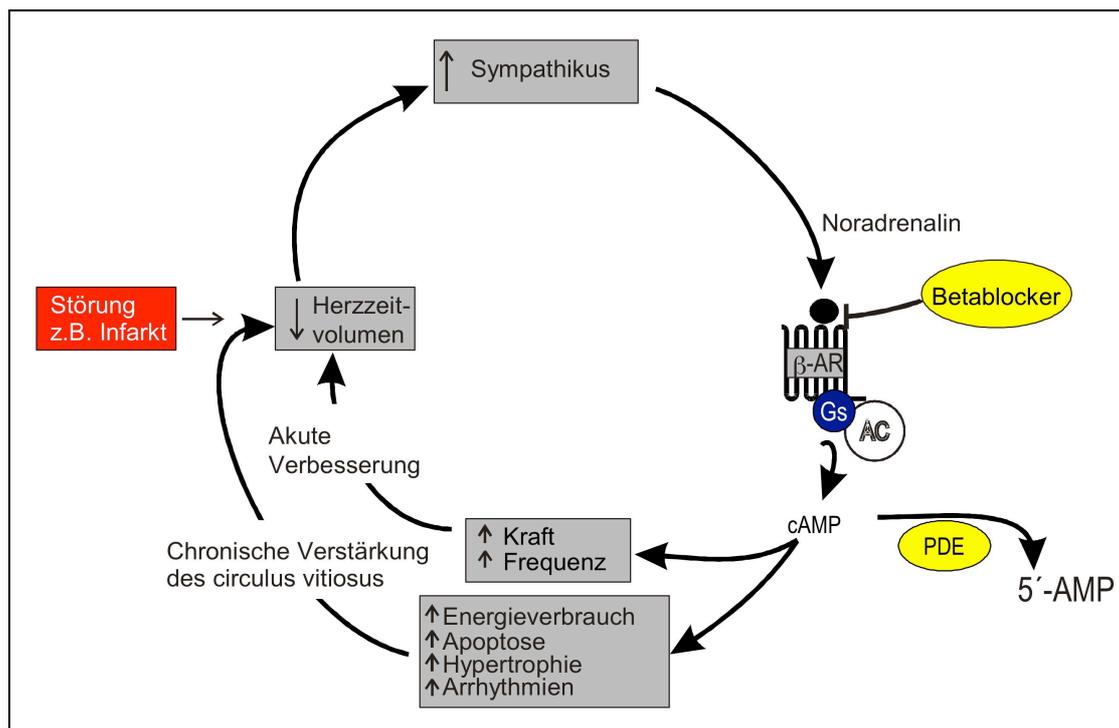


Abbildung 1.1 "Teufelskreis" der chronischen Katecholaminwirkung in der Herzinsuffizienz. Eine Störung der Herz-Kreislauffunktion (akut z.B. durch einen Infarkt oder chronisch z.B. durch Hypertonus) führt zur Aktivierung der Sympathikus. Dies führt initial zu einer Aufrechterhaltung des Herzzeitvolumens. Langfristig führt dieser Mechanismus jedoch über den vermehrten Energieverbrauch und die direkten toxischen Wirkungen der Katecholamine zu einer Verschlechterung der linksventrikulären Funktion (nach El-Armouche und Eschenhagen 2008).

So wird durch den verminderten Blutdruck akut der Pressorezeptorenreflex ausgelöst. Der Sympathikus wird aktiviert und es werden vermehrt Katecholamine in die Blutbahn abgegeben. Dadurch wird initial die Herzleistung gesteigert. Die gesteigerte Plasmakatecholaminkonzentration bewirkt aber gleichzeitig eine direkte Kardiotoxizität. Zusätzlich führt sie zu selektiver Vasokonstriktion mit Zentralisation des Kreislaufs, Minderperfusion der Niere, Aktivierung der Renin-Angiotensin II-Aldosteron-Achse und somit langfristig zu einer vermehrten Belastung des Myokards (Francis und Tang 2003).

Die Mehrarbeit des Herzens führt zu dessen Hypertrophie. Hierfür verantwortlich ist die Ausschüttung neuroendokriner Mediatoren, die zur Induktion verschiedener Hypertrophiesignalkaskaden führt (Braunwald und Bristow 2000). So ist die Katecholaminwirkung durch Freisetzung von lokalen Wachstumsfaktoren (Schluter et al. 1995) aber auch Angiotensin II (Sadoshima et al. 1993) für die Entstehung der Hypertrophie mitverantwortlich.

Die Hypertrophie ist, wenn sie ein gewisses Maß überschreitet, in verschiedener Hinsicht schädlich. Die Diffusionsstrecke des Sauerstoffs vergrößert sich, da die Anzahl der Kapillaren mit der Hypertrophie nicht zunimmt (relative Koronarinsuffizienz). Gerade bei einer exzentrischen Hypertrophie, die bei vermehrter Volumenarbeit des Herzens ausgebildet wird, ist gemäß des Laplace Gesetzes eine verstärkte Wandspannung und damit ein höherer Sauerstoffbedarf notwendig, um den gleichen Blutdruck aufzubauen. Bei adäquater Therapie ist die kardiale Hypertrophie zumindest partiell reversibel (Krayenbuehl et al. 1983).

Ein Charakteristikum der Herzinsuffizienz ist eine trotz erhöhter Plasmakatecholaminkonzentration abgeschwächte β -adrenerge Signalkaskade. Die Desensitivierung hat verschiedene Ursachen. Verantwortlich sind die Down-Regulation der β_1 -Adrenorezeptoren (Bristow et al. 1982, Bristow et al. 1993) und eine gesteigerte Desensitivierung und Internalisierung der Rezeptoren. Dies geschieht über eine verstärkte β -Adrenorezeptorkinase-1 (β -ARK)-Aktivität (Choi et al. 1997, Iaccarino et al. 2001, Ungerer et al. 1993), die den Rezeptor phosphoryliert und dadurch dessen Entkopplung von nachgeschalteten GTP-abhängigen Proteinen (G-Proteine) bewirkt und so die Internalisierung des Rezeptors erleichtert (Hausdorff et al. 1990). Das Verhältnis der β -Adrenorezeptoren verschiebt sich und es resultiert ein Verhältnis von 50:50 zwischen β_1 - und β_2 -Rezeptoren. Weiterhin trägt eine erhöhte Expression von inhibitorischen G-Proteinen (G_i) (Neumann et al. 1988, Feldman et al. 1988, Böhm et al. 1990, Eschenhagen et al. 1991) zur β -adrenergen Desensitivierung bei. Diese beeinflusst den Phosphorylierungszustand und damit die Aktivität vieler Proteine, die direkt oder indirekt den Calciumhaushalt regulieren.

In Kardiomyozyten spielt Calcium als zentraler *second messenger* eine entscheidende Rolle, und eine gestörte Calciumhomöostase nimmt Einfluss auf die elektromechanische Kopplung,

die Rhythmogenese, den Zelltod sowie die Kardiomyozytenhypertrophie und unterstützt so die Progression der Herzinsuffizienz. Im insuffizienten Herzen sind die Calciumtransienten kleiner und fallen langsamer ab. Calciumaufnahme und -gehalt des SR sind verringert. In der Diastole werden die Calciumionen langsamer in das SR transportiert. Dadurch bleibt die diastolische Calciumkonzentration hoch und zugleich steht im SR wenig Calcium für die nächste Kontraktion zur Verfügung. Daraus resultieren eine verminderte Relaxation und Kontraktion. Einer der Faktoren hierfür ist das erhöhte Verhältnis von PLB zu SERCA 2a (Hasenfuss 1998), das aus einer verminderten SERCA-2a-Expression resultiert.

1.3 Serin-/Threoninphosphatasen

1.3.1 Einteilung der Proteinphosphatasen

Die frühe Entdeckung und intensive Erforschung der Proteinkinasen begünstigte die Meinung, dass Kinasen entscheidend für die Regulation des Phosphorylierungsgrad sind. Inzwischen weiß man aber, dass der Phosphorylierungszustand wichtiger Phosphoproteine nicht nur über eine Aktivierung der entsprechenden Kinase, sondern je nach Protein auch genau so gut über eine Hemmung der entsprechenden Proteinphosphatase erhöht werden kann (Cohen 2002). Traditionell werden diese Phospho-Serin und -Threonin dephosphorylierenden Phosphatasen (im Folgenden Phosphatasen genannt) anhand ihrer biochemischen Eigenschaften und der Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Inhibitoren in Typ 1 und Typ 2 Phosphatasen eingeteilt (Cohen und Cohen 1989, Shenolikar und Nairn, 1991). Die Typ 1 Phosphatasen werden durch die Phosphatase-1-spezifischen inhibitorischen Proteine 1 (Inhibitor-1) und 2 (Inhibitor-2) gehemmt. Sie dephosphorylieren bevorzugt die β -Untereinheit der Phosphorylasekinase, wogegen die Typ 2 Phosphatasen eine höhere Spezifität gegenüber der α -Untereinheit aufweisen und nicht durch die Inhibitoren-1 und -2 beeinflussbar sind. Die Typ 2 Phosphatasen werden noch weiter in die Subtypen Phosphatase-2A, Phosphatase-2B (Calcineurin) und Phosphatase-2C unterteilt. Darüber hinaus wurden noch Phosphatasen vom Typ 4, 5,6 und 7 identifiziert (Cohen 1997).

1.3.2 Proteinphosphatase-1

Beim Menschen wurden vier Isoformen der Phosphatase-1 gefunden, Phosphatase-1 α , Phosphatase-1 β (syn. Phosphatase-1 δ), Phosphatase-1 γ 1 und Phosphatase-1 γ 2 (Sasaki et al. 1990). Sie werden von drei Genen kodiert. Phosphatase-1 γ 1 und Phosphatase-1 γ 2 sind *Splice*-Varianten eines Gens. Die Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Phosphatase-1-Isoformen beträgt > 90%. Die Phosphatase-1 reguliert so unterschiedliche Prozesse wie den Zellzyklusverlauf, die Proteinsynthese, den Kohlenhydratmetabolismus, die Transkription

und die neuronale Signaltransduktion (Ceulemans et al. 2004). Die Regulation dieser vielfältigen zellulären Prozesse durch ein einzelnes Enzym gelingt aufgrund der Interaktion der katalytischen Untereinheit der Phosphatase-1 mit mehr als 50 verschiedenen regulatorischen Untereinheiten (Cohen 2002). Die meisten der regulatorischen Untereinheiten führen die katalytische Untereinheit einem spezifischen subzellulären Kompartiment zu.

1.3.3 Regulation und Funktion der Proteinphosphatase-1 im Herzen

Auch im Herzen spielen regulatorische Untereinheiten eine wichtige Rolle. Am SR bindet die 160-kDa schwere Untereinheit G_M die 37-kDa Phosphatase-1c an die transmembranäre Domäne von PLB (Berrebi-Bertrand 1998). Im Zytosol ist die Aktivität der freien Phosphatase-1c geringer (Hubbard 1989) und kann dort zudem durch Bindung des PKA-aktivierten Inhibitor-1 gehemmt werden (Cohen und Cohen 1989). Etwa 90% der PLB-assoziierten Phosphatase-Aktivität werden im Herzen der Phosphatase-1 zugesprochen (MacDougall et al. 1991, Steenaart et al. 1992). Verschiedene Befunde deuten auf eine wichtige Rolle der Phosphatase-1 in der Herzinsuffizienz hin. In der menschlichen Herzinsuffizienz (Neumann et al. 1997) und in Tiermodellen der experimentellen Herzinsuffizienz (Gupta et al. 2003) ist die Phosphatase-1-Konzentration erhöht. Die herzspezifische Überexpression von Phosphatase-1c im Mausmodell führt zu Veränderungen, die der menschlichen Herzinsuffizienz sehr ähnlich sind. So kommt es bei diesen Tieren im Alter von sechs Monaten zu einer ausgeprägten kardialen Hypertrophie und Fibrosierung. Dies geht einher mit einer erhöhten Expression des atrialen natriuretischen Peptids. Letztlich führen diese Veränderungen zu einer hochgradig reduzierten linksventrikulären Funktion und bedingen eine deutlich erhöhte Mortalität der Tiere (Carr et al. 2002).

1.4 Proteinphosphatase-Inhibitoren

1.4.1 Einteilung der Phosphatase-Inhibitoren

Die Phosphatase-1 wird durch mehrere endogene inhibitorische Proteine reguliert. Hierzu gehören der Inhibitor-1, der Inhibitor-2, das Dopamin- und cAMP-regulierte Phosphoprotein-32 (DARPP-32) und der nukleäre Inhibitor der Phosphatase-1 (NIPP-1) (Cohen 2002). Der inhibitorische Effekt aller vier Inhibitoren ist thermo- und säurestabil, eine für Proteine ungewöhnliche Eigenschaft. Inhibitor-1 und DARPP-32 sind Strukturhomologa und besitzen eine weitere Besonderheit. Sie entwickeln ihren inhibitorischen Effekt erst nach Phosphorylierung durch die PKA (Huang et al. 1999, Cohen et al 1988).

1.4.2 Proteinphosphatase-Inhibitor-1

Inhibitor-1 wird als hochspezifischer Phosphatase-1 Hemmer im Zytosol (Iyer et al. 1988) verschiedener Gewebe von Säugetieren exprimiert. Die höchsten Konzentrationen bei Säugetieren wurden im Gehirn, Skelettmuskel, Fettgewebe und den Nieren gefunden (MacDougall et al. 1989, Gustafson et al. 1991, Hemmings et al. 1992, Alder und Barbas, 1995, Lowenstein et al. 1995), aber auch im Herzen wird Inhibitor-1 exprimiert (Neumann et al. 1991, Gupta et al. 1996).

Die Primärstruktur von Inhibitor-1 aus dem menschlichen Gehirn und der Skelettmuskulatur von Ratte und Kaninchen besteht aus 171 bzw. 165 Aminosäuren. Die N-terminalen 54-66 Aminosäuren verkörpern die kürzeste aktive Untereinheit des Inhibitor-1 der Ratte, des Kaninchens und des Menschen (Aitken et al. 1982, Elbrecht et al. 1990, Endo et al. 1996). Darin liegt 9Lys-Ile-Gln-Phe₁₂, das Phosphatase-1 Bindungsmotiv (Goldberg et al. 1995, Egloff et al. 1997), und Threonin 35, welches PKA-abhängig phosphoryliert wird und so den Inhibitor-1 aktiviert (Cohen et al. 1977). Phosphatase-1c bindet sowohl an Threonin 35 phosphorylierten, wie auch nicht phosphorylierten Inhibitor-1. Allerdings dissoziiert nicht-phosphorylierter Inhibitor-1 doppelt so schnell wieder ab.

1.4.3 Proteinphosphatase-Inhibitor-1 als Element der β -adrenergen Signalkaskade

Inhibitor-1 verfügt selbst über mindestens vier Phosphorylierungsstellen, die seine Aktivität regulieren. Da er von der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) an Threonin 35 phosphoryliert wird und ausschließlich in diesem Zustand sehr potent die Phosphatase-1 hemmt (Cohen et al. 1988), könnte Inhibitor-1 den durch PKA-Aktivierung erhöhten Phosphorylierungszustand von Phosphoproteinen im Herzen erhöhen bzw. stabilisieren.

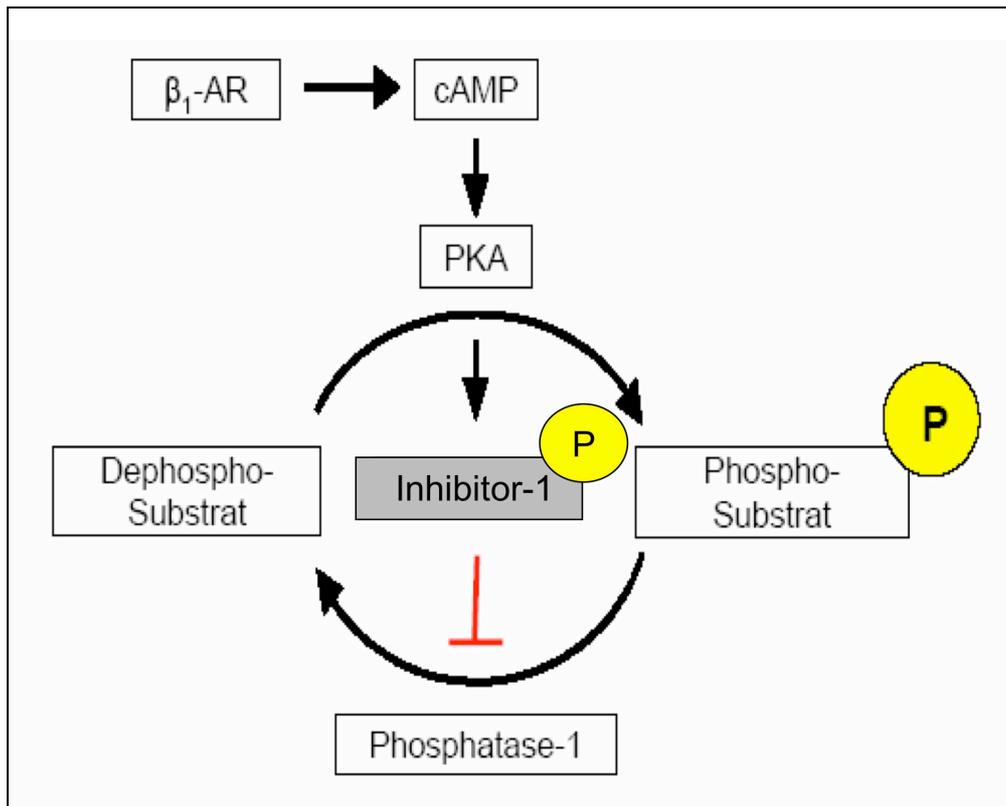


Abbildung 1.3 Inhibitor-1 hemmt die Phosphatase-1 und damit die Dephosphorylierung von PKA Substraten. Die Aktivierung von β_1 -Adrenorezeptoren führt über ein stimulierendes G Protein zur Aktivierung der membranständigen Adenylylcyclase. Diese wiederum katalysiert die Bildung des second messengers cyclisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat aus ATP und aktiviert darüber die Proteinkinase A. Letztlich resultiert daraus eine Phosphorylierung wichtiger Regulatorproteine. Antagonisiert wird diese Phosphorylierung u.a. durch die Typ-1 Phosphatasen (Phosphatase-1). Inhibitor-1 ist ebenfalls ein Substrat der PKA und hemmt ausschließlich im phosphorylierten Zustand sehr potent und selektiv die Phosphatase-1. Inhibitor-hat somit eine positive Verstärkerfunktion in der β -adrenergen Signalkaskade im Herzen.

Phosphorylierungen an Serin 67 (Braz et al. 2004, Sahin et al. 2006) und Threonin 75 (Rodriguez et al. 2007) durch $PKC\alpha$ scheinen die Inhibitor-1 Aktivität zu hemmen. Alle Phosphorylierungen sind reversibel und durch weitere Phosphatasen geregelt. Dephosphoryliert wird Inhibitor-1 *in vitro* durch die Phosphatase-2A und die Phosphatase-2B, wobei *in vivo* bei erhöhter freier Calciumkonzentration die Phosphatase-2B wahrscheinlich dominiert (Bibb et al. 2001, El-Armouche et al. 2006). Da die Aktivität der Phosphatase-2B Ca^{2+} -abhängig ist und die PKA cAMP-abhängig ist, kann Inhibitor-1 als ein Bindeglied zwischen den beiden wichtigsten sekundären Botenstoffen der Herzmuskelzelle, Calcium und cAMP betrachtet werden. Obwohl Inhibitor-1 schon vor über 30 Jahren als prototypisches Verbindungselement zwischen der PKA und Phosphatase-1 beschrieben wurde (Huang und Glimsmann 1976) und theoretisch eine sehr interessante Stellung in der Signaltransduktion einnimmt, ist er lange nur mit dem Glykogenhaushalt in Leber und Skelettmuskel in Verbindung gebracht worden (Cohen und Cohen 1989).

1.4.4 Proteinphosphatase-Inhibitor-1 in der Herzinsuffizienz

Inhibitor-1 ist in der menschlichen Herzinsuffizienz stark reguliert. Bei insuffizienten humanen Herzen konnte im Vergleich zu nicht-insuffizienten Spenderherzen eine um 57% verminderte Inhibitor-1 Konzentration im Western Blot nachgewiesen werden und der PKA-Phosphorylierungsgrad war um 72% verringert (El-Armouche et al. 2004). In denselben Herzen bestand eine enge Korrelation zwischen dem erniedrigten Phosphorylierungsgrad von Inhibitor-1 und dem ebenfalls erniedrigtem Phosphorylierungsgrad von PLB. Dies deutet auf einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen den Funktionszuständen beider Proteine hin. Zusammengenommen impliziert dies, dass die stark verminderte Expression und Phosphorylierung von Inhibitor-1 zum Wirkungsverlust von Katecholaminen bei der Herzinsuffizienz beitragen könnte.

Vergleichbare Ergebnisse findet man im Tiermodell. Im Herzinsuffizienzmodell der chronischen Isoprenalininfusion fand sich eine verminderte Inhibitor-1 mRNA- und Proteinkonzentration und ebenfalls eine erniedrigte PLB-Phosphorylierung, die auch im experimentellen Modell der Herzinsuffizienz mit dem Phosphorylierungsgrad von Inhibitor-1 korrelierte (El-Armouche et al. 2007).

1.5 Transgene Mäuse als Modell

1.5.1 Generierung transgener Mäuse

Zur Erforschung der Funktion einzelner Proteine eignen sich insbesondere transgene Mausmodelle. Zur Generierung transgener Mäuse erfolgt die Integration fremder DNA in das Mausgenom (Beddington et al. 1989). Die hierfür verwendeten Injektionskonstrukte enthalten neben der cDNA des Gens, das als Transgen exprimiert werden soll, auch einen entsprechenden Promoter und möglicherweise zusätzliche regulatorische Sequenzen. Zur gewebsspezifischen Expression kann ein organspezifischer Promotor verwendet werden. Indem die Sequenz des Transgens verändert wird, können sowohl Funktion als auch Lokalisation des transgenen Genprodukts verändert werden.

Zur herzspezifischen Überexpression eignet sich der α MHC-Promoter. Dieser dient endogen zur Expression der α -Isoform der Myosin-heavy-chain. Myosin besteht aus zwei schweren Ketten (MHC) und vier Leichtketten (MLC). Während der Embryonalentwicklung ist die β -Isoform der MHC im Ventrikel dominierend und die α -Isoform wird vor allem im Vorhof exprimiert (Ng et al. 1991). Bei der Geburt kommt es unter dem Einfluss von Thyroxin zu einem Wechsel der Isoformen. Eine Expression mittels α MHC-Promoter führt neben der Expression im Herzen zu einer Expression des Produkts in der proximalen Vena cava und den Pulmonalvenen (Subramaniam et al. 1991). Zur Generierung der transgenen Mäuse

wird das Injektionskonstrukt in linearisierter Form in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle injiziert.



Abbildung 1.4 Generierung transgener Mäuse durch Pronukleusinjektion (Transgenic Facility Tübingen)

Die injizierten Eizellen werden dann in pseudoschwangere Ammen übertragen. Ein Teil der implantierten Eier entwickelt sich zu Nachkommen, die zum Teil das Transgen in ihr Genom integriert haben. Da die Integration des DNA-Fragments zufällig geschieht, ist es möglich dass ein anderes, möglicherweise essentielles Gen durch die Integration des Transgens inaktiviert wird. Die Integration in der Nähe cis-wirkender regulatorischer DNA-Elemente, wie z.B. „silencer“, kann darüber hinaus eine Expression des Transgens verhindern. Mit Hilfe von Southernblot-Analysen oder Polymerasekettenreaktion können so genannte Founder-Tiere identifiziert werden, die das Transgen meist in mehreren Kopien in ihrem Genom integriert haben. Die resultierende Proteinkonzentration kann im Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

1.5.2 Herzkreislaufphysiologie der Maus

Die normale Herzfrequenz bei Mäusen beträgt 450-620 Schläge pro min. Es gibt drei prinzipielle Mechanismen zur Steigerung der kardialen Funktion:

1. Die Kraft-Frequenzbeziehung
2. Die β -adrenerge Stimulation
3. Der Frank-Starling-Mechanismus

Die maximale Herzfrequenzreserve bezogen auf den basalen Herzrhythmus unterscheidet sich bei verschiedenen Tierarten. Für Tierarten mit einem Körpergewicht über 1 Kilogramm ist eine Steigerung auf das 2-3-fache der basalen Herzfrequenz typisch. Kleintiere wie die Maus zeigen eine maximale Steigerung um 30-50% (Vornanen 1992). Dies deutet daraufhin, dass die Kraft-Frequenz-Beziehung bei der Maus eine kleinere Rolle spielt. Der Blutdruck der Mäuse liegt bei 100-115 mmHg, mit systolischen Spitzen bis zu 120 mmHg (Kass et al. 1998). Die Druckentwicklung pro Zeit (dP/dt), die häufig als Parameter der Kontraktilität bestimmt wird, beträgt bei Mäusen 4000 mmHg pro Sekunde und kann bis zu 16000 mmHg pro Sekunde ansteigen. Beim Menschen wurden Werte maximale von 1900 mmHg pro Sekunde berichtet (Kass et al. 1998).

Zusätzlich bereiten bei der Maus die geringe Größe von 5-7 cm, das Gewicht von 20-60 g und der kurze Herzzyklus technische Probleme bei der Untersuchung der kardialen Funktion.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Generierung und Charakterisierung einer Mauslinie mit herzspezifischer Überexpression des Inhibitor-1, um die in vivo Funktion zu untersuchen und insbesondere seine Rolle in der Herzinsuffizienz besser zu verstehen. Unserer Hypothese nach könnte die verminderte Inhibitor-1-Expression eine maladaptive Reaktion der Herzinsuffizienz sein und eine verstärkte Inhibitor-1-Expression im Herzinsuffizienzmodell protektiv wirken.

Die Überprüfung der Hypothese sollte durch folgende Schritte erreicht werden:

1. Generierung transgener Mäuse mit herzspezifischer Überexpression von Inhibitor-1.
2. Analyse von Inhibitor-1 Konzentration auf Protein- und mRNA-Ebene und der Phosphatase-1 Konzentration und Aktivität und Untersuchung derselben nach β -adrenerger Stimulation.
3. Untersuchung des Phosphorylierungsgrades verschiedener Zielproteine.
4. Erfassung des kardiovaskulären Phänotyps in vivo mittels Echokardiographie.
5. Untersuchung der transgenen Mäuse im Herzinsuffizienzmodell der chronischen Isoprenalininfusion.
6. Untersuchung der Auswirkung der Ketamin/Xylazin Narkose im Isoprenalininfusionsmodell bei Inhibitor-1 transgenen Mäusen sowie Inhibitor-1 Knock-out Mäusen.

2 Material und Methoden

2.1 Inhibitor-1 transgene Mäuse

Die Inhibitor-1 transgenen Mäuse wurden in Erlangen und Hamburg in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ali El-Armouche generiert. Die Pronukleusinjektion erfolgte in der Transgenic Mouse Facility des Zentrums für Molekulare Neurobiologie in Hamburg. Für die Experimente wurden Inhibitor-1 transgene Mäuse verschiedenen Alters verwendet. Als Kontrolle dienten jeweils gleichaltrige Wildtypgeschwister. Die Mäuse wurden im Tierstall des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorff gehalten und mit handelsüblichem Labortierfutter und Leitungswasser *ad libitum* versorgt.

2.2 Genotypisierung der transgenen Mäuse

2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe

Für die Genotypisierung der Inhibitor-1 transgenen Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien gewonnen. Hierfür wurden die ca. 0,5 cm langen Schwanzbiopsien zunächst über Nacht in 0,5 ml Lysispuffer und 400 µg Proteinase-K bei 50 °C lysiert. Im Anschluss wurden die Proben mit dem DNA Isolation Reagent for Genomic DNA Kit (AppliChem, Darmstadt) behandelt und die DNA gefällt. Die ausgefallene DNA wurde durch 15 minütige Zentrifugation mit 10 000 rpm pelletiert, zweimal mit 96% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 80 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA wurde bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

Lysispuffer

0,05 M Tris-HCl, pH 8

0,1 M EDTA, pH 8

1% SDS

0,1 M NaCl

TE-Puffer

0,01 M Tris-HCl, pH 8

0,1 mM EDTA

2.2.2 Herstellung einer DNA-Sonde

Für die Herstellung der DNA-Sonde wurden jeweils 5 µg Plasmid DNA des pBlue-MHC- α PPI-1-SV40tpoIA Konstrukts mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und HindIII in den entsprechenden Puffern über Nacht verdaut, in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel (1,2%) aufgetrennt, ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin® Extract Kit (Macherey-Nagel, Düren) aus dem Gel aufgereinigt.

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonde erfolgte mit dem Rediprime DNA Labeling Kit. Hierbei wird eine Polymerase verwendet die an die freien 3'-Enden von degenerierten Primern, die nach Denaturierung der Sonden-DNA für 5 min bei 95 °C an die DNA binden, radioaktiv markierte Nukleotide einbaut. Nach Herstellerangaben wurden 25 ng aufgereinigte DNA für 30 min bei 37 °C mit 50 µCi 32 P-dCTP markiert. Nicht inkorporierte Aktivität wurde über NICK-Säulen entfernt. Der Einbau wurde in einem Cherenkow-Szintillator kontrolliert. Die Sonde wurde abschließend nochmals bei 100 °C denaturiert und bis zur Verwendung auf Eis gehalten.

2.2.3 Southern Blot

Für den Southern Blot wurden ca. 5 µg genomischer DNA mit EcoRI über Nacht verdaut. Die DNA-Fragmente wurden dann in einem Agarosegel (1%) nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch getrennt (Southern 1975). Die Gele wurden anschließend für 15 min mit 0,25 M HCl depuriniert, mit Aqua dest. gewaschen und für weitere 15 min mit 0,4 M NaOH denaturiert. Mit Hilfe eines Kapillarblots wurde die DNA auf eine Polyamidmembran übertragen. Die Membran wurde mit 2x SSC gewaschen und getrocknet. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wurde die Membran vor Inkubation mit der Sonde für 30 min bei 68 °C im Hybridisierungssofen mit Hybridisierungspuffer in Anwesenheit von 200 µg/ml Heringsspermien-DNA geblockt. Die Inkubation mit der Sonde erfolgte dann über Nacht im Rotationsofen bei 68 °C. Anschließend wurde die Membran zweimal für 30 min mit Waschpuffer bei 68 °C gewaschen. Zur Darstellung der Bindung wurde die Membran getrocknet, in Plastikfolie eingewickelt und über Nacht auf einer Phosphoimagerplatte in einer Kassette exponiert. Die Phosphoimagerplatte wurde dann mit einem Fujix BAS 2000 Phosphoimager ausgewertet.

Denaturierungslösung

0,4 M NaOH

Depurinierungslösung

0,25 M HCl

20x SSC

175,3 g/l NaCl

88,2 g/l Trinatriumcitrat

Transferlösung

2x SSC

Waschpuffer

0,5x SSC, 1% SDS

Hybridisierungspuffer

1,5x SSPE

7% SDS

10% PEG 20.000

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Genotypisierung, nach der Foundergeneration, fand mittels PCR statt. Zur Vermehrung der spezifischen genomischen DNA wurden folgender Ansatz und folgende Temperaturbedingungen gewählt. Die angewandten Primer sind in **Tabelle 2.2** aufgeführt.

PCR Reaktionsansatz

10-fach PCR Puffer II 5 µl

MgCl₂ (25 mM) 6 µl

dNTP 1 µl

Primer Alpha-MHCforward 2 µl (100 µM)

Primer I-1 rev. 2 µl (100µM) / Primer I-1 forw. 2 µl (100 µM)

Genomische DNA 4 µl

DNA Polymerase 0,25 µl

Aqua ad iniectabilia ad 50 µl

	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl der Zyklen
Präinkubation	94	10	1
Denaturierung	94	0,5	35
Annealing	58	0,5	35
Synthese	72	0,6	35
Extension	72	5	1

Tabelle 2.1 Bedingungen der Genotypisierungs-PCR

Primer	Sequenz
Alpha-MHC forward	5'-CGG CAC TCT TAG CAA ACC TC-3'
Inhibitor-1 reverse	5'-CCC TTG TTT CTG TTG CCC TA-3'
Inhibitor-1 forward	5'-TAA CCT CAT CAG CAC AGC TCA-3'

Tabelle 2.2 Primer der Genotypisierungs-PCR

Die amplifizierte Inhibitor-1 cDNA wurde über ein Agarose-Gel separiert. In ein elektrisches Feld gebracht, wandern die negativ geladenen DNA Stücke im Gel zur Anode und trennen sich nach ihrer Größe auf. Das, den Agarose-Gelen beigefügte, Fluorochrom Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen von Nukleinsäuren. Mit Ultraviolettlicht (UV-Licht) angeregt erscheint dieser Komplex im sichtbaren Bereich als leuchtende Bande. Es können so DNA Mengen von weniger als 5 ng detektiert werden und am (UV)-Transluminator sichtbar gemacht werden. Zur amplifizierten DNA wurde 20% DNA Ladepuffer gegeben. Der gesamte Ansatz wurde neben einem Größenstandard (O'RangeRuler 100 bp DNA-Leiter, Fermentas, St. Leon-Rot) auf ein 1%iges Agarose-Gel geladen. Das Gel wurde mit Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-(Tris)-Acetat-EDTA-Laufpuffer (TAE) in Elektrophorese-Kammern unter Spannung gelegt. Die Laufzeit betrug bei 55 V etwa 1-1,5 h.

Tris-Azetat-EDTA (TAE) Puffer

Tris 4,84 g

Na₂EDTA (H₂O)₂ 0,744 g

Azetat 1142 µl

ad 1 l *Aqua ad iniectabilia*

pH = 8,5

6x DNA Ladepuffer

Bromphenolblau 0,25%

Xylencyanol 0,25%

Glycerin 30%

EDTA 50 mM

1% Agarose DNA-Agarose Gel

0,5 g Universal Agarose wurde in 50 ml TAE in der Mikrowelle aufgekocht, unter rühren auf Handwärme abgekühlt und 10 µl Ethidiumbromidlösung zugeben. Anschließend wurde die Lösung blasenfrei in einen Gelhalter mit Probenkamm gegossen und 20-30 min zum Aushärten im Abzug stehen gelassen.

2.3 Erfassung biochemischer Parameter

2.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode (Bradford 1976) basiert auf der Farbänderung einer sauren Coomassie Brilliant Blau Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Der Farbveränderung liegt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm zugrunde, die bei Proteinbindung erfolgt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration aus der Absorption wurde mit bovinem Serumalbumin (BSA) eine Standardreihe erstellt. BSA wurde in einer Konzentration von 0,34 mg/ml in Aqua ad iniectabilia gelöst und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Die Standardreihe wurde nach folgendem Schema pipettiert.

Konzentration (µg/ml)	IgG-Standard (0,34 mg/ml) (µl)	NaOH (0,1 M) (µl)
0	0	800
85	5	795
170	10	790
340	20	780
510	30	770
680	40	760
850	50	750
1020	60	740

Tabelle 2.3 Verdünnungsreihe zur Proteinbestimmung

Zu 800 µl Standard bzw. Probe wurden 200 µl Bradford-Reagenz gegeben und gut gemischt. Nach Inkubation für 10 min wurde die Absorption in Einmalküvetten in einem Spektrometer bei 595 nm gemessen. Aus der Absorption lässt sich nach dem Lambert-Beer-Gesetz die Proteinkonzentration berechnen. Die Proben wurden in NaOH so verdünnt, dass die gemessenen Proteinkonzentrationen im mittleren Bereich der Standardkurve lagen. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmung.

2.3.2 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion aus Mäuseherzen wurden die gefrorenen Herzen mit einem, in flüssigem Stickstoff gekühlten, Mörser zermahlen. Diese wurden mit der vierfachen Menge Puffer versetzt, dann dreimal 30 sec mit dem Zell-Homogenisator (Colora Messtechnik GmbH Lorch/Württ.) auf Eis homogenisiert und anschließend durch je zehnmahlige Aspiration mit G20, G24 und zuletzt einer G27 Kanüle weiter homogenisiert. Das Gewebehomogenat wurde bei -20 °C aufbewahrt und vor der Untersuchung im Immunoblot die benötigte Menge mit 1/5 des Volumens sechsfach konzentrierten Puffer nach Lämmli versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

Lysepuffer

Tris HCl (1,5 M, pH 8,8)		2 ml
EDTA (0,5 M)		1 ml
NaF (1 M)		3 ml
SDS (20%)		15 ml
Glycerol		10 ml
Aqua bidest.	ad.	100 ml

Sechsfach konzentrierter Ladepuffer nach Lämmli (1970)

SDS		1,2 g
Glycerol		6,0 g
DTT		0,93 g
Bromphenol		6 mg
Tris HCl (0,5 M pH 6,8)		1,2 ml
Aqua bidest.	ad.	10 ml

2.3.3 Gelelektrophorese

Die Proteine wurden über ein denaturierendes, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zuerst wurde ein Trenngel (12-18%) gegossen und darauf, nach dessen Aushärtung ein Sammelgel (5%). Anhand der Proteinbestimmung wurden gleiche Proteinmengen der verschiedenen Proben (20-80 µg) geladen. Zur späteren

Zuordnung der Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard (Precision Plus Protein Standards™, All Blue, BIORAD) in eine Tasche geladen. Die Elektrophorese wurde mit einer Stromstärke von 5 mA/Gel gestartet, und die Stromstärke während des Prozesses auf 40 mA/Gel erhöht, wobei die Spannung einen Wert von 140 V nicht überschritt. Wenn die Lauffront die Unterkante erreicht hatte wurde die Elektrophorese beendet und das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt.

Trenngel (10%)

Acrylamid (30%, Mix 37,5:1)	3,3 ml
Aqua bidest.	4,0 ml
Tris HCl (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml
SDS (10%)	0,1 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)	0,1 ml
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamid (TEMED)	4,0 µl

Sammelgel (5%)

Acrylamid (30%)	0,85 ml
Aqua bidest.	2,8 ml
Tris HCl (0,5 M, pH 6,8)	1,25 ml
SDS (10%)	0,05 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,05 ml
TEMED	5,0 µl

Laufpuffer

Tris	3,02 g
Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g
Aqua bidest.	ad. 1000 ml

2.3.4 Immunoblot

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch Nassblot-Verfahren entweder auf eine hydrophobe Polyvinyliden-Membran (PVDF, Hybond^{TM-P}, Amersham Biosciences, Freiburg) oder auf eine Nitrocellulosemembran (Protran®, 0,45 µm Porengröße, Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Zur Untersuchung von Phospholamban gesamt, der PLB-Serin 16- oder Threonin 17-Phosphorylierung, musste die PVDF-Membran verwendet werden. Bei allen anderen Proteinen konnte auch die Nitrocellulosemembran verwendet werden. Der Proteintransfer erfolgte bei einem konstanten Gleichstrom von 400 mA oder bei 4 °C und 20 V über Nacht. Um die übergegangenen Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran für 5 min mit Ponceau S gefärbt. Zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran mit TBS mit TWEEN 20 (TBST) gewaschen und zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit Magermilchpulver (5%) für 45 min inkubiert. Vor der Zugabe des primären Antikörpers wurde die Membran dreimal für 10 min in TBST gewaschen. Die Inkubation der primären, gegen das jeweilige Protein spezifischen Antikörper, erfolgte in der Regel unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur für 90 min oder über Nacht bei 4 °C. Die Verdünnungen und Lösungsmittel der einzelnen Antikörper sind **Tabelle 2.4** zu entnehmen.

Protein/Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
Calsequestrin	1:2500 in TBST	Affinity bioreagents	PA1-913	Anti-Rabbit	1:15000 in Milch
Phospho-DARP-32 (Threonin 35)	1:2000 in TBST	Cell-Signaling Technology	2304	Anti-Rabbit	1:10000 in Milch
Phospholamban	1:5000 in TBST	J. Colyer, University of Leeds		Anti-Mouse	1:5000 in TBST
Phospholamban Serin 16	1:5000 in TBST	J. Colyer, University of Leeds		Anti-Rabbit	1:10000 in Milch
Phospholamban Threonin 17	1:5000 in TBST	J. Colyer, University of Leeds		Anti-Rabbit	1:10000 in Milch
Inhibitor-1	1:5000 in TBST	A. El-Armouche, UKE Hamburg		Anti-Rabbit	1:15000 in Milch
Phospho-Troponin I	1:1000 in TBST	Cell-Signaling Technology	# 4004	Anti-Rabbit	1:15000 in Milch
Myosin-Binding-Protein-C	1:1000	W. Linke, Universität Heidelberg		Anti-Rabbit	1:15000 in Milch
Phosphatase-1	1:500 in TBST	Upstate Cat.	# 06-221	Anti-Rabbit	1:15000 in Milch
Phosphatase-2A	1:500 in TBST	Upstate Cat.	# 06-222	Anti-Rabbit	1:10000 in Milch
Anti-Rabbit	in Milch	Sigma	A-0545		
Anti-Mouse	In Milch	Sigma	A-3682		

Tabelle 2.4 Antikörper

Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 10 min folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet und an die Peroxidase des Meerrettichs gekoppelt ist, in Trockenmilch-Lösung bzw. in TBST für 1 h. Anschließend wurde erneut dreimal für je 10 min gewaschen und die Membran für 5 min mit dem ECL+Western-Blot Detektions-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) inkubiert, das ein Substrat der Peroxidase enthält, welches nach Umsetzung eine Chemolumineszenz zeigt. Zur Visualisierung wurden Filme (Super X-Ray, Fuji Medical X-Ray Films, Fuji Photo Film Co., LTD., Tokyo) je nach Stärke der Lumineszenz für 1 sek bis 15 min belichtet und sofort entwickelt oder die Visualisierung erfolgte digital durch den ChemiGenius2 (BioImagingSystem) und das dazugehörige Programm GeneSnap.

Um verschiedene Antikörper gegen Proteine ähnlicher Größe, bzw. gegen verschiedene Phosphorylierungsstellen auf einer Membran zu benutzen, wurden die Antikörper wieder von der Membran entfernt. Hierzu wurden die Membranen mit Strip-Puffer für 30 min bei 50 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend mehrmals mit TBST gewaschen, bis das zur Spaltung der Disulfid-Brücken eingesetzte Mercaptoethanol nicht mehr zu riechen war. Anschließend konnte die Membran erneut mit primärem Antikörper inkubiert werden und die oben beschriebene Prozedur wiederholt werden.

Transferpuffer

Tris	3,025 g
Glycin	144 g
Methanol	200 ml
Aqua bidest. ad	1000 ml

Ponceaurot S Lösung

Ponceaurot S	
Essigsäure (100%)	
Aqua bidest. ad.	100 ml

10x TBS

Tris	242,3 g
NaCl	175,3 g
Aqua bidest. ad.	2000 ml

TBST

10x TBS	100 ml
Tween 20	1 ml
Aqua bidest. ad.	1000 ml

Trockenmilch-Lösung

TBST	
Magermilchpulver	5 %

Strip-Puffer

TrisHCl	4,925 g
β-Mercaptoethanol	3,49 ml
SDS	10 g
Aqua bidest. ad.	500 ml
pH mit NaOH auf 6,7 eingestellt	

2.3.5 Erfassung und Verarbeitung der Daten

Die belichteten Filme wurden digitalisiert und anschließend die Schwärzung der einzelnen Banden mittels Densitometrie quantifiziert. Bei den digital mittels ChemiGenius2 (BioImagingSystem) aufgenommenen Blots konnte direkt eine Densitometrie erfolgen.

2.3.6 TCA-Extraktion

Da endogener Inhibitor-1 nur in sehr geringer Konzentration im Herzen vorkommt, ist er im Immunoblot in Gewebshomogenat von Wildtypmäusen nicht nachweisbar. Ein Nachweis gelingt erst nach Aufkonzentration des Inhibitor-1 durch Trichloressigsäure (TCA)-Extraktion (El-Armouche et. al. 2004). Diese beruht auf zwei ungewöhnlichen physikalischen Eigenschaften des Inhibitor-1. Zum einen auf seiner Löslichkeit in hohen Konzentrationen von TCA zum anderen auf seiner Hitzebeständigkeit.

Für die TCA-Extraktion wurde das Herzgewebe von 7 Wildtypmäusen stickstoffgekühlt gemörsert und gepoolt, sodass eine Menge von knapp 1 g Herzgewicht vorhanden war. Dieses wurde mit der vierfachen Menge eiskalter 1,5%iger Trichloressigsäure versetzt, dann mit dem Zell-Homogenisator (Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württ.) auf Eis homogenisiert und für 30 min auf Eis äquilibriert. Anschließend wurde das Homogenat für 30 min mit 14 000 rpm bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand schrittweise mit 19% TCA versetzt um eine Erhöhung der TCA-Konzentration auf 3, 5, 10, 15 und letztlich 19% zu erreichen, die zum Ausfällen von Inhibitor-1 und Proteinen mit ähnlicher Eigenschaft führt. Diese Suspension wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 18 000 rpm für 30 min zentrifugiert. Dabei fällt Inhibitor-1 im Sediment aus. Die Proteine wurden in 320 µl Tris (400 mM pH 8,0) aufgenommen und für 10 min gekocht, um Proteine mit geringerer Hitzetoleranz zu denaturieren. Anschließend wurde nochmals bei 14 000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde über Nacht gegen 4 l Wasser dialysiert (Pierce Dialysekassette, Cut off 10 kD, Volumen 100-500 µl), und nochmals mit 14 -000 rpm für 30 min zentrifugiert. Im Überstand befand sich der ca. 500-fach angereicherte Inhibitor-1, der nun im Immunoblot nachgewiesen werden konnte.

2.3.7 Messung der Phosphatase-Aktivität

Die Experimente zur Messung der Phosphatase-Aktivität wurden im Labor von PD Dr. P. Boknik in Münster durchgeführt. Zur Messung der Phosphataseaktivität (Neumann et al. 1991) wurden die Proben mit der γ - ^{32}P -markierten Phosphorylase a inkubiert und das dephosphorylierte γ - ^{32}P -Phosphat im γ -Szintillationszähler quantitativ erfasst (**s. Abb. 2.1**). Durch Zusatz des Komplexbildners EDTA in der Phosphorylase a-Substratlösung konnten Einflüsse der Calcium-abhängigen Phosphatase-2B und der Magnesium-abhängigen Phosphatase-2C weitgehend ausgeschlossen werden.

Phosphorylase a-Substratlösung pro Ansatz:

Aqua ad iniectabilia	10 μl
β -Mercaptoethanol (1 :20)	1 μl
Tris, 50 mM, pH 7,4	1 μl
EDTA, 10 mM, pH 7,4	0,5 μl
Coffein, 100 mM	2,5 μl
^{32}P -Phosphorylase a	5,0 μl

In einer Testmessung wurde die Menge an Homogenat bestimmt, bei der etwa 20% der eingebrachten Menge γ - ^{32}P -Phosphorylase umgesetzt wurde, um für das Messergebnis eine hohe Proportionalität zu erreichen. Zur entsprechenden Probenmenge ad 30 μl Homogenisationspuffer wurde 20 μl Phosphorylase a-Substratlösung zugegeben und dann für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl 50%iger Trichloressigsäure gestoppt. Dann wurden 30 μl Rinderserumalbumin (20 g/l in 0.1 % Natriumazid) hinzugefügt und die Proteine 10 min auf Eis gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 13 000 g und 4 °C (Centrifuge 5417 R; Eppendorf, Hamburg) sedimentiert und 70 μl des Überstandes im γ -Szintillationszähler gemessen. Bei jeder Messung wurden Gesamtradioaktivität (*total counts*) als Maß für die spezifische Radioaktivität und die unspezifische Hintergrundradioaktivität (Leerwert) der Phosphorylase a-Lösung in 30 μl Homogenisationspuffer ermittelt. Da die Proteinbestimmung der Phosphorylase a-Lösung auf Grund fehlender technischer Möglichkeiten im Heißlabor nicht möglich war, wurden die ermittelten *Counts* pro min (CPM) auf die Menge an Protein in den Proben bezogen. Die Messung der Phosphatase-Aktivität erfolgte dreimal je Probe und der Mittelwert wurde für die weitere Auswertung verwendet.

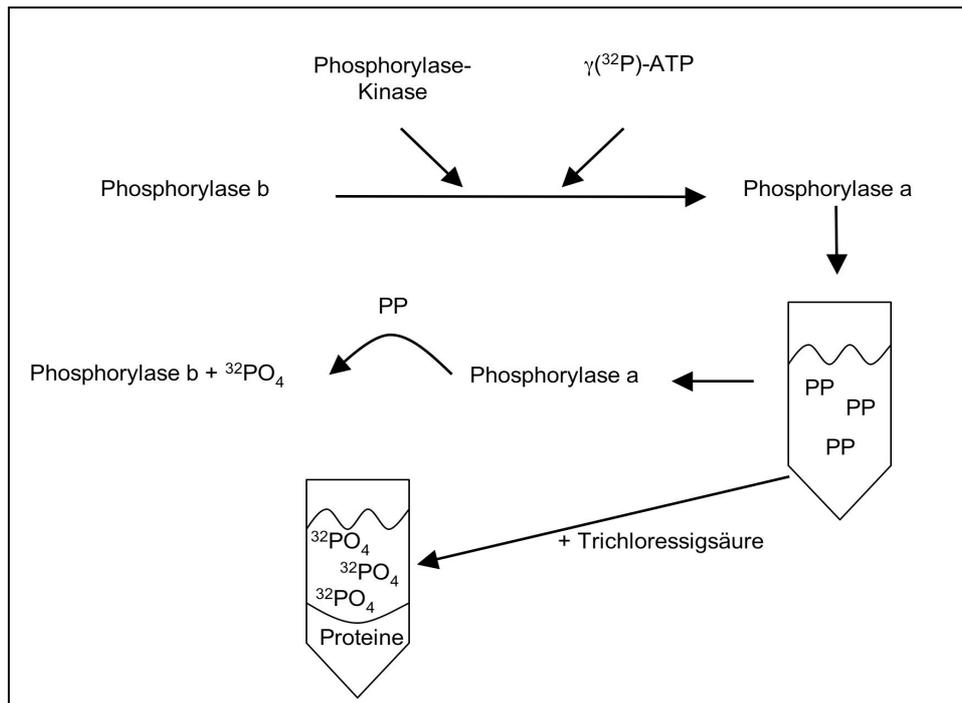


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Messung der Phosphatase-Aktivität. Die Phosphorylase Kinase phosphoryliert Phosphorylase b mit γ - ^{32}P -ATP zu Phosphorylase a. Phosphorylase a wird in standardisierter Konzentration den Proben zugegeben. Enthalten die Proben Phosphatase-1 oder Phosphatase-2A dephosphoryliert die Phosphatase die Phosphorylase a und γ - ^{32}P -Phosphat ($^{32}\text{PO}_4$) wird frei. Durch Zugabe von Trichloressigsäure werden die Proteine gefällt und abzentrifugiert. Im Überstand verbleibt das freie γ - $^{32}\text{PO}_4$, das mit einem γ -Szintillationszähler quantitativ erfasst wird und mit der Phosphatase-Aktivität der gemessenen Probe korreliert.

2.3.8 Langendorffperfusion

Die β -adrenerge Stimulation wurde an antegrad, salin perfundierten Herzen im Langendorffperfusionssystem durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse sternotomiert, das Herz freipräpariert und am Aortenbogen wenige Millimeter über der Aortenklappe abgetrennt und an einer mit warmer Thyrode perfundierten Langendorffkanüle mit Bindfaden fixiert. Zur Perfusion wurde modifizierte Thyrode-Lösung verwendet, die ständig mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) begast wurde und aufgrund eines zur Erwärmung vorgeschalteten Reservoirs eine Temperatur von 37 °C hatte. Die Erwärmung wurde durch ein Wasserbad (MWG Lauda CS, Lauda-Königshofen) gewährleistet und die Perfusion wurde durch den Druckunterschied, der durch die erhöhte Stellung des Thyrodereservoirs bewirkt wurde, aufrechterhalten. Wenn das Herz sicher platziert war und mit einem Fluss von 6 ml/min perfundiert war, wurde das Organbad um das Herz geschlossen. Das Herz sollte rhythmisch mit einer Frequenz von mindestens 450 Schlägen pro min schlagen. Wenn dies der Fall war, wurde das Herz über eine Klammer mit einem induktiven Kraftaufnehmer verbunden und für 10 min mit begaster Thyrode perfundiert. Die Erfassung der Daten erfolgte mittels eines PC-

gestützten Biomonitoring Systems (BMON, Ingenieurbüro G. Jäckel, Hanau). Um die β -adrenerge Stimulation zu überprüfen wurden die Herzen anschließend mit Isoprenalin (10^{-6} M), einem β 1-Rezeptoragonist (DL-Isoproterenol hydrochloride; Sigma, Taufkirchen) perfundiert. Die Stimulation wurde durch Zunahme der Kraftentwicklung kontrolliert.

2.4 Modell der Isoprenalininduzierten Herzhypertrophie

2.4.1 Behandlung der Tiere

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen eingeteilt.

Gruppe	Genotyp	Behandlung
1	Wildtyp	NaCl (0,9 %)
2	Wildtyp	Isoprenalin (15 mg/kg pro Tag)
3	Inhibitor-1-Transgen	NaCl (0,9 %)
4	Inhibitor-1-Transgen	Isoprenalin (15 mg/kg pro Tag)

Tabelle 2.5 Gruppeneinteilung. Alle Gruppen wurden über eine Dauer von 7 Tagen behandelt.

Isoprenalin wurde in 0,9% NaCl mit 0,002 M HCl gelöst. Die Substanzen wurden über osmotische Alzet®-Minipumpen, Modell 1007D (Alza, Corporation, Palo Alto, USA) mit einer mittleren Abgaberate von 0,5 μ l pro h appliziert. Die Minipumpen bieten den Vorteil der konstanten und definierten Verabreichung der Substanz, sodass gleichmäßige Plasmakonzentrationen erreicht werden (Jonson et al. 1983). Die Konzentration der Substanzen in den Pumpen wurde so gewählt, dass sich eine Tagesdosis von 15 mg/kg ergab. Nach Befüllung der Pumpen wurden diese zur Equilibrierung über Nacht 12 h bei 37 °C in 0,9% NaCl belassen. Zur Implantation wurden die Mäuse mit 2-3% Isofluran anästhesiert. Die Alzet®-Minipumpen wurden subkutan in den Nacken implantiert und die Wunde in Einzelknopfnahttechnik verschlossen. Zur Analgesie erhielten die Tiere 5,4 mg Metamizol im Trinkwasser pro Tag.

Nach Ablauf der Behandlungsdauer wurden die Tiere durch CO₂ anästhesiert und durch cervikale Dislokation getötet. Der Thorax wurde eröffnet und das Herz am Gefäßstamm abgetrennt und entnommen. Das Herz wurde kurz in NaCl-Lösung (0,9%) von Blut und Bindegewebe befreit und anschließend mit Filterpapier 3-5 mal trocken getupft, anschließend gewogen (Feuchtwicht) und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.5 Erfassung physiologischer Parameter

2.5.1 Transthorakale Echokardiographie

Die Ultraschalluntersuchungen wurden mit dem Vevo 660 System (Visual Sonics Inc., Toronto, Canada) für Kleintierultraschalluntersuchungen mit einem 30 MHz Schallkopf durchgeführt.

Zur Einleitung der Narkose wurden die Mäuse in eine Induktionskammer mit Isofluran (3%) gesetzt. Die anästhesierte Maus wurde in Rückenlage auf eine Wärmeplatte (37 °C) gelegt und mit den Pfoten zur simultanen Ein-Kanal-EKG-Ableitung auf EKG-Elektroden fixiert. Die Messungen erfolgten bei einer Herzfrequenz zwischen 450 und 550 Schlägen pro min. Die Körpertemperatur wurde über eine Rektalsonde registriert und mit Hilfe einer Rotlichtlampe über 36,5 °C gehalten. Die Narkose wurde über eine Gesichtsmaske (1-1,8% Isofluran, Gasfluss Carbogen 1,5 l/min) aufrechterhalten. Der Brustkorb wurde enthaart. Dann wurden in 10° Linksseitenlage 2-dimensionale Längs- und Queransichten des Herzens mit einer Frame-Rate von 30 Hz im Electro Cardio Version Modus aufgezeichnet. Hierbei wurden aus der Echokardiographie beim Menschen bekannte Standardeinstellungen (lange und kurze parasternale Achse) gewählt. Bei der Längsansicht weist der Schallkopf vom linken Rippenbogen zur rechten Schulter. In dieser Ansicht wurden die systolische und diastolische Länge des linken Ventrikels gemessen.

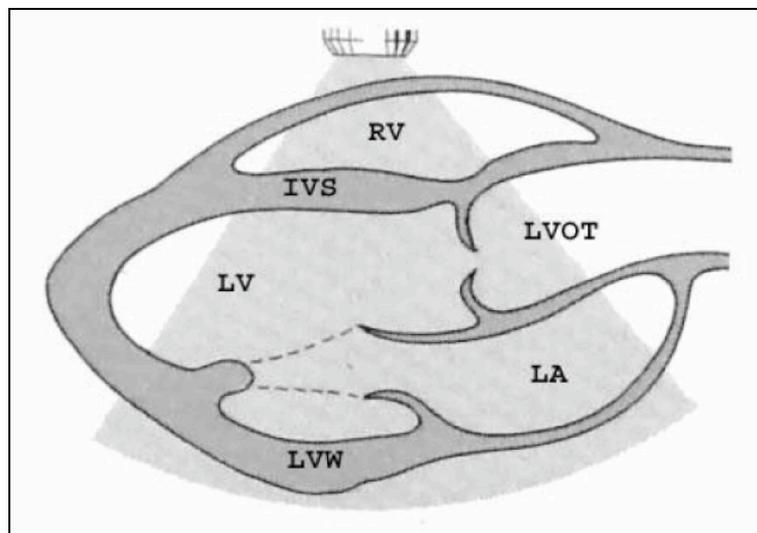


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung einer echokardiographischen Längsansicht des Herzens (nach Köhler u. Tataru 2001, IVS: Interventrikuläres Septum, LV: Linker Ventrikel, LVW: Hinterwand des linken Ventrikels, RV: Rechter Ventrikel)

Nach Drehung des Schallkopfs um 90° Grad mit dem Uhrzeigersinn bekam man die Queransicht. Der rechte Ventrikel lag dabei im linken oberen Bildausschnitt.

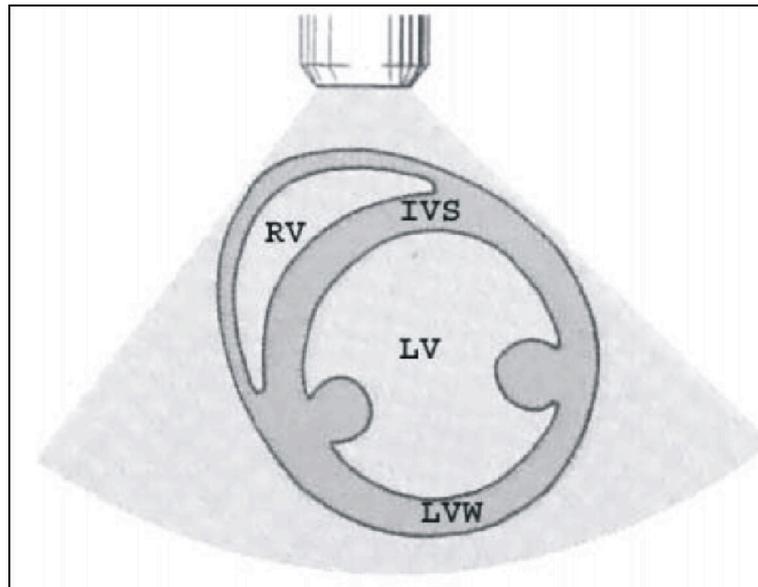


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung einer echokardiographischen Queransicht des Herzens (nach Köhler u. Tataru 2001, IVS: Interventrikuläres Septum, LV: Linker Ventrikel, LVW: Hinterwand des linken Ventrikels, RV: Rechter Ventrikel)

Die Dicke der vorderen und hinteren Ventrikelwand, sowie die epikardiale und endokardiale linksventrikuläre Fläche, wurden in dieser Einstellung gemessen. Die Aufnahmen wurden zuerst unter basalen Bedingungen aufgezeichnet. Anschließend wurde den Mäusen der β -Agonist Dobutamin ($2 \mu\text{g/g}$ Körpergewicht) intraperitoneal injiziert und die Aufnahmen in der kurzen Achse wiederholt. Die Mäuse erwachten innerhalb weniger Minuten nach der Untersuchung. Von Beginn der Anästhesie bis zum Ende der Untersuchung vergingen in der Regel 25 bis 35 min.

2.5.2 Auswertung

Alle Messungen erfolgten offline durch den Untersucher. Dieser war dabei bezüglich Genotyp und Behandlung verblindet. Einzelne Variablen die sich nicht optimal messen ließen oder bei denen die Anschallungsebene nicht den Standardschnitten entsprach wurden nicht berücksichtigt. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des Vevo 70 V2.2.3 Auswerteprogramms. In den zweidimensionalen Standardeinstellungen wurden 9 Parameter gemessen.

Parameter	Abkürzungen
Vordere systolische Wanddicke	AWThs
Vordere diastolische Wanddicke	AWThd
Hintere systolische Wanddicke	PWThs
Hintere diastolische Wanddicke	PWThd
Systolische endokardiale Fläche	ENDOs
Diastolische endokardiale Fläche	ENDOd
Systolische epikardiale Fläche	EPIs
Linksventrikulärer systolischer Diameter	LVIDs
Linksventrikulärer diastolischer Diameter	LVIDd

Tab. 2.6 Echokardiographisch gemessene Werte

Aus den gemessenen Werten wurden folgende Parameter rechnerisch ermittelt:

Parameter	Abk.	Formel	Einheit
Fractional Area Shortening	FAS	$(\text{ENDOd} - \text{ENDOs}) / \text{ENDOd}$	%
Linksventrikuläre Masse	LVM	$[1,05 \times (5/6 \times \text{EPId} \times (\text{LVIDd} + t) - 5/6 \times \text{ENDOd} \times \text{LVIDd})]$	mg

Tabelle 2.7 Rechnerisch ermittelte Werte (1.05 entspricht hierbei dem spezifischen Gewicht von Muskulatur)

2.6 Histologie

2.6.1 Fixation und Kryokonservierung

Die Herzen wurden über Nacht in 4% Formalin fixiert. Anschließend entweder in einer aufsteigenden Isopropylalkohol-Reihe entwässert und in Paraffin eingebettet (**Tab.2.8**) oder für immunhistologische Untersuchungen über Nacht bei 4 °C in PBS mit 10% Succrose zur Kryoprotektion inkubiert und anschließend in vorgekühltem Isopentan (-80 °C) schockgefroren. Die weitere Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -80 °C.

2.6.2 Paraffinschnitte

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden 4 µm dicke basisparallele Querschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in einem 42-44 °C warmen Wasserbad gestreckt und daraufhin auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezo-gen.

Substanz	Zeit	Temperatur
70 % Isopropanol	2 – 3 h (oder über Nacht)	Raumtemperatur
80 % Isopropanol	2 – 3 h	Raumtemperatur
96 % Isopropanol I	2 – 3 h	Raumtemperatur
96 % Isopropanol II	2 – 3 h	Raumtemperatur
100 % Isopropanol I	2 – 3 h	Raumtemperatur
100 % Isopropanol II	2 – 3 h (oder über Nacht)	Raumtemperatur
100 % Isopropanol III	1 h	60 °C
Paraffin/Isopropanol 1:1	1 h	60 °C
Paraffin I	2 h	60 °C
Paraffin II	2 h	60 °C
Paraffin III	2 h (oder über Nacht)	60 °C
Ausgießen mit Paraffin		60 °C

Tabelle 2.8 Protokoll der Paraffineinbettung

2.6.3 Poly-L-Lysin-Beschichtung

Objektträger wurden mit Aceton gereinigt, danach in aqua dest. gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur in Poly-L-Lysin (1 mg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie nochmals in aqua dest. gewaschen und über Nacht bei 60 °C getrocknet.

2.6.4 Hämatoxylin & Eosin-Färbung und Lichtmikroskopie

In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanol-Reihe gewässert. Dann mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbt, in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe und abschließendem Xylolbad wieder entwässert sowie mit Eukitt® eingedeckelt (**Tab. 2.9**). Die mikroskopische Darstellung (Zeiss-Axioplan-Lichtmikroskop) erfolgte in 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung und die Fotografien erfolgten mit einer Zeiss-Axiocam-Kamera.

Substanz	Zeit
Xylol I	15 min
Xylol II	15 min
100 % Ethanol I	5 min
100 % Ethanol II	5 min
96 % Ethanol I	5 min
96 % Ethanol II	5 min
80 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	5 min
Aqua dest.	5 min
Hämalaunlösung	20 min
Leitungswasser, fließend	10 min
Eosinlösung	10 min

Aqua dest.	spülen
96 % Ethanol I	spülen
96 % Ethanol II	spülen
100 % Ethanol I	spülen
100 % Ethanol II	spülen
Xylol	3 – 5 min
Eindeckeln mit Eukitt®	

Tabelle 2.9 Protokoll der HE-Färbung

Eosinlösung (0,1%)

0,5 g Eosin gelblich (Eosin Y)

ad. 500 ml aqua

Hämalaunlösung nach Mayer

1 g Hämatoxylin in 1000 ml aqua dest gelöst, 0,2 g NaJO_3 und 50 g $\text{KAl(SO}_4)_2$

50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure eingerührt

2.6.5 Immunhistologie und konfokale Laserscanning Mikroskopie

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden Kryoschnitte verwendet. Zur Herstellung der Schnitte wurden die gefrorenen Präparate in Tissue Tec® eingebettet. Auf einem Kryotom wurden Schnitte von 10 µm Dicke bei -20 °C angefertigt und auf Poly-L-Lysinbeschichtete Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 30 min getrocknet und 2 Stunden in Blocklösung inkubiert. Danach 30 min in TBS gewaschen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde der Anti-Inhibitor-1 Antikörper in einer 1:250 Verdünnung benutzt und die Schnitte über Nacht mit dem Antikörper inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde Carbocyanin 3 gelabeltes Anti-Rabbit IgG verwendet. Mit ALEXA 488 markiertes Phalloidin (Sigma) wurde in einer Verdünnung von 1:60 verwendet

um Aktin zu färben. Der DNA interkalierende Farbstoff 4',6-Diamino-2-phenylindol (DAPI 1 µg/ml) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 für die Kernfärbung benutzt.

10x TBS

Trishydroxymethylaminmethan ultra pure 121,14 g

NaCl 180 g

ad. 2000 ml aqua dest.

Blocklösung

10% fetales Kälberserum

1% Rinderserumalbumin

0,5% Triton X

0,05% Thimerosal in TBS

Antikörperlösung

1% Rinderserumalbumin,

0,5% Triton X

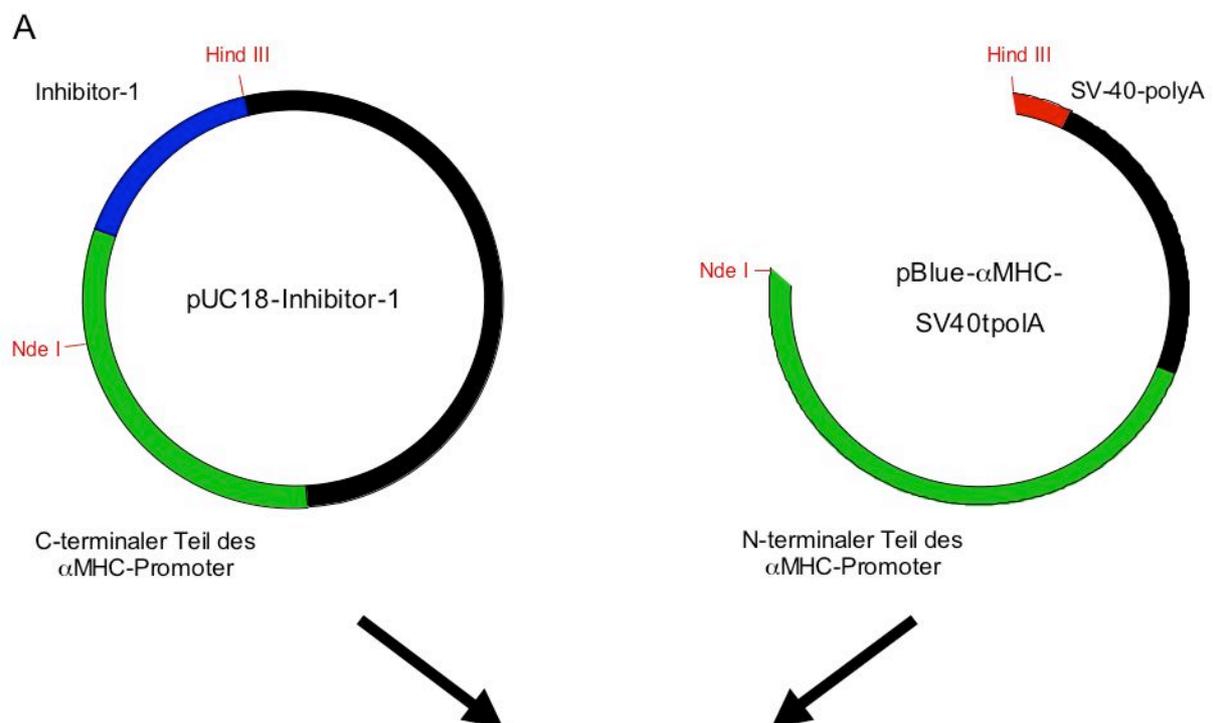
0,05% Thimerosal in TBS

3 Ergebnisse

3.1 Generierung Inhibitor-1 transgener Mäuse

Die Klonierung des Injektionsvektors erfolgte in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ali El-Armouche in Erlangen. Dazu wurden zwei Vektoren verwendet, die von Prof. Dr. Stefan Engelhardt zur Verfügung gestellt wurden. **Abbildung 3.1** gibt einen schematischen Überblick über die Klonierungsstrategie.

Als Transfervektor diente pUC18. Die codierende Sequenz des Inhibitor-1 wurde mittels PCR amplifiziert und in die Multiple Cloning Site von pUC18 einkloniert (**Abb. 3.1 A**). Der Vektor pUC18-Inhibitor-1 wurde mit den Restriktionsendonukleasen Hind III/Nde I geschnitten und das isolierte Fragment der codierenden Sequenz des Inhibitor-1 und des C-terminalen Teils des α MHC-Promoters in den Vektor pBlue- α MHC-SV40tpoA, in die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen Hind III/Nde I, umkloniert. Hieraus resultierte der pBlue- α MHC-Inhibitor-1-SV40tpoA (**Abb. 3.1 B**).



B

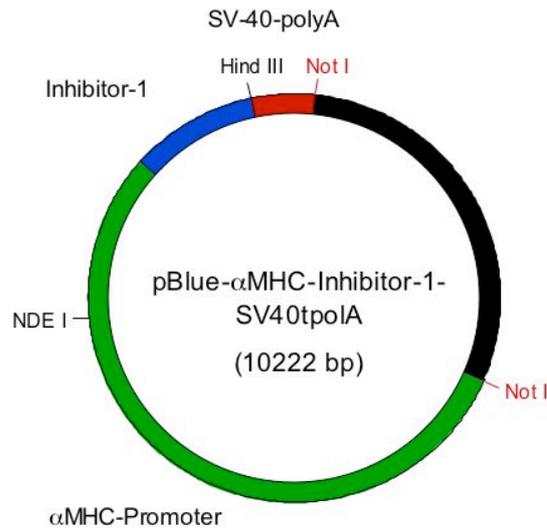


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Generierung des Injektionsvektors pBlue- α MHC-Inhibitor-1-SV40tpolA. Der pUC18-Vektor enthält ein lac-Operon zur Translation der eingefügten Gene in *E. coli*. Zur Selektion von pUC-positiven Bakterien dient ein Ampicillin-Resistenzgen. Der Name des Vektors leitet sich von der University of California (UC) ab, an der dieses Plasmid konstruiert wurde (A) Die Inhibitor-1-cDNA wurde in den pUC18-Vektor kloniert, sodass der Vektor pUC18-Inhibitor-1 entstand. Aus diesem wurde der C-terminale Teil des α MHC-Promoters und die Inhibitor-1 cDNA, mit den Restriktionsenzymen Hind III und Nde I, ausgeschnitten und in den pBlue-Vektor umklont. Zur Linearisierung und Entfernung der Vektorsequenzen, vor der Pronukleusinjektion, wurde das Restriktionsenzym Not I verwendet.

Aus dem pBlue- α MHC-Inhibitor-1-SV40-tpolA-Injektionsvektor wurden die Vektorsequenzen mit der Restriktionsendonuklease Not I ausgeschnitten, sodass eine linearisierte DNA, bestehend aus dem α MHC-Promoter, der Inhibitor-1 cDNA der Ratte, dem SV40-Intron und einem Poly(A)-Schwanz, zur Pronukleusinjektion verwendet werden konnte. Der α MHC-Promoter diente zur herzspezifischen Expression. Das SV40-Intron und der Poly(A)-Schwanz dienten zur stabilen Transkription.

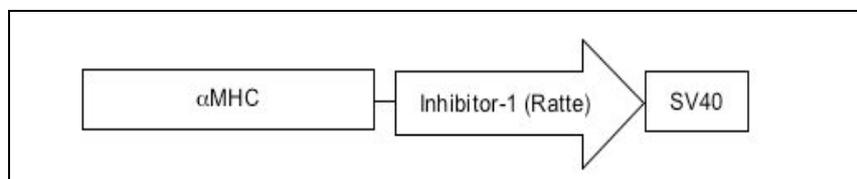


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der α MHC-Inhibitor-1-Expressionskassette. Zur Generierung transgener Mäuse mit einer herzspezifischen Überexpression des Inhibitor-1 der Ratte wurde die α MHC-Expressionskassette in befruchtete Eizellen der Maus mikroinjiziert. Die Transkription der codierenden Sequenz stand in dieser Expressionskassette unter der Kontrolle des α MHC-Promoters.

Die Pronukleusinjektion wurde im Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg durch Frau PD. Dr. I. Herrmanns-Borgmeyer vorgenommen. Zur Generierung der Inhibitor-1 transgenen Mäuse wurde der Mausstamm C57/Black-6 verwendet.

3.2 Nachweis Inhibitor-1 transgener Tiere

3.2.1 Sondenkonstruktion

Um die Nachkommen auf Integration des Transgens zu untersuchen, wurde aus dem Injektionskonstrukt durch Restriktionsverdau und anschließender präparativer Agarose-Gel-Elektrophorese ein 1,8 kb großes Fragment (**Abb. 3.2 A**), bestehend aus der cDNA des Inhibitors-1 und des C-terminalen Teils des α MHC-Promoters für Southern-Blot-Analysen hergestellt (**Abb. 3.2 B**).

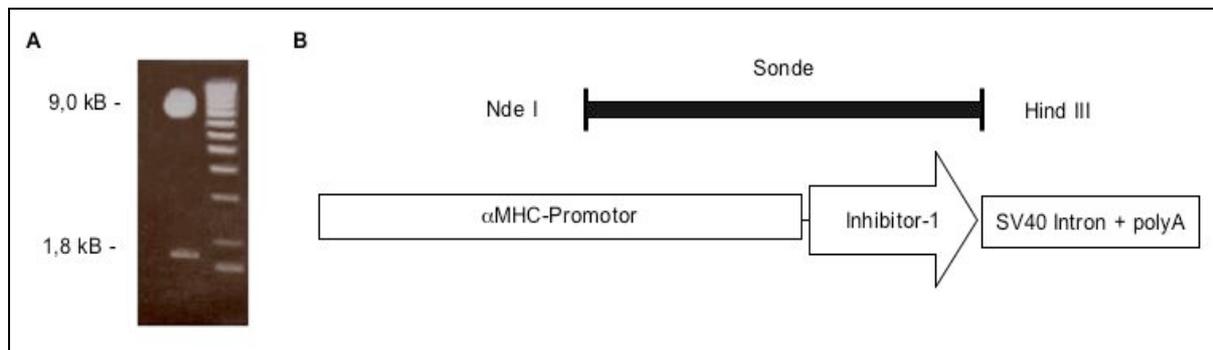


Abbildung 3.2 Sonde zur Genotypisierung Inhibitor-1 transgener Mäuse. (A) Der *pBlue-αMHC-Inhibitor-1-SV40tpoIA*-Vektor wurde mit *Nde I* und *Hind III* geschnitten und anschließend das 1,8 kb große DNA Fragment ausgeschnitten und eluiert. (B) Die Sonde umfasst die komplette cDNA des Inhibitors-1 und den C-terminalen Teil des α MHC-Promoters.

Dieses Fragment wurde mit Hilfe von randomisierten Primern und Klenow-DNA-Polymerase ^{32}P -markiert und konnte somit als Sonde dienen. Um die Reaktion der Sonde mit genomischer Wildtyp-DNA zu überprüfen, wurde genomische DNA von Wildtypmäusen mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Southern-Blot-Analysen von EcoRI verdauter Mausschwanz-DNA zeigten nach Hybridisierung mit der Sonde bei Wildtyptieren eine Bande bei 3 kb (**Abb. 3.3**). Die Inkubation der DNA die mit Bam I und Hind III verdaut worden war, zeigte weniger klare Banden, sodass der EcoR I Verdau für die Genotypisierung verwendet wurde.

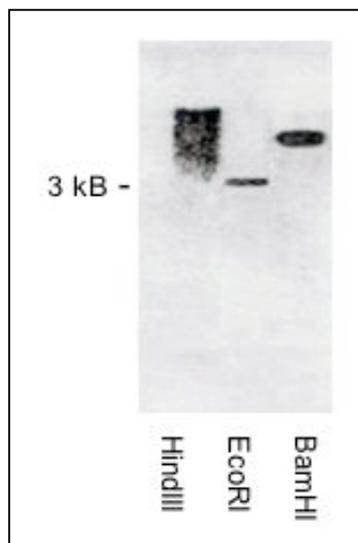


Abbildung 3.3 Southernblot genomischer Wildtyp DNA mit der α MHC/Inhibitor-1-Sonde. Genomische Wildtyp-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen BamH I, EcoR I und Hind III verdaut und in einem Agarosegel (1%) aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit der radioaktiv markierten α MHC-Inhibitor-1 Sonde hybridisiert.

3.3 Genotypisierung

3.3.1 Southern Blot

In der F1-Generation wurden 44 Tiere als Nachkommen der Ammentiere geboren. Im Southern Blot sah man bei allen Tieren die „Wildtypbande“ bei 3 kb. Inhibitor-1 transgene Tiere waren durch eine zusätzliche Bande bei 1,6 kb erkennbar (**Abb. 3.4 A**). Diese Bande konnte durch zwei EcoRI Schnittstellen im transgenen Konstrukt erklärt werden. Diese Bande konnte bei vier, einem Männchen und drei Weibchen, der 44 Nachkommen nachgewiesen werden. Diese Tiere wurden als Foundertiere bezeichnet.

Die vier Foundertiere wurden mit C57/Bl6-Wildtypmäusen weiter verpaart, um heterozygote Nachkommen zu erhalten. Abb. 3.3 C zeigt die Genotypisierung von Nachkommen des Foundertiers Nummer 29.

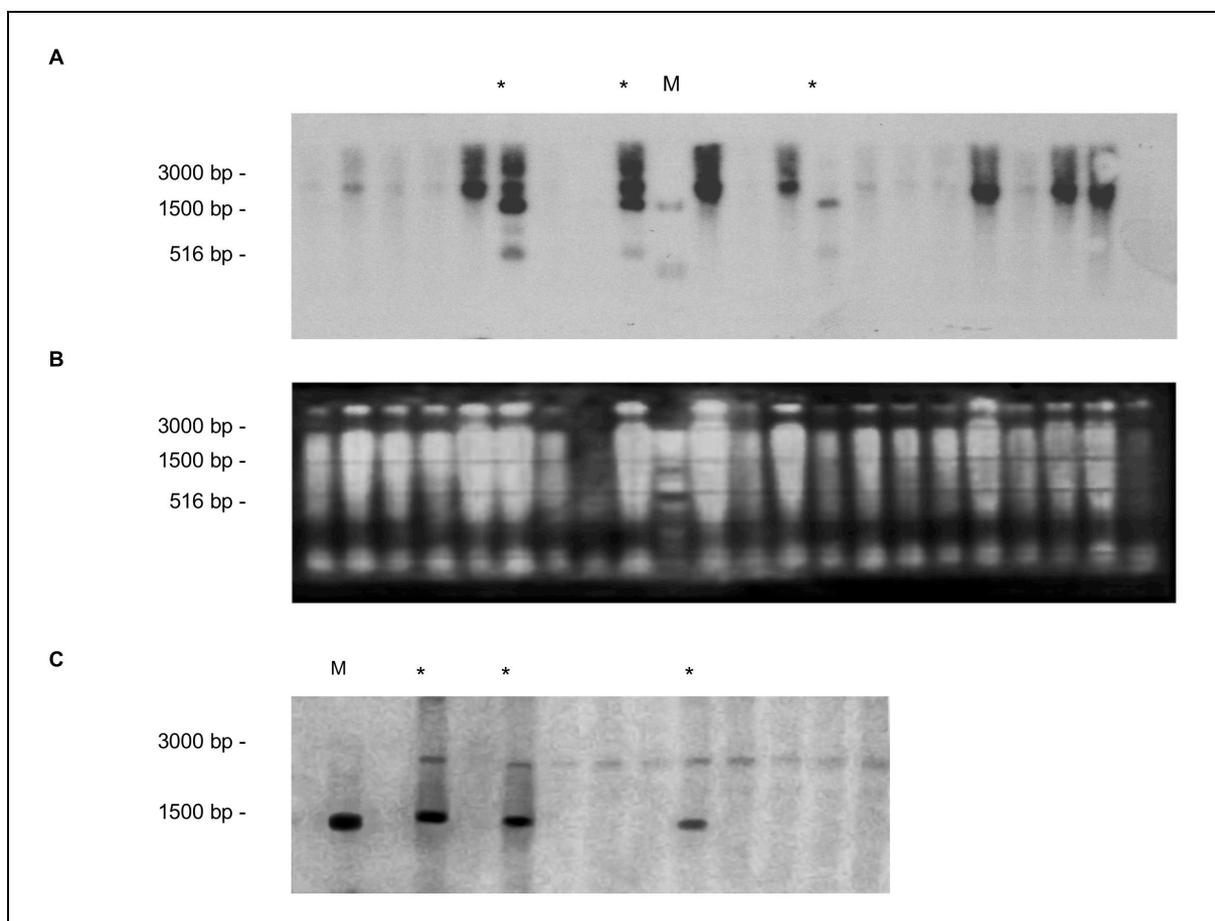


Abbildung 3.4 Southern Blot Analyse der Founder- und F1-Generation Inhibitor-1-transgener Tiere. (A) Darstellung eines Southern Blots nach EcoRI-Verdau genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien. Die Membran wurde mit radioaktiv markierter Sonde inkubiert. Die gebundene Sonde wurde mittels eines Phospho-Imagers detektiert. Mit Stern sind die transgenen Tiere markiert. Mit M ist der Größenmarker bezeichnet. (B) Ladungskontrolle des Agarosegels. (C) F1-Generation des Founders 29 nach Kreuzung mit C57/Bl6-Mäusen. Mit Sternchen bezeichnete Tiere waren heterozygot transgen.

3.3.2 Polymerasekettenreaktion

Die Genotypisierung der weiteren Generationen fand mittels PCR statt. Dazu generierten wir drei PCR-Primer: α MHCforward, Inhibitor-1-reverse und Inhibitor-1-forward. Die Primer α MHCforward und Inhibitor-1-reverse dienten zum Nachweis der Integration des Transgens. Sie führten zur Amplifikation des Übergangs zwischen dem α MHC-Promoter und dem Inhibitor-1 (**Abb. 3.5 A**), welcher endogen nicht vorhanden war. Daraus resultierte ein 300 bp großes Fragment. Aus der PCR mit den Primern Inhibitor-1-reverse und Inhibitor-1-forward resultierte ein 180 bp großes Fragment des Inhibitor-1-Gens, zum Nachweis einer erfolgreichen DNA-Extraktion und PCR (**Abb. 3.5 B**).

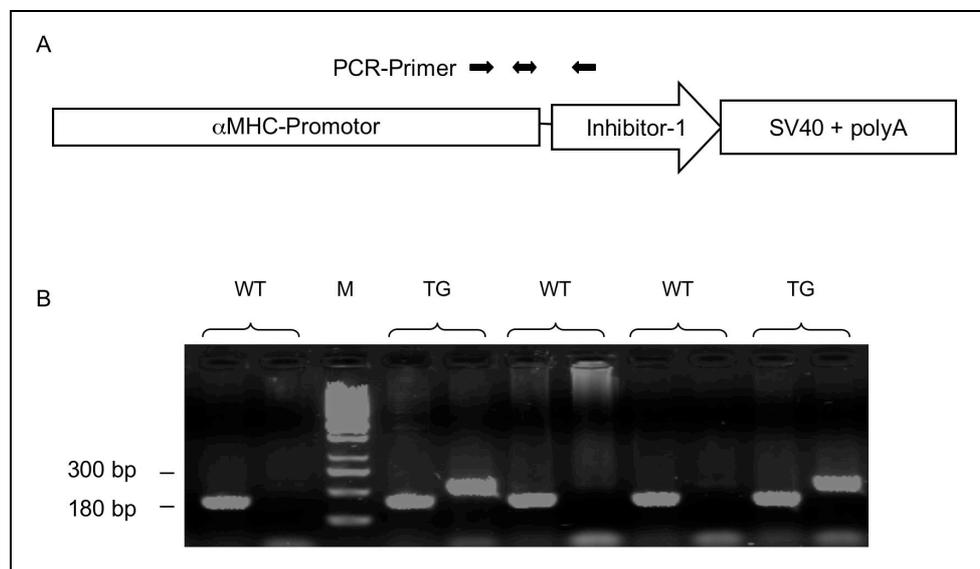


Abbildung 3.5 Genotypisierungs-PCR. Beispielhafte Darstellung eines Agarosegels (1%) zur Darstellung der PCR Produkte. Inhibitor-1 transgene Tiere zeigten eine Bande bei 300 bp und 180 bp. Wildtyptieren fehlte die Bande bei 300 bp. Mit M ist die Spur des Größenmarkers markiert.

3.4 Inhaltliche Ergebnisse

3.4.1 Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 Überexpression

Die Funktionalität des Vektors in Bezug auf die Expression des Transgens wird im Regelfall vor der Pronukleusinjektion getestet. Dies war in unserem Fall nicht möglich, da wir einen herzspezifischen Promoter verwendet hatten und Kardiomyozyten bekanntermaßen schwer zu transfizieren sind. Um die Überexpression von Inhibitor-1 zu untersuchen, wurde das Herz eines im Southern Blot positiv getesteten 10 Wochen alten Tieres der F1-Generation auf seinen Gehalt an Inhibitor-1 untersucht. Als Vergleich diente ein Wildtypgeschwistertier und als Positivkontrolle wurden mit AdEGFP/PPI-1 infizierte neonatale Rattenkardiomyozyten,

die Inhibitor-1 stark überexprimieren, benutzt. Im Western Blot ist bei Wildtypmäuseherzen kein Signal detektierbar, da die Inhibitor-1 Proteinkonzentration unter der Nachweisgrenze lag. Die transgenen Tiere zeigten durch das Signal bei 29 kD eine deutliche Überexpression von Inhibitor-1 (**Abb. 3.6**). Um eine unspezifische Bindung auszuschließen, wurden die gleichen Proben nochmals mit Präimmunserum des Inhibitor-1 Antikörpers inkubiert.

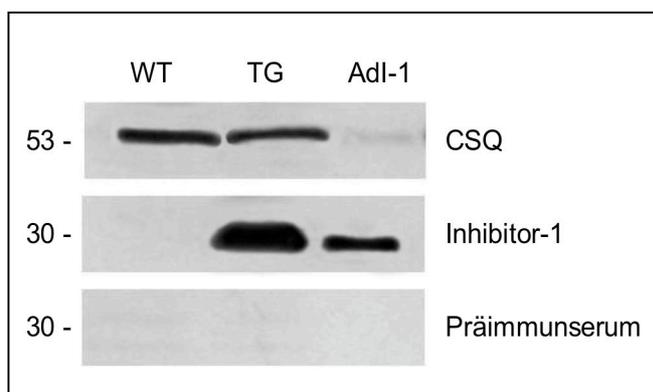


Abbildung 3.6 Darstellung der Inhibitor-1 Überexpression im Western Blot. Als Ladungskontrolle wurde Calsequestrin (CSQ) mitgeführt und zum Ausschluss unspezifischer Bindung erfolgte eine Inkubation mit Präimmunserum. Als Positivkontrolle dienten mit AdEGFP/PPI-1 (Adl-1) infizierte Kardiomyozyten der Ratte. Es wurden je 50 μ g Protein pro Spur geladen.

Zusätzlich untersuchten wir die Phosphorylierungsstellen an Threonin 35 und Serin 67 mit phosphospezifischen Antikörpern. Sowohl die PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle Threonin 35 als auch die PKC-Phosphorylierungsstelle Serin 67 waren vorhanden und detektierbar (**Abb. 3.7**).

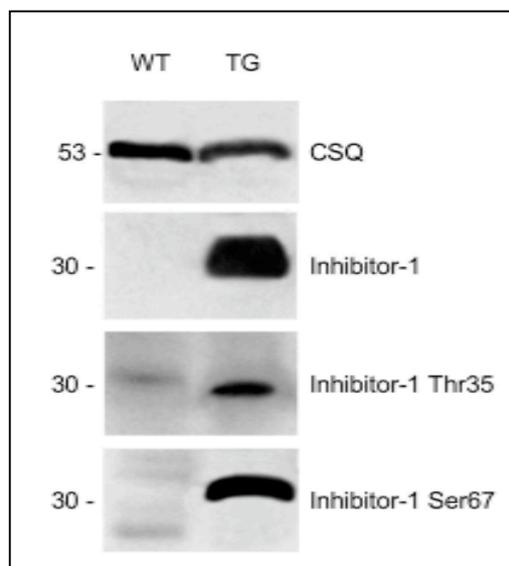


Abbildung 3.7 Inhibitor-1 Phosphorylierung. Die Phosphorylierungsstellen an Threonin 35 und Serin 67 wurden mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Als Ladungskontrolle diente CSQ. Es wurden 50 μ g Protein pro Spur geladen.

Da die Integration des Transgens zufällig erfolgt, ist weder die Anzahl der eingebauten Kopien, noch der Ort der Integration bekannt. Zudem besteht aufgrund regulatorischer Sequenzen in der Nähe des Integrationsortes nicht zwangsläufig eine Korrelation zwischen der Anzahl der integrierten Kopien und der Expression. Zur Abschätzung der absoluten

Inhibitor-1 Proteinmenge der transgenen Tiere wurde diese mit einer Verdünnungsreihe von rekombinant hergestelltem Inhibitor-1 der Ratte, mit bekannter Konzentration, verglichen. Die endogene Inhibitor-1 Konzentration von Wildtypmäusen war nicht bekannt und im Western Blot nicht nachweisbar, sodass zur Bestimmung der Inhibitor-1 Konzentration von Wildtypmäusen zuerst eine Aufkonzentrierung mittels TCA-Extraktion genutzt wurde. Damit konnte Inhibitor-1 ungefähr 500-fach aufkonzentriert werden. Für diese Methode wurde annähernd 1 g Herzgewebe benötigt. Um nach der Homogenisation eine Proteinmenge von 89 mg zu erhalten, wurden sieben Wildtypmäuseherzen benötigt und 850 mg Herzgewebe eingesetzt. Nach TCA-Extraktion resultierten daraus 300 μl mit einem Proteingehalt von ca. 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Der Western Blot in **Abb. 3.8** zeigt den Vergleich zwischen Wildtyptieren und Inhibitor-1 transgenen Tieren mit einer Verdünnungsreihe des rekombinant hergestellten Inhibitor-1 bekannter Konzentration.

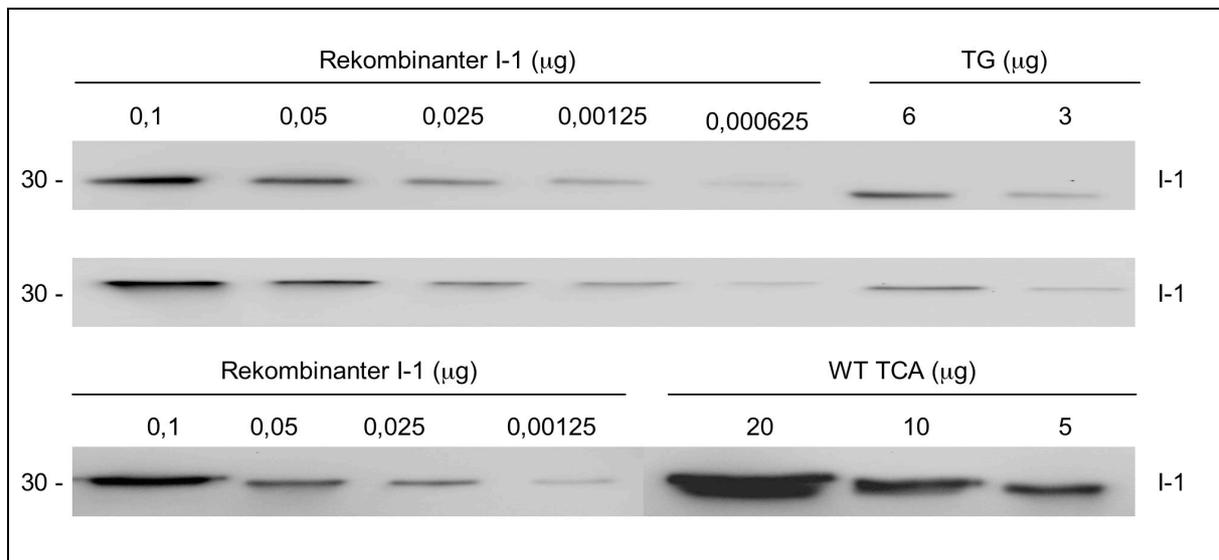


Abbildung 3.8 Quantifizierung der Inhibitor-1 Überexpression. *Western Blot der Linien 1 (obere Spur) und 2 im Vergleich zu Wildtyptieren. Die Proteinangaben der transgenen Mäuse beziehen sich auf das Gesamthomogenat nach Bradford. Die Angaben der Wildtypmäuse wurden nach TCA-Extraktion ebenfalls nach Bradford ermittelt.*

Die Intensität der Immunreaktion entsprach bei 0,1 μg rekombinatem Inhibitor-1 annähernd der von 10 μg nach TCA-Extraktion. Daraus ergab sich eine Menge von 740 μg Inhibitor-1 in 89 mg Gesamtprotein bzw. 445 fmol/mg Protein. Nach dem gleichen Prinzip wurden die Konzentrationen der transgenen Linien ermittelt. Die Bandenintensität von 0,5 μg rekombinatem Inhibitor-1 war vergleichbar der Reaktion von 6 μg Protein des Herzhomogenats der Linie 1. Daraus errechnete sich eine Konzentration von 1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gesamtprotein bzw. 90 pmol/mg. Für die Linie 2 ergab sich eine Konzentration von ca. 110 pmol/mg. Daraus errechnete sich eine ca. 200-250-fach erhöhte Inhibitor-1 Konzentration.

	Konzentration	Überexpression
Wildtyp	~ 0,5 pmol/mg	
Founderlinie 1	~ 90 pmol/mg	~ 200-fach
Founderlinie 2	~ 110 pmol/mg	~ 250-fach

Tabelle 2.1 Inhibitor-1 Überexpression

3.4.2 Inhibitor-1 mRNA-Konzentration

Wir bestimmten ebenfalls die Inhibitor-1 mRNA-Konzentration von transgenen Tieren mit Hilfe einer Real-time-PCR (RT-PCR). Dazu wurde die mRNA aus jeweils 6 Wildtyp- und transgenen Mäuseherzen 10 Wochen alter Tiere der Founderlinie 2 extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Um die Expression auf ein Housekeeping Gen zu korrelieren, wurde die Expression von GAPDH bestimmt. Die RT-PCR zeigte eine ca. 320-fache Überexpression (**Abb. 3.9**).

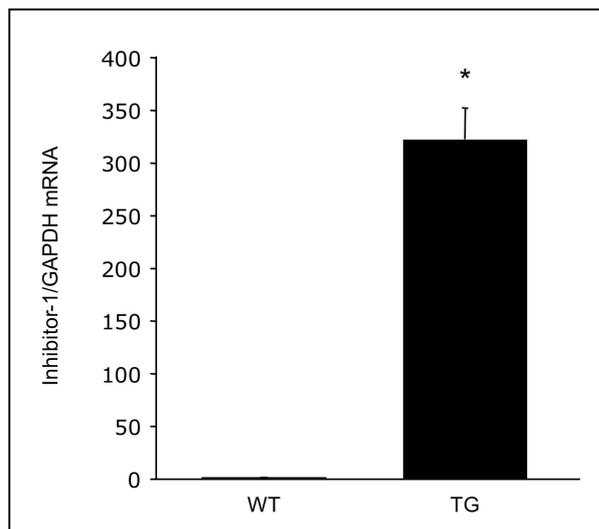


Abbildung 3.9 Inhibitor-1 mRNA-Konzentration Inhibitor-1 transgener Mäuse. Die Bestimmung erfolgte mittels RT-PCR mit den Primern Inhibitor-1 Taqm-forward und Inhibitor-1 Taqm-reverse in 3-fach Bestimmung. (* $p < 0,05$ TG vs. WT, $n = 6$).

3.4.3 Lokalisation von Inhibitor-1

Zur Darstellung der intrazellulären Verteilung des transgenen Inhibitor-1 wurde dieser mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Der sekundäre Antikörper war an einen roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, sodass sich Inhibitor-1 rot darstellte. Actinin wurde mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs, der an Phalloidin gekoppelt war, grün dargestellt. Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. In Wildtypherzen konnte Inhibitor-1 nicht nachgewiesen werden (**Abb. 3.10 D**). In den Herzen von Inhibitor-1 transgenen Mäusen war ein membranständiges, punktuelles Verteilungsmuster von Inhibitor-1 erkennbar (**Abb. 3.10 A/B**). Auffällig hierbei war, dass Inhibitor-1 nicht in allen Zellen nachgewiesen werden konnte.

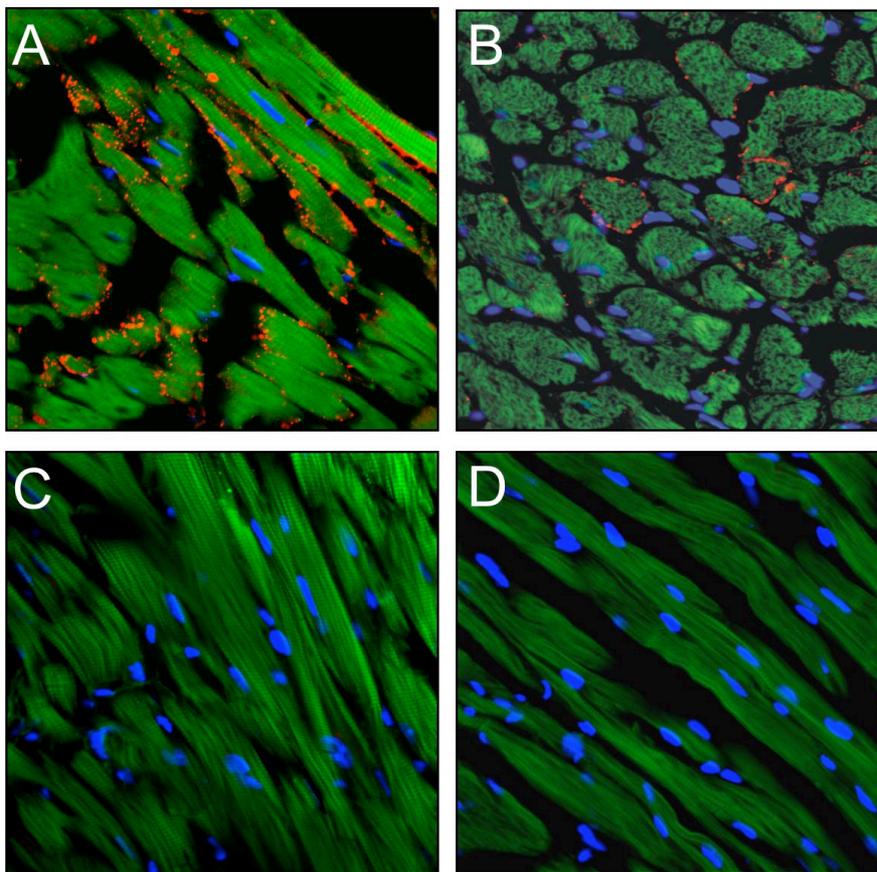


Abbildung 3.10 Immunhistologische Darstellung der Inhibitor-1 Lokalisation. (A) Längsschnitt transgener Kardiomyozyten. (B) Querschnitt transgener Kardiomyozyten. (C) Transgene Kardiomyozyten ohne den 1. Antikörper. (D) Wildtypkardiomyozyten. Es wurden 10 μm dicke Kryoschnitte verwendet. Inhibitor-1 wurde mit einem Antikörper nachgewiesen, der an einen roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte durch DAPI (blau) und mittels Phalloidin, das an einen grünen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, konnte Actinin angefärbt werden.

3.5 Auswirkungen der Inhibitor-1 Überexpression

3.5.1 Phosphorylierungszustand von Zielproteinen

Am Ende der β -adrenergen Signalkaskade steht die Phosphorylierung von Zielproteinen. Der Phosphorylierungsgrad von zwei Zielproteinen, TnI und MyBPC, wurde mit phosphospezifischen Antikörpern im Western-Blot untersucht. Hierfür wurden die Herzen von Wildtyp- und Inhibitor-1 transgenen Mäusen im Langendorffmodell perfundiert und zur β -adrenergen Stimulation mit Isoprenalin stimuliert. Es zeigte sich kein Unterschied in der Phosphorylierung von TnI an Serin 23 und Serin 24 und MyBPC an Serin 282 zwischen Wildtyp- und Inhibitor-1 transgenen Tieren unter basalen Bedingungen. Nach Isoprenalinstimulation (10^{-6} M) war die TnI Phosphorylierung an Serin 23 und Serin 24 unverändert. Die MyBPC-Phosphorylierung an Serin 282 war ebenfalls, im Vergleich zu Wildtypmäusen, nicht signifikant verändert (**Abb. 3.11**).

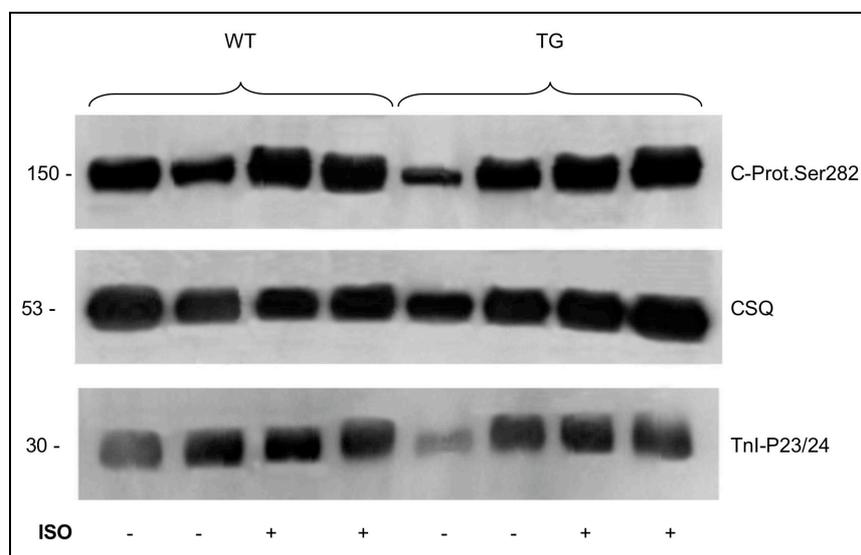


Abbildung 3.11 Troponin I und Myosin-Binding-Protein-C-Phosphorylierung. Der Nachweis erfolgte mit phosphospezifischen Antikörpern gegen MyBPC-Serin 282 und TnI-Serin 23/24 im Langendorffmodell unter basalen Bedingungen und nach einer akuten Stimulation mit Isoprenalin (10^{-6} M). Es wurden je $30 \mu\text{g}$ Protein geladen ($n=3$).

3.5.1.1 Regulation von Phospholamban

Eine zentrale Stellung in der Regulation des Calciumhaushalts und damit der Kontraktilität nimmt PLB ein. Die PLB-Konzentration wurde in Herzhomogenaten mit einem spezifischen Antikörper im Immunoblot nachgewiesen.

PLB besitzt zwei Phosphorylierungsstellen. Eine PKA vermittelte an Serin 16 und eine CamK II vermittelte an Threonin 17. Wir untersuchten die PLB-Phosphorylierung sowohl nach einfacher, schneller Präparation der Herzen als auch im Langendorffmodell. Die PLB-Phosphorylierung ist sehr sensitiv und unterschiedliche Herzisolationszeiten können somit

Einfluss auf die Phosphorylierung haben. Im Langendorffmodell konnten die Herzen nach standardisiertem Protokoll, unabhängig vom Einfluss des Autonomen Nervensystems und endogenen Katecholaminen, untersucht werden. Der Einfluss der Isolationszeit wurde minimiert.

Nach einfacher, schneller Präparation bestand kein Unterschied in der PLB-Phosphorylierung an Serin 16 und Threonin 17 zwischen Wildtyptieren und Inhibitor-1 transgenen Mäusen (**Abb. 3.12 A**).

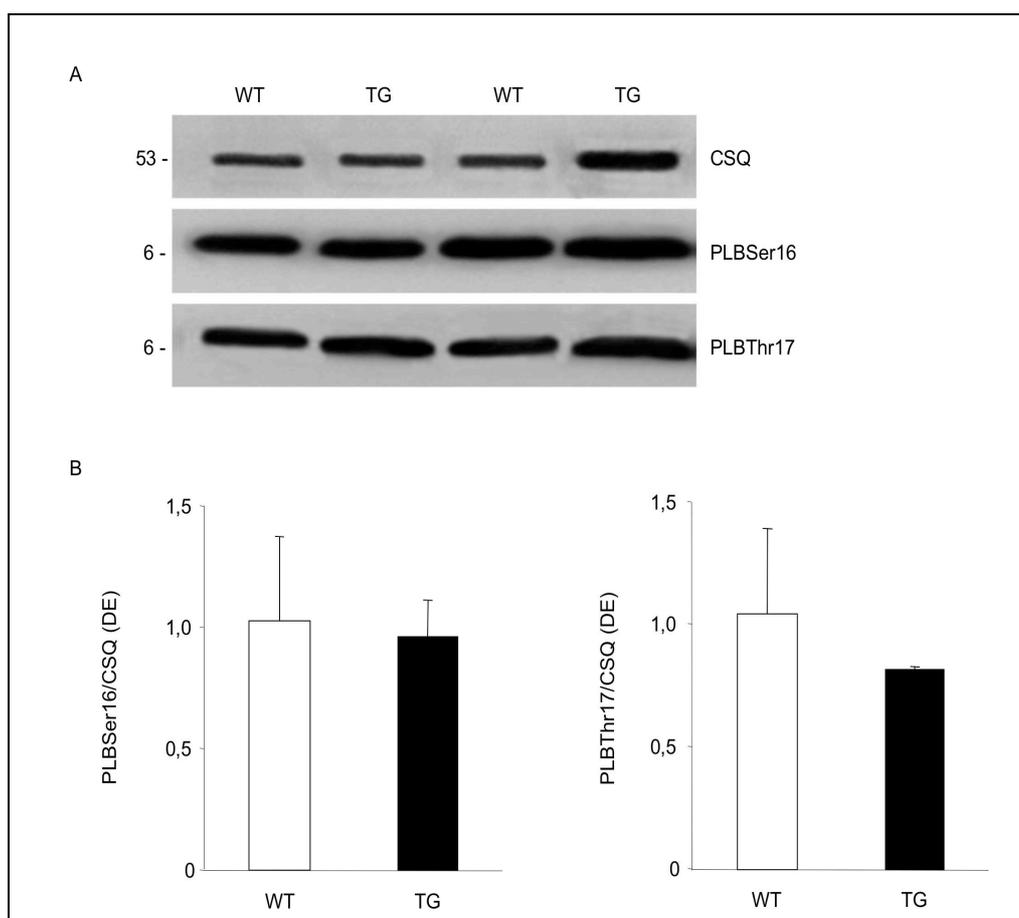


Abbildung 3.12 Phospholamban-Phosphorylierung. (A) Repräsentativer Western Blot zur Darstellung der PLB-Phosphorylierung nach einfacher Herzpräparation. Es wurden 50 µg Protein pro Spur geladen. (B) Statistische Zusammenfassung der Phosphorylierung an Serin 16 und Threonin 17 im Verhältnis zu CSQ (n= 3-4).

In den Untersuchungen im Langendorffmodell wurden die Herzen für 10 min mit begaster und erwärmter Thyrode-Lösung perfundiert. Zur Untersuchung der Auswirkungen einer β -adrenergen Stimulation erfolgte anschließend eine Stimulation mit Isoprenalin (10^{-6} M). In diesem Modell war die PLB-Phosphorylierung an Serin 16 bei Inhibitor-1 transgenen-Tiere unter basalen Bedingungen, d.h. nach alleiniger Perfusion mit Thyrode-Lösung, erniedrigt (**Abb. 3.13 B**). Im Gegensatz dazu war die PLB-Phosphorylierung an Serin 16 nach β -

adrenerger Stimulation mit Isoprenalin (10^{-6} M), d.h. nach Aktivierung des Inhibitor-1 durch die PKA, bei Inhibitor-1 transgenen Tieren im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren signifikant erhöht (**Abb. 3.13 C**).

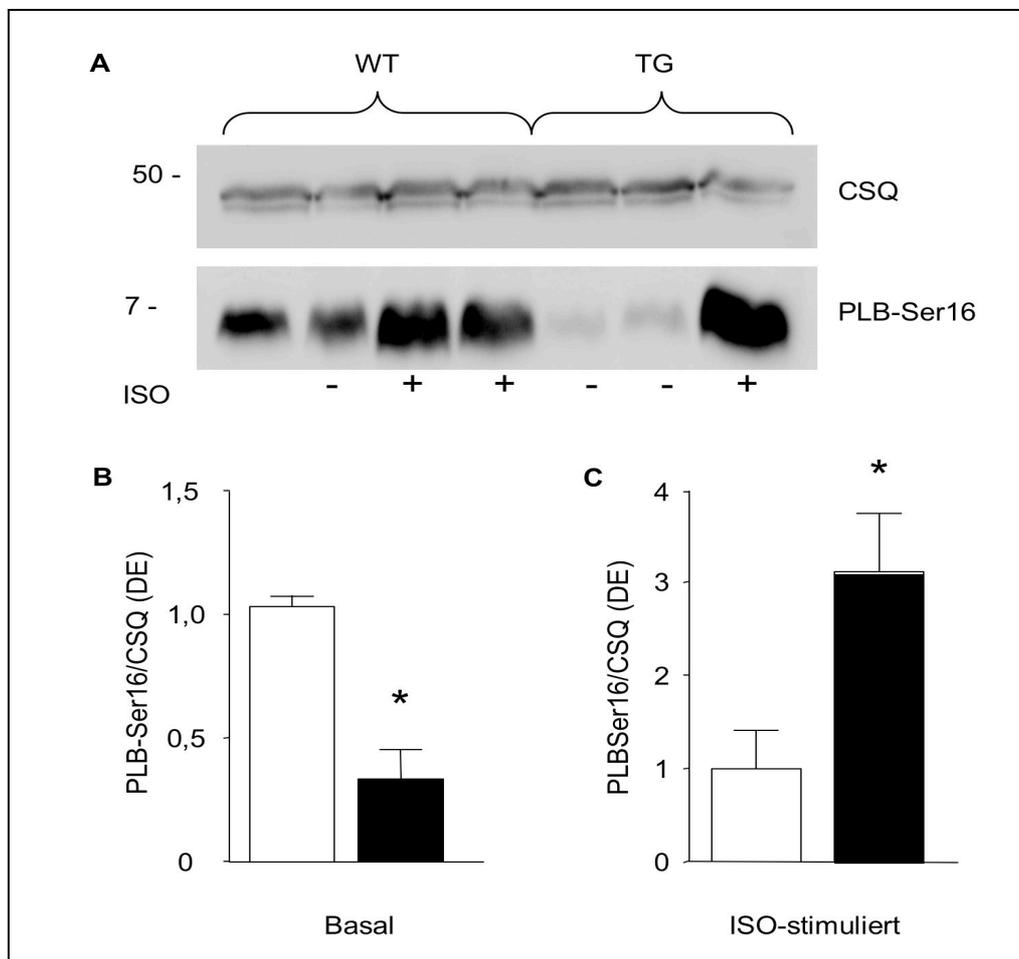


Abbildung 3.13 Phospholamban-Phosphorylierung an Serin 16. (A) Repräsentativer Western Blot zur Darstellung der PLB-Phosphorylierung nach Isoprenalinstimulation im Langendorffmodell. Der Nachweis erfolgte mit einem phosphospezifischen Antikörper im Western Blot. Es wurden $30 \mu\text{g}$ pro Spur geladen. Statistische Zusammenfassung unter basalen Bedingungen (B) und nach Isoprenalinstimulation (C) (* $p < 0,05$ TG vs. WT, $n = 3$)

3.5.2 Auswirkung der Inhibitor-1 Überexpression auf die Proteinphosphatase-1

3.5.2.1 Phosphatasekonzentration

Es ist bekannt, dass die Überexpression von inhibitorischen oder regulatorischen Untereinheiten der Phosphatase-1 zu kompensatorischen Veränderungen der Phosphatase-1 führen kann. Da unter basalen Bedingungen im Langendorffmodell eine erniedrigte PLB-Phosphorylierung (**Abb. 3.13 B**) auffiel untersuchten wir die Phosphatase-1-Konzentration und Aktivität von Inhibitor-1 transgenen Mäusen. Dazu wurden Gesamthomogenate

verwendet. Ein Teil wurde in SDS-Puffer aufgenommen und zur Analyse der Proteinkonzentration im Immunoblot benutzt.

Die Phosphatase-1-Konzentration Inhibitor-1 transgener Mäuse war bei Tieren der Linie 1 dreifach erhöht. Tiere der Linie 2 hatten eine fünffach erhöhte Phosphatase-1-Konzentration (**Abb. 3.14 A/B**). Die Konzentration der Phosphatase-2A war nicht erhöht (**Abb. 3.14 B**).

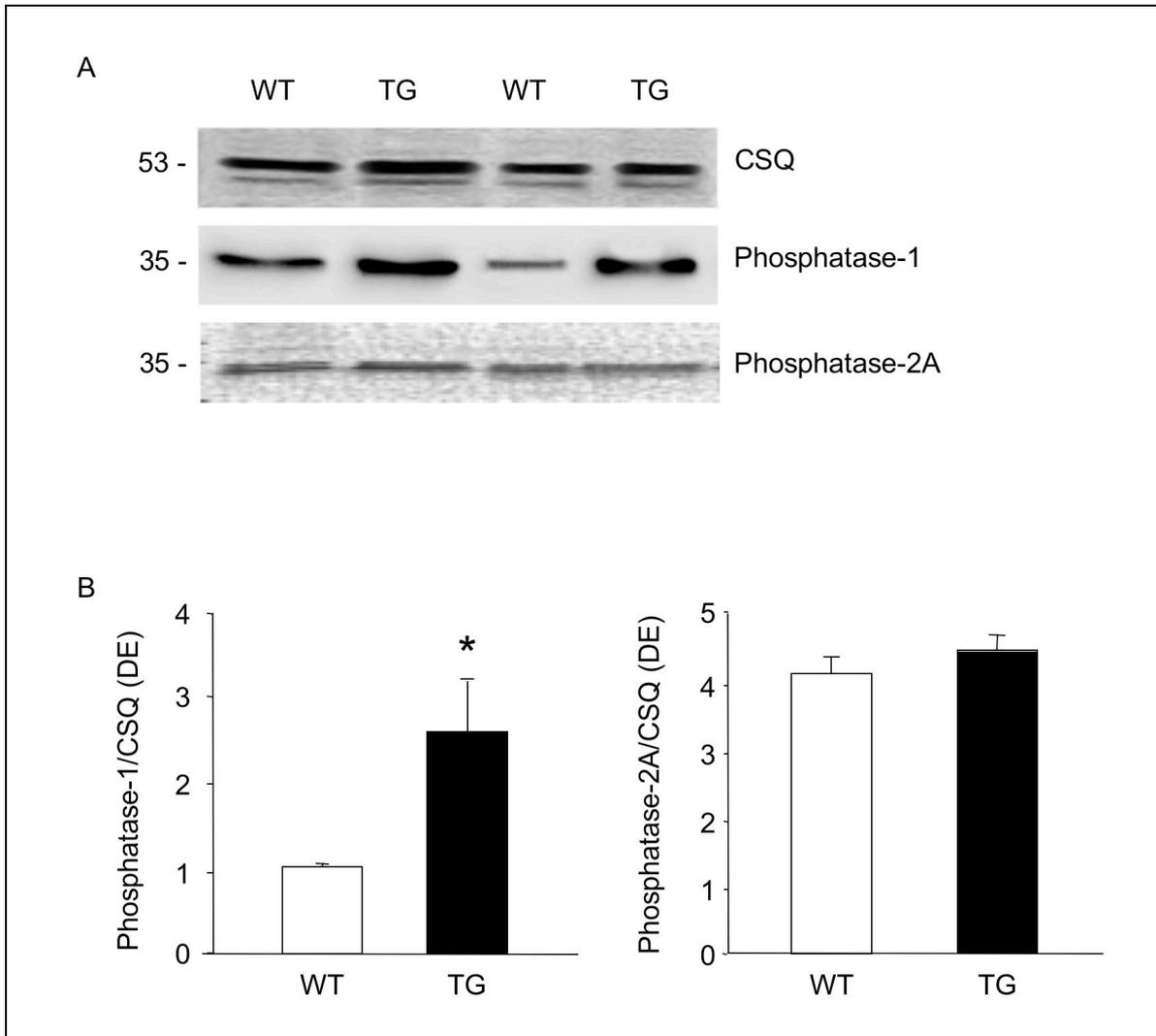


Abbildung 3.14 Immunologischer Nachweis von Phosphatase-1 und Phosphatase-2A. (A) Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot der Founderlinie 1 zur Darstellung der Phosphatase-1-Konzentration. Die Bestimmung der Phosphatase-2A-Konzentration erfolgte nur für die Linie 1. (B) Statistische Auswertung der Founderlinie 1 Phosphatase-1 und Phosphatase-2A (* $p < 0,05$ TG vs. WT, $n = 4$).

3.5.2.2 Phosphatase-1-Aktivität

Da die Inhibitor-1 transgenen Mäuse eine erhöhte Phosphatase-Konzentration zeigten, stellte sich die Frage nach der Phosphataseaktivität. Diese wurde in Gesamthomogenaten der Herzen von 10 Wochen alten Mäusen untersucht. Die gemessene Phosphatase-Aktivität

setzte sich unter den gegebenen Bedingungen (1 mM EDTA und Abwesenheit von zweiwertigen Kationen) aus der Aktivität der Phosphatase-1 und der Phosphatase-2A zusammen. Zur Differenzierung zwischen Phosphatase-1 und der Phosphatase-2A-Aktivität wurde den Proben Okadasäure in einer Konzentration von 10 nM zugesetzt. Okadasäure hemmt in dieser Konzentration nur die Phosphatase-2A. Daraus ließ sich der Anteil der Phosphatase-2A-Aktivität berechnen. Die spezifische Phosphatase-1-Aktivität aus Herzgewebe von Inhibitor-1 transgenen Tieren war gegenüber ihren Wildtypgeschwistertieren ca. 3-fach erhöht (**Abb. 3.15 A**). Die Phosphatase-2A-Aktivität war nicht signifikant verändert (**Abb. 3.15 B**).

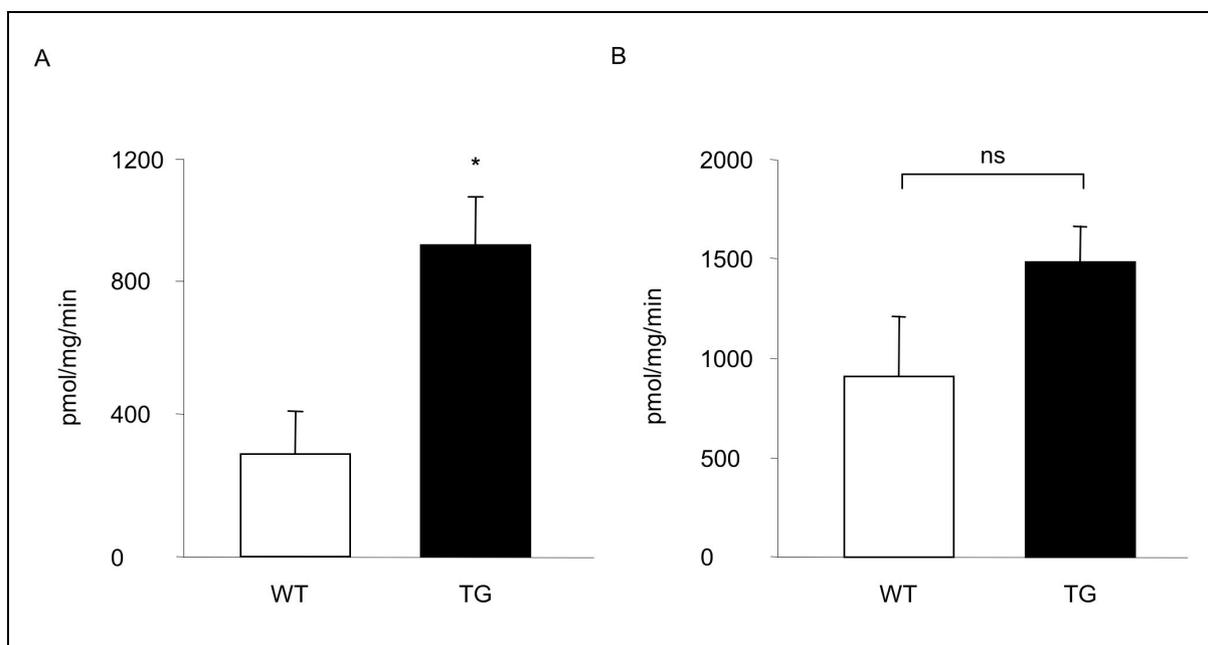


Abbildung 3.15 Phosphatase-1 und Phosphatase-2A-Aktivität in Herzhomogenaten Inhibitor-1 transgener Mäuse. Statistische Auswertung der Phosphatase-1 (A) und Phosphatase-2A-Aktivität (B) von Wildtyp- und Inhibitor-1 transgenen Mäusen in Herzhomogenaten nach einfacher Herzpräparation (* $p < 0,05$ TG vs. WT, $n = 3-5$).

Zur Untersuchung der Phosphataseaktivität nach β -adrenerger Stimulation wurde das Langendorffmodell verwendet. Hier war die Phosphatase-1-Aktivität Inhibitor-1 transgener Tiere basal ebenfalls ca. 3-fach erhöht (**Abb. 3.16 A**). Unter Isoprenalinstimulation (10^{-6} M) fiel die Phosphatase-1 Aktivität der Wildtypiere signifikant ab. Bei Inhibitor-1 transgenen Tieren zeigte sich jedoch keine Änderung unter β -adrenerger-Stimulation (**Abb. 3.16 A**). Die Phosphatase-2A zeigte keine Unterschiede zwischen Inhibitor-1 transgenen Tieren und Wildtypieren (**Abb. 3.16 B**).

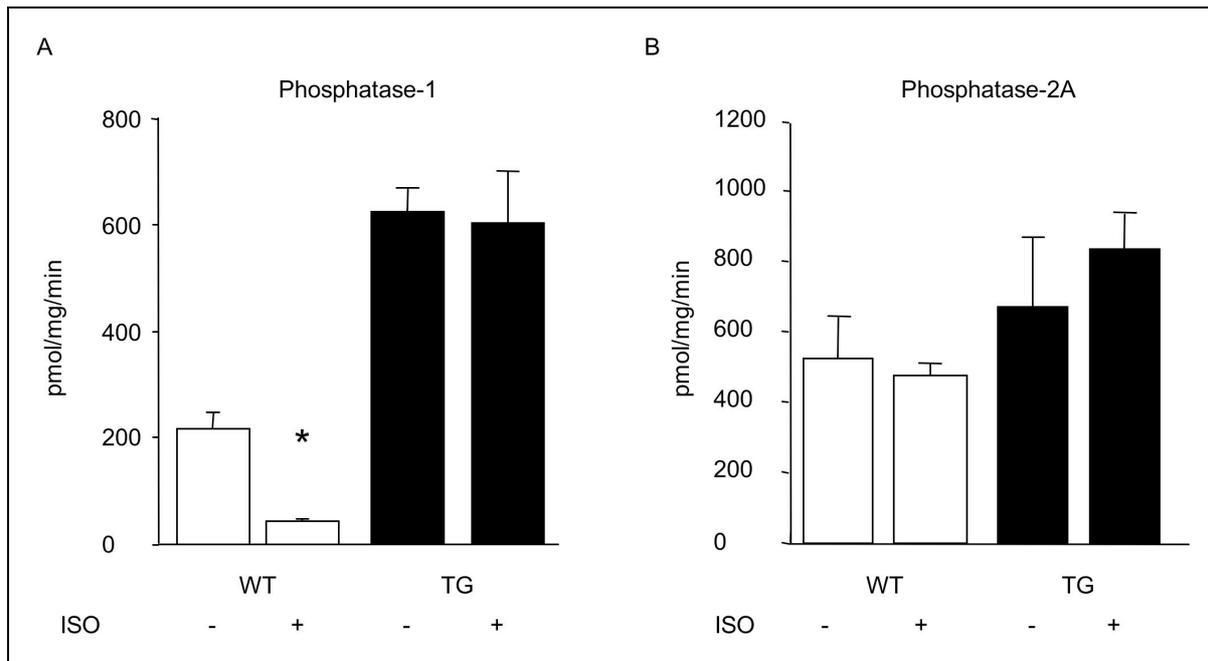


Abbildung 3.16 Phosphataseaktivität Inhibitor-1 transgener Mäuse im Langendorffmodell. Graphische Darstellung der (A) Phosphatase-1- und (B) Phosphatase-2A-Aktivität im Langendorffmodell unter basalen Bedingungen und nach Isoprenalinstimulation (10^{-6} M) (* $p < 0,05$ basal vs. Isoprenalin stimuliert, $n = 5-9$).

3.5.3 Phänotypisierung

Inhibitor-1 transgene Tiere waren äußerlich nicht von ihren Wildtypgeschwistertieren zu unterscheiden. Sie zeigten keine Verhaltensauffälligkeiten und hatten das gleiche Gewicht und die gleiche Größe. Bis zu einem Alter von 12 Monaten hatten sie keine erhöhte Sterblichkeit.

Auffällig war, dass sie im Alter von 12 Wochen ein um 14% erhöhtes Herz- zu Körpergewicht von $5,3 \pm 0,1$ mg/g im Vergleich zu Wildtyptieren mit $4,6 \pm 0,2$ mg/g hatten (**Abb 3.17 A**). Dieser Unterschied stieg auf 17% nach 12 Monaten. Das Verhältnis des Herz- zu Körpergewicht betrug dann $4,1 \pm 0,1$ mg/g im Vergleich zu $4,8 \pm 0,1$ mg/g (**Abb. 3.17 B**).

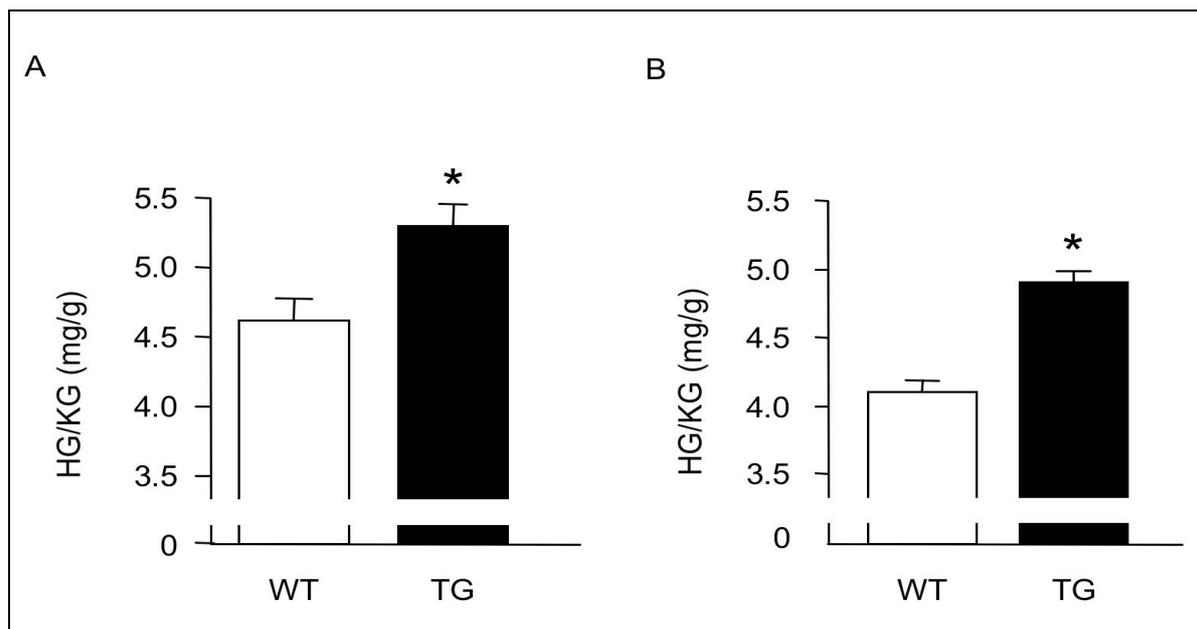


Abbildung 3.17 Relatives Herzgewicht Inhibitor-1 transgener Mäuse. Herzgewicht in mg bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse in g (A) im Alter von 3 Monaten und (B) im Alter von einem Jahr (* $p < 0,05$ TG vs. WT, $n = 8-17$).

3.5.4 Echokardiographie

Um die Auswirkungen der oben beschriebenen Veränderungen auf die Herzfunktion zu untersuchen, wurden Inhibitor-1 transgene Mäuse echokardiographiert. Anfangs wurde eine Ketamin/Xylazin-Narkose eingesetzt. Nachdem unter dieser Narkose einige Tiere starben gingen wir zu einer Isoflurananästhesie über. Die Tiere wurden mit einer Isoflurankonzentration von 1-1,8% Isofluran und einem Fluss von 0,5 l/min über eine Maske anästhesiert. Die Herzfrequenz wurde während der gesamten Untersuchungen gemessen. Diese unterschied sich nicht zwischen Inhibitor-1 transgenen Mäusen und ihren Wildtypgeschwistertieren (**Abb. 3.18**).

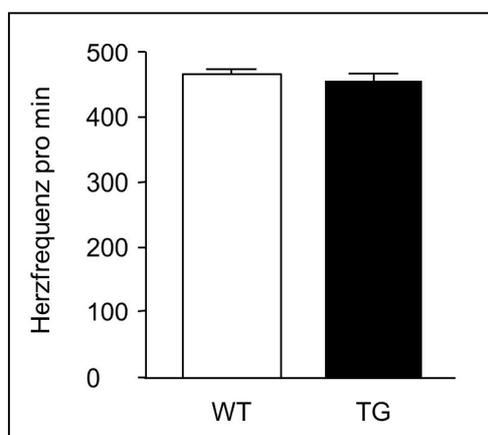


Abbildung 3.18 Herzfrequenz Inhibitor-1 transgener Mäusen Die Tiere waren mit Isofluran in einer Konzentration von 1-1,8% anästhesiert. Die Herzfrequenz wurde über Elektroden gemessen, auf welchen die Pfoten der Tiere fixiert waren ($n = 15-21$).

Mit der Echokardiographie ließen sich nichtinvasiv Aussagen über die Morphologie und Funktion am lebenden Tier treffen. Der Durchmesser des linken Ventrikels wurde in der Systole und Diastole gemessen. Inhibitor-1 transgene Mäuse hatten einen gering dilatierten linken Ventrikel (**Abb. 3.19 A/B**). Die linksventrikuläre Masse bei transgenen Tieren war erhöht (**Abb. 3.19 C**). Als Maß für die Kontraktilität des Herzens bestimmten wir die Fractional Area Shortening (FAS %), den Prozentsatz der Verkleinerung des linken Ventrikels während der Systole. Die FAS war mit $46 \pm 2\%$ bei Inhibitor-1 transgenen Mäusen signifikant niedriger als bei Wildtyptieren mit $52 \pm 3\%$ (**Abb. 3.19 D**). Zur β -adrenergen Stimulation wurde den Tieren Dobutamin ($2 \mu\text{g/g KG}$) intraperitoneal injiziert und nochmals die FAS bestimmt. Sie stieg bei Wildtyptieren um 19% auf 62%. Bei Inhibitor-1 transgenen Tieren zeigte sich ein deutlich höherer Anstieg um 35% auf 61%, sodass sich die FAS unter β -adrenerger Stimulation nicht unterschied (**Abb. 3.19 E**).

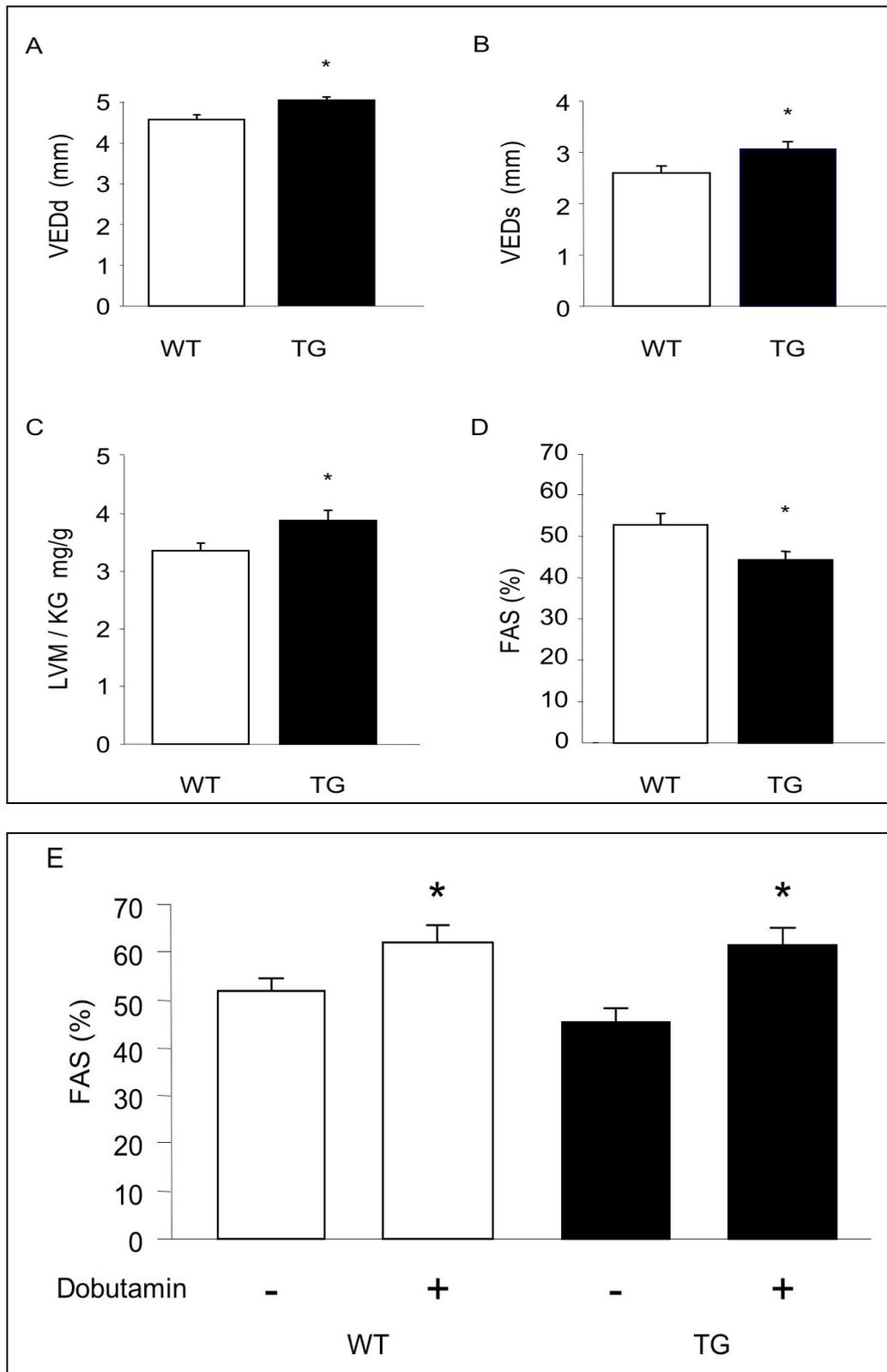


Abbildung 3.19 Ventrikeldimensionen und Kontraktilität Inhibitor-1 transgener Mäuse. Graphische Darstellung der echokardiographisch gemessenen (A) enddiastolischen und (B) endsystolischen Ventrikeldurchmesser bei Inhibitor-1 transgenen Mäusen im Alter von 20 Wochen. Vergleich der (C) linksventrikulären Masse (LVM) im Verhältnis zum Körpergewicht und der (D) FAS unter basalen Bedingungen. (E) Vergleich der FAS in Prozent nach Dobutaminstimulation (2 µg/ g KG)(* p < 0,05 WT vs. TG).

3.6 Modell der chronischen Isoprenalininfusion

Zur Überprüfung der Inhibitor-1 Überexpression in der pathologischen Herzhypertrophie wählten wir das Modell der chronischen Isoprenalininfusion (15 mg pro kg KG über 7 Tage). Die Tiere wurden in vier Gruppen eingeteilt. Die Kontrolltiere erhielten Minipumpen, die mit NaCl gefüllt waren.

Inhibitor-1 transgene Tiere hatten nach einer Woche chronischer Isoprenalininfusion eine signifikant höhere, echokardiographisch ermittelte, linksventrikuläre Masse (+ 13%) als Inhibitor-1 transgene Mäuse, die NaCl erhalten hatten. Bei ihren Wildtypgeschwistertieren zeigte sich die dieselbe Tendenz (+ 7%), jedoch war der Unterschied nicht signifikant (**Abb. 3.20 A**). Das Verhältnis des, nach Versuchsende gewogenen, Herz-zu-Körpergewichts stieg bei Inhibitor-1 und Wildtyptieren nach einer Woche Isoprenalininfusion im Vergleich zu Tieren, die NaCl infundiert bekommen hatten, signifikant an. Inhibitor-1 transgene Tiere zeigten dabei im Vergleich zu Wildtyptieren einen signifikant höheren Anstieg (**Abb. 3.20 B**). Echokardiographisch war sowohl bei Inhibitor-1 transgenen Mäusen als auch bei Wildtyptieren die Reaktion auf akute β -adrenerge Stimulation mittels Dobutamininjektion (2 $\mu\text{g}/\text{g KG}$) aufgehoben. Tiere, die NaCl infundiert bekommen hatten, reagierten weiterhin mit einer Zunahme der FAS auf eine intraperitoneale Dobutamininjektion (**Abb. 3.20 C**).

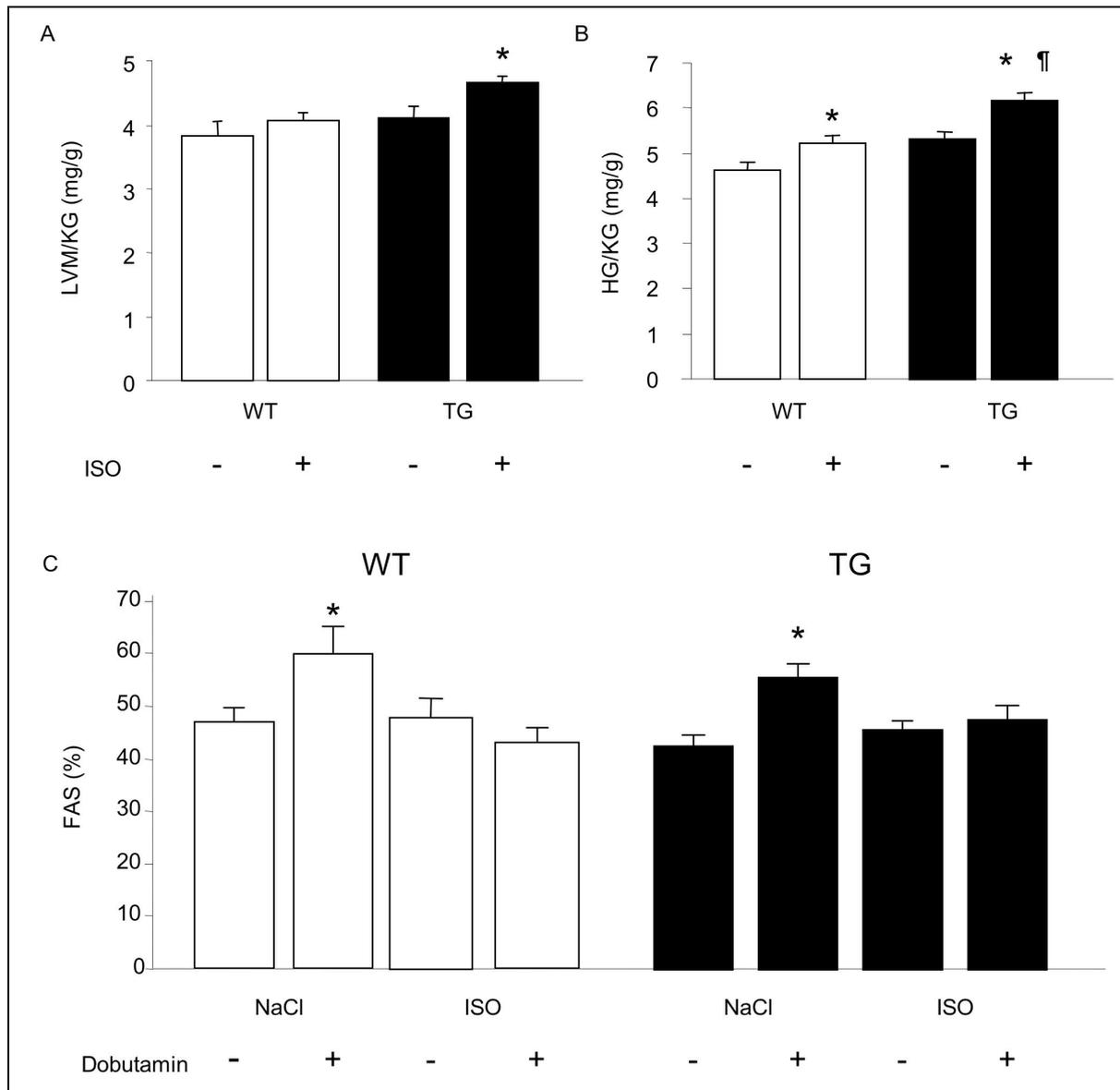


Abbildung 3.20 Herzgewicht und Kontraktilität Inhibitor-1 transgener Mäuse nach einer Woche chronischer Isoprenalininfusion. Graphische Darstellung des (A) echokardiographisch gemessenen Verhältnis LVM/KG und (B) des Verhältnis des HG/KG nach sieben Tagen Isoprenalin- (15 mg/kg KG) bzw. NaCl-Infusion (* $p < 0,05$ NaCl vs. Isoprenalin, ¶ $p < 0,05$ WT vs. TG, $n = 8-15$). (C) Echokardiographisch gemessene Verkleinerung der ventrikulären Fläche während der Systole in Prozent (* $p < 0,05$ basal vs. Dobutaminstimulation, $n = 8-15$).

3.7 Ketamin/Xylazin-Narkose

Die ersten Pumpenimplantation wurden mit einer Ketamin (120 mg/kg KG) und Xylazin- (16 mg/kg KG) Narkose durchgeführt. Während der Pumpenimplantationen starben drei Inhibitor-1 transgene Mäuse und zwei Wildtypiere, die eine mit Isoprenalin gefüllte Pumpe implantiert bekommen hatten. Die Inhibitor-1 transgenen Mäuse starben 10-15 min nach Implantation der Pumpen. Die Wildtypiere überlebten tendenziell etwas länger. Nach 25 min

waren jedoch auch alle Wildtyptiere verstorben. Auffällig war, dass sowohl alle Wildtyptiere als auch alle Inhibitor-1 transgene Mäuse, die eine mit NaCl gefüllte Pumpe implantiert bekamen, den Eingriff überlebten und dass bei Untersuchungen, die parallel an Inhibitor-1 Knock-out Tieren durchgeführt wurden, einige Tiere die Implantation von Isoprenalinpumpen überlebten. Für die oben beschriebenen Versuche wurde deshalb eine Isoflurannarkose gewählt.

Da Inhibitor-1 transgene Mäuse tendenziell schneller gestorben waren, wurde die Interaktion zwischen der Narkose mit Ketamin/Xylazin und Inhibitor-1 weiter untersucht. Hierzu wurden Wildtyp-, Inhibitor-1- transgenen und Inhibitor-1 Knock-Out Tieren Isoprenalinpumpen unter einer Ketamin/Xylazin-Narkose mit kontinuierlicher EKG-Überwachung implantiert. Bei dieser Versuchsanordnung starben alle Inhibitor-1 transgenen Tiere (3 von 3 Tieren) innerhalb von 15 min. Alle Wildtypgeschwistertiere sind innerhalb von 25 min gestorben (4 von 4 Tieren). Im EKG waren dabei höhergradige Herzrhythmusstörungen (gehäufte polymorphe ventrikuläre Extrasystolen, Ventrikuläre Tachykardien und Kammerflimmern **s. Abb. 3.21**) auffällig. Inhibitor-1 Knock Out Mäuse waren partiell geschützt. 43% der Knock Out Tiere überlebten die Implantation. Vier von sieben Mäusen starben 20 bis 40 min nach der Implantation (**Abb 3.22**).

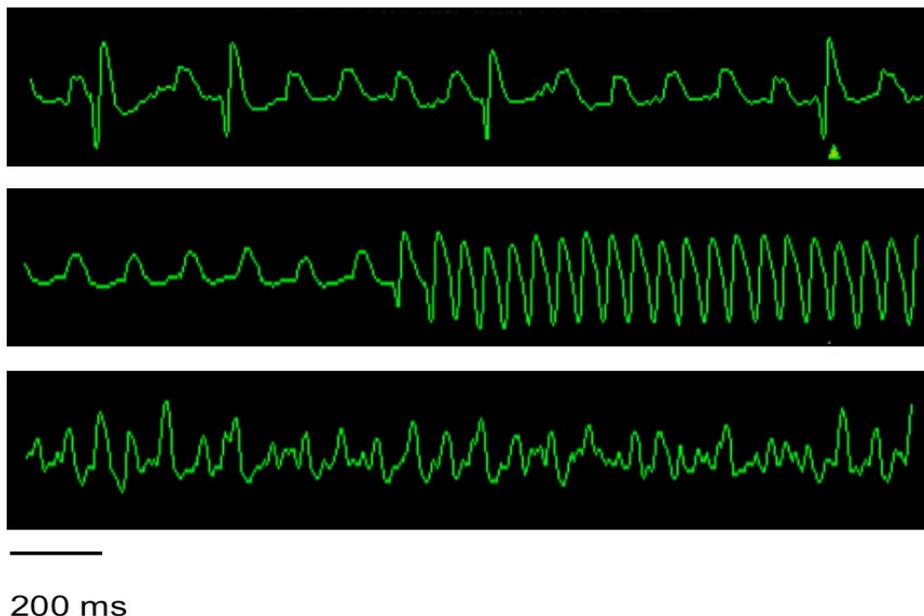


Abbildung 3.21 EKG während einer Isoprenalinpumpenimplantation unter einer Ketamin-Xylazin-Narkose. Exemplarische Darstellung verschiedener Rhythmusstörungen, wie Ventrikuläre Extrasystolen, Ventrikuläre Tachykardien und Kammerflimmern in typischer Reihenfolge.

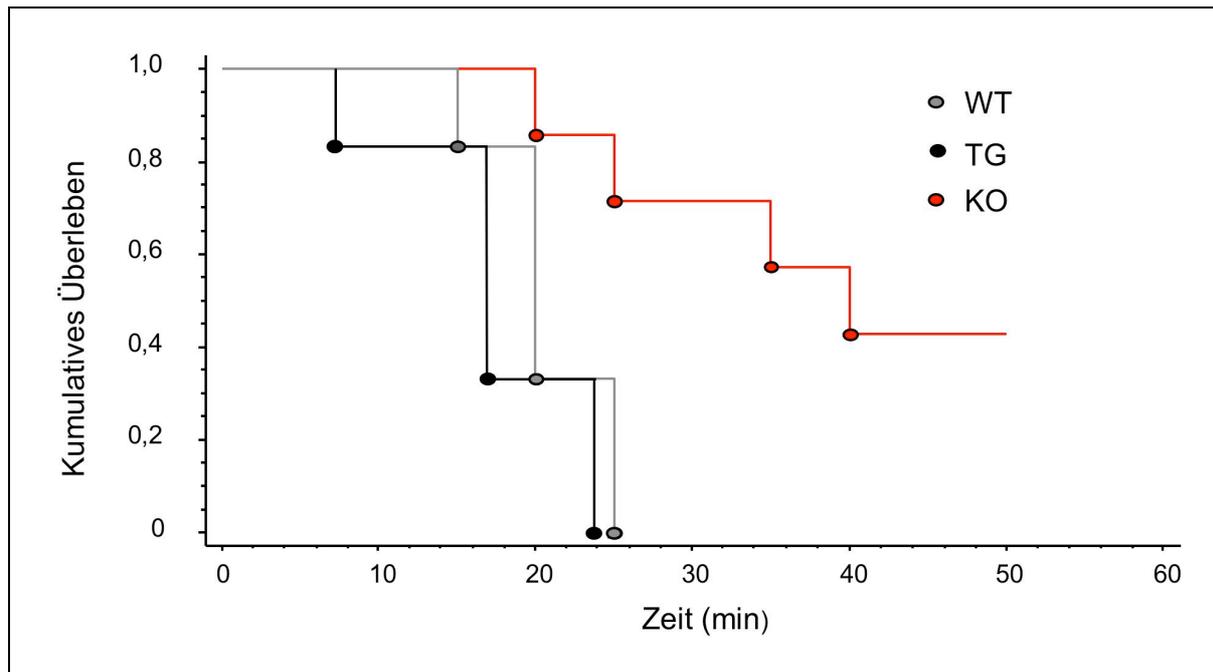


Abbildung 3.22 Kummulatives Überleben von Inhibitor-1-transgenen, Inhibitor-1 Knock-Out und Wildtypmäusen. Kaplan-Meier-Kurve von *Inhibitor-1* transgenen und *Inhibitor-1* Knock-out Mäusen im Vergleich zu Ihren Wildtypgeschwistertieren während der Isoprenalinpumpenimplantation unter einer Ketamin/Xylazin-Narkose (120 mg/kg KG Ketamin und 16 mg/kg KG Xylazin) .

4 Diskussion

4.1 Inhibitor-1 in der Herzinsuffizienz

Die Therapie der Herzinsuffizienz hat in den letzten 30 Jahren, seit der erstmaligen Anwendung von Beta-Blockern durch Waagstein, durch die Einführung von ACE-Hemmern und Aldosteronantagonisten Fortschritte gemacht. Erfreulicherweise nimmt die Verschreibung dieser Medikamente zu. Die mittlere Überlebensdauer nach einer erstmaligen Krankenhausaufnahme aufgrund von Herzinsuffizienz ist mit 2,3 Jahren bei Männern und 1,8 Jahren bei Frauen jedoch immer noch erschreckend niedrig (Jhund et al. 2009). Weitere Medikamente sind also notwendig, müssen ihren Vorteil aber bei zusätzlicher Gabe zu der etablierten Kombinationstherapie zeigen. Dies gelang durch die zusätzliche Gabe von Endothelinrezeptor-, Angiotensinrezeptor-, $\text{TNF}\alpha$ - und Interleukin-1-Antagonisten nicht (Teerlink et al. 2002, Anker et al. 2002, Pfeffer et al. 2003).

Ein alternatives Konzept wäre das Eingreifen in der intrazellulären β -adrenergen Signalkaskade. Inhibitor-1 könnte ein möglicher Angriffspunkt sein. Bisher lagen allerdings nur Daten über eine kurzzeitige adenovirale Überexpression in der Zellkultur, sowie an Engineered Heart Tissue vor (El-Armouche et al. 2004). Rattenkardiomyozyten, die mit einem Inhibitor-1 exprimierendem Adenovirus infiziert wurden, zeigten eine erhöhte PLB-Phosphorylierung und eine erhöhte Kontraktilität (El-Armouche et al. 2003). Ebenso zeigten Kardiomyozyten aus insuffizienten menschlichen Herzen, die mit einem konstitutiv aktiven Inhibitor-1 infiziert wurden, eine stärkere Zellverkürzung und höhere Ca^{2+} -Transienten nach β -adrenerger Stimulation (Carr et al. 2002). Das Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung der Auswirkungen einer langfristigen herzspezifischen Inhibitor-1-Überexpression im transgenen Mausmodell.

Das dazu verwendete Mausmodell überexprimierte den Inhibitor-1 herzspezifisch unter der Kontrolle des αMHC -Promoters. Die Aktivität dieses Promoters beginnt bereits während der Embryogenese und steigt nach der Geburt an (Subramaniam et al. 1991).

Inhibitor-1 transgene Mäuse überexprimierten die „Wildtypform“ des Inhibitor-1 der Ratte ca. 200-fach. Diese Mäuse entwickelten spontan eine kardiale Hypertrophie und zeigten im Alter von 10 Monaten eine um 17% erhöhte Herz- zu Körpergewicht Ratio. Des Weiteren zeigte sich im Modell der Katecholamin-induzierten Hypertrophie eine gegenüber Wildtyptieren gesteigerte Zunahme der Herz- zu Körpergewicht Ratio. Auffällig war eine kompensatorisch 2-3-fach gesteigerte Phosphatase-1-Konzentration und Aktivität. Im Folgenden werden die Hauptergebnisse diskutiert, mit publizierten Daten verglichen und abschließend wird ein Ausblick auf an diese Arbeit anschließende Experimente gegeben.

4.2 Inhibitor-1-Überexpression

Inhibitor-1 wird in gesunden menschlichen Herzen in einer Konzentration von 125 fmol/mg exprimiert (El-Armouche et al. 2004). Daten über die Konzentration im Mäuseherzen waren bisher nicht bekannt. Die kardiale Inhibitor-1-Konzentration bei Wildtypmäusen betrug 500 fmol/mg und war damit höher als beim Menschen. Die Inhibitor-1-Konzentration der transgenen Mauslinien betrug 90 pmol/mg bzw. 110 pmol/mg und war somit ca. 200-fach höher als bei Wildtyptieren. Die Inhibitor-1 mRNA-Konzentration war ca. 300-fach erhöht, sodass die erhöhte Proteinkonzentration auf eine erhöhte Expression zurückzuführen war. Eine 200-fache Überexpression ist im Vergleich mit anderen transgenen Linien, die ein Protein ebenfalls unter Kontrolle des α MHC-Promoters überexprimieren, sehr hoch. Inhibitor-2 transgene Tiere überexprimierten Inhibitor-2 40-fach (Kirchhefer et al. 2005). β 2-Rezeptor transgene Mäuse zeigten eine 5-45-fache (Turki et al. 1996) und β 1-Rezeptor transgene Mäuse eine 5-15-fache Überexpression (Engelhardt et al. 1999). Somit liegt die Inhibitor-1-Konzentration potentiell in einem unphysiologisch hohen Bereich.

4.3 Die Inhibitor-1-Phosphorylierungsstellen Threonin 35 und Serin 67

Inhibitor-1 besitzt an Threonin 35 und Serin 67 Phosphorylierungsstellen, die ihn gegensätzlich regulieren. Die Phosphorylierung an Threonin 35 aktiviert Inhibitor-1 (Cohen et al. 1988). Eine Phosphorylierung an Serin 67 hingegen hemmt seine Funktion (Braz et al. 2004). Beide Phosphorylierungsstellen ließen sich mittels phosphospezifischer Antikörper detektieren. Hier konnten eine relativ niedrige Threonin 35 und eine hohe Serin 67-Phosphorylierung nachgewiesen werden, sodass ein Großteil des überexprimierten Inhibitor-1 unter basalen Bedingungen in seiner inaktiven Form vorliegen könnte. Interessant ist, dass eine niedrige Threonin 35-Phosphorylierung auch in der menschlichen Herzinsuffizienz gefunden wurde (El-Armouche et al. 2004). Dagegen konnte eine Serin 67-Hyperphosphorylierung auch bei insuffizienten menschlichen Herzen gesehen werden (Braz et al. 2004). Somit zeigt sich bei Inhibitor-1 transgenen Tieren ein Phosphorylierungsmuster des Inhibitor-1, wie es auch in der menschlichen Herzinsuffizienz vorkommt.

4.4 Inhibitor-1-Lokalisation

Immunhistologisch gelang der Nachweis von Inhibitor-1 in den transgenen Tieren. Dabei war ein ungewöhnliches membranständiges, punktuell verteiltes Verteilungsmuster erkennbar. Der endogene Inhibitor-1 ist als zytosolisches Protein bekannt, und adenoviral infizierte Kardiomyozyten zeigten ebenfalls eine zytosolische Verteilung (El-Armouche et al. 2003).

Die membranständige Anfärbung von Inhibitor-1 in transgenen Mäusen könnte auf einen Sekretionsmechanismus der Zelle hinweisen, welcher als Reaktion auf die unphysiologische hohe Konzentration zurückzuführen sein könnte. Eine endgültige Erklärung konnte nicht gefunden werden.

4.5 Phosphatase-1 Konzentration und Aktivität

Inhibitor-1 transgene Mäuse hatten eine drei- bis vierfach erhöhte Phosphatase-1-Protein-Konzentration im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren, und die Phosphatase-1-Aktivität war entsprechend signifikant erhöht. Dies kann zum einen auf eine erhöhte Expression zurückzuführen sein, könnte andererseits aber auch aus einem verminderten Abbau resultieren. Verschiedene Daten sprechen für letzteres. Die Phosphatase-1 wird schnell abgebaut und liegt deshalb in der Zelle kaum in freier Form vor (Bollen et al. 1994). Verschiedene Mausmodelle zeigten, dass eine Veränderung regulatorischer Untereinheiten der Phosphatase-1 zu gleichsinnigen Änderungen ihrer Konzentration führten. Eine Überexpression von RGL/GM, einer muskelspezifischen regulatorischen Untereinheit hatte eine erhöhte Phosphatase-1-Konzentration zur Folge (Aschenbach et al. 2001). Der gleiche Befund resultierte aus einer Inhibitor-2-Überexpression (Kirchhefer et al. 2005). Eine RGL/GM-Deletion bewirkte dagegen eine Abnahme der Phosphatase-1-Konzentration (Suzuki et al. 2001). Unterstützt wird die Theorie einer Verlängerung der Halbwertszeit durch eine Interaktion mit regulatorischen Untereinheiten durch Untersuchungen an Inhibitor-2 transgenen Mäusen mittels Northern Blot. Ein Anstieg der Phosphatase-1-mRNA war dabei nicht nachweisbar (Kirchhefer et al. 2005). Dies sprach für eine Stabilisierung der Phosphatase-1 durch Assoziation mit regulatorischen Untereinheiten und müsste durch Messung der Phosphatase-1-mRNA bei Inhibitor-1 transgenen Mäusen weiter untersucht werden. Es zeigt aber auch, dass es bei klassisch generierten transgenen Mausmodellen zu komplexen Anpassungsreaktionen kommen kann, die eine Interpretation der Ergebnisse erschweren.

Die erhöhte Phosphatase-1-Aktivität erklärt sich bei gleichzeitiger Überexpression der Phosphatase-1 und des Inhibitor-1 durch die Notwendigkeit zur Aktivierung des Inhibitor-1. Da Inhibitor-1 die Phosphatase-1 nur nach Phosphorylierung an Threonin 35 hemmt (Cohen et al. 1988), kann bei gleichzeitigem Überschuss der beiden Gegenspieler eine erhöhte Phosphatase-1-Aktivität resultieren. Damit unterschieden sich Inhibitor-1 transgene Tiere grundsätzlich von transgenen Tieren, die eine konstitutiv aktive Form des Inhibitor-1 bzw. den Inhibitor-2 überexprimierten (Pathak et al. 2005, Kirchhefer et al. 2005).

4.6 Auswirkungen auf Zielproteine

Die Protein-Konzentration von PLB, MyBPC und TnI war in den Herzen Inhibitor-1 transgener Mäuse nicht verändert. Die MyBPC-Phosphorylierung an Serin 282 und die Phosphorylierung von TnI an Serin 23 und Serin 24 waren ebenfalls nicht verändert. Die Untersuchung der PLB-Phosphorylierung erfolgte sowohl basal nach einfacher Präparation der Herzen als auch im Langendorffmodell. Für die Untersuchungen nach einfacher Präparation wurden die Mäuse mit CO₂ narkotisiert und durch cervikale Dilokation getötet. Hierbei zeigte sich kein Unterschied der PLB-Phosphorylierung an Serin 16.

Für Untersuchungen im Langendorffmodell wurde das Herz freipräpariert und mit begaster, angewärmter Thyrode-Lösung antegrad perfundiert. Die Phosphorylierung an Serin 16 war in diesem Modell unter basalen Bedingungen vermindert. Nach Stimulation mit Isoprenalin kehrte sich das Verhältnis um, und es zeigte sich eine Hyperphosphorylierung. Die Erklärung hierfür dürfte erneut die gleichzeitig erhöhte Konzentration der Phosphatase-1 und des Inhibitors-1 sein. Ohne Stimulation (d.h. ohne Aktivierung des Inhibitors-1) wie im Langendorffmodell unter basalen Bedingungen führt die erhöhte Phosphatase-1-Aktivität zu verminderter PLB-Phosphorylierung. Vergleichbare Ergebnisse zeigten auch Phosphatase-1 überexprimierende Mäuse. Diese hatten bei dreifach erhöhter Phosphatase-1-Expression eine signifikant niedrigere PLB-Phosphorylierung (Carr et al. 2002). Nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin (10^{-6} M) war die PLB-Phosphorylierung im Vergleich zu Wildtypherzen erhöht. Dies stimmte mit Untersuchungen an Inhibitor-1 adenoviral infizierten adulten Rattenkardiomyozyten überein, die bei β -adrenerger Stimulation eine PLB-Hyperphosphorylierung zeigten (El-Armouche et al. 2003). Eine mögliche Erklärung ist die Verstärkerfunktion von Inhibitor-1, welche die basal erhöhte Phosphatase-1-Aktivität überwinden kann.

Widersprüchlich sind jedoch die Daten der Phosphataseaktivitätsmessungen. So zeigten Inhibitor-1 transgene Mäuse auch nach maximaler Isoprenalinstimulation eine hohe Phosphataseaktivität. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Inhibitor-1 nur in bestimmten Kompartimenten der Zelle wirkt und die Phosphataseaktivität im Gesamthomogenat nicht verändert wird. Ähnliche Ergebnisse ergaben Versuche mit Mäusen, die eine konstitutiv aktive Form des Inhibitor-1 überexprimieren. Diese Mäuse zeigten eine erhöhte PLB-Phosphorylierungen, hatten jedoch eine unveränderte TnI und RyR-Phosphorylierung (Pathak et al. 2005). Obwohl es in diesem Punkt eine Übereinstimmung zwischen Inhibitor-1 transgenen Mäusen und Mäusen, die eine konstitutiv aktive Form des Inhibitors-1 überexprimieren gibt, unterscheiden sich diese beiden Modelle deutlich. Ein genauer Vergleich der beiden Modelle folgt weiter unten.

Dass sich die PLB-Phosphorylierungslevel bei einfacher Präparation nicht unterscheiden, könnte auf eine durch die CO₂-Narkose und cervikale Dislokation bedingte unüberschaubare β -adrenerge-Stimulation zurückzuführen sein.

4.7 Morphologische und funktionelle Untersuchungen

Inhibitor-1 transgene Mäuse unterschieden sich äußerlich nicht von ihren Geschwistertieren. Bis zu einem Alter von einem Jahr zeigten sie keine erhöhte Sterblichkeit. Auffällig war, dass sie im Alter von 3 Monaten ein um 14% höheres Herz-zu-Körpergewicht als ihre Wildtypgeschwistertiere hatten. Im Alter von 10 Monaten stieg der Unterschied auf 17% an. Das Herz-zu-Körpergewicht ist ein sensibler und wichtiger Parameter, da murine Herzen ähnlich wie ein menschliches Herz auf eine Einschränkung der Herzfunktion mit der Entwicklung einer Hypertrophie reagieren. Somit könnte das erhöhte Herz-zu-Körpergewicht auf eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion hindeuten.

Um funktionelle Aussagen treffen zu können, wurden 20 Wochen alte Mäuse mittels Echokardiographie untersucht. Die Untersuchung der linksventrikulären Funktion und weiterer hämodynamischer Parameter ist bei Mäusen mittels Katheter möglich. Diese invasive Methode erlaubt jedoch keine wiederholten Untersuchungen um Veränderungen zwischen verschiedenen Zeitpunkten bzw. vor und nach einer Intervention zu untersuchen. Die Echokardiographie eignet sich hierfür als nichtinvasive Untersuchungsmethode, die eine morphologische und funktionelle Charakterisierung von Mäuseherzen erlaubt (Tanaka et al. 1996). Es lassen sich serielle Untersuchungen der linksventrikulären Funktion, Größe und Masse durchführen. Als Messgröße der linksventrikulären Funktion diente die Fractional Area Shortening in der parasternal kurzen Achse. Die Intra- bzw. Interuntersuchervariabilität wird bei dieser Methode in der Literatur mit 10% angegeben. Einzelne Parameter können zwischen verschiedenen einzelnen Mäusen bis zu 25% schwanken, was v.a. auf eine unterschiedliche Narkosetiefe zurückzuführen ist (Collins et al. 2003). Die Aufnahmen zur Berechnung der linksventrikulären Masse wurden ebenfalls im B-Mode gemacht. Die mit dieser Methode berechnete linksventrikuläre Masse zeigte in der Untersuchung von Collins (2003) eine höhere Korrelation als im M-Mode berechnete Werte. In unseren Untersuchungen korrelierten die berechneten Werte mit 0,8 mit dem gewogenen gesamten Herzgewicht. Das Gewicht des linken Ventrikels wurde von uns nicht gewogen. Die Korrelation unterschied sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht.

Die Narkose der Tiere erfolgte zunächst mit Ketamin und Xylazin. Nachdem unter dieser Narkose einige Tiere starben, erfolgte der Umstieg auf eine Isoflurannarkose. Nahezu alle Anästhetika wirken kardiodepressiv. Dies gilt auch für Isofluran. Mäuse neigen aufgrund der hohen Thoraxcompliance (Leith 1976) während einer Narkose zur Atelektasenbildung (Kass et al. 1998). Zusätzlich ist die Sauerstoffbindungskurve bei Mäusen nach rechts verschoben

(Schmidt-Neilsen und Larimer 1958). Diese Faktoren können aufgrund einer möglichen Hypoxie zur kardialen Depression beitragen. Isofluran scheint die beste Wahl zur Narkose zu sein. Die Kardiodepression ist gering und das Schlagvolumen wird kaum herabgesetzt. In einer Konzentration von 1,5% wird auch die Herzfrequenz, die positiv mit dem Schlagvolumen korreliert (Chaves et al. 2001), wenig beeinflusst. Zusätzlich sind Daten unter Isoflurannarkose besser reproduzierbar (Chaves et al. 2001, Roth et al. 2002). Problematisch kann der Einfluss der Isoflurannarkose auf die Sympathikusaktivität sein. FVB/N-Mäuse reagierten mit einem geringeren Anstieg der Herzfrequenz und der Kontraktilität (dP/dt) auf Isoprenalin unter einer Isoflurannarkose verglichen mit einer Ketamin/Inactin-Narkose (Pena und Wolska 2005). Dieser Effekt scheint abhängig vom Mausstamm zu sein und trat bei C57/Bl6 Mäusen, wie wir sie verwendeten, nicht auf.

Wildtyptiere hatten im Alter von 20 Wochen eine Fractional Area Shortening von 52%. Dies entspricht Daten von anderen Arbeitsgruppen (Mor-Avi et al. 1999). Überraschenderweise hatten Inhibitor-1 transgene Mäuse eine signifikant reduzierte linksventrikuläre Funktion. Hierfür sind mehrere Ursachen denkbar.

1. Die erhöhte Phosphatase-1-Aktivität
2. Die Inhibitor-1-Überexpression
3. Die unphysiologisch hohe Inhibitor-1-Konzentration

Es gibt einige Befunde, die für die erhöhte Phosphatase-1-Aktivität als Ursache der kontraktile Dysfunktion sprechen. Die Phosphatase-1-Aktivität ist in insuffizienten menschlichen Herzen erhöht (Neumann et al. 1997). Weiterhin gibt es ein transgenes Mausmodell welches diese These stützt. Transgene Mäuse, die die Phosphatase-1 herzspezifisch überexprimieren, entwickelten im Alter von sechs Monaten eine kardiale Hypertrophie und hatten schon nach drei Monaten eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion (Carr et al. 2002).

Eine wichtige Rolle in der Entstehung der Hypertrophie dürfte dabei die reduzierte PLB-Phosphorylierung und die daraus folgende verstärkte Hemmung der SERCA spielen, welche zu einer verminderten diastolischen Calciumaufnahme in das SR führt. Dazu passend führte ein PLB-Knock-Out, und damit Aufhebung der SERCA-Inhibition, bei Mäusen zu einer gesteigerten Kontraktilität (Luo et al. 1994). Dieses Modell konnte nach Kreuzung mit verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen sogar bei einigen dieser Modelle, jedoch nicht in allen (Kiriazis et al. 2002, Song et al. 2003) die Entstehung einer Herzinsuffizienz verhindern bzw. den Verlauf dieser abschwächen (Sato et al. 2001, Minamisawa et al. 1999, Engelhardt et al. 2004). Brittsan et al. konnten zeigen, dass eine nicht phosphorylierbare PLB-Mutante, und damit verstärkte SERCA-Inhibition, eine Hypertrophie induziert (Brittsan et al. 2000).

Ebenso führte ein Modell mit einem superinhibitorischen PLB zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie (Hagighi et al. 2001). Die verminderte PLB-Phosphorylierung und damit verstärkte Hemmung der SERCA scheint somit als Vermittler zwischen einer erhöhten Phosphatase-1-Aktivität und der Entwicklung einer Hypertrophie bei Mäusen zu stehen. Zu dieser Theorie passt die von uns im Langendorffmodell gefundene reduzierte PLB-Phosphorylierung der Inhibitor-1 transgenen Mäuse, sodass die erhöhte Phosphatase-1-Aktivität als Auslöser der Hypertrophie und eingeschränkten linksventrikulären Funktion möglich erscheint. Aus diesem Modell ergeben sich zwei Therapieansätze. Zum einen die Inhibition von PLB, zum anderen die Überexpression bzw. Verstärkung der SERCA. Ein gentherapeutischer Ansatz zur Inhibition von PLB konnte im Tiermodell die Entwicklung einer Herzinsuffizienz verhindern bzw. abschwächen (Hoshijima et al. 2002, del Monte et al. 2002, Iwanaga et al. 2004). Die Überexpression von SERCA führte im Maus- und Schweinmodell zur Verbesserung der linksventrikulären Funktion in der Herzinsuffizienz (del Monte et al. 2001, Kawase et al. 2007). Da dieser Ansatz im Tiermodell vielversprechende Erfolge zeigte, wurde kürzlich eine klinische Studie bei Herzinsuffizienzpatienten gestartet (Hajjar et al. 2008).

Interessanterweise bestehen, zumindest bezüglich Phospholamban, deutliche Unterschiede zum Menschen. So führt auch im Menschen eine „Gain-of-function“-Mutation von PLB zu einer dilatativen Kardiomyopathie (Haghighi et al. 2004). Andererseits wurde in zwei griechischen Familien eine PLB-Mutation beschrieben, die zum Einbau eines Stopcodons führt. Heterozygote Träger dieser Mutation entwickeln eine Hypertrophie ohne Einschränkung der linksventrikulären Funktion. Bei homozygoten Trägern führt die Mutation bereits im Jugendalter zu einer transplantationspflichtigen dilatativen Kardiomyopathie. Verblüffenderweise ist in diesen explantierten Herzen kein PLB nachzuweisen, sodass von einer Nullmutante mit Aufhebung der SERCA-Inhibition durch PLB auszugehen ist (Haghighi et al. 2003). Das zeigt, dass sich die im Tiermodell erfolgreichen Ideen wahrscheinlich nicht problemlos auf den Menschen übertragen lassen werden.

Für eine Beteiligung von Inhibitor-1 an der Entstehung der Hypertrophie sprechen Untersuchungen mit Inhibitor-1 Knock-out Mäusen. Diese Mäuse haben eine normale Herzfunktion mit erhaltener kontraktile Reserve. Sie zeigen in vitro eine leichte Subsensitivität gegenüber β -adrenerger Stimulation. Nach chronischer Isoprenalininfusion zeigten Inhibitor-1 Knock-out Tiere im Vergleich zu Wildtypgeschwistertieren aber eine deutlich geringere Hypertrophie-Entwicklung und eine geringer ausgeprägte interstitielle Fibrose. Während es bei den Wildtyptieren zu einer kompletten Desensitivierung gegenüber akuter β -adrenerger Stimulation mit Dobutamin kam, war der positiv inotrope Effekt von Dobutamin in den Inhibitor-1 Knock-out Mäusen teilweise erhalten, d.h. das Fehlen von Inhibitor-1 schützte vor der Entwicklung einer Isoprenalin induzierten Hypertrophie und β -

adrenergen Desensitivierung (El-Armouche et al. 2008). Diese Befunde sprechen für eine pathophysiologisch ungünstige Rolle des Inhibitor-1 in der Herzinsuffizienz. Im Umkehrschluss könnte seine Überexpression die Entwicklung einer Hypertrophie begünstigen.

Eine dritte Erklärung wäre die unphysiologisch hohe Expression von Inhibitor-1. Sie könnte unabhängig von der Inhibitor-1 Funktion zur Hypertrophie führen. So konnte gezeigt werden dass transgene Mäuse, die Green Fluorescent Protein (GFP) herzspezifisch überexprimieren, eine dilatative Kardiomyopathie entwickelten (Huang et al. 2000). Interessanterweise war hierbei eine deutliche Abhängigkeit vom Expressionsniveau zu erkennen. Eine Mauslinie, die GFP in geringer Menge exprimierte zeigte keinen Anstieg der Herzgewicht-zu-Körpergewicht-Ratio. Mauslinien die die 10 bis 12-fache Menge exprimierten, entwickelten eine Kardiomyopathie, sodass davon auszugehen ist dass die unphysiologisch hohe Konzentration eines Proteins, unabhängig von seiner physiologischen Rolle zu einer Störung der Zellfunktion, und letztlich zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie führen kann.

4.8 Herzinsuffizienzmodell der chronischen Isoprenalininfusion

Die Auswahl eines geeigneten Tiermodells für die menschliche Herzinsuffizienz ist schwierig. Es gibt kein Tiermodell, das alle Aspekte der menschlichen Herzinsuffizienz abbildet. Die Ätiologie der Herzinsuffizienz ist multifaktoriell und alle experimentellen Modelle haben ihre Grenzen. Zudem bestehen deutliche Unterschiede in der Herz-Kreislaufphysiologie zwischen dem Menschen und der Maus, wie am Beispiel des PLB-Knock-out Modells eindrucksvoll zu sehen ist. Aus verschiedenen Gründen wurde das Modell der durch chronische β -adrenerge Stimulation (Isoprenalin) hervorgerufenen Herzhypertrophie verwendet. Das Modell ist in unserem Labor gut etabliert. Es ist ein technisch einfaches Modell und viele der Veränderungen, die bei der Isoprenalin-induzierten Herzhypertrophie zu beobachten sind, gehen in die gleiche Richtung wie in der menschlichen Herzinsuffizienz. Dies trifft insbesondere auf die Veränderungen in der β -adrenergen Signalkaskade zu.

Die β -Rezeptordichte nimmt ab (Mende et al. 1992). Die inhibitorischen GTP-bindenden Proteine werden vermehrt exprimiert (Eschenhagen et al. 1992, Mende et al. 1992) und der cAMP-Gehalt der Zellen ist vermindert (Stein et al. 1996). Weiterhin kommt es zu einer erhöhten Aktivität von β -Adrenozeptor-Kinasen (Urasawa et al. 1996) und damit zur Entkopplung der β -Rezeptoren vom nachgeschalteten Signalweg. Alle diese Veränderungen sind auch in der menschlichen Herzinsuffizienz zu finden und führen letztlich zur Desensitivierung, sodass der positiv inotrope Effekt von Isoprenalin nach chronischer

Isoprenalininfusion abgeschwächt ist (Stein et al. 1996, Linck et al. 1996). Insbesondere die von uns untersuchte Phosphatasen/Phosphatase-Inhibitor-Achse ähnelt im Modell der chronischen Isoprenalininfusion der menschlichen Herzinsuffizienz. Chronische Isoprenalininfusion führt im Rattenmodell zu einer erhöhten Phosphataseaktivität (Boknik et al. 2000), vergleichbar der menschlichen Herzinsuffizienz. Und die Inhibitor-1-Konzentration war im Modell der chronischen Isoprenalininfusion ebenfalls wie in der menschlichen Herzinsuffizienz erniedrigt (El-Armouche et al. 2007).

Natürlich müssen auch die Limitationen dieses Modells gesehen werden. Die Ätiologie der menschlichen Herzinsuffizienz ist zumeist multifaktoriell (z.B. ischämisch und Hypertonie assoziiert). In vielen Fällen benötigt die Entstehung einer Herzinsuffizienz viele Jahre (z.B. Hypertonus). In anderen Fällen, wie z.B. im Rahmen eines großen Vorderwandinfarkts, entsteht sie innerhalb weniger Tage. Das Modell der chronischen Isoprenalininfusion ist auf einen Faktor beschränkt und kann naturgemäß diese unterschiedlichen Zeitverläufe nicht abbilden. Interessanterweise sind Fälle beschrieben, in welchen bei Herzinsuffizienzpatienten, die zu einer Herztransplantation anstanden, ein Phäochromozytom diagnostiziert wurde. Die Behandlung dieses Tumors verbesserte die Herzfunktion, sodass eine Transplantation nicht mehr nötig war (Imperato-McGinley et al. 1987, Quigg und Om 1994, Brilakis et al. 1999). Dies zeigt, dass unregulierte, hohe Katecholaminkonzentrationen zu einer Herzinsuffizienz führen können, die klinisch nicht von einer Herzinsuffizienz anderer Ätiologie unterschieden werden kann. Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung des Modells der chronischen Isoprenalininfusion als Herzinsuffizienzmodell. Wir wählten eine tägliche Isoprenalindosis von 15 mg Isoprenalin pro Kilogramm Körpergewicht. Dies entspricht einer mittleren Dosierung im Vergleich zu von anderen Arbeitsgruppen verwendeten Dosierungen. In der Literatur sind Dosierungen zwischen 0,3 mg pro kg Körpergewicht (Kudej et al. 1997, Hu et al. 2006) und 100 mg pro kg Körpergewicht beschrieben (Faulx et al. 2005).

Inhibitor-1 transgene Mäuse reagierten auf die chronische Isoprenalininfusion mit einem höheren Anstieg des Herz-zu-Körpergewichts und des Verhältnisses der linksventrikulären Masse zum Körpergewicht als Wildtypiere. Auffällig war hierbei, dass es bei Wildtypieren nur zu einem knapp 10%igen Anstieg kam. Ratten zeigten nach einer chronischen Isoprenalininfusion von 2,4 mg pro kg Körpergewicht einen Anstieg um knapp 40% (El-Armouche et al. 2007) und die Infusion von 0,3 mg Isoprenalin über fünf Tage führte zu einem Anstieg um knapp 30 % (Kudej et al. 1997). Eine mögliche Erklärung des geringen Anstiegs könnte der verwendete Mausstamm sein. C57/Bl6-Mäuse reagierten mit einer deutlich geringer ausgeprägten Hypertrophie auf eine chronische Isoprenalininfusion als ein A/J-Mausstamm. Dies war v.a. auf eine ausgeprägte β -adrenerge Desensitivierung,

ausgelöst durch eine Downregulation der β -Rezeptoren und verminderte AC-Aktivität, zurückzuführen (Faulx et al. 2005).

Diese Daten lassen auf eine pathophysiologisch ungünstige Rolle des Inhibitor-1 in der Herzinsuffizienz schliessen und stehen im Kontrast zu einem Mausmodell, welches eine trunkierte Form des Inhibitors-1 herzspezifisch überexprimiert. Diese transgenen Mäuse waren im Modell der druckinduzierten Herzinsuffizienz geschützt (Pathak et al. 2005). Es gibt jedoch wichtige Unterschiede zwischen dem von uns gewählten Modell und der Überexpression einer trunkierten Form des Inhibitor-1. So ist diese Form konstitutiv aktiv und muss nicht über die PKA aktiviert werden. Der trunkierten Form fehlen die beiden PKC-Phosphorylierungsstellen an Serin 67 und Serin 75. Eine Phosphorylierung an diesen Stellen führte zu einer verminderten Affinität des Inhibitor-1 gegenüber der Phosphatase-1 (Rodriguez et al. 2007). Interessanterweise führte eine verstärkte Phosphorylierung von Inhibitor-1 durch die PKC α zu einer eingeschränkten linksventrikulären Funktion (Braz et al. 2004) und Inhibitor-1 transgene Tiere zeigten eine starke Serin 67-Phosphorylierung. Die PKC wurde von uns nicht weiter untersucht. Eine erhöhte PKC-Aktivität in diesen Tieren könnte allerdings zur Entwicklung der Hypertrophie beitragen. Ein weiterer Unterschied ist die niedrigere Affinität von trunkiertem Inhibitor-1 zur Phosphatase-1 als die der Wildtypform. Dieses Detail mag zuerst unwichtig erscheinen. Es kann jedoch dazu führen, dass trunkierter Inhibitor-1 als partieller Agonist wirkt und die Phosphatase-1 unter basalen Bedingungen inhibiert, unter β -adrenerger Stimulation jedoch mit der Wildtypform von Inhibitor-1 konkurriert und somit die β -adrenerge Stimulation inhibiert (El-Armouche und Eschenhagen 2008). Ein weiterer Unterschied könnte die Wirkung auf verschiedene Zielproteine sein. Es gibt Hinweise, dass die trunkierte Form spezifisch auf PLB wirkt und die Phosphorylierung des RyR nicht beeinflusst (Pathak et al. 2005).

4.9 Ketamin/Xylazin-Narkose

Während der ersten von uns durchgeführten Pumpenimplantationen starben überraschenderweise unter der Narkose mit Ketamin und Xylazin alle Mäuse, die eine mit Isoprenalin gefüllte Pumpe implantiert bekamen innerhalb kurzer Zeit. Dagegen überlebten alle NaCl-Kontrolltiere. EKG-Aufzeichnungen zeigten vermehrt auftretende ventrikuläre Rhythmusstörungen, die letztlich zum Tod führten. Dies stimmt überein mit Beobachtungen, die eine vermehrte Arrhythmogenität unter der kombinierten Gabe von Xylazin, Ketamin und Katecholaminen zeigten (Wright et al. 1987). Da Inhibitor-1 eine Verstärkerfunktion in der β -adrenergen Signalkaskade hat, könnte sein Verlust zu einem Schutz vor diesen Arrhythmien führen. Wir haben deshalb diese Versuche mit Inhibitor-1-Knock-out-Tieren wiederholt. In

dieser Gruppe überlebten 3 von 7 Tieren die Implantation von Isoprenalinpumpen unter der Narkose mit Xylazin und Ketamin. Eine mögliche Erklärung dieser Befunde könnte eine durch den Verlust des Inhibitor-1 bewirkte partielle „interne Beta-Blockade“ sein, welche die Mäuse vor den Rhythmusstörungen schützt. Hierfür spricht, dass Wildtypiere, die mit dem Beta-Blocker Metoprolol vorbehandelt waren, ebenfalls vor tödlichen Arrhythmien geschützt waren (El-Armouche et al. 2008).

Beta-adrenerge-Desensitivierung: Gut oder schlecht?

Eine zentrale Frage ist, ob die Veränderungen der β -adrenergen Signalkaskade, welche in der Herzinsuffizienz gesehen werden, ursächlich für diese sind oder nur eine Folge sind. Verschiedene Argumente sprechen für eine kompensatorische Desensitivierung.

1. Eine chronische Katecholamininfusion führt bei Nagetieren zu einer β -adrenergen Desensitivierung (Osadchii et al. 2007, El-Armouche et al. 2007).
2. Die Desensitivierung der β -adrenergen Signalkaskade ist unabhängig von der Ursache der Herzinsuffizienz (El-Armouche und Eschenhagen 2008).
3. Sie ist umso stärker, je ausgeprägter die Herzinsuffizienzsymptome und damit die Plasmakatecholaminspiegel sind (Engelhardt et al. 1996, Cohn et al. 1984).

Falls die Desensitivierung also eine Reaktion darstellt, führt dies zur nächsten entscheidenden Frage.

Ist dies eine protektive Reaktion vor proarrhythmischen und energieverbrauchssteigernden Effekten der exzessiv erhöhten Katecholamine oder verstärkt sie z.B. über eine verringerte PLB-Phosphorylierung die kontraktile Dyfunktion und ist letztlich sogar schädlich?

Begonnen wurde diese Arbeit mit der Hypothese, dass eine Überexpression von Inhibitor-1 eine positive Wirkung in der Herzinsuffizienz erzielen könnte. Letztlich reihen sich unsere Daten jedoch in eine Anzahl von Befunden ein, welche die Theorie stützen, dass die β -adrenerge Desensitivierung, und damit auch die Down-Regulation des Inhibitor-1 ein protektiver Mechanismus ist. Hierfür spricht zuallererst, dass eine Therapie, welche auf eine Überwindung dieser Desensitivierung angelegt ist (Katecholamine, Phosphodiesteraseinhibitoren), zu einer erhöhten Letalität führt (O'Connor et al. 1999, Feldman et al. 1993, Stevenson et al. 2003), eine Therapie mit Beta-Blockern dagegen langfristig das Überleben und die linksventrikuläre Funktion verbessert (Hall et al. 1995).

Unterstützt wird diese Theorie durch verschiedene Mausmodelle, in welchen Teile der β -adrenergen Signalkaskade überexprimiert bzw. ausgeschaltet wurden (Übersicht in El-Armouche und Eschenhagen 2008). Interessant ist hierbei, dass die Überexpression eines

stimulierenden Elements der β -adrenergen Signalkaskade primär zu einer Hyperkontraktilität führt, langfristig aber zur Ausbildung einer Kardiomyopathie, vermehrten Arrhythmien und einer erhöhten Letalität (El-Armouche und Eschenhagen 2008). Transgene Tiere, die den β 1-Adrenozeptor überexprimieren, zeigten initial eine Hyperkontraktilität, entwickelten aber im Alter eine linksventrikuläre Dysfunktion und kardiale Fibrose (Engelhardt et al. 1999). Transgene Mäuse mit einer herzspezifischen Überexpression des stimulierenden G-Proteins (Gs) reagierten stärker auf eine β -adrenerge Stimulation, verstarben jedoch frühzeitig. Interessanterweise konnte dies durch die Gabe des Beta-Blockers Propranolol verhindert werden (Vatner 2001). Ebenso wirkte sich die Überexpression der Proteinkinase A negativ aus. Diese Tiere hatten eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion und verstarben an Arrhythmien (Antos et al. 2001) bereits nach 3 Monaten. Dass die Entwicklung der kardialen Dysfunktion durch eine β -adrenerge Aktivierung verursacht ist, wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die Effekte durch die Gabe von Propranolol aufgehoben werden konnten (Asai et al. 1999). Neben den Mausmodellen gibt es noch weitere Untersuchungen, die auf einen positiven Effekt der β -adrenergen Desensitivierung deuten. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine gain-of-function-Mutation von GRK5, einem Enzym das über eine Entkopplung des β 1-Rezeptors von der intrazellulären Signalkaskade zu einer Desensitivierung führt, das Überleben von herzinsuffizienten Afro-Amerikanern verlängert (Liggett et al. 2008). Es gibt weiterhin transgene Mausmodelle mit dem Verlust eines aktivierenden Elements der β -adrenergen Signalkaskade. Die Ergebnisse dieser Mausmodelle favorisieren ebenfalls die Idee der Desensitivierung als protektive Reaktion. Adenylylcyclase 5 (AC 5)-Knock-out-Mäuse sind vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz im Modell der chronischen β -adrenergen Stimulation und im Modell der druckinduzierten Herzinsuffizienz geschützt (Okumura et al. 2003, 2007). Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Versuche mit Inhibitor-1-Knock-out-Mäusen, welche vor der Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion nach chronischer Isoprenalininfusion geschützt waren (El-Armouche et al. 2008).

Allerdings führte die Überexpression der Adenylylcyclase 6 (AC 6), eines stimulierenden Elements der β -adrenergen Signalkaskade, zu einer Sensitivierung des Herzens gegenüber kurzfristiger β -adrenerger Stimulation und auch langfristig kam es nicht zur Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion. Sie schützte sogar vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz im Modell der ischämisch bedingten Herzinsuffizienz (Takahashi et al. 2008, Roth et al. 2002). Und ein weiteres transgenes Mausmodell ist auffällig. Die Ausschaltung der GRK2, einer β -Adrenorezeptorkinase, und damit eines inhibierenden Elements der β -adrenergen Signalkaskade, führt zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion und verringert die Mortalität nach einem Myokardinfarkt. Und natürlich sind die bereits oben besprochenen

Ergebnisse der transgenen Mäuse, welche die trunkierte, konstitutiv aktive Form des Inhibitor-1 überexprimierten, zu beachten.

In Zusammenschau dieser Befunde überwiegen jedoch die Daten, die für die β -adrenerge Desensitivierung als protektiven Mechanismus sprechen. Es ist jedoch noch lange nicht geklärt, ob eine partielle interne Beta-Blockade bzw. die Resensitivierung des β -adrenergen Signalweges eine neue therapeutische Option darstellen könnte. Ein Ansatz für eine interne Beta-Blockade wäre der Inhibitor-1. Interessant wären davor weitere Untersuchungen mit konditionell transgenen Tieren, wie sie aktuell in unserem Labor durchgeführt werden. Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt könnte die Hemmung der AC 5 sein. Alternativ wäre eine Resensitivierung der AC 6 denkbar oder möglicherweise ein Ansatz mit dem konstitutiv aktiven Inhibitor-1. Das große Hindernis hierbei ist sicherlich die Notwendigkeit eines gentherapeutischen Ansatzes. Ein solcher Ansatz wäre wichtig, da es aktuell so scheint, als sei das Konzept der neurohumeralen Blockade in der Herzinsuffizienztherapie ausgereizt. So konnte zuletzt eine Studie mit Ivabradin keinen Vorteil in Kombination mit der etablierten Therapie zeigen (Fox et al. 2008). Neue medikamentöse Therapiestrategien sind deshalb notwendig.

5 Zusammenfassung

In der Herzinsuffizienz führt die chronische Erhöhung des Sympathikotonus zur Desensitivierung des β -adrenergen Signalweges, wodurch nachfolgend die Phosphorylierung von regulatorischen Phosphoproteinen verändert wird. Der Phosphorylierungszustand wichtiger Phosphoproteine kann über eine Aktivierung der entsprechenden Kinase oder eine Hemmung der entsprechenden Phosphatase verändert werden. Die Proteinphosphatasen werden unter anderem durch inhibitorische Proteine reguliert. Der Proteinphosphatase-Inhibitor-1 stellt eines dieser inhibitorischen Proteine dar. Inhibitor-1 wird durch die cAMP abhängige Proteinkinase A an Threonin 35 phosphoryliert und hemmt ausschließlich in diesem Zustand die im Herzen vorherrschende Proteinphosphatase-1. Eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase $C\alpha$ ($PKC\alpha$) hat funktionell den gegensinnigen Effekt, d.h. eine Serin 67-Phosphorylierung bewirkt eine Abnahme der Inhibitor-Aktivität. Des Weiteren wird Inhibitor-1 von der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Phosphatase (Calcineurin) an Threonin 35 dephosphoryliert (deaktiviert). Damit könnte Inhibitor-1 als konditionelles, positiv inotropes Element der β -adrenergen Signalkaskade mit einer doppelten endogenen Rückkopplung ($PKC\alpha$ /Calcineurin) wirken. Die Inhibitor-1-Konzentration ist im insuffizienten menschlichen Myokard erniedrigt und seine PKA-Phosphorylierung (Aktivität) reduziert. Dies trägt wahrscheinlich zur β -adrenergen Subsensitivität und Einschränkung der kontraktile Reserve bei. Dies führte uns zur Hypothese, dass eine Erhöhung der Inhibitor-1 Proteinmenge die kontraktile Funktion verbessern und somit einen potentiellen Angriffspunkt in der Therapie der Herzinsuffizienz darstellen könnte.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein transgenes Mausmodell mit herzspezifischer Inhibitor-1 Überexpression etabliert. Folgende Haupeergebnisse wurden erzielt:

1. Es wurden zwei transgene Mauslinien mit 200-300 facher Überexpression von Inhibitor-1 generiert. In diesen Linien waren die Phosphorylierungsstellen an Threonin 35 und Serin 67 intakt. Auffällig waren eine niedrige Threonin 35 und eine hohe Serin 67-Phosphorylierung.
2. Inhibitor-1 transgene Mäuse zeigten eine 2-3-fach erhöhte Phosphatase-1-Konzentration und Aktivität, die wahrscheinlich kompensatorisch war und eine Ursache-Wirkungs Analyse hinsichtlich des Phänotyps erschwerte.
3. Im Langendorffmodell zeigten Inhibitor-1 transgene Mäuse eine verminderte PLB-Phosphorylierung unter basalen Bedingungen und eine erhöhte PLB-Phosphorylierung nach Isoprenalinstimulation (10^{-6} M), was implizierte, dass unter basalen Bedingungen die Phosphatase-1-Aktivität überwog, nach β -adrenerger Stimulation jedoch eine Aktivierung des Inhibitor-1 erfolgte, welche die erhöhte Phosphatase-1-Aktivität überwinden konnte.

Zusammenfassung

4. Inhibitor-1 transgene Mäuse entwickelten im Alter von 3 Monaten spontan eine kardiale Hypertrophie und zeigten eine Einschränkung der linksventrikulären Funktion.
5. Im Modell der chronischen Isoprenalininfusion reagierten Inhibitor-1 transgene Tiere mit einer signifikant höheren Zunahme der Herz-zu-Körpergewichts Ratio.
6. Das Fehlen von Inhibitor-1 in parallel untersuchten Inhibitor-1 Knock-Out Mäusen schützte vor Isoprenalin-induzierten tödlichen Arrhythmien unter einer Ketamin/Xylazin-Narkose.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass eine Inhibitor-1 Überexpression zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und kardialer Dysfunktion führt. Gleichzeitig sensitiviert sie gegenüber Katecholamin-induzierter Hypertrophie, sodass diese Daten gegen eine Überexpression von Wildtyp-Inhibitor-1 zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz sprechen.

6 Literaturverzeichnis

- Aitken A, Bilham T and Cohen P (1982) Complete primary structure of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 126:235-46
- Alder R and Barbas H (1995) Complementary distribution of the phosphoproteins DARPP-32 and I-1 in the cerebellar system. *Neuroreport* 6:2368-72
- Allen PB, Hvalby O, Jensen V, Errington ML, Ramsay M, Chaudhry FA, Bliss TV, Storm-Mathisen J, Morris RG, Andersen P and Greengard P (2000) Protein phosphatase-1 regulation in the induction of long-term potentiation: heterogeneous molecular mechanisms. *J Neurosci* 20:3537-43
- Anker SD, Coats AJ (2002) How to RECOVER from RENAISSANCE? The significance of the results of RECOVER, RENAISSANCE, RENEWAL and ATTACH. *Int J Cardiol.* 2002 Dec;86(2-3):123-30.
- Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, Olson EN (2001). Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res.* 2001 Nov 23;89(11):997-1004.
- Asai K, Yang GP, Geng YJ, Takagi G, Bishop S, Ishikawa Y, Shannon RP, Wagner TE, Vatner DE, Homcy CJ, Vatner SF (1999). Beta-adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic G(salpa) mouse. *J Clin Invest.* 1999 Sep;104(5):551-8.
- Aschenbach WG, Suzuki Y, Breeden K, Prats C, Hirshman MF, Dufresne SD, Sakamoto K, Vilaro PG, Steele M, Kim HJ, Jing SL, Goodyear LJ and DePaoli-Roach AA (2001) The muscle-specific protein phosphatase PP1G/R(GL)(G(M)) is essential for activation of glycogen synthase by exercise. *J Biol Chem* 276:39959-67
- Beddington RS, Morgernstern J, Land H and Hogan A (1989) An in situ transgenic enzyme marker for the midgestation mouse embryo and the visualization of inner cell mass clones during early organogenesis. *Development* 106:37-46
- Berrebi-Bertrand I, Souchet M, Camelin JC, Laville MP, Calmels T, Bril A (1998). Biophysical interaction between phospholamban and protein phosphatase 1 regulatory subunit GM. *FEBS Lett.* 1998 Nov 20;439(3):224-30.
- Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205
- Bers DM (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev. physiol* 70:23-49
- Bibb JA, Nishi A, O'Callaghan JP, Ule J, Lan M, Snyder GL, Horiuchi A, Saito T, Hisanaga S, Czernik AJ, Nairn AC and Greengard P (2001) Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by Cdk5. *J Biol Chem* 276:14490-7
- Böhm M, Gierschik P, Jakobs KH, Pieske B, Schnabel P, Ungerer M and Erdmann E (1990) Increase of Gi alpha in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 82:1249-65
- Boknik P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Luss H, Muller FU, Muller T, Schmitz W, Schroder F and Neumann J (2000) Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:222-31
- Bollen M, DePaoli-Roach AA, Stalmans W (1994). Native cytosolic protein phosphatase-1 (PP-1S) containing modulator (inhibitor-2) is an active enzyme. *FEBS Lett.* 1994 May 16;344(2-3):196-200.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54

Braunwald E. and Bristow MR (2000). "Congestive heart failure: fifty years of progress." *Circulation* 102(20 Suppl 4): IV14-23.

Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Kleivitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG and Molkentin JD (2004) PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 10:248-54

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC and Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307:205-11

Bristow MR, Minobe WA, Reynolds MV, Port JD, Rasmussen R, Ray PE and Feldman AM (1993) Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *J Clin Invest* 92:2737-45

Brittsan AG and Kranias EG (2000) Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol* 32:2131-9

Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing SJ, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoli-Roach AA and Kranias EG (2002) Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 22:4124-35

Carrier L (2007) Cardiac Myosin Binding Protein C in the heart. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2007 100:238-43

Chaves AA, Weinstein DM and Bauer JA (2001) Non-invasive echocardiographic studies in mice: influence of anesthetic regimen. *Life Sci* 69:213-22

Ceulemans H (2004) Functional diversity of protein-phosphatase-1, a cellular economizer and reset button *Physiol Rev.* 2004 Jan; 84(1):1-39

Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ and Rockman HA (1997) Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 272:17223-9

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

Cohen P, Foulkes M, Holmes CF, Nimmo GA and Tonks NK (1988) Protein phosphatase inhibitor-1 and inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol* 159:427-37

Cohen P and Cohen PT (1989) Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem* 264:21435-8

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

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

Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T (1984). Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1984 Sep 27;311(13):819-23.

Coletta A, Thackray S, Nikitin N and Cleland JG (2002) Clinical trials update: highlights of the scientific sessions of The American College of Cardiology 2002: LIFE, DANAMI 2, MADIT-2, MIRACLE-ICD, OVERTURE, OCTAVE, ENABLE 1 & 2, CHRISTMAS, AFFIRM, RACE, WIZARD, AZACS, REMATCH, BNP trial and HARDBALL. *Eur J Heart Fail* 4:381-8

Collins KA, Korcarz CE and Lang RM (2003) Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiol Genomics* 13:227-39

- Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J (2000) Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F400-16
- Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P and Barford D (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J* 16:1876-87
- El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, E Jackel, Harding SE, Boknik P, Neumann J and Eschenhagen T (2003) Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *Faseb J* 17:437-9
- El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O and Eschenhagen T (2004) Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 61:87-93
- El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didie D, Dobrev D and Eschenhagen T (2006) Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346:700-6
- El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh YH, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T and Carrier L (2007) Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 43:223-9
- El-Armouche A, Gocht F, Jaeckel E, Wittköpper K, Peeck M, Eschenhagen T (2007). 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 (2008). Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2008 Dec 1;80(3):396-406.
- Elbrecht A, DiRenzo J, Smith JG and Shenolikar S (1990) Molecular cloning of protein phosphatase inhibitor-1 and its expression in rat and rabbit tissues. *J Biol Chem* 265:13415-8
- Endo S, Zhou X, Connor J, Wang B and Shenolikar S (1996) Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry* 35:5220-8
- Engelhardt S, Böhm M, Erdmann E, Lohse MJ (1996). 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 Jan;27(1):146-54.
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* Jun 8;96(12):7059-64.
- Eriksson H (1995) Heart failure: a growing public health problem. *J Intern Med* 237:135-41
- Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Warnholtz A and Wustel JM (1991) Isoprenaline-induced increase in mRNA levels of inhibitory G-protein alpha-subunits in rat heart. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343:609-15
- Eschenhagen T (2008) Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nat Med* 14:485-7
- Faulx MD, Ernsberger P, Vatner D, Hoffman RD, Lewis W, Strachan R, Hoit BD (2005). Strain-dependent beta-adrenergic receptor function influences myocardial responses to isoproterenol stimulation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Jul;289(1):H30-6.

- Feldman AM, Cates AE, Veazey WB, Hershberger RE, Bristow MR, Baughman KL, Baumgartner WA and Van Dop C (1988) Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart. *J Clin Invest* 82:189-97
- Feldman AM, Bristow MR, Parmley WW, Carson PE, Pepine CJ, Gilbert EM, Strobeck JE, Hendrix GE, Powers ER, Bain RP et al (1993). Effects of vesnarinone on morbidity and mortality in patients with heart failure. Vesnarinone Study Group. *N Engl J Med*. 1993 Jul 15;329(3):149-55.
- Fox K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Ferrari R; BEAUTIFUL Investigators (2008). Ivabradine for patients with stable coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008 Sep 6;372(9641):807-16. Epub 2008 Aug 29.
- Francis GS, Tang WH (2003) Pathophysiology of congestive heart failure. *Rev Cardiovasc Med* 4 Suppl 2:S14-20
- Gaudin C, Ishikawa Y, Wight DC, Mahdavi V, Nadal-Ginard B, Wagner TE, Vatner DE, Homcy CJ (1995). Overexpression of Gs alpha protein in the hearts of transgenic mice. *J Clin Invest*. 1995 Apr;95(4):1676-83.
- Gauthier C, Langin D, Balligand JL (2000) Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci* 21:426-31
- Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W and Neumann J (2004) Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem* 279:40827-34
- Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC, Kuriyan J (1995) Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376:745-53
- Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM, Lesch M, Sabbah HN (1996) Evidence for presence and hormonal regulation of protein phosphatase inhibitor-1 in ventricular cardiomyocyte. *Am J Physiol* 270:H1159-64
- Gupta RC, Mishra S, Rastogi S, Imai M, Habib O, Sabbah HN (2003) 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* 285:H2373-81
- Gustafson EL, Girault JA, Hemmings HC, Nairn AC, Greengard P (1991) Immunocytochemical localization of phosphatase inhibitor-1 in rat brain. *J Comp Neurol* 310:170-88
- Haghighi K, Schmidt AG, Hoit BD, Brittsan AG, Yatani A, Lester JW, Zhai J, Y Kimura, Dorn GW 2nd, MacLennan DH, Kranias EG (2001) Superinhibition of sarcoplasmic reticulum function by phospholamban induces cardiac contractile failure. *J Biol Chem*. 2001 Jun 29;276(26):24145-52.
- Haghighi K, Kolokathis F, Pater L, Lynch RA, Asahi M, Gramolini AO, Fan GC, Tsiapras D, Hahn HS, Adamopoulos S, Liggett SB, Dorn GW 2nd, MacLennan DH, Kremastinos DT, Kranias EG (2003) Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest*. 2003 Mar;111(6):869-76.
- Haghighi K, Gregory KN, Kranias EG (2004) Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase-phospholamban interactions and dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Oct 1;322(4):1214-22. Review.
- Hall SA, Cigarroa CG, Marcoux L, Risser RC, Grayburn PA, Eichhorn EJ (1995) Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with beta-adrenergic blockade. *J Am Coll Cardiol*. Apr;25(5):1154-61.

- Hasenfuss G (1998) Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 37:279-89
- Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *Faseb J* 4:2881-9
- Hemmings HC, Girault JA, Nairn AC, Bertuzzi G and Greengard P (1992) Distribution of protein phosphatase inhibitor-1 in brain and peripheral tissues of various species: comparison with DARPP-32. *J Neurochem* 59:1053-61
- Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D (1993a) Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 88:107-15
- Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D (1993b) The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 22:6A-13A
- Hu A, Jiao X, Gao E, Koch WJ, Sharifi-Azad S, Grunwald Z, Ma XL, Sun JZ (2006). Chronic beta-adrenergic receptor stimulation induces cardiac apoptosis and aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury by provoking inducible nitric-oxide synthase-mediated oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Aug;318(2):469-75.
- Huang FL and Glinsmann WH (1976) Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 70:419-26
- Huang HB, Horiuchi A, Watanabe T, Shih SR, Tsay HJ, Li HC, Greengard P and Nairn AC (1999) Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem* 274:7870-8
- Huang, J. Aramburu, Douglas PS and Izumo S (2000) Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 6:482-3
- Hubbard MJ, Cohen P (1989). Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle. 2. Catalytic subunit translocation is a mechanism for reversible inhibition of activity toward glycogen-bound substrates. *Eur J Biochem.* Dec 22;186(3):711-6.
- Iaccarino G, Keys JR, Rapacciuolo A, Shotwell KF, Lefkowitz RJ, Rockman HA and Koch WJ (2001) Regulation of myocardial betaARK1 expression in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing alpha1B-adrenergic receptors. *J Am Coll Cardiol* 38:534-40
- Iyer RB, Koritz SB and Kirchberger MA (1988) A regulation of the level of phosphorylated phospholamban by inhibitor-1 in rat heart preparations in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 55:1-6
- Jhund PS, Macintyre K, Simpson CR, Lewsey JD, Stewart S, Redpath A, Chalmers JW, Capewell S, McMurray JJ (2009) Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. *Circulation* 2009 Feb 3;119(4):515-23
- Kass DA, Hare JM, Georgakopoulos D (1998) Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circ Res* 82:519-22
- Kaupp UB, Seifert R (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82:769-824
- Kirchhefer U, Baba HA, Boknik P, Breeden KM, Mavila N, Bruchert N, Justus I, Matus M, Schmitz W, Depaoli-Roach AA, Neumann J (2005) Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase inhibitor-2. *Cardiovasc Res* 68:98-108
- Kiriazis H, Sato Y, Kadambi VJ, Schmidt AG, Gerst MJ, Hoit BD, Kranias EG (2002). Hypertrophy and functional alterations in hyperdynamic phospholamban-knockout mouse hearts under chronic aortic stenosis. *Cardiovasc Res.* Feb 1;53(2):372-81.
- Kranias EG and Di Salvo J (1986) A phospholamban protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261:10029-32

- Krayenbuehl HP, Hess OM, Schneider J and Turina M (1983) Physiologic or pathologic hypertrophy. *Eur Heart J* 4 Suppl A:29-34
- Kudej RK, Iwase M, Uechi M, Vatner DE, Oka N, Ishikawa Y, Shannon RP, Bishop SP, Vatner SF (1997). Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 1997 Oct;29(10):2735-46.
- Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH (2000) Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res* 86:51-8
- Lai NC, Roth DM, Gao MH, Tang T, Dalton N, Lai YY, Spellman M, Clopton P, Hammond HK (2004). Intracoronary adenovirus encoding adenylyl cyclase VI increases left ventricular function in heart failure. *Circulation.* 2004 Jul 20;110(3):330-6.
- Leith DE (1976) Comparative mammalian respiratory mechanics. *Physiologist* 19:485-510
- Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A, Dorn GW 2nd (2000). Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation.* 2000 Apr 11;101(14):1707-14.
- Liggett SB, Cresci S, Kelly RJ, Syed FM, Matkovich SJ, Hahn HJ, Diwan A, Martini JS, Sparks L, Parekh RR, Spertus JA, Koch WJ, Kardia SL, Dorn GW 2nd (2008) A GRK5 polymorphism that inhibits beta-adrenergic receptor signaling is protective in heart failure. *Nat Med.* 2008 May;14(5):510-7.
- Linck B, Boknik P, Eschenhagen T, Muller FU, Neumann J, Nose M, Jones LR, Schmitz W and Scholz H (1996) Messenger RNA expression and immunological quantification of phospholamban and SR-Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 31:625-32
- Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschmann T, Kranias EG (1994) Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation *Circ Res* 75:401-409
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003) What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93:896-906
- Lowenstein PR, Shering AF, MacDougall LK, Cohen P (1995) Immunolocalisation of protein phosphatase inhibitor-1 in the cerebral cortex of the rat, cat and ferret. *Brain Res* 676:80-92
- MacDougall LK, Campbell DG, Hubbard MJ, Cohen P (1989) 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* 1010:218-26
- MacDougall LK, Jones LR, Cohen P (1991) Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 196:725-34
- MacLennan DH, Kranias EG (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:566-77
- Maier LS and Bers DM (2002) Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34:919-39
- Mende U, Eschenhagen T, Geertz B, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J, Sempell R, Steinfath M (1992) Isoprenaline-induced increase in the 40/41 kDa pertussis toxin substrates and functional consequences on contractile response in rat heart. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345:44-50
- Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross Jr J, Kranias EG, Giles WR, Chien KR (1999) Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell.* 1999 Oct 29;99(3):313-22.

- Mor-Avi V, Korcarz C, Fentzke RC, Lin H, Leiden JM, Lang RM (1999) Quantitative evaluation of left ventricular function in a Transgenic Mouse model of dilated cardiomyopathy with 2-dimensional contrast echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 1999 Mar;12(3):209-14.
- Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC, Watanabe AM (1991). Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res* 69:1450-7
- Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997) Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29:265-72
- Neumann J, Schmitz W, Scholz H, von Meyerinck L, Döring V, Kalmar P (1988) Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. *Lancet* Oct 22;2(8617):936-7.
- Ng W (1991) Cardiac myosin heavy chain mRNA and myocardial function in the mouse heart *Circ Res.* 1991 Jun; 68 (6):1742-50.
- Okumura S, Takagi G, Kawabe J, Yang G, Lee MH, Hong C, Liu J, Vatner DE, Sadoshima J, Vatner SF, Ishikawa Y (2003) Disruption of type 5 adenylyl cyclase gene preserves cardiac function against pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Aug 19;100(17):9986-90.
- Okumura S, Vatner DE, Kurotani R, Bai Y, Gao S, Yuan Z, Iwatsubo K, Ulucan C, Kawabe J, Ghosh K, Vatner SF, Ishikawa Y (2007) Disruption of type 5 adenylyl cyclase enhances desensitization of cyclic adenosine monophosphate signal and increases Akt signal with chronic catecholamine stress. *Circulation.* 2007 Oct 16;116(16):1776-83.
- Osadchii OE (2007) Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail Rev.* 2007 Mar;12(1):66-86. Epub 2007 Mar 27. Review.
- Packer M, Califf RM, Konstam MA, Krum H, McMurray JJ, Rouleau JL, Swedberg K (2002) Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE). *Circulation* 106:920-6
- Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz JE, Lorenz JN, Bodi I, Weiser D, Hahn H, Carr AN, Syed F, Mavila N, Jha L, Qian J, Marreez Y, Chen G, McGraw DW, Heist EK, Guerrero JL, DePaoli-Roach AA, Hajjar RJ, Kranias EG (2005) Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ Res* 96:756-66
- Pearson TA (1999) Cardiovascular disease in developing countries: myths, realities, and opportunities. *Cardiovasc Drugs Ther* 13:95-104
- Pena JR, Wolska BM (2005) Differential effects of isoflurane and ketamine/inactin anesthesia on cAMP and cardiac function in FVB/N mice during basal state and beta-adrenergic stimulation. *Basic Res Cardiol* 100:147-53
- Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Køber L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM (2003) Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial Investigators. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med.* 2003 Nov 13;349(20):1893-906.
- Pierre S, Eschenhagen T, Geisslinger G, Scholich K. P (2009) Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Apr;8(4):321-35. Review. PMID: 19337273
- Rodriguez P, Mitton B, Nicolaou P, Chen G, Kranias EG (2007) Phosphorylation of Human Inhibitor-1 at Ser-67 and/or Thr-75 Attenuates the Stimulatory Effects of Protein Kinase A-

Signaling in Cardiac Myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* Jul;293(1):H762-9.

Roth DM, Swaney JS, Dalton ND, Gilpin EA, Ross J (2002) Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H2134-40

Roth DM, Bayat H, Drumm JD, Gao MH, Swaney JS, Ander A, Hammond HK (2002) Adenylyl cyclase increases survival in cardiomyopathy. *Circulation*. 2002 Apr 23;105(16):1989-94.

Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S (1993) Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75:977-84

Sahin B, Shu H, Fernandez J, El-Armouche A, Molkenin JD, Nairn AC, Bibb JA (2006) Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by protein kinase C. *J Biol Chem*

Sasaki K, Shima H, Kitagawa Y, Irino S, Sugimura T, Nagao M (1990) 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* 81:1272-80

Sato Y, Kiriazis H, Yatani A, Schmidt AG, Hahn H, Ferguson DG, Sako H, Mitarai S, Honda R, Mesnard-Rouiller L, Frank KF, Beyermann B, Wu G, Fujimori K, Dorn GW 2nd, Kranias EG (2001). Rescue of contractile parameters and myocyte hypertrophy in caldesmon overexpressing myocardium by phospholamban ablation. *J Biol Chem*. Mar 23;276(12):9392-9.

Schluter KD, Zhou XJ, Piper HM (1995) Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-beta in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* 269:C1311-6

Schmidt-Neilsen K, Larimer JL (1958) Oxygen dissociation curves of mammalian blood in relation to body size. *Am J Physiol* 195:424-8

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

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

Solaro RJ (2008) Review focus series: sarcomeric proteins as key elements in integrated control of cardiac function *Cardiovasc Res*. 2008 Mar 1;77(4):616-8

Song Q, Schmidt AG, Hahn HS, Carr AN, Frank B, Pater L, Gerst M, Young K, Hoit BD, McConnell BK, Haghighi K, Seidman CE, Seidman JG, Dorn GW 2nd, Kranias EG (2003). Rescue of cardiomyocyte dysfunction by phospholamban ablation does not prevent ventricular failure in genetic hypertrophy. *J Clin Invest*. Mar;111(6):859-67.

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. Nov 5;98(3):503-17.

Steenart NA, Ganim JR, Di Salvo J and Kranias EG (1992) The phospholamban phosphatase associated with cardiac sarcoplasmic reticulum is a type 1 enzyme. *Arch Biochem Biophys* 293:17-24

Stein B, Bartel S, Kirchhefer U, Kokott S, Krause EG, Neumann J, Schmitz W, Scholz H (1996). Relation between contractile function and regulatory cardiac proteins in hypertrophied hearts. *Am J Physiol*. 1996 Jun;270(6 Pt 2):H2021-8.

Stevenson LW (2003) Clinical use of inotropic therapy for heart failure: looking backward or forward? Part II: chronic inotropic therapy. *Circulation*. 2003 Jul 29;108(4):492-7. Review.

Stewart S, MacIntyre K, Capewell S and McMurray JJ (2003) Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century? *Heart* 89:49-53

- Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J (1991) Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1991 Dec 25;266(36):24613-20
- Suzuki Y, Lanner C, Kim JH, Vilardo PG, Zhang H, Yang J, Cooper LD, Steele M, Kennedy A, Bock CB, Scrimgeour A, Lawrence JC, DePaoli-Roach AA (2001) Insulin control of glycogen metabolism in knockout mice lacking the muscle-specific protein phosphatase PP1G/RGL. *Mol Cell Biol* 21:2683-94
- Tada M, Yabuki M, Toyofuku T (1998) Molecular regulation of phospholamban function and gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 853:116-29
- Takahashi T, Tang T, Lai NC, Roth DM, Rebolledo B, Saito M, Lew WY, Clopton P, Hammond HK (2006) Increased cardiac adenylyl cyclase expression is associated with increased survival after myocardial infarction *Circulation.* 2006 Aug 1;114(5):388-96.
- Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, Hunter JJ, Chien KR, Ross J Jr (1996) Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation.* 1996 Sep 1;94(5):1109-17.
- Teerlink JR (2002) The development of new medical treatments for acute decompensated heart failure. *Heart Fail Monit.* 2002;2(4):129-37
- Turki J, Lorenz JN, Green SA, Donnelly ET, Jacinto M, Liggett SB (1996) Myocardial signaling defects and impaired cardiac function of a human beta 2-adrenergic receptor polymorphism expressed in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 17;93(19):10483-8.
- Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ (1993) Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87:454-63
- Urasawa K, Yoshida I, Takagi C, Onozuka H, Mikami T, Kawaguchi H, Kitabatake A (1996) Enhanced expression of beta-adrenergic receptor kinase 1 in the hearts of cardiomyopathic Syrian hamsters, BIO53.58. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Feb 6;219(1):26-30.
- Vornanen M (1992) Maximum heart rate of soricine shrews: correlation with contractile properties and myosin composition. *Am J Physiol* 262:R842-51
- Weber MA (2001) Vasopeptidase inhibitors. *Lancet* 358:1525-32
- Wright M, Heath RB, Wingfield WE (1987) Effects of xylazine and ketamine on epinephrine-induced arrhythmia in the dog. *Vet Surg.* 1987 Sep-Oct;16(5):398-403.

7 Anhang

7.1 Ergebnistabellen des Modells der chronischen Isopranlaininfusion

Nr.	Alter (W.)	G.	LVM (mg)	HG (mg)	KG (g)	LVM/KG (mg/g)	HG/KG (mg/g)	FAS (%)	HF (S/min)
227	17	f	113	141	27,3	4,1	5,2	55	490
229	17	f	108	122	26,1	4,1	4,7	49	454
234	17	m	135	188	35,7	3,8	5,3	52	517
251	21	m	137	183	34,5	4,0	5,3	24	545
233	17	m	103	160	34,3	3,0	4,7	45	467
65	18	f	83	125	26,5	3,1	4,7	50	447
66	18	m	117	157	32,3	3,6	4,9	47	451
78	18	m	147	153	30,5	4,9	5,0	40	483

Tabelle 7.1.1 Wildtyp (NaCl)

Nr.	Alter (W.)	G.	LVM (mg)	HG (mg)	KG (g)	LVM/KG (mg/g)	HG/KG (mg/g)	FAS (%)	HF (S/min)
230	17	f	122	161	26,7	4,6	6,0	48	480
231	17	f	101	131	26,8	3,8	4,9	55	576
236	17	m	131	186	33,6	3,9	5,5	47	580
250	21	m	148	185	33,5	4,4	5,5	44	476
47	18	f	108	139	26,1	4,1	5,3	58	560
50	18	f	122	135	31,9	3,8	4,2	53	521
1	18	m	125	196	31,7	3,9	6,2	31	447

Tabelle 7.1.2 Wildtyp (Isoprenalin $10^{-6} M$)

Nr.	Alter (W.)	G.	LVM (mg)	HG (mg)	KG (g)	LVM/KG (mg/g)	HG/KG (mg/g)	FAS (%)	HF (S/min)
237	17	f	92	113	21,7	4,3	5,2	45	491
239	17	f	124	137	26,6	4,7	5,1	57	480
259	19	m	118	155	28,3	4,2	5,5	42	480
258	19	m	164	171	30,2	5,4	5,7	50	465
252	21	m	114	149	27,2	4,2	5,5	30	545
249	23	f	103	121	24,6	4,2	4,9	45	468
39	18	f	83	112	23,4	3,6	4,8	35	427

44	18	m	114	161	31,6	3,6	5,1	39	560
45	18	m	106	170	32,5	3,3	5,2	39	521
42	18	m	118	168	29,4	4,0	5,7	35	447
49	18	f	91	122	29,0	3,2	4,2	50	504
56	18	f	138	161	26,7	5,1	6,0	43	483
67	18	f	111	173	28,3	3,9	6,1	42	483

Tabelle 7.1.3 Inhibitor-1 transgen (NaCl)

Nr.	Alter (W.)	G.	LVM (mg)	HG (mg)	KG (g)	LVM/KG (mg/g)	HG/KG (mg/g)	FAS (%)	HF (S/min)
235	17	m	141	167	31,2	4,5	5,4	47	576
241	17	f	121	141	24,3	5,0	5,8	40	530
246	23	m	138	185	27,7	5,0	6,7	50	571
260	19	m	136	159	27,5	5,0	5,8	39	483
248	23	f	120	156	28,6	4,2	5,5	49	420
43	18	m	137	176	28,4	4,8	6,2	51	560
46	18	f	109	150	26,1	4,2	5,8	41	545
40	18	f	129	198	29,4	4,4	6,7	43	504
53	18	m	146	180	29,8	4,9	6,0	48	508
247	23	f	125	178	26,5	4,7	6,7	45	476

Tabelle 7.1.4 Inhibitor-1 transgen (Isoprenalin 10^{-6} M)

7.2 Ergebnistabellen des Herz-zu-Körpergewichtverhältnis nach 10 Monaten

Nr.	Alter (W.)	Genotyp	Geschlecht	HG (mg)	KG (g)	HG/KG (mg/g)
183	46	WT	m	179	45,7	3,9
184	46	WT	m	195	45,3	4,3
185	46	WT	m	200	47,2	4,2
218	40	WT	m	169	44,1	3,8
223	40	WT	m	174	41,2	4,2
46	65	WT	f	163	40,4	4,0
73	65	WT	f	153	40,3	3,8
75	63	WT	f	153	37,3	4,1

Tabelle 7.2.1 Wildtyp (10-12 Monate)

Nr.	Alter (W.)	Genotyp	Geschlecht	HG (mg)	KG (g)	HG/KG (mg/g)
219	40	TG	m	175	33,6	5,2
220	40	TG	m	162	32,8	4,9
221	40	TG	m	175	37,6	4,6
222	40	TG	m	192	36,6	5,2
142	51	TG	m	185	39,5	4,7
145	51	TG	m	193	37,5	5,1
147	51	TG	m	206	39,5	5,2

7	51	TG	f	138	30,5	4,5
9	51	TG	f	150	33,4	4,5
8	51	TG	f	113	26,6	4,2
10	51	TG	m	194	40,7	4,8
11	51	TG	m	191	40,9	4,7
4	51	TG	f	143	35,4	4,0
6	51	TG	m	154	33,3	4,6

Tabelle 7.2.1 Inhibitor-1 transgen (10-12 Monate)

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Eschenhagen danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Ganz besonders möchte ich Herrn PD Dr. Ali El-Armouche für seine engagierte, motivierende und immer freundliche, fachliche und persönliche Unterstützung während der gesamten Dissertation danken.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und die fachliche Unterstützung. Jutta Starbatty danke ich für die Einarbeitung im Labor und insbesondere für die herzliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe.

Bei meinen Mitdoktoranten möchte ich mich für die Hilfe im Labor bedanken, insbesondere Jasmin Singh danke ich für die Zusammenarbeit und Unterstützung während der gemeinsamen Laborzeit.

Meinen Eltern danke ich für Ihre großartige Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Meinen Brüdern fürs Lesen, Loben, Kritisieren und Beraten.

Nicole danke ich für alles. Ohne sie: gar nichts.

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: