

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie  
Zentrum für Experimentelle Medizin

Prof. Dr. med. T. Eschenhagen

## **Generierung und kardiovaskuläre Phänotypisierung einer transgenen Mauslinie, die die Phosphodiesterase-2A unter Kontrolle eines herzspezifischen Promotors überexprimiert**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von  
Fabian Johannes Brunner  
aus Hamburg

Hamburg 2011

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.10.2011**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:** Prof. Dr. T. Eschenhagen

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:** Prof. Dr. A. El-Armouche

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:** Prof. Dr. S. Baldus

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.2	Klinik der Herzinsuffizienz	1
1.3	Physiologie der Herzfunktion	3
1.3.1	Elektromechanische Kopplung	4
1.3.2	$\beta$ -adrenerge Signalkaskade	4
1.3.3	cGMP als intrazellulärer Botenstoff	8
1.3.4	Veränderungen während der Herzinsuffizienz	8
1.4	Phosphodiesterasen	9
1.4.1	Überblick	9
1.4.2	Phosphodiesterase-2	12
1.5	Transgene Mausmodelle	14
1.6	Zielsetzung	15
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Generierung PDE2A-transgener Mäuse	16
2.2	Gelelektrophorese	17
2.3	Genotypisierung	17
2.3.1	Isolierung genomischer DNA	17
2.3.2	Genotypisierung mittels Southern-Blot	18
2.3.3	Genotypisierung mittels PCR	19
2.4	Restriktionsverdau von DNA	19
2.5	Klonierung	20
2.5.1	Herstellung von Agarplatten und LB-Medium	20

---

2.5.2	Ligation	20
2.5.3	Transformation von Plasmid-DNA	20
2.5.4	Animpfen einer Schüttelkultur für eine Mini-Plasmidpräparation	21
2.5.5	Mini-Plasmidpräparation	21
2.5.6	Maxi-Plasmidpräparation mittels Ionenaustauscher-Säule	22
2.5.7	Transfektion von HEK-293-Zellen	22
2.6	Implantation osmotischer Minipumpen	23
2.7	Organentnahme	24
2.8	RNA-Analysen	24
2.8.1	Isolation von RNA	24
2.8.2	Reverse Transkription	25
2.8.3	Quantitative <i>realtime</i> -PCR	26
2.8.4	Klassische RT-PCR	28
2.9	Proteinanalytische Methoden	28
2.9.1	Proteinisolation aus Geweben	28
2.9.2	Proteinbestimmung nach Bradford	28
2.9.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.9.4	Western-Blot-Analyse	29
2.10	Echokardiographie	30
2.11	Statistische Auswertung	32
2.12	Verwendete Materialien	33
2.12.1	PCR-Primer und Bedingungen	33
2.12.2	Antikörper	39
2.12.3	Substanzen	39
2.12.4	Hilfsmittel und Geräte	41

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
3.1	Chronisches Isoprenalin-Stressmodell der Maus	43
3.2	Generierung PDE2A2-transgener Mauslinien	45
3.3	Analyse des PDE2A-mRNA-Gehalts	50
3.4	Untersuchung der PDE2A auf Proteinebene	51
3.4.1	Klonierung der PDE2A-HA in einen Expressionsvektor	51
3.4.2	Analyse der PDE2A-Proteinmenge	52
3.5	Organspezifische Expression der PDE2A	54
3.6	Gravimetrische Untersuchung der PDE2A-TG Mäuse	56
3.7	Echokardiographische Untersuchungen	57
3.8	Analyse kardialer Ca <sup>2+</sup> -regulierender Proteine	60
3.8.1	Proteingehalt und Phosphorylierung von Phospholamban	60
3.8.2	Analyse des SERCA2a-Proteingehalts	61
3.8.3	Proteingehalt und Phosphorylierung von Troponin I	62
3.9	Analyse charakteristischer Hypertrophie-Signalwege	63
3.10	mRNA-Analysen der PDE2A-TG	64
3.11	Generierung einer weiteren PDE2A2-transgenen Linie	66
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1	Hauptergebnisse	68
4.2	Dysregulation der PDEs	69
4.3	Generierung und Identifizierung PDE2A-transgener Mäuse	71
4.4	Expressionsnachweis	75
4.5	Echokardiographische Untersuchungen	76
4.6	Molekularbiologische Phänotypisierung	80
4.7	Ausblick	82

---

4.8	Nachträgliche Anmerkung	82
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>100</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>102</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>103</b>
10.1	Echokardiographische Parameter	103
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>104</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Herzinsuffizienz**

Die Herzinsuffizienz zählt zu einer der häufigsten internistischen Erkrankungen. Prävalenz und Inzidenz sind stark altersabhängig. Die Rate der Neuerkrankungen lag bis zum Jahre 1990 bei 10 bis 40 pro 10.000 Einwohner und ist stetig auf mehr als 75 pro 10.000 gestiegen (McMurray und Stewart 2000). Allein in Deutschland wurden im Jahr 2006 über 300.000 Patienten auf Grund einer Herzinsuffizienz stationär aufgenommen. Somit stellte die Herzinsuffizienz in diesem Jahr, gefolgt von Angina pectoris Beschwerden, den häufigsten Grund für eine Krankenhauseinweisung dar (Statistisches Bundesamt 2008). Generell sind Erkrankungen des Kreislaufsystems die führende Todesursache in Deutschland. Im Jahr 2008 starben knapp 360.000 Menschen am Versagen des Herz-Kreislaufsystems. Ursächlich war im selben Jahr die Herzinsuffizienz mit fast 50.000 Sterbefällen auf Platz drei hinter dem akuten Myokardinfarkt mit über 55.000 und der chronisch ischämischen Herzerkrankung mit mehr als 70.000 Fällen zu verzeichnen (Statistisches Bundesamt 2010). Die klinische Prognose einer Herzinsuffizienz nimmt mit zunehmendem Alter deutlich ab. Allerdings sind seit Mitte der neunziger Jahre, wahrscheinlich durch eine verbesserte pharmakologische Therapie, die Todesfälle ebenso wie die Anzahl der Krankenhauseinweisungen auf Grund einer Herzinsuffizienz rückläufig. Auch das mittlere Überleben bei einer Herzinsuffizienz ist im Jahr 2003, verglichen mit dem Jahr 1986, von unter 1,5 Jahren um bis zu einem Jahr angestiegen (Jhund et al. 2009). Die allerdings generell noch immer schlechte klinische Prognose, das zunehmende Alter unserer Gesellschaft und die Wahrscheinlichkeit eines weiteren Anstiegs dieser Erkrankung machen die Notwendigkeit einer tiefgreifenden Erforschung der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und einer Entwicklung neuer Therapieoptionen deutlich.

## **1.2 Klinik der Herzinsuffizienz**

Eine Herzinsuffizienz liegt vor, wenn das Herz nicht mehr in der Lage ist, das Gewebe ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen, um den peripheren Stoffwechsel

in Ruhe und unter Belastung sicherzustellen. Klinisch auffällig werden erkrankte Patienten unter anderem durch Atemnot, verminderte Belastbarkeit und Flüssigkeitsretention (Aktories et al. 2009). Als Auslöser für eine solche Schwäche des Herzmuskels kommen verschiedene Ursachen in Betracht: eine koronare Herzerkrankung, Hypertonie, genetisch bedingte Kardiomyopathie, diverse Klappenvitien und weitere mehr (McKee et al. 1971; McMurray und Stewart 2000). All diese verschiedenen Grunderkrankungen können über ihre gemeinsame Endstrecke zu dem Syndrom der Herzinsuffizienz führen. Die entstehende Minderversorgung führt zu einer neurohumoralen Aktivierung, die akut darauf abzielt, den Blutdruck zu erhöhen und den kardialen Auswurf zu steigern, um eine adäquate Sauerstoffversorgung des Organismus sicherzustellen. Als wichtigste Transmitter sind hierbei Noradrenalin und Adrenalin sowie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) zu nennen. Durch die chronische adrenerge Überaktivierung des Herzmuskels kommt es langfristig allerdings zu einem verminderten Ansprechen des Herzmuskelgewebes auf Katecholamine. Die Belastbarkeit des Patienten nimmt weiterhin ab. In Verbindung mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und der gestiegenen Nachlast kommt es zur Hypertrophie des Herzmuskels, apoptotischen Vorgängen im Myokard und Fibrose (El-Armouche und Eschenhagen 2009). Ebenso führt die Aktivierung des RAAS zu einem fibrotischen Umbau des kranken Herzens und in dessen Folge zu einer stetig nachlassenden kardialen Leistung (Ma et al. 2010). In der Summe führen diese Veränderungen zu einem immer weiter fortschreitenden kardialen Funktionsverlust, so dass ein *Circulus vitiosus* mit einer stetig abnehmenden Kontraktilität erreicht wird (El-Armouche und Eschenhagen 2009).

Die klinische Einteilung der Herzinsuffizienz erfolgt anhand der Leistungsfähigkeit des Patienten nach der Klassifikation der *New York Heart Association* (NYHA) in die Stadien I bis IV. Die Therapie der Herzinsuffizienz stützt sich abhängig vom Stadium auf die Anwendung von ACE-Inhibitoren bzw. Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten,  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten, Diuretika und Aldosteron-Antagonisten. Herzglykoside kommen in niedrigen Serumspiegeln zum Einsatz (Aktories et al. 2009). Die intuitiv richtige Idee zum Einsatz cAMP-erhöhender (zyklisches Adenosinmonophosphat; siehe Kap. 1.3.2) und somit positiv inotrop wirkender Substanzen wie Inhibitoren der

Phosphodiesterasen (PDEs) oder Sympathomimetika erhöht langfristig die Sterblichkeit und ist daher nur akut im Rahmen eines kardiogenen Schocks indiziert (aktuelle Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie). Die Empfehlung zum Verzicht auf eine dauerhafte Therapie mit PDE-Inhibitoren leitet sich unter anderem aus der *Prospective Randomized Milrinone Survival Evaluation* (PROMISE) Studie ab. In dieser Untersuchung wurde die Gabe des PDE3-Inhibitors Milrinon bei Patienten im Stadium NYHA III und IV untersucht. Nach sechs Monaten zeigten sich eine erhöhte allgemeine Sterblichkeit um 28% und ein Anstieg der kardiovaskulär bedingten Sterblichkeit um 34%. In keiner Untergruppe konnte ein Überlebensvorteil beobachtet werden (Packer et al. 1991).

### 1.3 Physiologie der Herzfunktion

Im gesunden Herzen wird die autonome Fähigkeit zur rhythmischen Kontraktion vom Sinusknoten dominiert. Verschiedene Ionenkanäle sorgen für eine diastolische Depolarisation. Die wahrscheinlich wichtigsten sind die HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels*). Dies sind nichtselektive Kationenkanäle, die durch Hyperpolarisation aktivierbar sind und somit durch die Repolarisation der Zellmembran immer wieder neue Aktionspotenziale generieren können. Die im Sinusknoten vorherrschende Isoform ist der HCN4-Kanal. (Überblicke in Boyett 2009 und Verkerk et al. 2009). Die Aktionspotenziale breiten sich anschließend über den AV-Knoten und das His-Purkinje-System auf das Arbeitsmyokard aus. Die Zellen des Arbeitsmyokards sind durch Poren, die von speziellen Proteinkomplexen gebildet werden, zu einem funktionellen Synzytium vereint und ermöglichen dadurch eine gerichtete Pumpaktion. In neueren Studien gibt es Hinweise darauf, dass diese Schrittmacherfunktion auch durch oszillierende rhythmische  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in den Zellen des Sinusknoten beeinflussbar ist (Überblick in Lakatta et al. 2010). Des Weiteren ist die autonome Herzaktion über das vegetative Nervensystem modulierbar.

### 1.3.1 Elektromechanische Kopplung

Die Möglichkeit aus einer Änderung des Membranpotenzials der Kardiomyozyten eine mechanische Kontraktion zu generieren, wird als elektromechanische Kopplung beschrieben. Dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion kommt hierbei als Mediator eine entscheidende Bedeutung zu (Übersicht in Bers 2002). Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) dient als intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung erfolgt dort primär durch Calsequestrin (CSQ). Während des Aktionspotenzials strömt zunächst über aktivierte L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (LTCC) der transversalen Tubuli  $\text{Ca}^{2+}$  in das Zellinnere. Hier bindet das  $\text{Ca}^{2+}$  an die Ryanodin-Rezeptoren (RyR2) des SR, was dann zu einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über die RyR2 aus dem SR führt. Das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  bindet nun an das Troponin C der Myofilamente und leitet so den Kontraktionszyklus ein. Während des beschriebenen Vorgangs steigt die Konzentration des  $\text{Ca}^{2+}$  von  $10^{-7}$  M (diastolisch) auf  $10^{-5}$  M (systolisch) an. Für die nötige Wiederherstellung der Ausgangskonzentration besitzt die Herzmuskelzelle eine sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a), welche  $\text{Ca}^{2+}$  unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch zurück in das SR pumpt. Zusätzlich wird  $\text{Ca}^{2+}$  über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in der Zellmembran in den Extrazellularraum transportiert. Außerdem verfügt die Herzmuskelzelle noch über einen mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter zur Aufnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien (Bers 2002).

### 1.3.2 $\beta$ -adrenerge Signalkaskade

Beim Menschen liegt das Herzzeitvolumen in Ruhe bei 4,5 bis 6 l/min, berechnet aus dem Produkt der Schlagfrequenz (60-80/min) und des Schlagvolumens (~80ml). Beide Faktoren stellen modulierbare Stellgrößen dar. Für die Anpassung der Herzarbeit an das diastolische Volumenangebot nutzt das Herz zum einen den Frank-Starling-Mechanismus, welcher durch veränderte Vorspannung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung an den Myofilamenten zu einer an die Vor- und Nachlast angepassten Auswurfleistung führt (Aktories et al. 2009). Zum anderen lassen sich Herzfrequenz (Chronotropie), Erregungsleitung (Dromotropie), Relaxation (Lusitropie) und Kontraktionsfähigkeit (Inotropie) über Bindung von Noradrenalin und

Adrenalin an die kardialen  $\beta$ -Adrenozeptoren ( $\beta$ -AR) direkt durch den Sympathikus steigern. Das Herzzeitvolumen kann so innerhalb von Sekunden um das Fünffache des Ruhewertes erhöht werden.

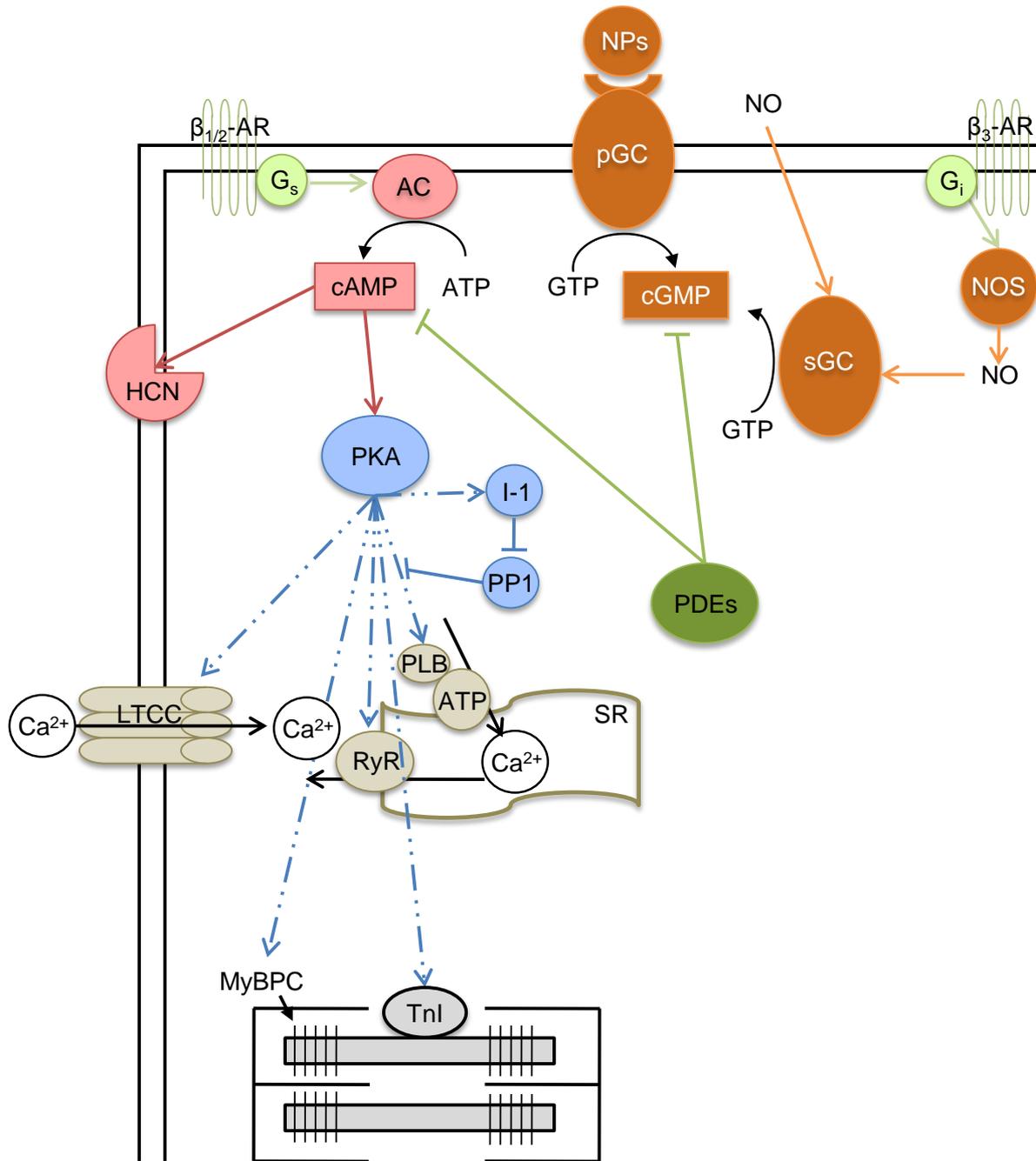
Mit einem Anteil von 70-80% sind die  $\beta_1$ -AR der häufigste Subtyp im Herzen, gefolgt von Rezeptoren des Typs  $\beta_2$ -AR. Die  $\beta_3$ -AR stellen den mengenmäßig geringsten Anteil dar. Die Bindung von Adrenalin oder Noradrenalin an einen  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -AR führt über die stimulierende Untereinheit eines G-Proteins ( $G_s$ ) zu einer Aktivierung der Adenylylzyklasen (AC), die die Bildung von cAMP aus ATP katalysieren. Als intrazellulärer Botenstoff aktiviert cAMP die Proteinkinase A (PKA). Die PKA phosphoryliert dann spezifische Regulatorproteine der elektromechanischen Kopplung (s.u.). Das Gleichgewicht dieser Signalkaskade wird auf zwei Ebenen reguliert. Zum einen durch cAMP-abbauende Enzyme, die Phosphodiesterasen (siehe Kap. 1.4) und zum anderen durch Proteinphosphatasen, die eine Dephosphorylierung katalysieren und so funktionell der PKA gegenüberstehen (El-Armouche und Eschenhagen 2009).

Im Folgenden wird auf wichtige  $Ca^{2+}$ -regulierende Proteine eingegangen, die von der PKA zur Steigerung der Inotropie und Lusitropie phosphoryliert werden (Abb. 1.1): LTCC, RyR2, Phospholamban (PLB), Troponin I (TnI), Myosin-bindendes Protein C (MyBPC) und den Proteinphosphatase-Inhibitor-1 (I-1). All diese Proteine sind wichtige Bestandteile der  $Ca^{2+}$ -Signalwege im Herzen. PLB ist am SR lokalisiert und das bekannteste Zielprotein der PKA. In Anhängigkeit seiner Phosphorylierung bindet PLB an die SERCA2a und moduliert so deren Aktivität. Die Phosphorylierung des PLB an der PKA-Stelle Serin 16 führt zu einer veränderten Interaktion des PLB mit der SERCA2a, so dass die PLB-vermittelte Hemmung der SERCA2a-Aktivität aufgehoben wird. Auf diesem Wege kommt es zu einer rascheren Wiederaufnahme von  $Ca^{2+}$  in das SR. Auch die PKA-abhängigen Phosphorylierungen des TnI (Serin 23/24) und am Serin 282 des MyBPC tragen zu einer schnelleren Relaxation bei, indem sich die Affinität der Myofilamente zu  $Ca^{2+}$  vermindert (Kobayashi und Solaro 2005; Carrier 2007). Eine Phosphorylierung des LTCC und des RyR2 hingegen führen zu einer erhöhten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Freisetzung (Bers 2002; Lohse et al. 2003; Lehnart et al. 2009). Die PKA-abhängige Phosphorylierung von I-1

an Threonin 35 führt zu einer verstärkten I-1-vermittelten Hemmung der Proteinphosphatase-1 (PP1). Durch die verminderte dephosphorylierende Aktivität der PP1 kommt es somit zusätzlich zu einer funktionalen Verstärkung der beschriebenen PKA-Phosphorylierungen beziehungsweise deren Effekten (Neumann et al. 1991; El-Armouche et al. 2003; El-Armouche et al. 2008; Wittköpper et al. 2010). Neben der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade haben auch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteine wie z.B. die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige (CaM)-Kinase II einen Einfluss auf die Regulation der Calciumhomöostase. Im Rahmen dieser Arbeit wird auf diese Signalwege nicht näher eingegangen (Übersicht in Maier und Bers 2007).

Die genaue Funktion der kardialen  $\beta_3$ -AR ist noch nicht ausreichend geklärt. Zum einen gibt es Daten, die nahelegen, dass es durch die Aktivierung von  $\beta_3$ -AR zu negativ inotropen Effekten kommt (Gauthier et al. 1996). Intrazellulär werden diese Effekte wahrscheinlich über inhibitorische G-Proteine ( $G_i$ ) vermittelt, die zu einer Aktivierung der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (NOS) führen (Gauthier et al. 1998; Abb. 1.1). Eine adrenerge Stimulation der  $\beta_3$ -AR führt auf diesem Wege zu einem Anstieg des intrazellulären Spiegels des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP; Mongillo et al. 2006). Auf der anderen Seite gibt es aber auch Hinweise, dass eine Aktivierung der  $\beta_3$ -AR über den cAMP/PKA-Signalweg auf Vorhofebene zu einer Steigerung der Kontraktilität führt (Skeberdis et al. 2008).

Der  $\beta$ -adrenerg vermittelte Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels führt neben den beschriebenen PKA-abhängigen Veränderungen auch zu einer direkten Modulation der Aktivierungskinetik der HCN-Kanäle in den kardialen Schrittmacherzellen. Die Bindung von cAMP führt zu einer Verschiebung der Aktivierungsschwelle hin zu positiveren Spannungszuständen. Es kommt somit zu einer gesteigerten Chronotropie (DiFrancesco und Tortora 1991; DiFrancesco 2010).



**Abb. 1.1 Übersicht der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade.** Gezeigt ist die schematische Darstellung einer Herzmuskelzelle. Die doppelten Linien an den Seiten stellen das Sarkolemm dar. Es beinhaltet die membranständigen Rezeptoren und Ionen-Kanäle. Stimulierende Wirkungen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Hemmende Eigenschaften sind durch Striche mit stumpfen Enden symbolisiert. Die blau-gestrichelten Pfeile stellen die Phosphorylierungswege der PKA dar. Der NCX und die  $Ca^{2+}$ -ATPase des Sarkolemm sowie der mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Uniporter sind nicht eingezeichnet. Der direkte cAMP-Einfluss auf den HCN-Kanal in den kardialen Schrittmacherzellen soll durch dessen ergänzende Darstellung in dieser Übersicht verdeutlicht werden. ATP am SR symbolisiert die SERCA2a. NPs stellt zusammenfassend die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP dar (siehe Kap. 1.3.3).

### 1.3.3 cGMP als intrazellulärer Botenstoff

Die Bildung des zyklischen cGMP als intrazellulärer Botenstoff wird durch zwei Enzyme katalysiert, durch eine zytoplasmatische Form der Guanylylzyklase (sGC) und durch die transmembranöse GC (pGC). Die sGC ist direkt durch NO aktivierbar. Die pGC wird durch das atriale natriuretische Peptid (ANP), das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) und das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) aktiviert (Kuhn 2004; Burley et al. 2007; Zaccolo und Movsesian 2007; Abb. 1.1). Die intrazelluläre Signalkaskade des cGMP erfolgt weiter über die (i) Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen (PKG), (ii) direkte Modulation spezifischer Kationenkanäle und (iii) Regulation von PDEs (Lucas et al. 2000; Feil et al. 2003; Abb. 1.2). Die PKG ist ebenso wie die PKA eine Serin/Threonin-Kinase, die verschiedene Zielproteine in der Herzmuskelzelle phosphoryliert. Auf die Zielproteine der PKG, deren weitere Funktion und die spezifischen Kationenkanäle wird in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

### 1.3.4 Veränderungen während der Herzinsuffizienz

Eine charakteristische Veränderung des kranken Herzens ist die sogenannte  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung. Dabei kommt es zu einem verminderten Ansprechen des Herzmuskels auf Katecholamine und somit zu einer kardialen Dysfunktion (Colucci et al. 1988; El-Armouche und Eschenhagen 2009). Die  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung hat mehrere Ursachen. Während einer Herzinsuffizienz kommt es zu einer starken Verminderung der kardialen  $\beta_1$ -AR-Dichte (Bristow et al. 1982), die mit dem klinischen Schweregrad der Herzinsuffizienz korreliert (Engelhardt et al. 1996). Des Weiteren wird die  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung durch eine vermehrte Expression von desensitivierenden  $\beta$ -Adrenozeptorkinasen (GRK2; Ungerer et al. 1993), die zu einer Phosphorylierung und damit Entkopplung der  $\beta$ -AR von den  $G_s$ -Proteinen führen und einer ebenfalls gesteigerten Expression inhibitorischer G-Proteine (Eschenhagen et al. 1992) gefördert.

Weitere wichtige Veränderungen während einer Herzinsuffizienz betreffen die Calciumhomöostase. So kommt es während der Herzinsuffizienz zu einer verminderten Aktivität der SERCA2a (Hasenfuss 1998). Der NCX wird hingegen

vermehrt exprimiert (Studer et al. 1994). Die Phosphorylierungen von PLB, Tnl und MyBPC sind vermindert (Bartel et al. 1996; El-Armouche et al. 2007). Interessanterweise scheinen wiederum der LTCC (Schröder et al. 1998) und der RyR2 (Marx et al. 2000) in der Herzinsuffizienz stärker phosphoryliert zu sein. Dies deutet auf eine veränderte Aktivität der PKA in den intrazellulären Kompartimenten während einer Herzinsuffizienz hin. Die in den jeweiligen Kompartimenten veränderten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel ließen somit unter anderem die verminderte Kontraktilität und das vermehrte Auftreten von Arrhythmien während einer Herzinsuffizienz erklären (Bers 2002; Lehnart et al. 2009).

## 1.4 Phosphodiesterasen

### 1.4.1 Überblick

Nicht nur Herzkraft und -frequenz, sondern auch Kontraktion und Relaxation der Glattmuskelzellen in den Gefäßen werden direkt oder indirekt über die intrazellulären Botenstoffe cAMP und cGMP gesteuert. Zusammen mit  $\text{Ca}^{2+}$  bilden diese zyklischen Nukleotide die Grundlage für die Regulation der Hämodynamik des kardiovaskulären Systems. Die Regulation der cAMP- und cGMP-Konzentration läuft nicht nur über deren AC- oder GC-vermittelte Synthese, sondern auch über abbauende Enzyme: die PDEs. PDEs sind Metallophosphohydrolasen, die spezifisch die zyklischen 3',5'-Phosphatgruppen des cAMP und/oder cGMP spalten, wodurch das jeweilige 5'-Nukleotid entsteht.

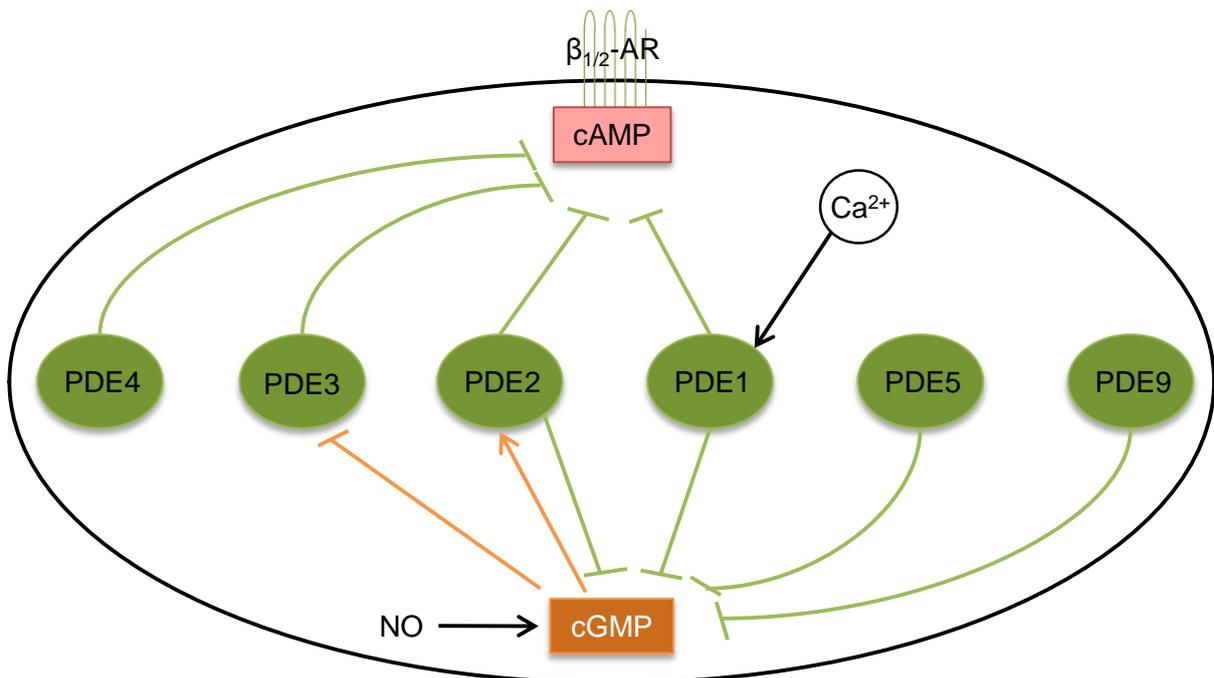
PDEs kommen in Säugetieren ubiquitär in allen Organen vor. Für Menschen, Ratten und Mäuse sind 21 Gene beschrieben, die für PDEs kodieren. Die Einteilung der PDEs erfolgt anhand von Sequenzhomologien und Enzymeigenschaften in elf Familien. Diese Familien werden nach dem kodierenden Gen und möglichen Spliceprodukten weiter eingeteilt. Am Beispiel der PDE2A2 lässt sich die Nomenklatur aufzeigen: Die erste Zahl „2“ gibt die Familie an. Der folgende Buchstabe „A“ zeigt das kodierende Gen und somit die Subfamilie und die letzte Zahl „2“ die Splicevariante an (Omori und Kotera 2007). Allen PDEs ist eine stark konservierte Region gemein, die sich C-terminal befindet. Diese erstreckt sich über

ungefähr 270 Aminosäuren, die Teil des katalytischen Zentrums der Enzyme sind. Die PDE-Familien 2, 5, 6, 10 und 11 besitzen spezielle GAF-Bindungsdomänen am Aminoterminus, die unter anderem die Bindung von cGMP als allosterischen Regulator ermöglichen. Diese fünf PDEs werden darum auch als GAF-PDE Subfamilie zusammengefasst (Omori und Kotera 2007). GAF-Domänen sind für diverse Proteine beschrieben, in denen sie neben cGMP auch die Bindung von AC und des Transkriptionsfaktors FhIA der *E.coli*-Bakterien ermöglichen. Aus deren Anfangsbuchstaben setzt sich daher das Akronym GAF zusammen (cGMP, AC, FhIA; Martinez et al. 2002a).

Im Herzen sind bis jetzt Isoformen der PDE-Familien 1 bis 5 und 9 beschrieben: PDE1C; PDE2A; PDE3A; PDE4B; PDE4D; PDE5A; PDE9A (Fischmeister et al. 2006; Abb. 1.2). Die PDE1 ist durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin aktivierbar. Sie hydrolysiert sowohl cGMP als auch cAMP. Die Michaeliskonstante ( $K_m$ ) ist für cGMP niedriger und die maximale Enzymgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) höher als für cAMP. Die PDE3 hydrolysiert sowohl cGMP als auch cAMP mit vergleichbarer Affinität. Die sehr niedrige  $V_{max}$  für die cGMP-Hydrolyse führt funktionell allerdings zu einer kompetitiven Hemmung der cAMP-Hydrolyse durch das cGMP. Diese Hemmung ist für cGMP-Konzentrationen  $<50$  nM beschrieben (Zaccolo und Movsesian 2007). Die PDE4 hydrolysiert ausschließlich cAMP. Die PDE5 und PDE9 hydrolysieren spezifisch cGMP (Omori und Kotera 2007; für die PDE2 siehe Kap. 1.4.2).

Es ist bekannt, dass die Kompartimentierung von intrazellulären Botenstoffen und Proteinen entscheidende Wirkung auf die Funktionsweise des  $\beta$ -AR/cAMP/PKA-Signalweges hat. So ist die intrazelluläre Lokalisierung – und damit die Funktion – der PKA von deren Kopplung an spezielle Ankerproteine abhängig (Schillace und Scott 1999). Aber auch schon die Akkumulierung von cAMP an den intrazellulär verankerten PKAs ist dynamisch reguliert. Es verdichten sich die Hinweise, dass den PDEs dabei eine entscheidende Rolle zukommt. In Rattenkardiomyozyten konnte nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation ein starker Anstieg von cAMP gemessen werden. Der cAMP-Spiegel nahm besonders im Bereich des SR nahe der transversalen Tubuli zu. Die gleichzeitige Gabe eines unspezifischen PDE-Inhibitors verhinderte diese Kompartimentierung des cAMP und führte zu einem diffusen Anstieg von cAMP in

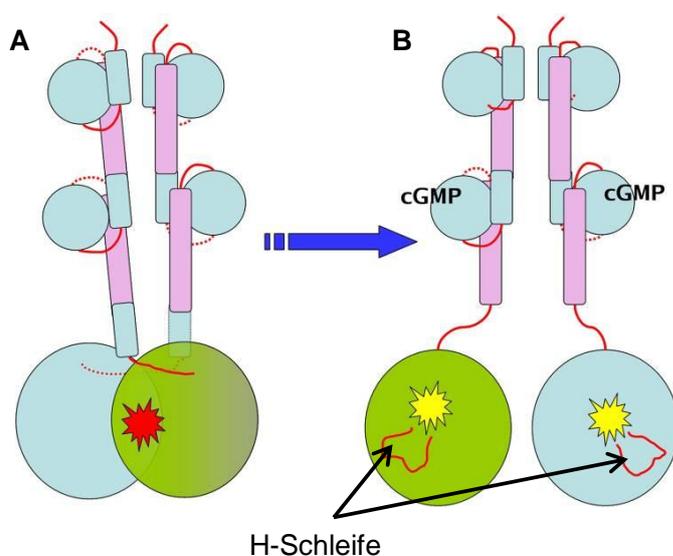
der gesamten Herzmuskelzelle (Zaccolo und Pozzan 2002). Auch Lehnart et al. (2005) konnten zeigen, dass die PDEs für eine intrazelluläre Kompartimentierung des cAMP, möglicherweise im Kompartiment des RyR2-Komplexes, verantwortlich sind. So führte das verwendete Modell eines PDE4D-*knockouts* in Mäusen durch eine Fehlfunktion des RyR2-Komplexes zur Entstehung einer Herzinsuffizienz und Arrhythmien. Des Weiteren fanden Mongillo et al. (2004) bei ihrem Vergleich der PDE3 und PDE4 im Herzen Hinweise, dass die PDE4 offensichtlich viel stärker an  $\beta$ -AR-aktivierte AC gekoppelt ist als die PDE3. Vergleichbare Ergebnisse gibt es auch für die PDE2. Obwohl diese nur einen geringen Anteil an den gesamten kardialen PDEs hat, führt eine spezifische Hemmung der PDE2 zu einem verstärkten Anstieg des cAMP auf  $\beta$ -adrenerge Stimuli (Mongillo et al. 2006). Generell lässt sich der Schluss ziehen, dass die Kompartimentierung der PDEs für deren Funktionalität weitaus wichtiger sein könnte als ihre Proteinmenge bzw. Gesamtaktivität.



**Abb. 1.2 Regulation und Funktion der Phosphodiesterasen.** Gezeigt ist ein schematischer Überblick der kardialen PDEs. Die grünen Striche mit stumpfem Ende symbolisieren die Hydrolyse von cAMP und/oder cGMP durch die jeweilige PDE. Der orangefarbene Strich mit stumpfem Ende zeigt den hemmenden Einfluss von cGMP auf die PDE3. Pfeile stellen stimulierende Wirkungen dar.  $Ca^{2+}$  symbolisiert den  $Ca^{2+}$ /Calmodulin Komplex.

### 1.4.2 Phosphodiesterase-2

Die PDE2 wurde zum ersten Mal von Beavo et al. (1971) beschrieben. Sie konnte bis heute in vielen Geweben und Zelltypen nachgewiesen werden: dem Gehirn, dem Herzen, sowie in Thrombozyten, Endothelzellen, Glomerulosazellen der Nebenniere und in Makrophagen (Bender und Beavo 2006). Das humane PDE2A-Monomer besteht aus 941 Aminosäuren und lässt sich in vier Bereiche einteilen: (i) den N-Terminus, (ii) die GAF-A-Domäne, (iii) die GAF-B-Domäne und (iv) die katalytische Domäne. Diese vier Domänen sind linear organisiert und durch  $\alpha$ -Helices stabilisiert. Bei der PDE2A handelt es sich um ein Homodimer. Beide Monomere stehen in derselben Ausrichtung zueinander (Pandit et al. 2009). Die Helices und Schleifen der GAF-A-Domäne scheinen primär für die Verknüpfung der Monomere verantwortlich zu sein (Martinez et al. 2002b). Das C-terminal gelegene katalytische Zentrum der einzelnen Monomere ist durch eine H-Schleife „verschlossen“. Auf Grund der Konfiguration des Dimers können diese H-Schleifen nicht geöffnet werden und verhindern somit das Binden des Substrates in dem katalytischen Zentrum. Während der Enzymaktivierung kommt es durch Bindung von cGMP an die GAF-B-Domäne in bestimmten Abschnitten der  $\alpha$ -Helix zu einer Neuausrichtung des Dimers. Die Konfiguration der beiden katalytischen Domänen der Monomere trennt sich auf. Nun können die H-Schleifen „aufschwingen“ und das katalytische Zentrum freigeben (Pandit et al. 2009; Abb. 1.3).



**Abb. 1.3 Enzymaktivierung der PDE2A.** Gezeigt ist eine schematische Darstellung des PDE2A-Homodimers. (A) Stellung des Dimers im inaktiven Zustand. Die katalytischen Zentren sind verschlossen (roter Stern). (B) Durch Bindung des cGMP an die GAF-B-Domäne ändert sich die Konfiguration des Dimers und die H-Schleifen können die katalytischen Zentren freigeben (gelbe Sterne; Abb. aus Pandit et al. 2009).

Die PDE2 hydrolysiert sowohl cAMP als auch cGMP (Abb. 1.2). Die  $K_m$  unterscheidet sich für die Hydrolyse von cAMP und cGMP. Für cAMP beträgt die  $K_m$  basal  $30 \mu\text{M}$  und für cGMP  $10 \mu\text{M}$  (Zaccolo und Movsesian 2007). Die hydrolytische Aktivität für cAMP kann durch cGMP-Konzentrationen im Bereich von  $200\text{-}500 \text{ nM}$  (Zaccolo und Movsesian 2007) gesteigert werden. Nach allosterischer Stimulation der PDE2 durch die Bindung von cGMP an die GAF-B-Domäne kommt es zu einer deutlichen Abnahme der  $K_m$  ausschließlich für cAMP und dadurch zu einer präferentiellen cAMP-Hydrolyse. Die Enzymaktivität der PDE2A steigt somit mehr als zehnfach an (Martinez et al. 2002a). Es besteht auf diese Weise die einzigartige Möglichkeit über Signalwege, die den intrazellulären cGMP-Spiegel anheben, die Konzentration an cAMP durch eine gesteigerte PDE2-abhängige Hydrolyse reduzieren zu können (Simmons und Hartzell 1988; Han et al. 1996; Nikolaev et al. 2005). Experimentell lässt sich die PDE2 pharmakologisch durch verschiedene Substanzen selektiv hemmen. Einer der ersten PDE2-Inhibitoren war Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin (EHNA) mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration im hohen nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich. Neuere Substanzen wie z.B. BAY 60-7750 (Bayer) bieten eine weitaus größere Potenz und Selektivität (Bender und Beavo 2006).

Insgesamt sind im Herzen drei Splicevarianten der PDE2A bekannt: PDE2A1, PDE2A2 und PDE2A3. Diese drei Isoformen unterscheiden sich N-terminal. Die PDE2A2 weist hier im Vergleich zu den Isoformen PDE2A1 und PDE2A3 einen hydrophoberen Bereich auf. Diese Eigenschaft könnte über ein membranassoziiertes bzw. zytosolisches Vorkommen der jeweiligen Splicevariante entscheiden (Yang et al. 1994; Rosman et al. 1997). Passend dazu konnte die PDE2A bis jetzt sowohl zytosolisch als auch gebunden an der Plasmamembran, dem SR, dem Golgi-Apparat und der Kernhülle nachgewiesen werden (Zaccolo und Movsesian 2007). Unterschiede in der Enzymkinetik zwischen den verschiedenen Splicevarianten sind nicht bekannt (Bender und Beavo 2006).

Es gibt bis heute insgesamt nur wenige Untersuchungen der PDE2A im Herzen. Mongillo et al. (2006) konnten nachweisen, dass die PDE2A den Anstieg des intrazellulären cAMP in Kardiomyozyten während einer adrenergen Stimulation limitiert. Zudem war dieser cAMP-Anstieg durch Stimulation der PDE2A cGMP-

abhängig reduzierbar. Außerdem führte die pharmakologische Hemmung der PDE2A nach adrenerger Stimulation nicht nur zu einem deutlichen Anstieg des intrazellulären cAMP, sondern auch zu einer Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und der Kontraktilität (Mongillo et al. 2006). Im Rattenmodell konnten Yanaka et al. (2003) nach Druckbelastung des Herzens (*aortic banding*) in den hypertrophierten Ventrikeln eine gesteigerte PDE2A-abhängige cAMP- und cGMP-Hydrolyse nachweisen. Ebenso konnte im Angiotensin-II-induzierten Hypertrophiemodell der Ratte eine gesteigerte PDE2A-abhängige cGMP-Hydrolyse beobachtet werden (Mokni et al. 2010). Änderungen in der Konzentration der PDE2A-mRNA (Yanaka et al. 2003) bzw. der PDE2A-mRNA und des PDE2A-Proteins (Mokni et al. 2010) konnten in beiden Studien nicht beobachtet werden. Ceolotto et al. (2008) konnten hingegen in Rattenherzen mit einer Leberzirrhose-assoziierten Kardiomyopathie einen zweifachen Anstieg der PDE2A auf mRNA- und Proteinebene nachweisen. Diese wenigen und uneinheitlichen Erkenntnisse lassen keine eindeutigen Schlüsse über die Funktion und die Bedeutung der kardialen PDE2A zu. Die Notwendigkeit einer Erforschung der Physiologie bzw. Pathophysiologie der kardialen PDE2A *in vivo* und *in vitro* wird somit deutlich.

## 1.5 Transgene Mausmodelle

Der Begriff „transgen“ bezeichnet seit den frühen achtziger Jahren Tiere, die fremde DNA in ihr Genom integriert haben. Transgene Modelle eignen sich zur Erforschung der Funktion einzelner Proteine, die in solchen Modellen vermehrt gebildet werden. DNA-Konstrukte können hierzu durch Mikroinjektion in den Vorkern (Pronukleus) einer befruchteten Eizelle eingebracht werden. Diese Eizelle wird nach deren Implantation von Ammentieren ausgetragen (Gordon et al. 1980). Auf Grund der kurzen Generationsfolge und der hohen Anzahl an Nachkommen pro Wurf sowie der einfachen Haltungsbedingungen eignen sich Mäuse besonders gut als Modelltiere. Die Pronukleusinjektion bietet den Vorteil, dass jede mögliche klonierte DNA-Sequenz verwendet werden kann. Die Integration des injizierten Fragments erfolgt dann zufällig in das Genom. Bei Integration einer höheren Kopienzahl des Injektionsfragments erfolgt die Integration der identischen Fragmente in einer *head-*

*to-tail* Ausrichtung (Palmiter und Brinster 1986). Die häufig gewünschte organspezifische Expression des eingebrachten Transgens erfordert den Einsatz eines ebenso gewebespezifischen Promotors. Für eine kardiale Expression eignet sich der Promotor der  $\alpha$ -Isoform der schweren Kette des Myosins (MHC). Endogen werden im Herzen zwei MHC-Isoformen gebildet:  $\alpha$ -MHC und  $\beta$ -MHC. Während der fetalen Entwicklung ist im Ventrikel die  $\beta$ -Isoform dominant. In den Vorhöfen hingegen ist durchgehend die  $\alpha$ -Isoform aktiv. Nach der Geburt kommt es in den Ventrikeln unter dem Einfluss von Thyroxin zu einem Wechsel der Isoform, so dass dann auch hier die  $\alpha$ -Isoform dominiert. Eine transgene Expression mittels  $\alpha$ -MHC-Promotor führt neben einer postnatalen hohen Expression im gesamten Herzen auch zu einer geringen Expression in der Lunge (Ng et al. 1991; Subramaniam et al. 1991).

## 1.6 Zielsetzung

Da es zurzeit noch keine *in vivo* Untersuchungen bezüglich der Funktion der PDE2A im Herzen bzw. nur wenige Experimente über eine mögliche Regulation im kranken Herzen gibt, ist das Feld möglicher Erkenntnisse weit gesteckt. Zunächst sollte eine mögliche Regulation der PDE2A in einem kardiovaskulären Stressmodell untersucht werden. Zum besseren Verständnis der Funktion der PDE2A sollte zudem eine transgene Mauslinie generiert werden, die die PDE2A unter Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promotors herzspezifisch überexprimiert. Auf Grund der aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisse lässt sich vermuten, dass die Überexpression der PDE2A unter akuter  $\beta$ -adrenerger Stimulation zu einem verminderten cAMP-Anstieg und damit zu einer verminderten kontraktilen Reserve führen könnte. Es ist gleichzeitig auch ein permanenter Einfluss der transgenen PDE2A auf das cAMP/cGMP-Gleichgewicht, die angeschlossenen Signalwege und Kompartimentierungen denkbar. Daher sollten auch bereits basal mögliche Veränderungen im Phänotyp der transgenen Mäuse sonographisch und molekularbiologisch untersucht werden.

## 2 Methoden

### 2.1 Generierung PDE2A-transgener Mäuse

Bei dem zur Generierung der transgenen Mäuse verwendeten Ausgangskonstrukt handelt es sich um ein 11.874 Basenpaare (bp) langes ringförmiges Plasmid (siehe Kap. 3.2, Abb. 3.3). Um ein linearisiertes Konstrukt für die Pronukleusinjektion zu erhalten, wurden 25 µg des Plasmids mit dem Restriktionsenzym *NotI* über Nacht bei 37 °C verdaut (siehe Kap. 2.4). Dieser Digestionsansatz wurde über ein Ethidiumbromid-freies Agarosegel (0,6%) aufgetrennt und das erwartete Segment dann bei 8.982 bp aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt (*Silica Bead DNA Gel Extraction Kit*, Fermentas). Nach Aufnahme in *Aqua ad iniectabilia* wurde die Konzentration der DNA anhand eines Molekulargewichtsmarkers bestimmt (siehe Kap. 2.2) und in einer Endkonzentration von 10 ng/µl zur Pronukleusinjektion an Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer (Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg) übergeben.

Die PDE2A-transgenen Mauslinien Linie 27 und Linie 60 wurden anschließend durch eine Pronukleusinjektion des *NotI*-verdauten Ausgangskonstrukts generiert. Hierzu wurde die linearisierte DNA des Konstrukts durch Mikroinjektion in den Pronukleus befruchteter muriner Eizellen des Stammes FVB/N eingebracht und diese pseudoschwangeren Ammen implantiert. Die Injektionen wurden von Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer (Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg) durchgeführt. Die Generierung wurde durch die Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Freien und Hansestadt Hamburg (G21307/50/08) genehmigt. Die weitere Zucht und Haltung der Mauslinien erfolgte in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Universitätsmedizin Göttingen. Die Mäuse wurden mit handelsüblichem Labortierfutter und Leitungswasser durch die Tierpfleger versorgt.

## 2.2 Gelelektrophorese

Die jeweilige DNA wurde in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße in einer Agarosegelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurden 0,6-1,4%ige Gele verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer (40 mM Tris, 2 mM Natriumedetat, pH 8,5) gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde die Lösung mit 0,2-0,5 µg/µl Ethidiumbromid versetzt und in den Schlitten einer Flachbett-Elektrophoresekammer (Bio-Rad) gegossen. Entstandene Luftblasen wurden entfernt und ein Kamm zur Bildung der Ladetaschen in gewünschter Größe hinzugefügt. Nach dem Aushärten wurde das Gel in der Laufkammer mit TAE-Puffer vollständig bedeckt und die zu untersuchenden Proben geladen. Je nach Reagenz konnte hier entweder auf die Zugabe eines separaten Ladepuffers verzichtet werden (bei Verwendung der *DreamTaq<sup>TM</sup> Green DNA Polymerase*, Fermentas) oder es wurde 6-fach Ladepuffer (*6x Orange DNA Loading Dye*, Fermentas) hinzugegeben. Zusätzlich wurde, je nach erwarteter Größe, der jeweilige Molekulargewichtsmarker (*GeneRuler<sup>TM</sup> 100bp DNA Ladder*; *GeneRuler<sup>TM</sup> 1kb Plus DNA Ladder*; *GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix*, alle Fermentas) als Referenz oder zur Konzentrationsbestimmung mit geladen. Die Elektrophorese erfolgte je nach Größe des Gels bei einer Spannung von 80-120 V für 60-120 min, bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Unter UV-Licht konnten die DNA-Banden durch das in der DNA interkalierende Ethidiumbromid sichtbar gemacht und mit einer Kamera elektronisch festgehalten werden (*Gel Doc<sup>TM</sup> XR*, Bio-Rad).

## 2.3 Genotypisierung

### 2.3.1 Isolierung genomischer DNA

Für die Genotypisierung der PDE2A-transgenen Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien zwei bis vier Wochen alter Tiere isoliert. Die Biopsien wurden über Nacht bei 55 °C in 500 µl Digestionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM EDTA, pH 8, 0,5% SDS) und 400 µg/ml Proteinase-K verdaut. Im Anschluss wurden die Proben mit 500 µl des *DNA Isolation Reagent for Genomic DNA Kit* (AppliChem) versetzt und die DNA mit absolutem Ethanol gefällt. Zur Gewinnung eines DNA-

Pellets wurde der Ansatz bei ca. 11.000 rcf für 11 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit Ethanol 95% gewaschen und der Überstand jeweils nach Zentrifugation bei 1.000 rcf für 1 min abgesaugt. Nach Lufttrocknung des Pellets für ca. 2 h wurde dieses in 100 µl TE-Puffer (1 M Tris-HCL, 0,5 M EDTA, pH 7,4) auf einem Thermomixer bei 37 °C für 2 h gelöst. Die isolierte DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

Nach erfolgreicher Etablierung der Genotypisierungs-Bedingungen für die PCR (Polymerase-Kettenreaktion; siehe Kap. 2.3.3) wurde zur Aufarbeitung der Schwanzbiopsien ein weniger aufwändiges Protokoll ohne Proteinase-K verwendet. Hierbei wurden die Schwanzspitzen für 1 h bei 95 °C durch Zugabe von 75 µl Lysispuffer (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA) lysiert. Die Reaktion wurde anschließend durch dreiminütige Inkubation auf Eis gestoppt und durch Zugabe von 75 µl 40 mM Tris-HCL-Puffer neutralisiert. Die isolierte DNA wurde direkt für die PCR (siehe Kap. 2.3.3) eingesetzt und für maximal 24 h bei 4 °C gelagert.

### 2.3.2 Genotypisierung mittels Southern-Blot

Die Genotypisierung der Gründungstiere erfolgte mittels Southern-Blot. Hierfür wurde die genomische DNA über Nacht bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (Fermentas; siehe Kap. 2.4) in einer feuchten Kammer mit einem 2-4-fachen Enzymüberschuss verdaut und gelelektrophoretisch über ein 0,8%iges Agarosegel bei einer Spannung von 50 V aufgetrennt. Das Gel wurde dann für 15 min mit 0,25 M HCl behandelt, um die DNA partiell zu depurinieren und anschließend zur Denaturierung mit 0,4 M NaOH für 15 min versetzt. Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht mittels Kapillarblot-Verfahren unter alkalischen Bedingungen (0,4 M NaOH) auf eine positiv geladene Nylonmembran (*Hybond N<sup>+</sup>*, Amersham Biosciences). Die Membran wurde am nächsten Tag für 2 h bei 80 °C gebacken und anschließend in einer Rollflasche mit einer Hybridisierungslösung (*ExpressHyb<sup>TM</sup>*, Becton Dickinson) zusammen mit frisch denaturierter Heringssperma-DNA (20 µg/ml) für 1 h bei 42 °C prähybridisiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP; 1x10<sup>6</sup> cpm/ml Hybridisierungslösung) erfolgte die Hybridisierungsreaktion über Nacht bei 65 °C. Die radioaktive Markierung der Sonde mittels Zufalls-

Oligonukleotiden (*random primer*, *Rediprime<sup>TM</sup> II Kit*, Amersham Biosciences) erfolgte nach Herstellerangaben. Die Membran wurde nach der Hybridisierung mehrmals gewaschen (75 mM NaCl, 7,5 mM Natriumcitrat, 1% SDS, pH 7,0), anschließend in Frischhaltefolie eingewickelt und in einer Phosphorimager-Kassette für 24 bis 120 h exponiert. Das Hybridisierungsmuster wurde mittels Phosphorimager-System (FLA-3000, Fuji) visualisiert.

Die DNA-Sonde zur Detektion der transgenen Tiere wurde durch einen Restriktionsverdau mit *HindIII* (Fermentas; siehe Kap. 2.4) aus dem Ausgangskonstrukt (siehe Kap. 3.2, Abb. 3.3) geschnitten und die entsprechenden Fragmente mittels Gelelektrophorese über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte DNA für die Sonde wurde bei 696 bp mit einem Gelextraktionskit nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel aufgereinigt (*Silica Bead DNA Gel Extraction Kit*, Fermentas).

### 2.3.3 Genotypisierung mittels PCR

Die Bestätigung des Genotyps der Gründungstiere sowie die Bestimmung des Genotyps in allen folgenden Generationen erfolgte mittels PCR. Hierfür wurde die *DreamTaq<sup>TM</sup> Green DNA Polymerase* (Fermentas) in einem 50 µl Reaktionsansatz verwendet. Die gewählten Primer, der PCR-Ansatz und die PCR-Bedingungen sind in Tab. 2.2 (Kap. 2.12.1) dargestellt. Die amplifizierte DNA wurde über ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel (1%) gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kap. 2.2).

## 2.4 Restriktionsverdau von DNA

Für die Restriktionsanalysen wurde die gewünschte DNA, wenn nicht anders angegeben, mit der erforderlichen Menge des jeweiligen Restriktionsenzym 1-2 h gemäß Herstellerangaben (New England Biolabs oder Fermentas) inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über einen Zeitraum von 20 min bei 65 °C

inkubiert und der Restriktionsverdau somit beendet. Die entstandenen Fragmente wurden im Anschluss gelelektrophoretisch untersucht (siehe Kap. 2.2).

## 2.5 Klonierung

### 2.5.1 Herstellung von Agarplatten und LB-Medium

Für die benötigten Schüttelkulturen wurde LB-Medium (Tryptone 1%, Yeast Extract 0,5%, 170 mM NaCl, pH 7,4) hergestellt und im Autoklaven sterilisiert. Zur Herstellung der Agarplatten wurden 15 g Agar in LB-Medium ad 1000 ml gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf 37 °C wurde die Lösung mit Kanamycin als Selektionsantibiotikum auf eine Endkonzentration von 60 µg/ml versetzt und der Ansatz zügig in Petrischalen zur Aushärtung gegossen.

### 2.5.2 Ligation

Die zu ligierende Vektor- und *Insert*-DNA wurden nach deren Restriktionsverdau (siehe Kap. 2.4) komplett in einem Agarosegel 0,8% aufgetrennt und die gewünschten Fragmente aus dem Gel mittels eines Gelextraktionskits nach Herstellerangaben isoliert (*GeneJET<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit*, Fermentas). Anschließend wurden in einem Gesamtansatz von 10 µl 10-35 ng Vektor-DNA mit einem 1-4-fachen molaren Überschuss an *Insert*-DNA mit T4-DNA-Ligase (1 U) im Ligationspuffer (beides New England Biolabs) über Nacht bei 14 °C inkubiert. Die Reaktion wurde im Anschluss bei 65 °C über 20 min inaktiviert und direkt zur Transformation eingesetzt.

### 2.5.3 Transformation von Plasmid-DNA

Die Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E.coli*-Bakterien (Top10) erfolgte nach der Hitze-Schock-Methode. Hierzu wurden 2 µl des Ligationsansatzes zu 75 µl einer Bakteriensuspension gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 30 sec auf 42 °C erhitzt und sofort danach für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Tryptone

2%, Yeast Extract 0,5%, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Glucose) wurde der Ansatz für 60 min bei 37 °C geschüttelt und anschließend 150 µl auf Kanamycin-haltige (60 µg/ml) Agarplatten (siehe Kap. 2.5.1) ausplattiert. Um ein gutes Bakterien-Wachstum zu erreichen, wurden die Platten über Nacht bei 37 °C bebrütet.

#### **2.5.4 Animpfen einer Schüttelkultur für eine Mini-Plasmidpräparation**

Je eine Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 10 ml LB-Medium überführt. Zusätzlich wurde 50 µl Kanamycin (10 mg/ml) als Selektionsantibiotikum hinzugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Inkubator unter Schütteln inkubiert.

#### **2.5.5 Mini-Plasmidpräparation**

Die analytische Plasmidpräparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Hierzu wurden je 2 ml der Bakteriensuspension (siehe Kap. 2.5.4) bei ca. 10.000 rcf und 4 °C für 30 sec zentrifugiert und das entstandene Pellet in 200 µl P1-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0, Qiagen) resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien durch die Zugabe von 200 µl P2-Puffer (200 mM NaOH, 3,5 mM SDS, Qiagen) für 5 min lysiert und im Anschluss durch 200 µl P3-Puffer (3 M Kaliumacetat, Qiagen) neutralisiert. Danach wurde aus dem Überstand die Plasmid-DNA mit 500 µl Isopropanol ausgefällt und bei 4 °C für 20 min bei ca. 14.500 rcf zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 350 µl Ethanol 70% gewaschen und erneut bei ca. 14.500 rcf und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und anschließend in *Aqua ad iniectabilia* vorsichtig resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte photometrisch (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Nukleinsäuren haben bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum, Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm. Um von einer möglichst reinen DNA-Qualität ausgehen zu können, wurde darauf geachtet, dass das Absorptionsverhältnis 260 nm/ 280 nm bei ca. 1,8 lag. Eine

optische Dichte bei 260 nm von 1 entsprach einer doppelsträngigen DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Positive Klone wurden mittels Restriktionsanalyse verifiziert.

### 2.5.6 Maxi-Plasmidpräparation mittels Ionenaustauscher-Säule

Zur Animpfung einer Schüttelkultur zur Maxi-Plasmidpräparation wurden 250 ml LB-Medium mit 2,5 ml Bakteriensuspension (siehe Kap. 2.5.4) der positiven Klone unter Zugabe von 1,25 ml Kanamycin (10 mg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben mittels *NucleoBondPC 500 Kit* (Macherey-Nagel) isoliert. Hierbei wurden die Bakterien zunächst alkalisch lysiert und anschließend genomische DNA, denaturierte Proteine und SDS ausgefällt. Das Bakterienlysat wurde über eine Anionenaustauschersäule gereinigt. Die Bindung erfolgte bei niedrigem pH-Wert und niedriger Salzkonzentration auf Grund der Interaktion der negativ geladenen Phosphatreste der DNA mit den positiv geladenen Diethylaminomethanol-Gruppen auf der Oberfläche des Anionenaustauscherharzes. Die Säule wurde mit Waschpuffer mittlerer Salzkonzentration gewaschen und die DNA anschließend mit einem Hochsalzpuffer im schwach alkalischen Milieu eluiert. Durch Isopropanolfällung wurde die DNA konzentriert und entsalzt. Das DNA-Sediment wurde mit Ethanol 70% gewaschen und anschließend getrocknet. Das erhaltene Pellet wurde anschließend in *Aqua ad iniectionem* gelöst und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe Kap. 2.5.5).

### 2.5.7 Transfektion von HEK-293-Zellen

*Human embryonic kidney* (HEK)-293-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 60-70% in Zellkulturschalen bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre im Inkubator kultiviert. Die Transfektion von 4 µg des Endkonstruktes (PDE2A im pAdTrack-CMV-Vektor; siehe Kap. 3.4) erfolgte mittels *TurboFect<sup>TM</sup>* (Fermentas) nach Herstellerangaben. Die Zellen wurden anschließend für 48 h inkubiert (s.o.). Da der pAdTrack-CMV-Vektor auch für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) kodiert,

konnte die erfolgreiche Transfektion durch die GFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen am Mikroskop unter UV-Licht untersucht werden. Die Zellen wurden anschließend in 100 µl PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,0) mit 6 x Probenpuffer (siehe Kap. 2.9.3) 6:1 verdünnt, geerntet und im Folgenden als „Positivkontrolle“ in den Western-Blot-Analysen (siehe Kap. 2.9.4) verwendet.

## **2.6 Implantation osmotischer Minipumpen**

Die Versuche zur chronischen Applikation von Isoprenalin wurden von Frau Dr. Katrin Wittköpper durchgeführt.

Um eine chronische Applikation des Isoprenalins in den Versuchstieren zu erreichen, wurden osmotische Minipumpen des Modells 1007D (Alzet<sup>®</sup>) mit einer Abgaberate von 0,5 µl/h verwendet. Isoprenalin wurde in 0,9% NaCl mit 0,2 mM HCl bei Raumtemperatur gelöst und jede Pumpe anschließend, dem Körpergewicht des jeweiligen Tieres entsprechend, befüllt. Um eine konstante Abgaberate der Minipumpen zu gewährleisten, wurden die Pumpen nach dem Befüllen für 10-14 h bei 37 °C in 0,9% NaCl vorinkubiert. Die Abgaberate an Isoprenalin betrug 1,25 µg/h x Körpergewicht (g).

Zur Implantation der Minipumpen wurden die Mäuse mit Isofluran (3 Vol. %) anästhesiert. Die Minipumpen wurden subkutan über eine Hautinzision (ca. 7 mm) im Nacken nach Mobilisierung der Haut implantiert. Die Haut wurde mit 2-3 Michel-Klammern verschlossen. Zur Analgesie erhielten die Tiere über den gesamten Behandlungszeitraum 5,4 mg Metamizol (Ratiopharm) pro Tag. Nach Ablauf der Behandlungsdauer von 5 Tagen wurden die Tiere getötet und jeweils Herz, Lunge und Leber entnommen und gewogen (siehe Kap. 2.7).

## 2.7 Organentnahme

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation nach vorheriger Isofluran-Narkose getötet. Anschließend wurden sie gewogen, der Thorax und der Peritonealraum eröffnet und die entsprechenden Organe entnommen. Diese wurden in 0,9% NaCl gespült, kurz getrocknet und dann gewogen. Das Herz wurde nach Bestimmung des Gesamtgewichtes in die Vorhöfe und Ventrikel getrennt und die jeweiligen Gewichte noch einmal separat bestimmt. Gewebe, welches für weitere molekularbiologische Untersuchungen benötigt wurde, ist in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert worden. Vor der weiteren Verwendung ist das Gewebe unter Kühlung mittels flüssigen Stickstoffs mit einem Stahlmörser pulverisiert worden.

## 2.8 RNA-Analysen

### 2.8.1 Isolation von RNA

Die Gesamt-RNA wurde aus ~30 mg gefrorenem Organpulver (siehe Kap. 2.7) mit dem *SV Total RNA Isolation System Kit* (Promega) isoliert. Es wurden alle Proben einer zu untersuchenden Serie parallel aufgearbeitet, um Schwankungen in der RNA-Qualität zu minimieren. Folgende Angaben für den RNA-Lysis-Puffer und den RNA-Dilutions-Puffer beziehen sich auf 30 mg Gewebe und wurden vor der Präparation an das jeweilige Gewicht des untersuchten Organpulvers angepasst. Zunächst wurde das Organpulver mit 87,5 µl RNA-Lysis-Puffer (4 M GTC, 10 mM Tris, pH 7,5, 0,97% β-Mercaptoethanol, Promega) 3 x 30 sec homogenisiert (*TissueLyser II*, Qiagen). Zwischen den Homogenisierungsschritten wurden die Proben für ca. 30 sec auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 175 µl RNA-Dilutions-Puffer (Promega) hinzugegeben, die Reaktionsgefäße vorsichtig invertiert und die Lösung bei 70 °C für 3 min inkubiert. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz bei 12.000 rcf und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Durch die hohe Konzentration an GTC (Guaninthiocyanat) blieben die zellulären Proteine größtenteils im Niederschlag, während sich die zu isolierende RNA im Überstand befand. Die RNA wurde dann in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 µl Ethanol 70% aus dem Überstand gefällt und der Ansatz anschließend auf eine Silica-haltige Zentrifugationssäule (Promega)

gegeben. Die Säulen wurden über einem Abfallgefäß 1 min bei 12.000 rcf und 4 °C zentrifugiert, so dass die gefällte RNA an die Silica-Oberfläche der Säule binden konnte. Um restliche Verunreinigungen durch Proteine und Zellbestandteile zu beseitigen, wurde RNA-Wasch-Puffer (60 mM Kaliumacetat, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 60% Ethanol, Promega) auf die Säule gegeben und diese erneut 1 min bei 12.000 rcf und Raumtemperatur zentrifugiert. Zum Verdau kontaminierender genomischer DNA wurde die Säule anschließend mit je 40 µl *Yellow Core Buffer* (22,5 mM Tris, 1,125 M NaCl, 0,0025% *Yellow Dye*), 5 µl 9 mM MnCl<sub>2</sub> und 5 µl DNase I-Enzym (alles Promega) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Verdau mit dem DNase-Stopp-Puffer (2 M GTC, 4 mM Tris-HCl, pH 7,5, 57% Ethanol, Promega) gestoppt und die Säule 1 min bei 12.000 rcf und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurden je 600 µl des RNA-Wasch-Puffers auf die Säule gegeben und diese erneut 1 min bei 12.000 rcf und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Waschschrift wurde mit 250 µl des RNA-Wasch-Puffers wiederholt und die Säule bei ca. 14.500 rcf und Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert. Beide Waschschriffe dienten der weiteren Entfernung von restlichen Salzen, Proteinen und zellulären Bestandteilen, die die gebundene RNA hätten kontaminieren können. Im letzten Schritt wurde die Säule auf ein steriles Reaktionsgefäß gesetzt und die isolierte RNA mit 25-70 µl Nuklease-freiem Wasser (Promega) durch Zentrifugation bei 12.000 rcf und Raumtemperatur für 1 min aus der Säule eluiert. Sofort im Anschluss wurde die RNA-Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (NanoDrop, Thermo Scientific; siehe Kap. 2.5.5). Für die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde auf ein Absorptionsverhältnis 260 nm/ 280 nm von ca. 2,0 geachtet, um von einer möglichst reinen RNA-Qualität ausgehen zu können. Eine optische Dichte bei 260 nm von 1 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

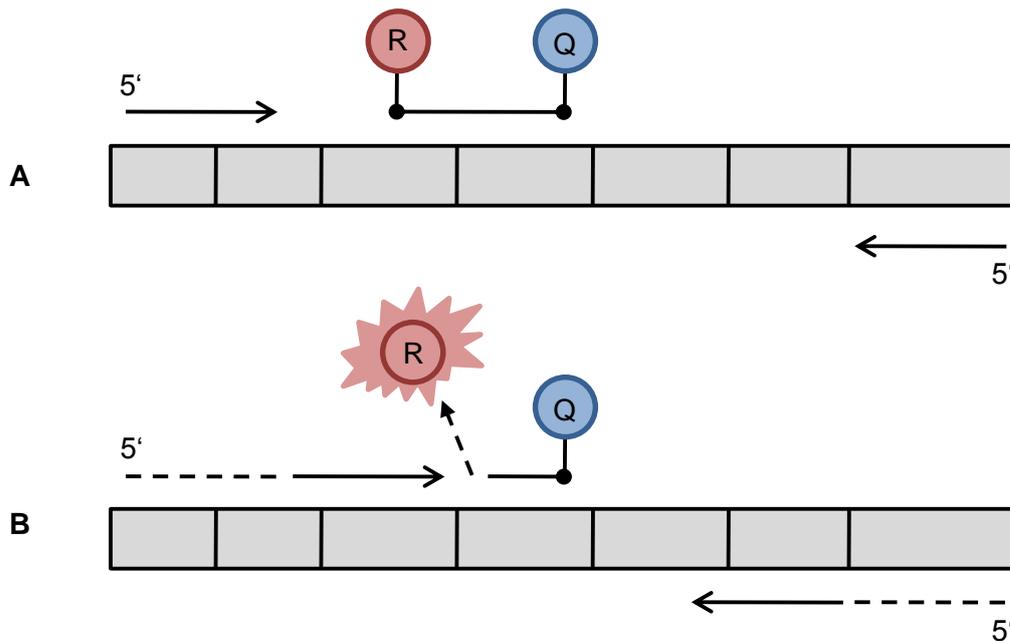
### 2.8.2 Reverse Transkription

Nach der Konzentrationsbestimmung (siehe Kap. 2.8.1) wurden 500-1000 ng RNA mittels Reverser-Transkriptase in cDNA gemäß den Herstellerangaben des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems) umgeschrieben. Um die spezifische Transkription von polyadenylierter mRNA zu gewährleisten, wurden

Oligo(dT)-Primern (Applied Biosystems) verwendet, welche spezifisch an den PolyA-Schwanz der mRNA binden konnten. Die entstandene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zusätzlich wurde von jeder Probe eine Negativkontrolle ohne Zugabe der Reversen-Transkriptase mitgeführt. Alle Proben für eine zu untersuchende Serie wurden parallel umgeschrieben, um eine einheitliche cDNA-Qualität zu gewährleisten.

### 2.8.3 Quantitative *realtime*-PCR

Die mRNA-Konzentration im Mausgewebe wurde mittels quantitativer *realtime*-PCR (RT-PCR) der durch reverse Transkription erhaltenen cDNA (siehe Kap. 2.8.2) mit dem ABI PRISM 7900HT *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) laut Herstellerhandbuch bestimmt. Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit beruht auf der Verwendung spezifischer Taqman<sup>®</sup>-Sonden, die am 5'-Ende mit einem *Reporter*-Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein; FAM) und am 3'-Ende mit einem *Quencher*-Farbstoff (6-Carboxy-tetramethylrhodamin; TAMRA) markiert sind. In diesem Zustand wird die Fluoreszenz des *Reporter*-Farbstoffes durch den *Quencher* unterdrückt. Wenn die Taq-Polymerase (*AmpliTaq Gold*<sup>®</sup>, Applied Biosystems), die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt, die Sonde während der Synthese am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch *Reporter* und *Quencher* voneinander. Durch die Anregung mit UV-Licht kann dann eine steigende *Reporter*-Fluoreszenz gemessen werden (Abb. 2.1). Diese steigt entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts proportional zum Gehalt der DNA mit jedem PCR-Zyklus an.



**Abb. 2.1 Schematische Darstellung einer Taqman® RT-PCR.** (A) Primer (schwarze Pfeile) und Sonde binden an den cDNA-Strang. Der *Quencher* (Q) unterdrückt die Reporterfluoreszenz. (B) Durch Entfernung des Reporters (R) vom *Quencher* entsteht das Fluoreszenzsignal.

Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als interner Standard verwendet. Die cDNA wurde generell unverdünnt eingesetzt. Bei der Quantifizierung des atrialen natriuretischen Peptides (ANP) und des B-Typ natriuretischen Peptides (BNP) wurde die eingesetzte cDNA 1:10 vorverdünnt. Die Analyse erfolgte unter der Verwendung des *Taqman® Universal PCR-Master Mix* (Applied Biosystems). Alle Messungen wurden hierbei als Dreifachbestimmung mit der *ABI PRISM 7900HT Sequenze Detection System Software, Version 2.3* (Applied Biosystems) analysiert. Die mRNA-Menge wurde über den Vergleich der relativen Ct-Werte unter Verwendung der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel bestimmt. Die Ct-Werte des GAPDHs wurden von den Ct-Werten der zu bestimmenden mRNA subtrahiert ( $\Delta Ct$ ). Der Mittelwert der  $\Delta Ct$ -Werte der Kontrollgruppe wurde dann von jedem einzelnen  $\Delta Ct$ -Wert abgezogen, wodurch die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte erhalten wurden. Die Anwendung der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel zeigte dann den relativen mRNA-Gehalt bezogen auf die Kontrolle an. Die verwendeten Primer und Sonden sowie die PCR-Bedingungen sind in Tab. 2.3 dargestellt (siehe Kap. 2.12.1).

## 2.8.4 Klassische RT-PCR

In dieser Arbeit wurden mittels nicht-quantitativer RT-PCR die aus muriner mRNA umgeschriebene cDNA (siehe Kap. 2.8.2) mit verschiedenen Primern untersucht, um die organspezifische Expression der transgenen PDE2A, der endogenen PDE2A und von GAPDH zu zeigen. Als Primer für die endogene PDE2A und GAPDH wurden dieselben Primersequenzen wie zur quantitativen RT-PCR verwendet (siehe Kap. 2.12.1, Tab. 2.3). Der Nachweis der transgenen PDE2A erfolgte durch ein Primerpaar, bei welchem der Vorwärts-Primer in einem C-terminalen Exonübergang der PDE2A-mRNA und der Rückwärts-Primer im HA-Tag der transgenen cDNA lag (siehe Kap. 2.12.1, Tab. 2.4). Der Reaktionsansatz zur Amplifikation wurde entsprechend den Angaben der *AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA-Polymerase* gewählt (AppliedBiosystems). Die amplifizierte cDNA wurde über ein 1,2%iges Agarosegel separiert und die Größe der Fragmente über einen Molekulargewichtsmarker bestimmt (*Gene Ruler<sup>TM</sup> 100bp*, Fermentas). Die Gelbilder wurden unter UV-Licht elektronisch festgehalten.

## 2.9 Proteinanalytische Methoden

### 2.9.1 Proteinisolation aus Geweben

Pulverisiertes Ventrikelgewebe (30-45 mg; siehe Kap. 2.7) wurde mit dem zehnfachen Volumen eines Lysispuffers (3% SDS, 30 mM Tris-Base, pH 8,8, 5 mM EDTA, 30 mM NaF, 10% Glycerol) versetzt und mit dem *TissueLyser II* (Qiagen) homogenisiert. Grobe Gewebeteile wurden für 10 min bei 16.000 rcf und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Kap. 2.9.2) und für immunologische Nachweise von Proteinen verwendet. Die weitere Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### 2.9.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Methode zur Proteinbestimmung basiert auf der Farbänderung einer sauren *Coomassie Brilliant Blue* Lösung in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration. Der Farbveränderung liegt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des

Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm zugrunde, die bei Proteinbindung erfolgt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels einer Standardkurve. Hierzu wurde bei jeder Messung eine Standardreihe mit Rinder-Immunglobulin G (*Bovine Immunoglobulin G*, Sigma) in einem Konzentrationsbereich von 0-1020 µg/ml erstellt. Nach der Hinzugabe des Bradford-Reagenz zur zu messenden Probe und der Standardreihe wurde die Lösung gut gemischt und diese für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proben wurden hierbei in 0,1 N NaOH so vorverdünnt, dass die gemessenen Proteinkonzentrationen im mittleren Bereich der Standardkurve lagen. Jede Messung erfolgte als Doppelbestimmung.

### 2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS (Natriumdodecylsulfat)-PAGE wurde nach der Lämmli-Methode durchgeführt. Die Proben (siehe Kap. 2.9.1) wurden in 6 x Probenpuffer (2% SDS, 10% Glycerol, 10 mM Tris-Base, pH 6,8, 100 mM DTT und 0,01% Bromphenolblau) 6:1 aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte mit 8-18%igen Polyacrylamidgelen in Abhängigkeit des zu separierenden Protein-Molekulargewichts (Sammelgel: 125 mM Tris-Base, pH 6,8, 5% Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung: 37,5:1, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,08% TEMED; Trenngel: 375 mM Tris-Base, pH 8,8, 8-18% Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung: 37,5:1, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,03% TEMED). Die Gelelektrophorese erfolgte innerhalb des Sammelgels bei 80 V für 10-20 min und anschließend im Trenngel bei 120 V in dem *Mini Protean 3* Elektrophoresesystem (Bio-Rad) in einem Elektrophorese-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS). Auf jedem Gel wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt (*Precision Plus Protein Standard<sup>TM</sup>*, Bio-Rad).

### 2.9.4 Western-Blot-Analyse

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden in dem *Mini Trans-Blot Cell System* (Bio-Rad) im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran (*Protan<sup>®</sup> BA 85*, Schleicher und Schuell) oder für den Phospholambannachweis auf eine PVDF-

Membran (*Hybond-P PVDF*, Amersham-Pharmacia) übertragen. Der Transfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA für 90 min in Transferpuffer I (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20% Methanol) durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung (0,1 m/v Ponceau-S, 1% v/v Eisessig) angefärbt, um den Transfer zu kontrollieren. Die Membranen wurden vollständig in einem TBS-T Puffer (100 mM Tris-Base, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) entfärbt und anschließend zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen in einer 5%igen Milchpulver-Lösung (Milchpulver in TBS-T Puffer) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Abweichend hiervon wurden beim Nachweis des HA-Tags und der PDE2A zur Blockade 10% fetales Kälberserum beziehungsweise 10% Ziegenserum (beides in TBS-T Puffer verdünnt) bei 4 °C über Nacht verwendet.

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Kap. 2.12.2, Tab. 2.5) über Nacht bei 4 °C wurde die Membran drei- bis sechsmal mit TBS-T 0,1-0,3% (TBS-T Puffer mit 0,1-0,3% Tween 20) für jeweils 5 min gewaschen und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (HRPO-konjugiert; siehe Kap. 2.12.2, Tab. 2.5) inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch erneutes drei- bis sechsmaliges Waschen in TBS-T 0,1-0,3% für je 5-10 min entfernt und die Membran mit dem ECL-Substrat (*Enhanced Chemiluminescence*, Pierce) nach Angaben des Herstellers inkubiert. Das Chemilumineszenz-Signal wurde durch das *VersaDoc Imaging System 4000 MP* (Bio-Rad) visualisiert und elektronisch festgehalten. Die Quantifizierung erfolgte mit der *Quantity One Software* (Bio-Rad).

## 2.10 Echokardiographie

Alle kardialen echokardiographischen Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Michael Didié (Abteilung Pharmakologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt und ausgewertet. Sowohl die Messungen als auch die Auswertungen erfolgten verblindet.

Die Ultraschalluntersuchungen wurden auf dem Vevo<sup>®</sup> 2100 *Imaging System* (VisualSonics) mit einem 30 MHz Schallkopf durchgeführt. Zur Einleitung der Narkose wurde die Maus in eine Induktionskammer mit Isofluran (3 Vol. %) gesetzt. Die anästhesierte Maus wurde in Rückenlage auf eine Wärmeplatte gebracht und mit den Pfoten auf EKG-Elektroden fixiert. Zusätzlich wurde die Körpertemperatur der Maus rektal kontinuierlich überwacht.

Die basalen Messungen erfolgten bei einer Herzfrequenz von 450-550 Schlägen/min (bpm) und einer Körpertemperatur von 37 °C. Die Narkose wurde über eine Gesichtsmaske (1-2 Vol. % Isofluran, 1,5 l/min Sauerstoff) aufrechterhalten. Der Brustkorb wurde enthaart und mit vorgewärmtem Ultraschallgel bedeckt. Mit einer Bildfrequenz von 60 Hz wurde zunächst im *B-Mode* die parasternale lange Achse des Herzens dargestellt. Sichtbare Strukturen waren hierbei die Herzspitze, der linke Ventrikel und dessen Übergang in die Aorta, das interventrikuläre Septum und beide Vorhöfe. Anschließend wurde der linke Ventrikel in der parasternalen kurzen Achse auf der mittleren Ebene der Papillarmuskeln aufgenommen. Die Ebene diente auch der Erstellung von *M-Mode* Aufnahmen. Anschließend wurde der Maus 10 µg/g Dobutamin (Fresenius) intraperitoneal injiziert und die Aufnahmen, wie zuvor beschrieben, wiederholt. Gemessen wurden die verschiedenen Parameter sowohl in der Systole als auch in der Diastole (siehe Tab. 2.1).

**Tab. 2.1** Echokardiographisch gemessene Parameter:

Parameter	Abkürzung
Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. endsystolischer Längendurchmesser	Ld bzw. Ls
Innere bzw. äußere linksventrikuläre Fläche in Diastole/ Systole bzw. nur in der Systole	Area d/s bzw. Epi s
Linksventrikuläre enddiastolische/ endsystolische Vorderwand- bzw. Hinterwandstärke	AWTh d/s bzw. PWTh d/s
Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. -systolischer Durchmesser	LVIDd bzw. LVIDs

Aus den gemessenen Parametern wurden dann folgende Werte berechnet:

**Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraction (FAS):**

$$\text{FAS (\%)} = (\text{Area d} - \text{Area s}) / \text{Area d} \times 100$$

**Linksventrikuläre Masse (LVM):**

$$\text{LVM (mg)} = 1,05 \times [5/6 \times \text{Epi s} \times (\text{Ls} + \text{t}) - 5/6 \times \text{Area s} \times \text{Ls}]$$

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

**Linksventrikuläres enddiastolisches bzw. endsystolisches Volumen (LVEDV/LVESV):**

$$\text{LVEDV } (\mu\text{l}) = 5/6 \times \text{Ld} \times \text{Area d} \text{ bzw. } \text{LVESV} = 5/6 \times \text{Ls} \times \text{Area s}$$

**Schlagvolumen (SV):**

$$\text{SV } (\mu\text{l}) = \text{LVEDV} - \text{LVESV}$$

**Ejektionsfraction (EF):**

$$\text{EF (\%)} = \text{SV} / \text{LVEDV} \times 100$$

**Herzminutenvolumen (CO):**

$$\text{CO (ml/min)} = \text{SV} \times \text{Herzfrequenz} / 1000$$

## 2.11 Statistische Auswertung

Die Daten werden als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler des jeweiligen Mittelwertes dargestellt. Die Daten wurden aus den gemessenen Einzelwerten der untersuchten Tiere/ Proben berechnet. Mit n wurde die Anzahl der untersuchten Tiere/ Proben bezeichnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test nach *Student* für unverbundene bzw. verbundene Stichproben ermittelt. Die Analysen

wurden mit der *Prism 4 Software* (GraphPad) durchgeführt. p-Werte <0,05 wurden als signifikant bewertet und als solche gekennzeichnet.

## 2.12 Verwendete Materialien

### 2.12.1 PCR-Primer und Bedingungen

Alle verwendeten „Vorwärts“- und „Rückwärts“-Primer (for bzw. rev) sowie Sonden wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen.

**Tab. 2.2 Genotypisierung:** Primersequenzen, PCR-Ansatz und PCR-Bedingungen:

#### Primersequenzen:

Primer	Sequenz
αMHC for	5'-cgg cac tct tag caa acc tc-3'
PDE2A rev	5'-aag ggc ttt ccc agt agg tc-3'

#### PCR-Ansatz (50 µl):

Substanz	Volumen (µl)
Primer αMHC for (10 µM)	1,0
Primer PDE2A rev (10 µM)	1,0
dNTPs (10 mM)	2,0
10-fach PCR Puffer	5,0
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2
DNA (siehe Kap. 2.3.1)	1,0
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	39,8

Die verwendete *DreamTaq<sup>TM</sup> Green DNA Polymerase* (Fermentas) beinhaltet die Taq-Polymerase und einen 10-fach PCR Puffer (enthält 20 mM MgCl<sub>2</sub>). Als Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) wurde der *dNTP Mix, 25 mM each* (Fermentas) verwendet.

PCR-Bedingungen:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94 °C	08:00	1
Denaturierung	94 °C	00:45	35
Hybridisierung	59 °C	00:30	
Elongation	72 °C	00:30	
Elongation	72 °C	10:00	1

**Tab. 2.3 Taqman<sup>®</sup> *realtime*-PCR:** Primersequenzen, PCR-Ansätze und PCR-Bedingungen im Mausmodell:

Primersequenzen:

Primer	Sequenz
GAPDH for	5'-atg ttc cag tat gac tcc act cac g-3'
GAPDH rev	5'-gaa gac acc agt aga ctc cac gac a-3'
GAPDH Sonde	5'-aag ccc atc acc atc ttc cag gag cga ga-3'
PDE2A for	5'-cat gca agt gct ggt cat acc-3'
PDE2A rev	5'-gca tcc act gac gtg ttc tga-3'
PDE2A Sonde	5'-ctg tca tct tgg tgc act gtg gcc agc-3'
ANP for	5'-gtg cgg tgt cca aca cag at-3'
ANP rev	5'-gct tcc tca gtc tgc tca ctc a-3'
ANP Sonde	5'-tga tgg att tca aga acc tgc tag acc acc tg-3'
BNP for	5'-cca gtc tcc aga gca att caa-3'
BNP rev	5'-gaa atg gcc cag aga cag ct-3'
BNP Sonde	5'-tgc aga agc tgc tgg agc tga taa gag a-3'
$\beta_1$ -AR for	5'-cgc ctc ttc gtc ttc ttc a-3'
$\beta_1$ -AR rev	5'-ggc agt aga tga tgg ggt tga-3'
$\beta_1$ -AR Sonde	5'-ctg ggc tac gcc aac tcg gcc-3'

RT-PCR-Ansatz für GAPDH (10 µl):

Substanz	Volumen (µl)
GAPDH for (10 µM)	0,6
GAPDH rev (10 µM)	0,4
GAPDH Sonde (10 µM)	0,2
<i>Master Mix</i>	5,0
cDNA (siehe Kap. 2.8.2)	1,0
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	2,8

RT-PCR-Ansatz für PDE2A (10 µl):

Substanz	Volumen (µl)
PDE2A for (10 µM)	0,9
PDE2A rev (10 µM)	0,9
PDE2A Sonde (10 µM)	0,2
<i>Master Mix</i>	5,0
cDNA (siehe Kap. 2.8.2)	1,0
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	2,0

RT-PCR-Ansatz für ANP (10 µl):

Substanz	Volumen (µl)
ANP for (10 µM)	0,6
ANP rev (10 µM)	0,4
ANP Sonde (10 µM)	0,2
<i>Master Mix</i>	5,0
cDNA (siehe Kap. 2.8.2)	1,0
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	2,8

RT-PCR-Ansatz für BNP (10 µl):

Substanz	Volumen (µl)
BNP for (10 µM)	0,3
BNP rev (10 µM)	0,3
BNP Sonde (10 µM)	0,1
<i>Master Mix</i>	5,0
cDNA (siehe Kap. 2.8.2)	1,0
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	3,3

RT-PCR-Ansatz für  $\beta_1$ -AR (10 µl):

Substanz	Volumen (µl)
$\beta$ -AR for (10 µM)	0,9
$\beta$ -AR rev (10 µM)	0,3
$\beta$ -AR Sonde (10 µM)	0,2
<i>Master Mix</i>	5,0
cDNA (siehe Kap. 2.8.2)	1,0
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	2,6

Bei dem angegebenen *Master Mix* handelte es sich um den *Taqman<sup>®</sup> Universal PCR-Master Mix* (Applied Biosystems; siehe Kap. 2.8.3).

PCR-Bedingungen:

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

**Tab. 2.4 Klassische RT-PCR:** Primersequenzen, PCR-Ansätze und PCR-Bedingungen zum Nachweis der organspezifischen PDE2A-Expression:

Primersequenzen:

Primer	Sequenz
PDE2A_C-term for	5'-cag gga gac ttg gag aag g-3'
HA-Tag rev	5'-gcc acc cat caa gct atc c-3'

Die Primersequenzen für den Nachweis der endogenen PDE2A und GAPDH sind in Tab. 2.3 angegeben.

PCR-Ansatz für GAPDH (25 µl):

Substanz	Volumen (µl)
GAPDH for (10 µM)	1,5
GAPDH rev (10 µM)	1,0
dNTPs (10 mM)	2,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,0
10-fach PCR Puffer	2,5
AmpliTaq Gold	0,75
cDNA (siehe Kap. 2.8.2)	3
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	11,25

PCR-Ansatz für die endogenen PDE2A (25 µl):

Substanz	Volumen (µl)
PDE2A for (10 µM)	0,5
PDE2A rev (10 µM)	0,5
dNTPs (10 mM)	0,25
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0
10-fach PCR Puffer	2,5

AmpliTaq Gold	0,25
cDNA (siehe Kap. 2.8.2)	2,0
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	17,0

PCR-Ansatz für die transgene PDE2A (25 µl):

Substanz	Volumen (µl)
PDE2A_C-term for (10 µM)	0,5
HA-Tag rev (10 µM)	0,5
dNTPs (10 mM)	0,25
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0
10-fach PCR Puffer	2,5
AmpliTaq Gold	0,25
cDNA (siehe Kap. 2.8.2)	2,0
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	17,0

Für die Polymerase und den PCR-Puffer wurde die *AmpliTaq Gold*<sup>®</sup> DNA-Polymerase (AppliedBiosystems) verwendet.

PCR-Bedingungen:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94 °C	10:00	1
Denaturierung	94 °C	00:15	32
Hybridisierung	60 °C	00:45	
Elongation	72 °C	00:45	
Elongation	72 °C	07:00	1

### 2.12.2 Antikörper

**Tab. 2.5** Verwendete Antikörper zum immunologischen Nachweis von Proteinen im Western-Blot (pk: polyklonal; mk: monoklonal; Anti-m: Anti-Maus; Anti-r: Anti-Kaninchen; Anti-g: Anti-Ziege; IgG: Immunglobulin G; -HRPO: konjugiert an Meerrettich-Peroxidase):

1. Antikörper	Verd.	Firma	2. Antikörper	Verd.
CSQ (pk)	1:2500	Dianova	Anti-r-IgG-HRPO	1:5000
cTnl (mk)	1:30000	Millipore	Anti-m-IgG-HRPO	1:10000
cTnl Serin 22/23 (pk)	1:1000	Cell Signaling	Anti-r-IgG-HRPO	1:5000
HA-tag (pk)	1:1000	Invitrogen	Anti-r-IgG-HRPO	1:10000
PathScan <sup>®</sup> (pk)	1:500	Cell Signaling	Anti-r-IgG-HRPO	1:2000
PDE2A (pk)	1:500	FabGennix	Anti-r-IgG-HRPO	1:10000
PDE2A (pk)	1:200	Santa Cruz	Anti-g-IgG-HRPO	1:10000
PLB (mk)	1:5000	Badrilla	Anti-m-IgG-HRPO	1:5000
PLB Serin 16 (pk)	1:5000	Badrilla	Anti-r-IgG-HRPO	1:5000
PLB Threonin 17 (pk)	1:5000	Badrilla	Anti-r-IgG-HRPO	1:5000
SERCA2a (pk)	1:500	Santa Cruz	Anti-g-IgG-HRPO	1:10000

Alle Sekundärantikörper wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

### 2.12.3 Substanzen

Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (37,5:1)	AppliChem
Agarose	Invitrogen
Alpha- <sup>32</sup> P-dCTP	Hartmann Analytics
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Aqua ad injectabilia	Braun

---

Bacto™ Tryptone	Becton Dickinson
Bacto™ Yeast	Becton Dickinson
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Ambion
Bromphenolblau	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dobutamin	Fresenius
Ethanol absolut	AppliChem
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetrasessigsäure (EDTA)	AppliChem
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerol	Merck
Glycin	AppliChem
Histidin	Sigma-Aldrich
Hydrochloridsäure (HCl)	AppliChem
Isoprenalin	Sigma-Aldrich
Isopropanol	AppliChem
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kanamycin	Gibco® Invitrogen
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchloridhexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )	AppliChem
Mercaptoethanol	Gibco
Metamizol	Ratiopharm
Methanol	AppliChem

Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumchlorid 0,9%	Braun
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	AppliChem
Natriumedetat	AppliChem
Natriumfluorid (NaF)	Fluka
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
Natriumhydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Ponceau-S	AppliChem
Proteinase K	Roth
Saccharose	AppliChem
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad
Tetranatriumdiphosphat (Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Sigma-Aldrich
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)-Base	Sigma-Aldrich
Tris Hydrochlorid (Tris-HCl)	AppliChem
Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween <sup>®</sup> 20)	AppliChem
Ziegenserum	PAA Laboratories

#### 2.12.4 Hilfsmittel und Geräte

<i>Agarose GEL Electrophoresis System Sub-Cell GT</i>	Bio-Rad
Analytikwaage	Sartorius AG
<i>Biosphere<sup>®</sup> Filter Tips</i>	Sarstedt
Brutschrank (Bakterien)	Hereaus
Elektrophoresespannungsgerät <i>PowerPack P25</i>	Biometra

---

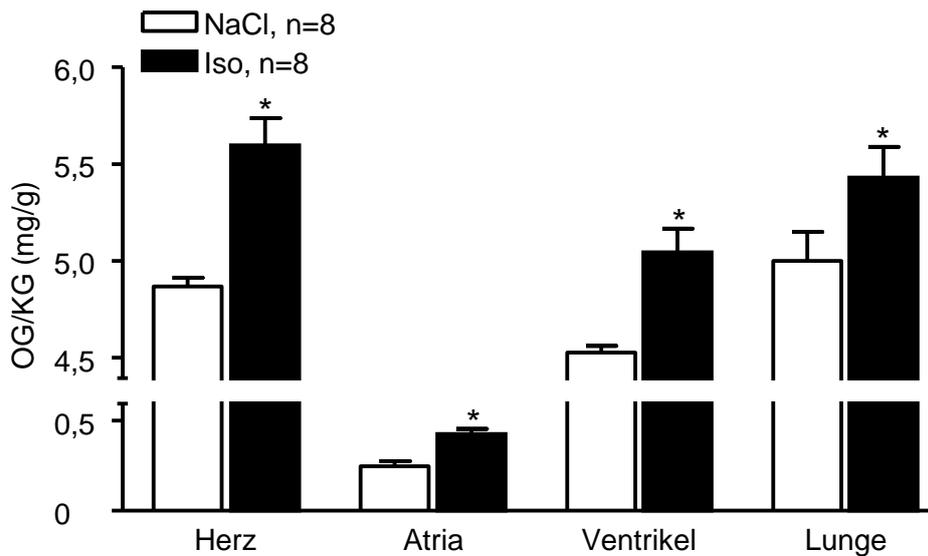
Elektrophoresespannungsgerät <i>PowerPac Basic</i>	Bio-Rad
Elektrophoresespannungsgerät <i>PowerPac HC</i>	Bio-Rad
Elektrophoresesystem (Mini Protean <sup>®</sup> <i>electrophoreses cell</i> )	Bio-Rad
Eppendorf <i>Safe Lock</i> Reaktionsgefäße	Eppendorf
Gewebekulturplatten, <i>6-well</i>	Nunc
Horizontalschüttler <i>Rocking Platform</i>	Biometra
<i>Hybridization bottles</i> HB-OV-BM	Thermo EC
<i>Hybridization mini oven</i> MKli HYBAID	Thermo EC
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge 5804R</i>	Eppendorf
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt
Magnetrührer Ikamag <sup>®</sup> Reo	Schütt
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
PCR-Gerät <i>GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700</i>	Applied Biosystems
Photometer, <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf
pH-Meter	InoLab
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Pipetten, serologisch 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polytron Stativ-Dispergiergerät	Kinematica
Tischzentrifuge <i>Combi-Spin FVL-2400N</i>	Peqlab
<i>TissueLyser II</i>	Qiagen
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf
Wasserbad	Köttermann
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Chronisches Isoprenalin-Stressmodell der Maus

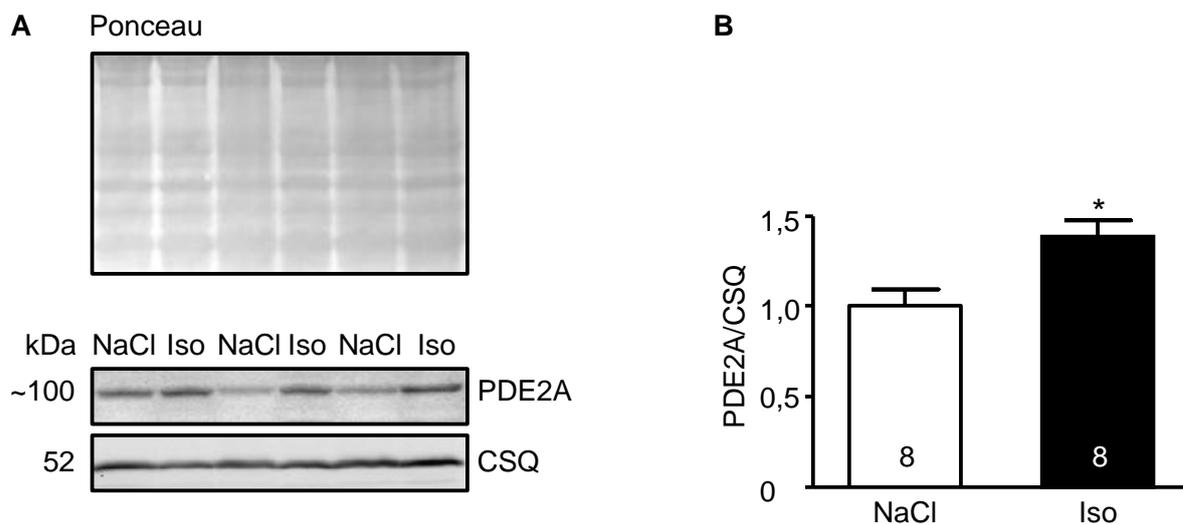
Die Eigenschaft der Phosphodiesterase-2A (PDE2A), cGMP-stimuliert sowohl cAMP als auch cGMP (zyklisches Adenosin- bzw. Guanosinmonophosphat) hydrolysieren zu können, macht diese zu einem interessanten Stellglied innerhalb und besonders zwischen den entsprechenden Signalwegen. Gleichzeitig gibt es noch wenige Daten bezüglich möglicher Veränderungen der kardialen PDE2A in kranken Herzen. Daher sollte der Proteingehalt der PDE2A in einem experimentellen Herzinsuffizienzmodell untersucht werden. Hierzu wurde als anerkanntes kardiovaskuläres Stressmodell das der chronisch Isoprenalin-induzierten Herzhypertrophie gewählt (El-Armouche et al. 2008; Wittköpper et al. 2010). Es wurden männliche Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet. Diese wurden über fünf Tage kontinuierlich mittels osmotischer Minipumpen mit Isoprenalin (30 µg/g x Tag; Iso) stimuliert. Die Behandlung der Kontrollgruppe erfolgte mit 0,9%iger Natriumchloridlösung (NaCl).

Nach fünf Tagen wurden das Herz und die Lunge der behandelten 12 Wochen alten Mäuse entnommen und die jeweiligen Gewichte auf das Körpergewicht normalisiert. Die Körpergewichte unterschieden sich in den untersuchten Gruppen nicht (Iso 29,7±0,5 g vs. NaCl 30,7±0,5 g, jeweils n=8). Wie bei einer Herzhypertrophie zu erwarten, zeigten sich allerdings deutliche Gewichtszunahmen (i) des gesamten Herzens, (ii) der Atria, (iii) der Ventrikel und als mögliches Zeichen einer Linksherzinsuffizienz auch (iv) der Lunge (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1 Relative Organgewichte nach chronischem Isoprenalin-induzierten Stress.** Die jeweiligen Organgewichte (OG) sind auf das Körpergewicht (KG) normalisiert. \* $p < 0,05$  vs. NaCl.

Molekularbiologisch wurde in denselben Tieren mittels Western-Blot die Proteinkonzentration der PDE2A bestimmt. Die Normalisierung erfolgte auf Calsequestrin (CSQ). Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinkonzentration der PDE2A in den Isoprenalin-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe um rund 40% erhöht war (Abb. 3.2.).

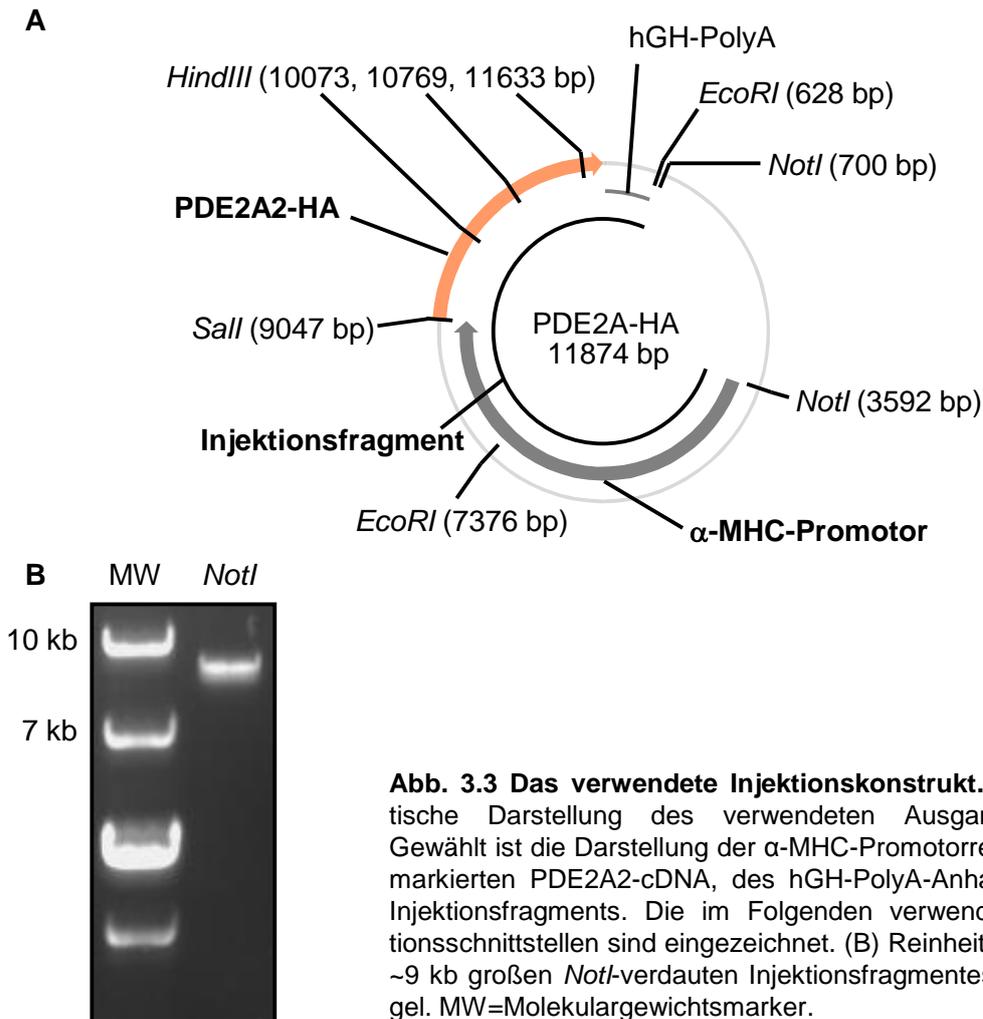


**Abb. 3.2 Analyse der PDE2A-Proteinkonzentration nach chronischer Isoprenalingabe.** (A) Exemplarische Ausschnitte der Ponceau-gefärbten Membran und der detektierten Signale der PDE2A und des CSQ im Western-Blot. (B) Proteingehalt der PDE2A normalisiert auf CSQ in den Ventrikeln der Isoprenalin-behandelten Tiere (Iso) im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl). Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in den Säulen dargestellt. \* $p < 0,05$  vs. NaCl.

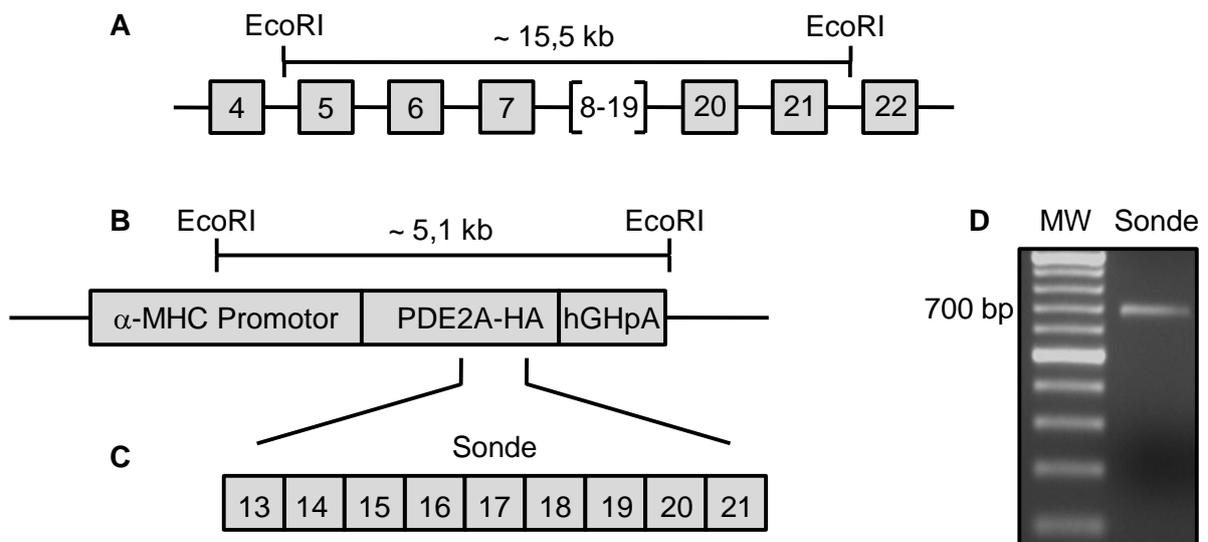
### 3.2 Generierung PDE2A2-transgener Mauslinien

Da bis zum heutigen Zeitpunkt die kardiale Funktion der PDE2A *in vivo* nur unzureichend untersucht ist, sollte eine Maus generiert werden, die die PDE2A herzspezifisch überexprimiert. So sollte eine neue Möglichkeit geschaffen werden, ein besseres Verständnis für die Funktion der PDE2A als Stellglied zwischen den cGMP- und cAMP-vermittelten Signalwegen des Herzens zu erlangen.

Das Ausgangskonstrukt wurde uns freundlicherweise aus dem Labor von Herrn Professor Fischmeister (*Laboratoire de Signalisation et Physiopathologie Cardiaque*, Universität Paris-Süd 11, Frankreich) zur Verfügung gestellt. In Abb. 3.3 ist das Konstrukt schematisch dargestellt. Es enthält den unprozessierten murinen Promotor der  $\alpha$ -Isoform der schweren Myosinkette ( $\alpha$ -MHC), gefolgt von der cDNA der murinen PDE2A2 (*NCBI Reference Sequence*: NM\_001008548.3). Im Vergleich zu den Isoformen 1 und 3 der PDE2A zeichnet sich die PDE2A2 N-terminal durch eine hydrophobe Region aus, die möglicherweise über ein membranassoziiertes Vorkommen der Isoform 2 entscheiden könnte (siehe Kap. 1.4.2). Die Sequenz der PDE2A2 wurde C-terminal mit einem Hämagglutinin (HA)-Tag versehen (PDE2A2-HA), was die spätere Analyse des transgenen Proteins ermöglichen sollte. Die folgende Polyadenylierungs-Region (PolyA) entstammte dem Gen des humanen Wachstumshormons (hGH). Zur Linearisierung und zur Entfernung der Vektorsequenzen für die Pronukleusinjektion wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *NotI* verdaut und das gewünschte Fragment über ein Agarosegel aufgereinigt (Abb. 3.3).

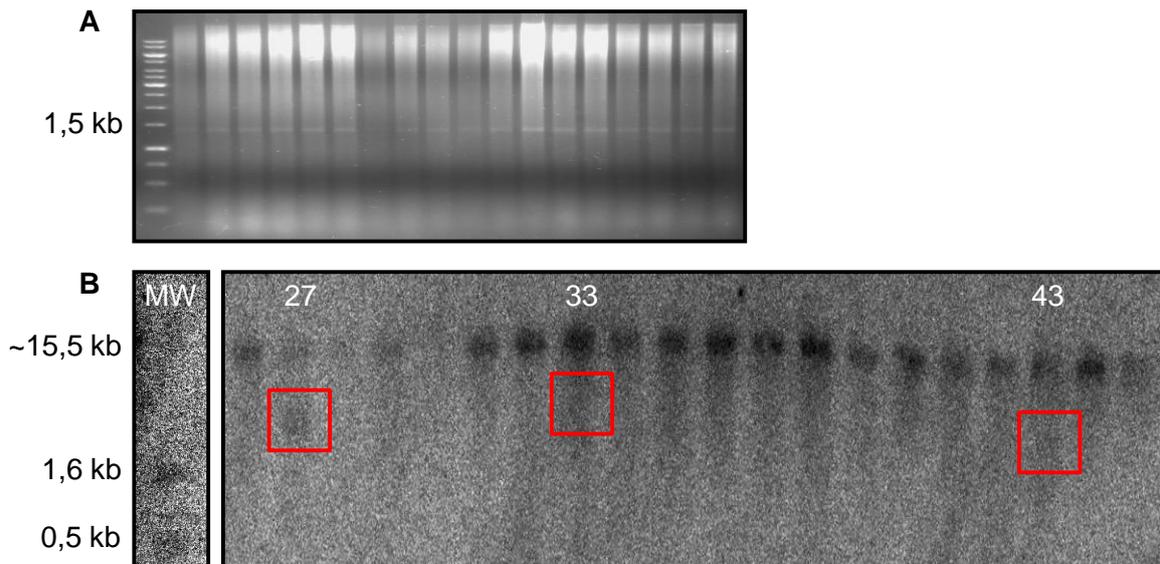


Nach erfolgreicher Pronucleusinjektion wurden 46 potenzielle Gründungstiere geboren ( $F_0$ -Generation). Die Identifikation transgener Tiere erfolgte zunächst mittels Southern-Blot. Hierzu wurde eine 696 bp lange Sonde mit einem *HindIII*-Restriktionsverdau aus dem Ausgangskonstrukt (Abb. 3.3) geschnitten. Die DNA-Sequenz der Sonde erstreckte sich von Exon 13 bis Exon 21 (Abb. 3.4 C). Die später radioaktiv markierte Sonde konnte so partiell in jeder Region zwischen diesen Exonen binden. Der Verdau der genomischen DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* durchgeführt. Die vorherige Untersuchung möglicher *EcoRI*-Schnittstellen der genomischen und transgenen DNA ließ ein Signal im Southern-Blot für die endogene PDE2A bei einer Größe von ~15,5 kb erwarten. Das Signal für die transgene PDE2A wurde für eine Größe von ~5,1 kb errechnet (Abb. 3.4 A und B).



**Abb. 3.4 Erläuterung des Bandenmusters für den Southern-Blot.** (A) Schematische Darstellung eines Ausschnitts des murinen PDE2A-Gens. *EcoRI*-Schnittstellen liegen in den Intron-Sequenzen zwischen Exon 4 und 5 und zwischen Exon 21 und 22. Dieses ~15,5 kb große Fragment wird von der Sonde detektiert und ergibt das Signal der endogenen PDE2A. (B) Die schematische Darstellung des Injektionsfragments zeigt die *EcoRI*-Schnittstellen in der  $\alpha$ -MHC-Promotorregion und direkt hinter dem PolyA-Ende (hGHpA). Das verdaute Fragment von ~5,1 kb ergibt somit das Signal für die transgene PDE2A. (C) Schematische Darstellung der 696 bp großen Sonde, herausgeschnitten aus dem Ausgangskonstrukt (Abb. 3.3). (D) Gelelektrophoretische Reinheitskontrolle der Sonde zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (MW).

Die Analyse der gelelektrophoretischen Auftrennung des genomischen *EcoRI*-Verdaus zeigte die charakteristischen Banden repetitiver Sequenzen bei ~1,3 kb (Cheng und Schildkraut 1980; Abb. 3.5 A). Nach Durchführung des Southern-Blots zeigte dessen Auswertung im Phosphorimager die erwarteten Signale der endogenen PDE2A bei ~15,5 kb in allen untersuchten Proben. Das errechnete Signal der transgenen PDE2A bei ~5,1 kb wurde in drei Proben der Tiere mit den fortlaufenden Nummern 27, 33 und 43 detektiert (Abb. 3.5 B).

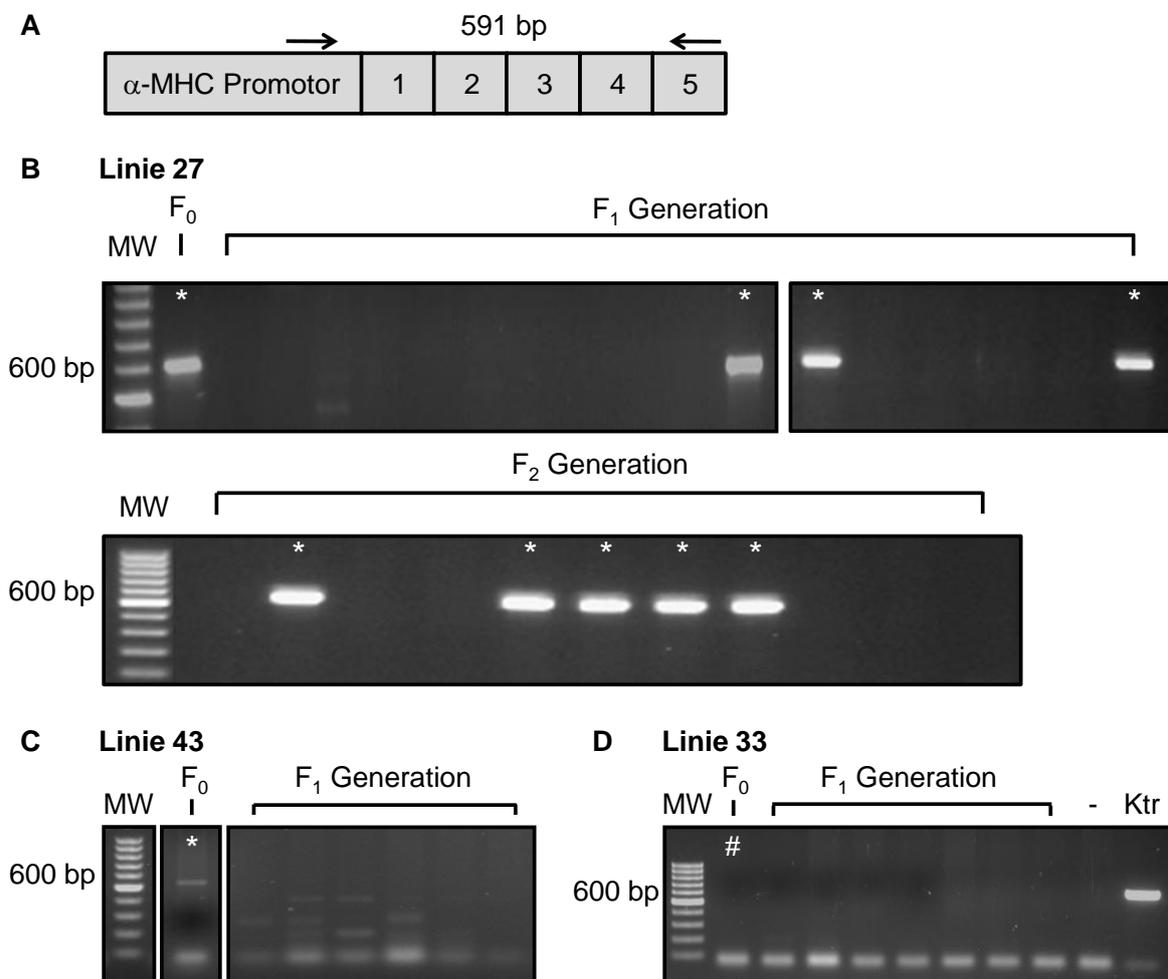


**Abb. 3.5 Southern-Blot-Analyse der F<sub>0</sub>-Generation.** (A) Repräsentatives Foto der gelelektrophoretischen Auftrennung der genomischen DNA nach deren *EcoRI*-Verdau. Gezeigt ist zudem ein Molekulargewichtsmarker in der linken Spur. (B) Exemplarischer Ausschnitt der Phosphorimageraufnahme der untersuchten Proben und eines Molekulargewichtsmarkers (MW). Die Signale der transgenen PDE2A sind rot umrandet.

Die Befunde sollten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestätigt und alle folgenden Genotypisierungen ebenfalls mittels PCR vorgenommen werden. Die gewählten Primer befanden sich im  $\alpha$ -MHC-Promotor und dem Exon 5 der PDE2A. Das gebildete Fragment konnte auf Grund der Kombination von  $\alpha$ -MHC-Promotor und Exon 5 der PDE2A nur in transgenen Tieren amplifiziert werden. Das Transgenspezifische Fragment hatte eine kalkulierte Länge von 591 bp (Abb. 3.6 A).

Nach der PCR-Amplifikation zur Genotypisierung zeigte sich zunächst nur für die Maus 27 das erwartete transgene DNA-Fragment bei ~600 bp (F<sub>0</sub>; Abb. 3.6 B). Der Befund aus der Southern-Blot-Analyse konnte somit für diese Linie bestätigt werden. Zusätzlich konnte nach Optimierung der PCR-Bedingungen auch das Weibchen 43 als transgen bestätigt werden (F<sub>0</sub>; Abb. 3.6 C). Trotz aller weiteren Versuche, die PCR-Bedingungen zu sensitivieren, war es nicht möglich, die Maus 33 in der PCR als transgen zu verifizieren (F<sub>0</sub>; Abb. 3.6 D). Es wurden zunächst trotzdem alle drei F<sub>0</sub>-Tiere für die Verpaarungen verwendet. Diese erfolgten mit Mäusen des Stammes C57BL/6J. Die Nachkommen dieser Tiere (F<sub>1</sub>-Generation) wurden wiederum mittels PCR genotypisiert. Bei den Nachkommen des F<sub>0</sub>-Männchens 27 zeigte unerwarteterweise nur ca. jedes achte Tier der nächsten Generation (F<sub>1</sub>) einen

transgenen Genotyp (Abb. 3.6 B). Die Verpaarung dieser wenigen transgenen Nachkommen der F<sub>1</sub>-Generation in die F<sub>2</sub>-Generation ergab dann aber eine erwartete Transmission von 50% (Abb. 3.6 B). Die Linie wurde auf Grund des Gründungstieres als Linie 27 bezeichnet. Die Nachkommen (F<sub>1</sub>-Generation) des PCR-positiven F<sub>0</sub>-Weibchens 43 waren allesamt nicht als transgen zu identifizieren (Abb. 3.6 C), so dass hier keine weitere Verpaarung zur Etablierung einer neuen Linie erfolgte. Bei den Nachkommen des nur im Southern-Blot als transgen zu identifizierenden Weibchens 33 (Abb. 3.5 B) zeigten sich ebenfalls keine transgenen F<sub>1</sub>-Nachkommen (Abb. 3.6 D). Es wurde daher auch in dieser Linie auf weitere Verpaarungen verzichtet.

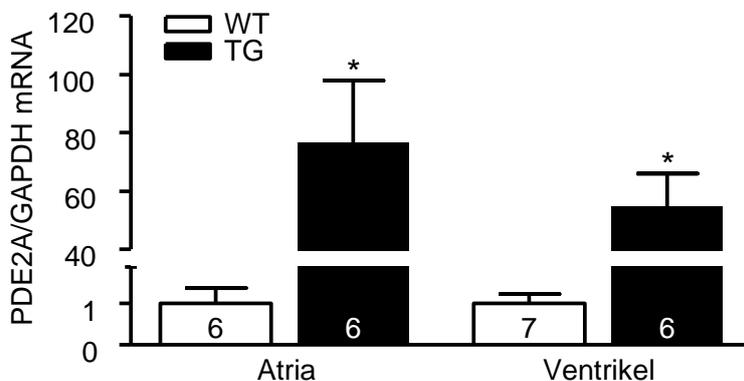


**Abb. 3.6 Genotypisierung mittels PCR.** (A) Schematischer Ausschnitt der injizierten cDNA und der Lokalisation der verwendeten Primer (Pfeile). (B) Exemplarische gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten zur Genotypisierung der Linie 27. Gezeigt sind das F<sub>0</sub>-Tier und eine Auswahl an Nachkommen der F<sub>1</sub>- und F<sub>2</sub>-Generation. Transgene Tiere sind mit \* markiert. (C) Gelelektrophorese des transgenen F<sub>0</sub>-Tiers 43 (\*) mit fehlender Transmission in die nächste Generation und (D) der nicht transgenen Tiere der Linie 33. F<sub>0</sub>-Gründungstier (#), H<sub>2</sub>O-Negativkontrolle (-). Als „Positivkontrolle“ wurden ~50 ng des Ausgangskonstrukts (siehe Kap. 3.2) für die PCR eingesetzt (Ktr). Zusätzlich lief auf jedem Gel ein Molekulargewichtsmarker (MW).

Für die anschließende basale Charakterisierung der Linie 27 wurden Tiere der F<sub>2</sub> Generation dieser Linie verwendet. Alle Untersuchungen wurden mit gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Geschwistertieren durchgeführt.

### 3.3 Analyse des PDE2A-mRNA-Gehalts

Zum Nachweis der Transkription der transgenen PDE2A wurde die mRNA-Gesamtkonzentration der endogenen und transgenen PDE2A bestimmt. Hierzu wurden die Herzen 7-9 Wochen alter Wildtyp-Tiere (WT) und transgener Tiere (TG) entnommen. Aus den Ventrikeln und Atria wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die PDE2A-Transkriptmenge mittels quantitativer *realtime*-PCR (RT-PCR) bestimmt. Die Normalisierung der mRNA-Konzentration der PDE2A erfolgte auf GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Die Analyse ergab eine rund 55-fach erhöhte mRNA-Konzentration im Ventrikel bzw. eine 75-fache Steigerung in den Atria der TG- verglichen mit den WT-Tieren. Der in der Tendenz zu erkennende Unterschied im mRNA-Gehalt zwischen Atria und Ventrikel in der TG-Gruppe war als nicht signifikant zu bewerten (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7 Konzentration der kardialen PDE2A-mRNA.** Die Menge der PDE2A-mRNA ist auf GAPDH normalisiert. Die Anzahl der untersuchten Proben ist in den Säulen gezeigt. \* $p < 0,05$  vs. WT.

Somit konnte die erfolgreiche Transkription der transgenen PDE2A im Herzen gezeigt werden. Als nächster Schritt sollte die erfolgreiche Translation auf Proteinebene nachgewiesen werden.

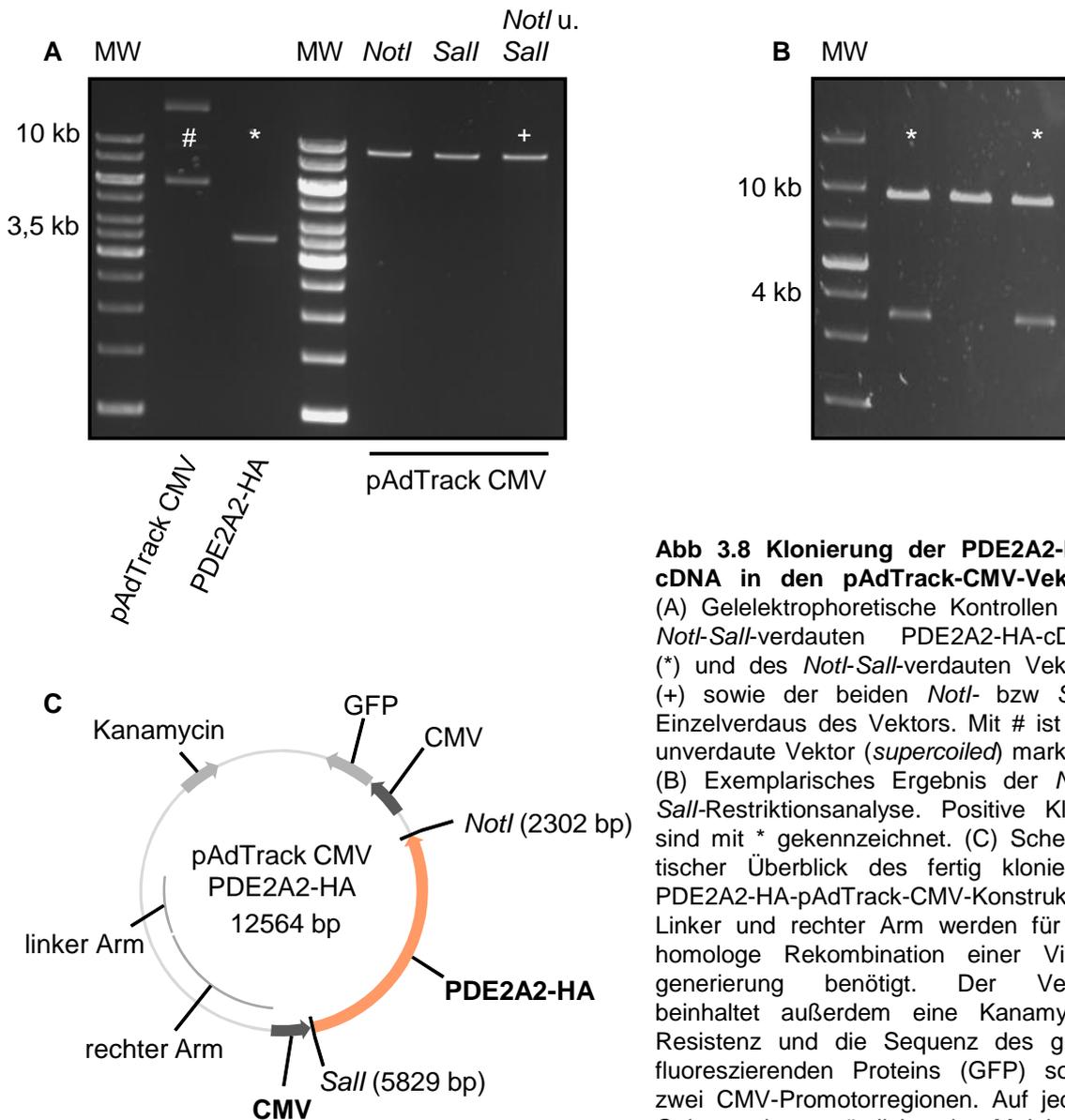
### 3.4 Untersuchung der PDE2A auf Proteinebene

#### 3.4.1 Klonierung der PDE2A-HA in einen Expressionsvektor

Die Detektion der PDE2A aus kardialen SDS-Standardhomogenaten zeigte eine Vielzahl unspezifischer Banden. Um die spezifische PDE2A-Bande identifizieren zu können, wurde zunächst eine „Positivkontrolle“ generiert. Hierzu sollte die PDE2A2-HA-cDNA aus dem Ausgangskonstrukt (siehe Kap. 3.2, Abb. 3.3) in einen Expressionsvektor kloniert werden. Aus folgenden Gründen wurde der pAdTrack-CMV-Vektor verwendet: Das fertige PDE2A2-HA-pAdTrack-CMV-Konstrukt sollte (i) zur transienten Transfektion von HEK-293-Zellen und somit für eine Expression des PDE2A2-HA-Proteins als „Positivkontrolle“ in den Western-Blot-Analysen verwendet werden, (ii) zur Bestimmung der PDE2A2-Hydrolyseaktivität von cGMP und cAMP *in vitro* genutzt werden und (iii) zukünftig zur Generierung eines Adenovirus dienen.

Die cDNA der PDE2A2-HA wurde mit den Restriktionsenzymen *Sall* und *NotI* aus dem Ausgangskonstrukt (siehe Kap. 3.2, Abb. 3.3) herausgeschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt. Das isolierte Fragment hatte eine Größe von ~3,5 kb (Abb. 3.8 A). Auch alle anderen Schritte der Klonierung wurden zunächst gelelektrophoretisch kontrolliert. Der *Sall-NotI* Doppelverdau des pAdTrack-CMV-Vektors wurde vor der Klonierung auf vollständige Linearisierung analysiert. Da die *Sall*- und *NotI*-Restriktions-Schnittstellen nur 7 bp auseinander lagen und das herausgeschnittene Segment somit nicht detektierbar gewesen ist, hätte das isolierte Schneiden nur eines der beiden Enzyme in dem 9.220 bp großen Vektor nicht bemerkt werden können. Darum wurde zusätzlich das erfolgreiche Schneiden beider Enzyme separat durch die Linearisierungen des Vektors nur mit *Sall* bzw. *NotI* überprüft. Sowohl nach dem *Sall-NotI* Doppelverdau als auch nach beiden Einzelverdaus war gelelektrophoretisch der linearisierte Vektor bei ~9 kb zu erkennen (Abb. 3.8 A), so dass von einem suffizienten Verdau beider Enzyme ausgegangen werden konnte. Die *Sall-NotI*-doppelverdauten Fragmente des pAdTrack-CMV-Vektor wurden aus dem Gel aufgereinigt und die ebenfalls *Sall-NotI*-geschnittene PDE2A2-HA-cDNA wurde C-terminal des CMV-Promotors in den pAdTrack-CMV-Vektor kloniert. Das fertige PDE2A2-HA-pAdTrack-CMV-Konstrukt

(Abb. 3.8 C) wurde in Bakterien transformiert und positive Klone mittels Restriktionsanalyse durch die Enzyme *Sall-NotI* (Abb. 3.8 B) bzw. *EcoRI* (Aufnahme nicht gezeigt) identifiziert.

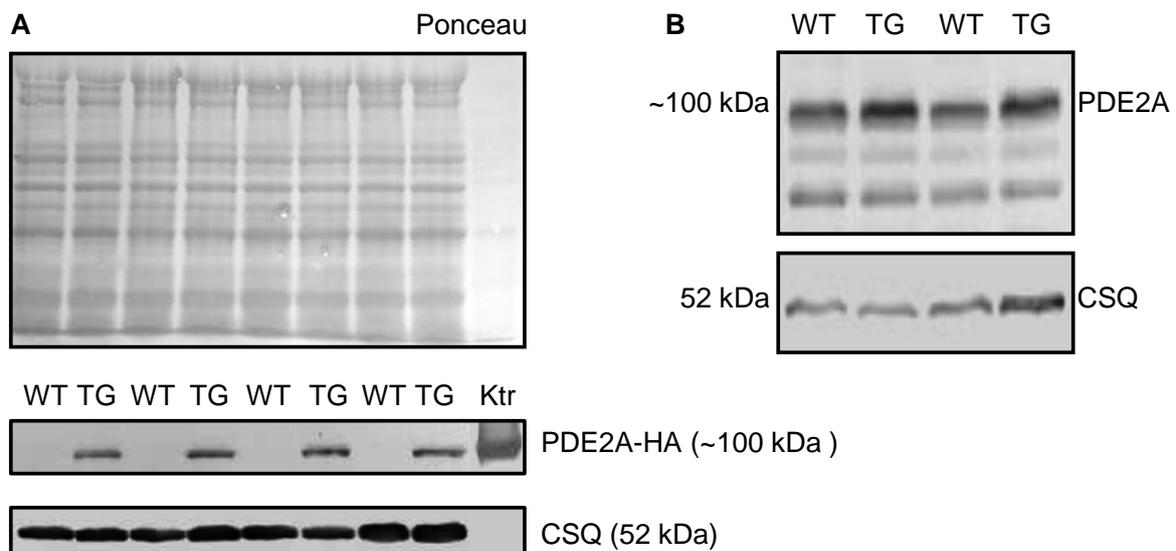


**Abb 3.8 Klonierung der PDE2A2-HA-cDNA in den pAdTrack-CMV-Vektor.** (A) Gelelektrophoretische Kontrollen der *NotI-Sall*-verdauten PDE2A2-HA-cDNA (\*) und des *NotI-Sall*-verdauten Vektors (+) sowie der beiden *NotI*- bzw. *Sall*-Einzelverdaus des Vektors. Mit # ist der unverdaute Vektor (*supercoiled*) markiert. (B) Exemplarisches Ergebnis der *NotI-Sall*-Restriktionsanalyse. Positive Klone sind mit \* gekennzeichnet. (C) Schematischer Überblick des fertig klonierten PDE2A2-HA-pAdTrack-CMV-Konstrukts. Linker und rechter Arm werden für die homologe Rekombination einer Virusgenerierung benötigt. Der Vektor beinhaltet außerdem eine Kanamycin-Resistenz und die Sequenz des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) sowie zwei CMV-Promotorregionen. Auf jedem Gel wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker geladen (MW).

### 3.4.2 Analyse der PDE2A-Proteinmenge

Zur Analyse der PDE2A-Proteinmenge wurden 7-9 Wochen alten WT- und TG-Geschwistertieren die Herzen entnommen und aus den Ventrikeln SDS-

Standardhomogenate gewonnen. Diese wurden für die Western-Blot-Analysen verwendet. Eine durch die mRNA-Daten (siehe Kap. 3.3) vermutete Transgenbedingte Überexpression der PDE2A in den TG-Tieren sollte mittels eines PDE2A-Antikörpers (FabGennix) überprüft werden. Da die transgene PDE2A zusätzlich mit einem HA-Tag (siehe Kap. 3.2) versehen war, wurde ergänzend ein Antikörper verwendet, welcher gegen das HA-Peptid gerichtet war. Wie erwartet konnte in der Western-Blot-Analyse das HA-Peptid ausschließlich in den TG-Tieren bei ca. 100 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.9 A). Auch mit dem Antikörper, der gegen die PDE2A gerichtet war, konnte bei ~100 kDa ein stärkeres Signal in den TG-Tieren beobachtet werden. Die Quantifizierung sollte nach Normalisierung auf CSQ erfolgen. Für die Auswertung des Signals TG vs. WT bestand das große Problem, dass die spezifische Bande der PDE2A mit einem unspezifischen Signal auf gleicher Höhe vermischt wurde, so dass eine Quantifizierung der PDE2A-Proteinmenge bis heute nicht möglich war (Abb. 3.9 B).



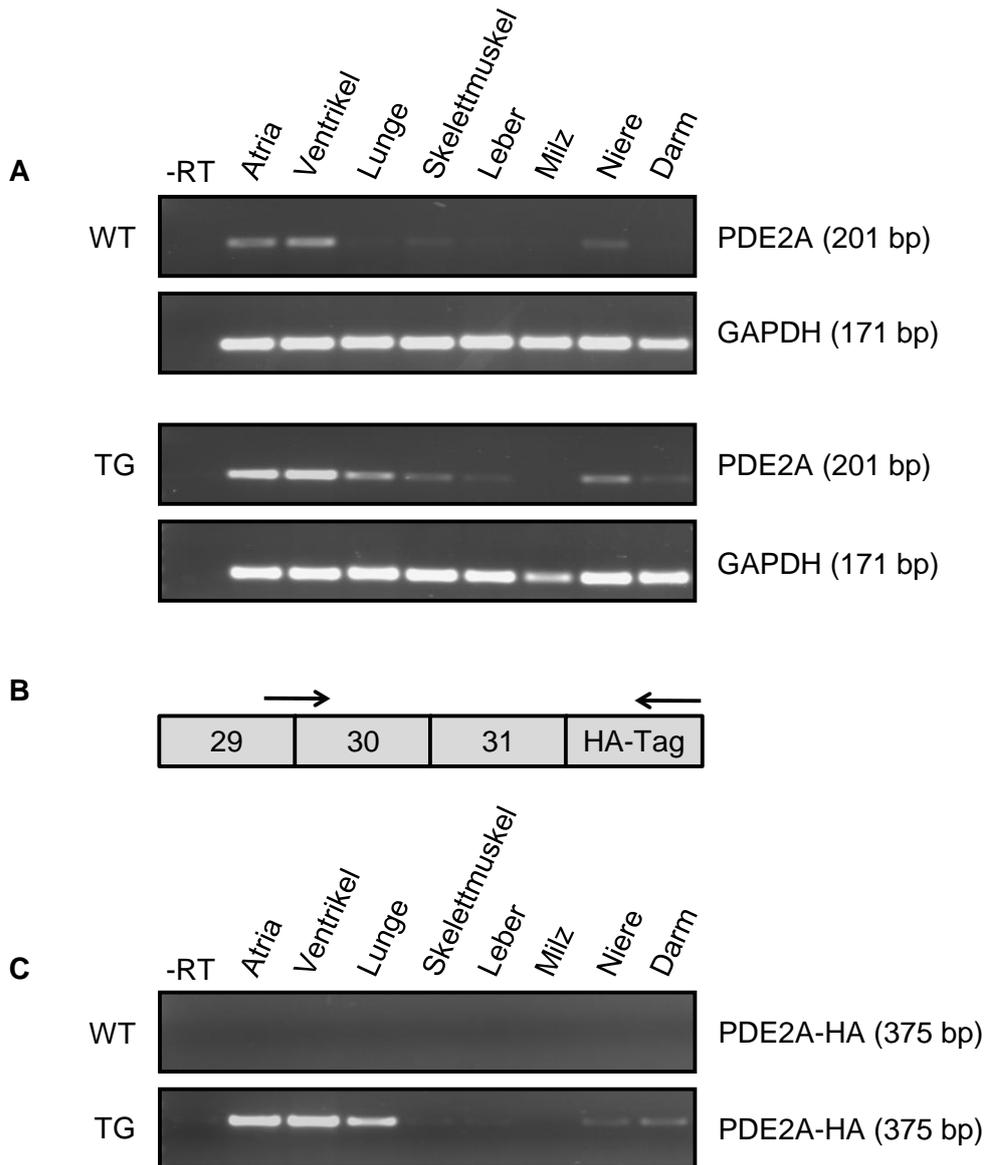
**Abb. 3.9 Western-Blot-Analyse der PDE2A-HA.** (A) Ponceau-Färbung der Nitrocellulosemembran und exemplarische Darstellung des HA-Peptid-Nachweises der transgenen PDE2A-HA in den TG-Tieren. Als Kontrolle (Ktr) diente das HEK-Zell-Lysat nach Transfektion mit dem PDE2A2-HA-pAdTrack-CMV-Konstrukt (siehe Kap. 3.4.1). (B) Stärkeres Signal in den PDE2A-TG Mäusen. Die Bande ist dachartig über einer unspezifischen Bande zu erkennen. Das Ktr-Signal ist nicht abgebildet. Als Ladekontrolle wurde in beiden Fällen CSQ gezeitigt.

Die in Kap. 3.1 beschriebene Detektion der PDE2A (Abb. 3.2) im Mausmodell der chronisch Isoprenalin-induzierten Herzhypertrophie erfolgte kurz vor der Beendigung dieser Arbeit mit einem anderen Antikörper (Santa Cruz Biotechnology). Es besteht daher die Hoffnung, zukünftig den Proteingehalt der PDE2A mittels dieses Antikörpers in den transgenen Tieren bestimmen zu können.

### 3.5 Organspezifische Expression der PDE2A

Zur Analyse der herzspezifischen PDE2A-HA-Expression durch Verwendung des  $\alpha$ -MHC-Promotors wurden von einer transgenen Maus und einem nicht transgenen Geschwistertier folgende Organe entnommen: Herz, Lunge, Skelettmuskel, Leber, Milz, Niere und Darm. Die RNA wurde aus den Organen isoliert und die synthetisierte cDNA für eine nicht-quantitative RT-PCR eingesetzt. Es wurden zwei verschiedene Ansätze untersucht, die sich in den verwendeten Primern unterschieden. (i) Der Gesamt-PDE2A-Gehalt wurde durch Verwendung der etablierten RT-PCR-Primer (siehe Kap. 3.3) und (ii) die transgene PDE2A-mRNA durch eine C-terminale Lokalisation anderer Primer detektiert. Die Transgen-Spezifität wurde hierbei durch die Wahl des Rückwärts-Primers im HA-Tag (Abb. 3.10 B) erreicht. GAPDH diente als Ladekontrolle. Alle PCRs wurden mit je 32 Amplifikationszyklen durchgeführt und jeweils negativ-RT Proben (-RT) mitgeführt.

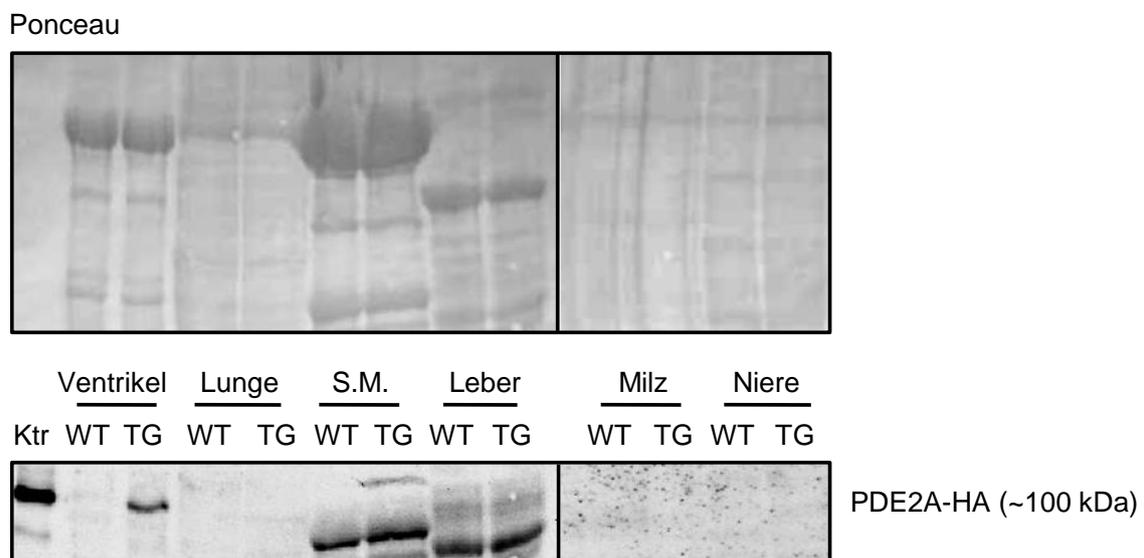
Im WT zeigte sich im Organvergleich das stärkste Signal für die gesamte PDE2A im Herzen (Abb. 3.10 A). Wie erwartet konnten mit den Transgen-spezifischen Primern in keinem Organ des WT-Tieres die PDE2A amplifiziert werden (Abb. 3.10 C). In den Organen des TG-Tieres zeigte sich verglichen mit dem WT-Tier ein stärkeres Signal für die gesamte PDE2A im Herzen und der Lunge (Abb. 3.10 A). Dieses Ergebnis deckte sich mit der Beobachtung, dass die transgene PDE2A besonders in den Atria, den Ventrikeln und der Lunge exprimiert wurde (Abb. 3.10 C).



**Abb. 3.10 Klassische RT-PCR-Analyse in verschiedenen Organen.** (A) Organverteilung der Gesamt-PDE2A im WT und TG. Als Ladekontrolle ist GAPDH gezeigt. (B) Schematische Übersicht des Primerpaares (Pfeile) zum Nachweis der transgenen PDE2A. Gezeigt sind Exon 29 bis 31 und der HA-Tag des transgenen PDE2A-Konstrukts. (C) Organspezifität der transgenen PDE2A. Die verwendeten Molekulargewichtsmarker sind auf den gewählten Gelbildern nicht zu sehen. Die errechneten Fragmentgrößen sind jeweils in Klammern angegeben.

Das Expressionsmuster der transgenen PDE2A sollte auf Proteinebene weiter verifiziert werden. Von denselben Tieren wurden aus den Ventrikeln, der Lunge, einem Skelettmuskel, der Leber, der Milz und einer Niere auch die Proteine isoliert und die transgene PDE2A-Expression immunologisch mit dem HA-Tag-Antikörper detektiert (Abb. 3.11). Wie erwartet konnte auf Proteinebene die transgene PDE2A

nur in den Ventrikeln der TG-Maus detektiert werden. Die Expression der PDE2A in der Lunge konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Ein detektiertes schwaches Signal im Skelettmuskel der TG-Maus entsprach eindeutig nicht den erwarteten ~100 kDa und wurde somit als nicht PDE2A-HA-abhängig gewertet. Die weiteren detektierten Signale im Skelettmuskel und der Leber waren in der TG- und WT-Maus identisch und entsprachen ebenfalls nicht einer Größe von ~100 kDa, so dass sie ebenfalls als unspezifisch gewertet wurden (Abb. 3.11). Die Atria wurden auf Proteinebene nicht untersucht, da die Gewebemenge vollständig für die RNA-Isolation benötigt worden war.

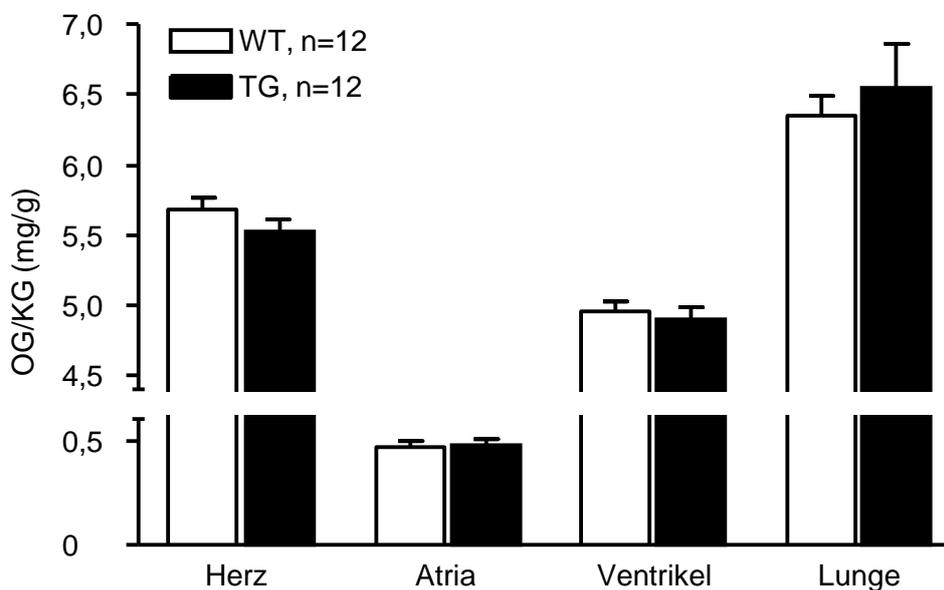


**Abb. 3.11 Herzspezifische Expression auf Proteinebene.** Zum Nachweis der Transgenspezifischen PDE2A-HA bei ~100 kDa wurden je 80 µg Protein geladen. Das Ponceau ist als Ladekontrolle gezeigt. S.M.=Skelettmuskel. Ktr=HEK-Zell-Lysat (siehe Kap. 3.4.1).

### 3.6 Gravimetrische Untersuchung der PDE2A-TG Mäuse

Im Rahmen der kardialen Grundcharakterisierung der transgenen PDE2A-Linie 27 wurden gravimetrische Untersuchungen durchgeführt. Um Hinweise auf organmorphologische Veränderungen wie z.B. eine Herzhypertrophie zu bekommen, wurden bei jedem Tier während der Organentnahme für die molekularbiologischen Untersuchungen auch das Gewicht des gesamten Herzens, der Atria und der

Ventrikel bestimmt. Zusätzlich wurden auch die Gewichte der Lunge und der Leber bestimmt. Dies sollte bei einer möglichen Gewichtszunahme Hinweise auf einen Rückstau vor dem linken bzw. rechten Herzen im Sinne einer kardialen Insuffizienz liefern. Die Körpergewichte der 7-12 Wochen alten Mäuse unterschieden sich zwischen den TG- und den WT-Geschwistertieren nicht (TG  $24,1 \pm 1,0$  g vs. WT  $23,1 \pm 1,2$  g, jeweils  $n=12$ ). Die Organgewichte wurden auf das jeweilige Körpergewicht normalisiert. Auch im Vergleich der relativen Organgewichte von TG- zu WT-Mäusen zeigten sich keine Unterschiede (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12 Untersuchung der relativen Organgewichte.** Die jeweiligen Organgewichte (OG) wurden auf das Körpergewicht (KG) des jeweiligen Tieres normalisiert. Die Daten der relativen Lebergewichte sind nicht gezeigt (TG  $51,4 \pm 0,7$  mg/g vs. WT  $49,9 \pm 0,8$  mg/g, jeweils  $n=12$ ).

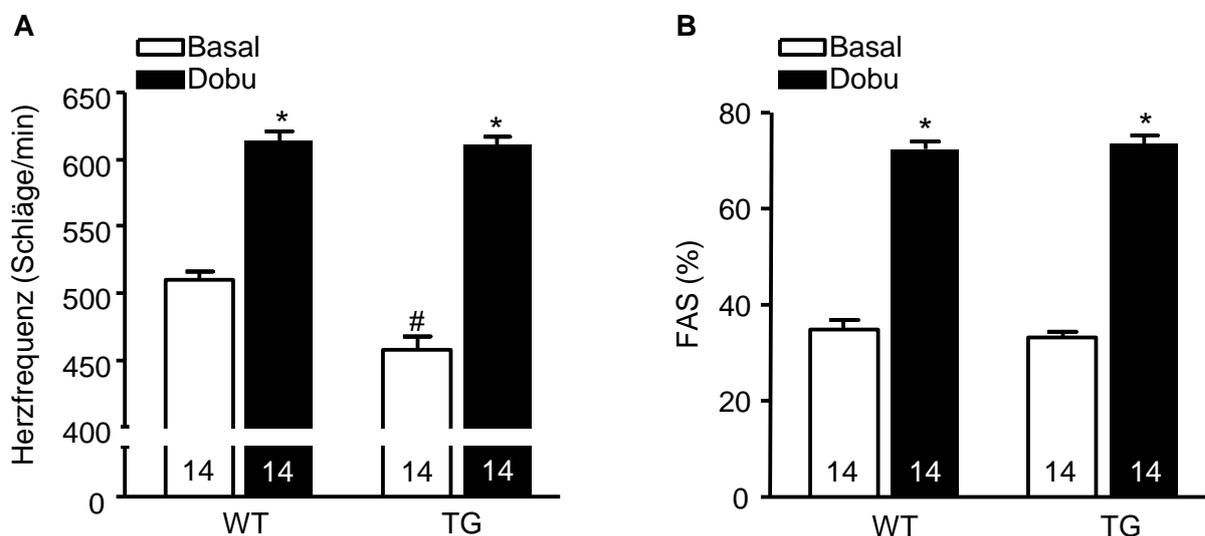
### 3.7 Echokardiographische Untersuchungen

Um einen möglichen Einfluss der transgenen PDE2A auf die Herzfunktion zu untersuchen, wurden 14 TG-Tiere im Alter von 11-12 Wochen sonographisch untersucht. Als Kontrolle diente dieselbe Anzahl an WT-Geschwistertieren selben Alters und Geschlechts. Die Aufnahmen wurden unter milder Isofluran-Narkose

(1-2 Vol. %) zunächst basal und anschließend unter akuter maximaler Dobutaminstimulation (10 mg/kg Körpergewicht; Dobu) durchgeführt.

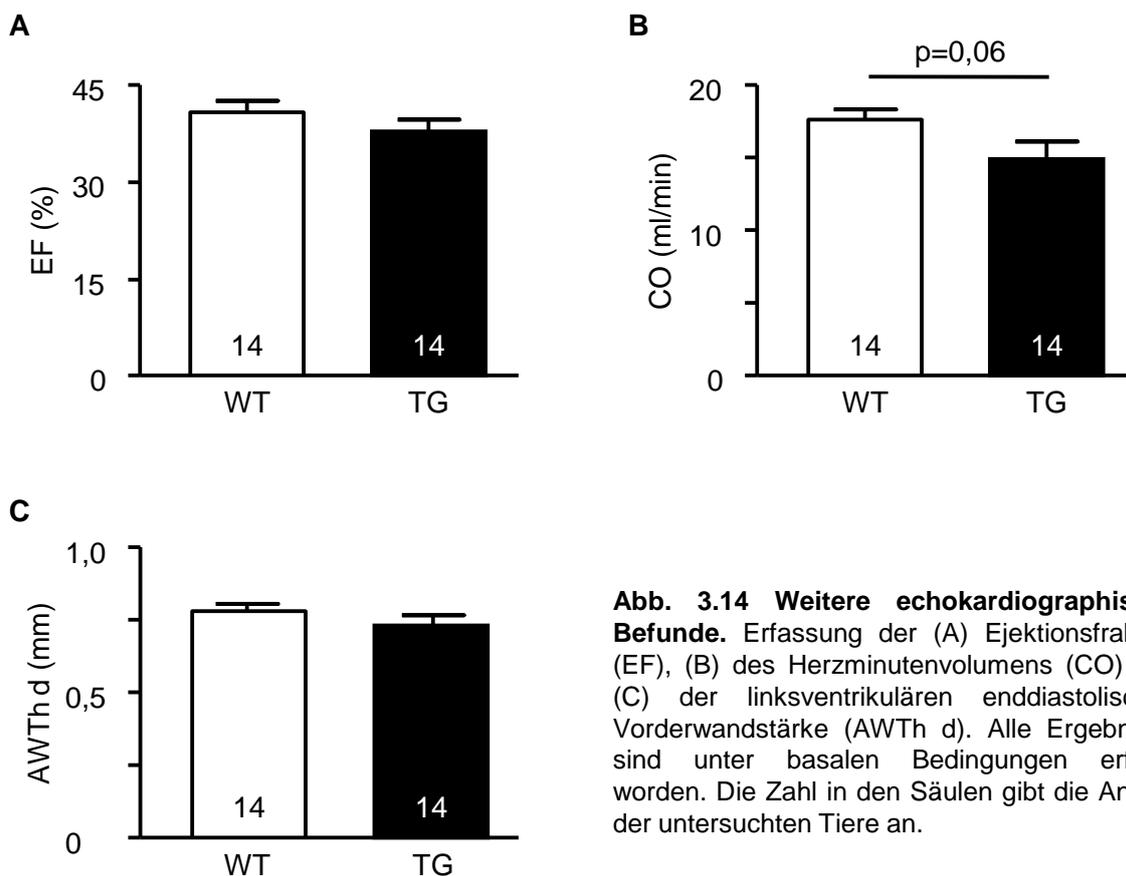
Als entscheidender Befund konnte unter basalen Bedingungen in den TG-Tieren eine um ~10% erniedrigte Herzfrequenz verglichen mit den WT-Tieren gemessen werden. Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation zeigte sich wie erwartet in der WT-Gruppe ein deutlicher Anstieg der Herzfrequenz um ~20%. Auch in der TG-Gruppe war ein Frequenzanstieg zu beobachten. Hier stieg die Frequenz im Verhältnis allerdings deutlich stärker an (~30%). Interessanterweise erreichte somit die maximal erreichbare Frequenz in der TG-Gruppe das gleiche Niveau wie in der Gruppe der WT-Geschwistertiere (Abb. 3.13 A).

Als Maß für die Kontraktilität des Myokards wurde die linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion (FAS) bestimmt. Hierbei zeigte sich unter basalen Bedingungen kein Unterschied zwischen den TG- und WT-Tieren. Die maximale Dobutaminstimulation führte in beiden Gruppen zu einer Verdopplung der FAS, so dass die maximale kontraktile Reserve gleich war (Abb. 3.13 B).



**Abb. 3.13 Herzfrequenz und Flächenverkürzungsfraktion (FAS).** Die Analysen fanden unter basalen Bedingungen (Basal) und nach Dobutaminstimulation (Dobu) statt. (A) Herzfrequenzen der WT- und TG-Tiere. \* $p < 0,05$  vs. Basal in der jeweiligen Gruppe. # $p < 0,05$  vs. WT Basal. (B) Darstellung der FAS in denselben Gruppen. \* $p < 0,05$  vs. Basal in der jeweiligen Gruppe. Die Zahl in den Säulen gibt die Anzahl der untersuchten Tiere an.

Unter basalen Bedingungen wurden noch weitere echokardiographische Parameter bestimmt. Die Ejektionsfraktion (EF; Abb. 3.14 A) als prozentuales Maß des Schlagvolumens zeigte keine Unterschiede zwischen TG- und WT-Tieren. Die Tendenz zu einer Reduktion des Herzminutenvolumens (CO; Abb. 3.14 B) in den TG-Tieren lässt sich durch die erniedrigte Herzfrequenz erklären (Abb. 3.13 A). Auch die linksventrikuläre enddiastolische Vorderwandstärke (AWTh d; Abb. 3.14 C) zeigte als sonographisch messbarer Parameter für eine ventrikuläre Hypertrophie keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Weitere echokardiographische Parameter ergaben ebenfalls keinen Unterschied zwischen TG- und WT-Geschwistertieren und deuten auf eine normale, vergleichbare Herzmorphologie und Funktion hin. Die echokardiographischen Daten sind im Anhang tabellarisch aufgelistet (siehe Kap. 10.1, Tab. 10.1).



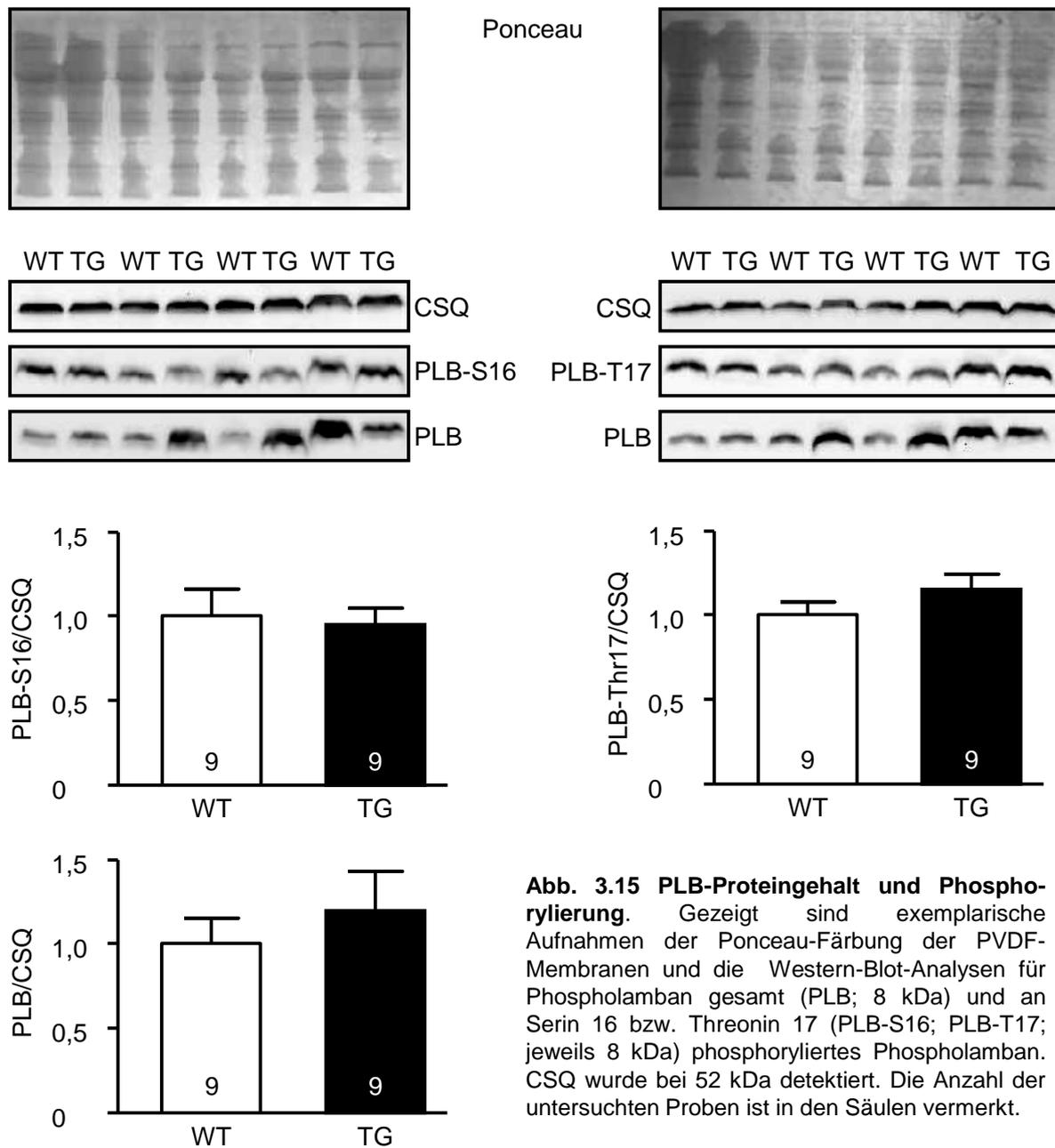
**Abb. 3.14 Weitere echokardiographische Befunde.** Erfassung der (A) Ejektionsfraktion (EF), (B) des Herzminutenvolumens (CO) und (C) der linksventrikulären enddiastolischen Vorderwandstärke (AWTh d). Alle Ergebnisse sind unter basalen Bedingungen erfasst worden. Die Zahl in den Säulen gibt die Anzahl der untersuchten Tiere an.

### 3.8 Analyse kardialer Ca<sup>2+</sup>-regulierender Proteine

Da die PDE2A mittels cAMP-Hydrolyse (siehe Kap. 1.4.2) zu einer verminderten Aktivität der Proteinkinase A (PKA) führen und hierdurch modulierenden Einfluss auf Komponenten der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade nehmen könnte, sollten mögliche Konsequenzen der transgenen PDE2A-Überexpression im Herzen analysiert werden. Es wurden zentrale Ca<sup>2+</sup>-regulierende Zielproteine des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und der Myofilamente ausgewählt und deren PKA-abhängigen Phosphorylierungszustände bzw. direkte Regulation als Indikator für eine veränderte  $\beta$ -Adrenozeptor (AR)/cAMP/PKA-Signalkaskade untersucht. Für die folgenden Analysen wurden den Mäusen die Ventrikel entnommen und direkt mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Auf diese Weise sollte die Konservierung der Proteine inklusive deren Phosphorylierungszustände gewährleistet werden.

#### 3.8.1 Proteingehalt und Phosphorylierung von Phospholamban

Phospholamban (PLB) ist eines der bekanntesten PKA-Substrate. Eine erhöhte PDE2A-induzierte cAMP-Hydrolyse könnte über eine verminderte PKA-Aktivität somit direkten Einfluss auf die Phosphorylierung von PLB nehmen und PLB möglicherweise ein indirektes Substrat der PDE2A darstellen. Um dies zu untersuchen sollte sowohl die Konzentration als auch der Phosphorylierungszustand des PLB immunologisch analysiert werden. Zur Untersuchung wurde deshalb zunächst die Gesamtmenge an PLB im Ventrikel bestimmt (Abb. 3.15). Serin 16 stellt die Phosphorylierungsstelle für die PKA am PLB dar und sollte deshalb als Indikator für eine veränderte PKA-abhängige PLB-Phosphorylierung untersucht werden. Um einen potenziell exklusiven Einfluss der PKA auf den Phosphorylierungszustand des PLB zeigen zu können, sollte auch die Threonin 17-Phosphorylierungsstelle des PLB untersucht werden. Threonin 17 wird am PLB über eine Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase phosphoryliert. In der Auswertung der TG-Tiere verglichen mit den WT-Geschwistertieren zeigten sich nach Normalisierung auf CSQ keine Unterschiede der Gesamtmenge des PLB oder in dessen untersuchten Phosphorylierungsstellen (Abb. 3.15).

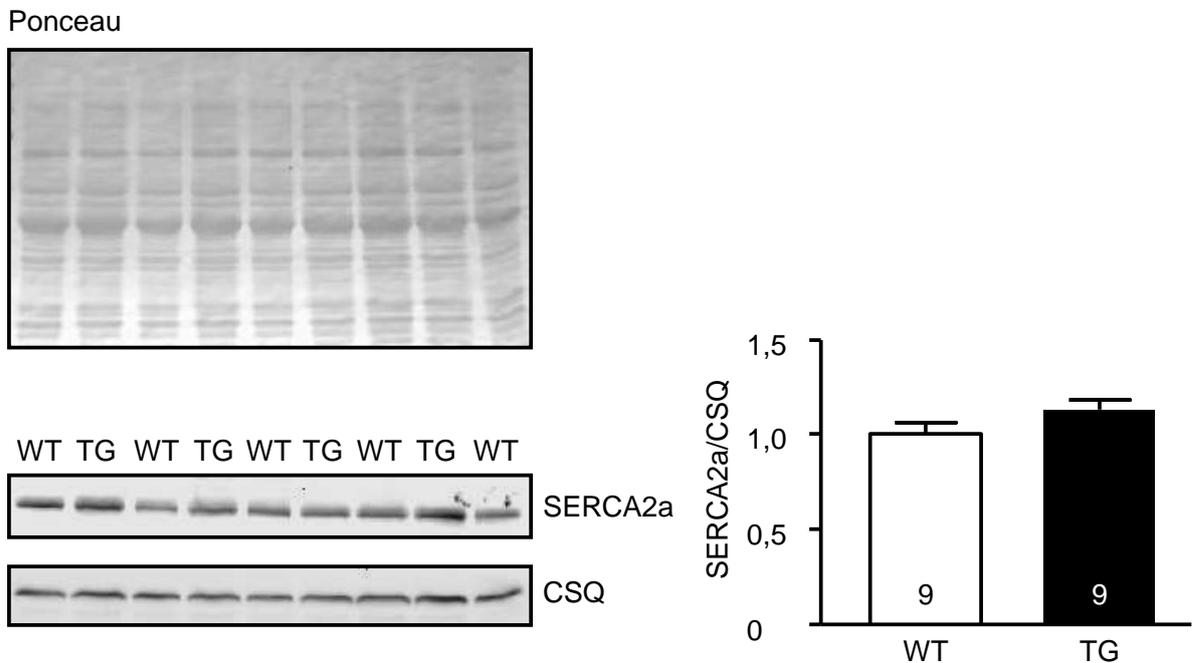


**Abb. 3.15 PLB-Proteingehalt und Phosphorylierung.** Gezeigt sind exemplarische Aufnahmen der Ponceau-Färbung der PVDF-Membranen und die Western-Blot-Analysen für Phospholamban gesamt (PLB; 8 kDa) und an Serin 16 bzw. Threonin 17 (PLB-S16; PLB-T17; jeweils 8 kDa) phosphoryliertes Phospholamban. CSQ wurde bei 52 kDa detektiert. Die Anzahl der untersuchten Proben ist in den Säulen vermerkt.

### 3.8.2 Analyse des SERCA2a-Proteingehalts

Die sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) stellt selbst kein Zielprotein der PKA dar. Allerdings ist ihre Regulation eng mit der des PLB verknüpft und die SERCA2a nimmt selbst als  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des SR eine wichtige Stellung in der Calciumhomöostase ein. Aus diesem Grund sollte eine kompensatorische Regulation dieses Proteins durch mögliche anderweitige Einflüsse der transgenen PDE2A auf

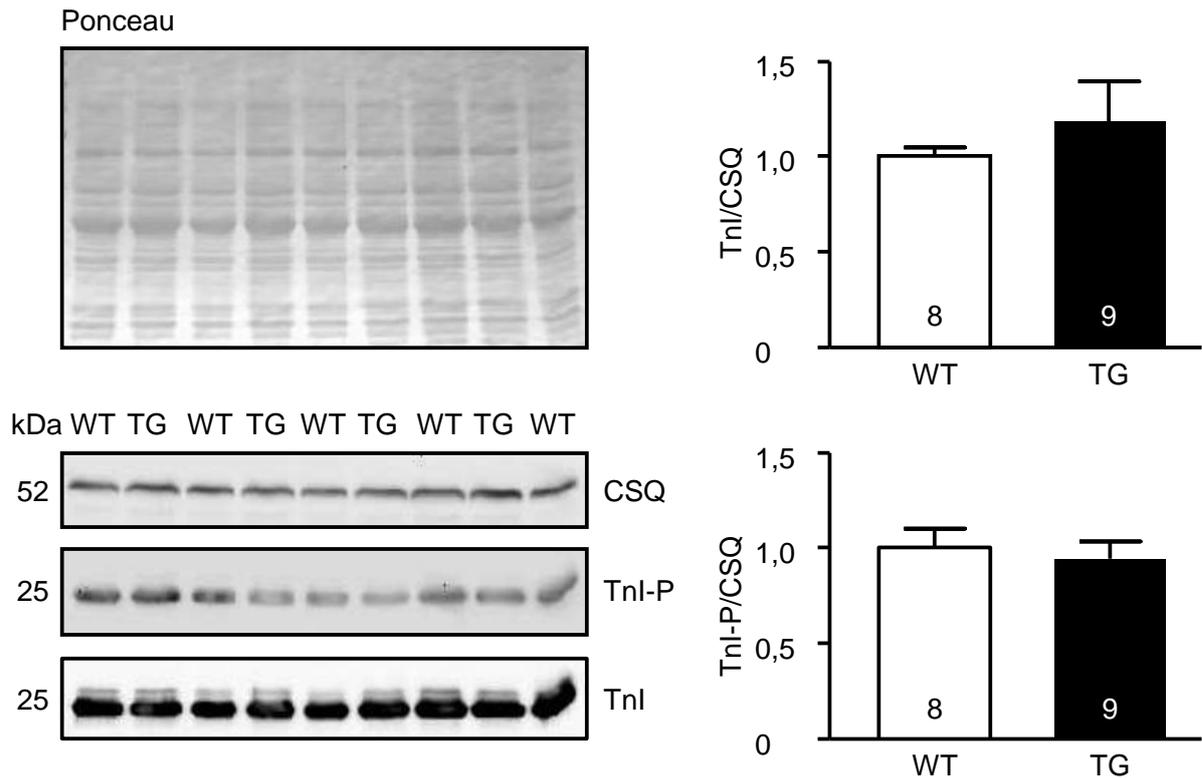
die Calciumhomöostase untersucht werden. Die immunologische Untersuchung der SERCA2a-Konzentration in der Western-Blot-Analyse ergab keinen Unterschied zwischen TG- und entsprechenden WT-Geschwistertieren (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16 Western-Blot-Analyse zur Quantifizierung der SERCA2a.** Gezeigt ist ein exemplarischer Ausschnitt der Membran nach Ponceau-Färbung. Die SERCA2a wurde bei 100 kDa detektiert und auf CSQ (52 kDa) normalisiert. Die Anzahl der untersuchten Ventrikel ist in den Säulen angegeben.

### 3.8.3 Proteingehalt und Phosphorylierung von Troponin I

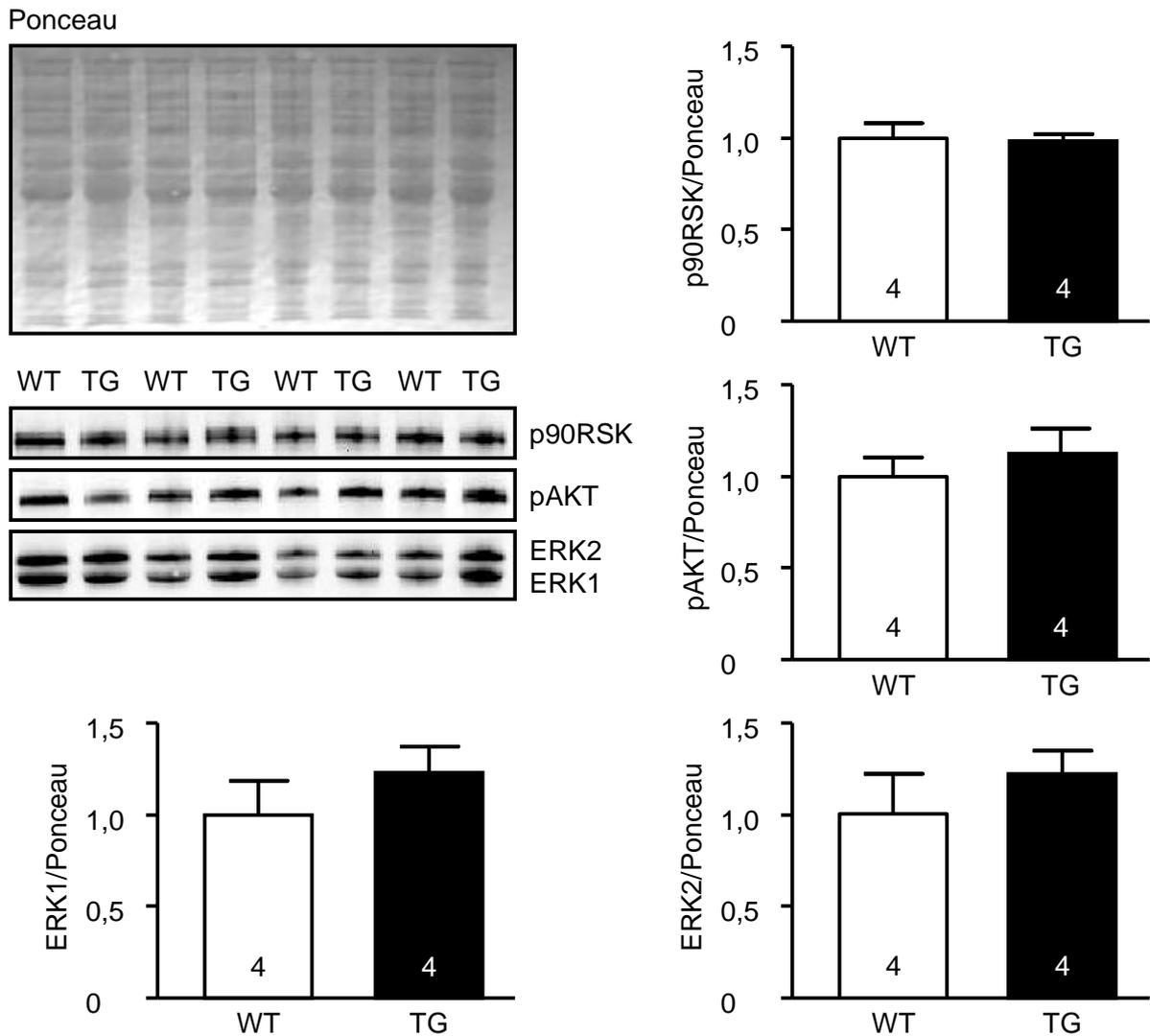
Das Troponin I (TnI) ist ein klassisches Zielprotein der PKA an den Myofilamenten. Um einen möglichen Einfluss der PDE2A auf die TnI-Phosphorylierung zu untersuchen, wurde der TnI-Gehalt sowie die Menge an phosphoryliertem TnI (TnI-P) mittels Western-Blot analysiert. Detektiert wurden hierbei die PKA-spezifischen Phosphorylierungsstellen des TnI an Serin 22/23. Nach Normalisierung auf CSQ zeigten sich sowohl im Proteingehalt als auch im Phosphorylierungsgrad des TnI keine Veränderungen in TG- gegenüber WT-Tieren (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17 Western-Blot-Analyse des TnI und TnI-P.** Gezeigt sind exemplarische Ausschnitte der Ponceau-gefärbten Membranen sowie der Antikörper-Detektion. Die Zahl in den Säulen gibt die Anzahl der untersuchten Proben an.

### 3.9 Analyse charakteristischer Hypertrophie-Signalwege

Auf Proteinebene wurden in den Ventrikeln bestimmte Phosphoproteine untersucht, deren Regulation eine zentrale Rolle während der kardialen Hypertrophie spielt. Mittels Western-Blot wurde der Phosphorylierungsgrad (i) der in den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg involvierten Proteinkinase B Akt (pAKT), (ii) der beiden Mitogen-aktivierten (MAP)-Kinasen ERK1 und ERK2 (*extracellularly responsive kinases* 1 und 2) und (iii) der ribosomalen S6-Kinase p90 (p90RSK) als ein Substrat der MAP-Kinasen untersucht. Die Quantifizierung aller untersuchten Proteine ergab keine Unterschiede dieser Phosphoproteine zwischen den beiden Gruppen WT und TG (Abb. 3.18). Ein Einfluss der transgenen PDE2A auf die genannten Phosphoproteine und damit auf Knotenpunkte der kardialen Hypertrophie ist somit unwahrscheinlich.



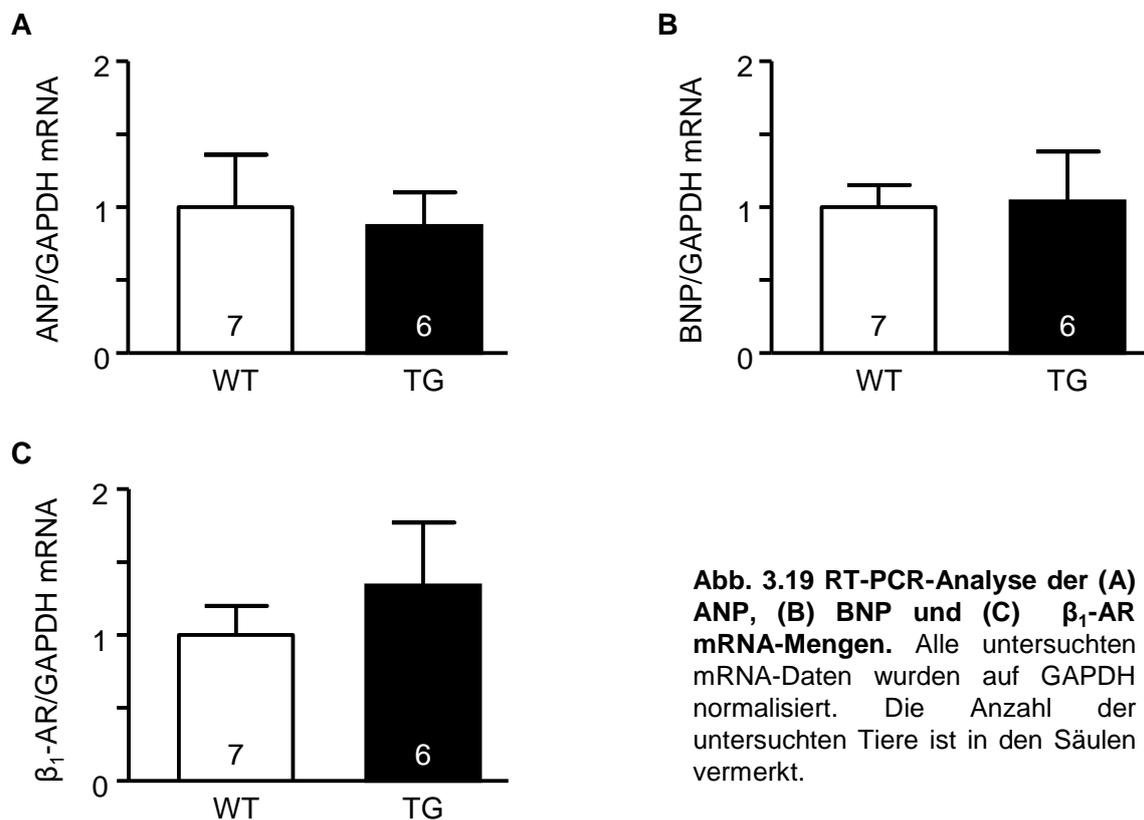
**Abb. 3.18 Quantifizierung PKA-unabhängiger hypertrophierelevanter Phosphoproteine.** Gezeigt sind die Membran nach Ponceau-Färbung und die detektierten Signale der Western-Blot-Analyse (ERK1/2 bei 42/44 kDa, pAKT bei 60 kDa und p90RSK bei 90 kDa). Zur Quantifizierung erfolgte die Normalisation auf das Ponceau. Die Anzahl der untersuchten Proben ist in den Säulen angegeben.

### 3.10 mRNA-Analysen der PDE2A-TG

Zusätzlich zu den gravimetrischen Analysen der Organgewichte (siehe Kap. 3.6) und den sonographischen Untersuchungen (siehe Kap. 3.7) wurde mittels RT-PCR nach Hinweisen einer kardialen Hypertrophie gesucht. Hierzu wurde die mRNA-Menge der natriuretischen Peptide ANP und BNP (atriales bzw. B-Typ natriuretisches Peptid) gemessen. Diese Peptide gelten als klassische Hypertrophiemarker. In den

analysierten Ventrikelproben 7-9 Wochen alter Mäuse zeigten sich keine Unterschiede des mRNA-Gehalts von ANP und BNP der TG-Tiere verglichen mit ihren WT-Geschwistertieren (Abb. 3.19 A und B).

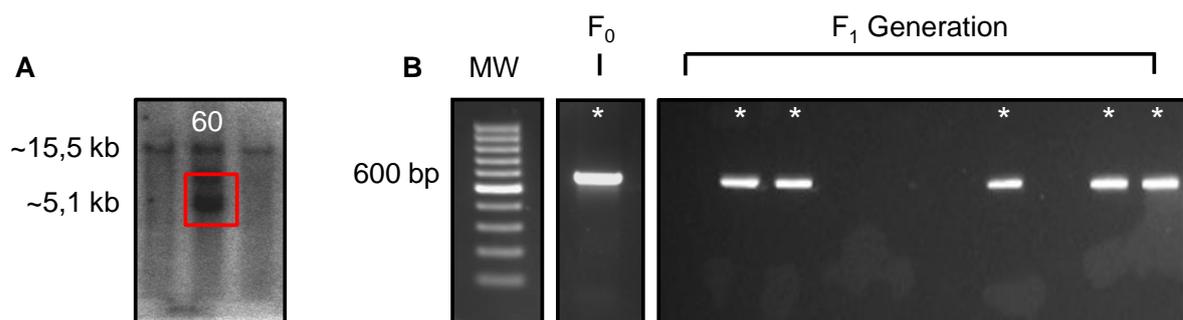
Zusätzlich wurde auch die mRNA-Konzentration der  $\beta_1$ -AR in denselben Proben untersucht. Auf diese Weise sollte analysiert werden, ob die transgene PDE2A durch Veränderungen in den cAMP/PKA-Signalwegen zu einer kompensatorischen Regulation der  $\beta_1$ -AR geführt hat. Im Vergleich der TG-Tiere mit WT-Geschwistertieren zeigte sich kein Unterschied des mRNA-Gehalts der  $\beta_1$ -AR (Abb. 3.19 C). Eine kompensatorische Regulation der  $\beta_1$ -AR auf Grund der transgenen PDE2A scheint daher eher unwahrscheinlich zu sein.



**Abb. 3.19 RT-PCR-Analyse der (A) ANP, (B) BNP und (C)  $\beta_1$ -AR mRNA-Mengen.** Alle untersuchten mRNA-Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in den Säulen vermerkt.

### 3.11 Generierung einer weiteren PDE2A2-transgenen Linie

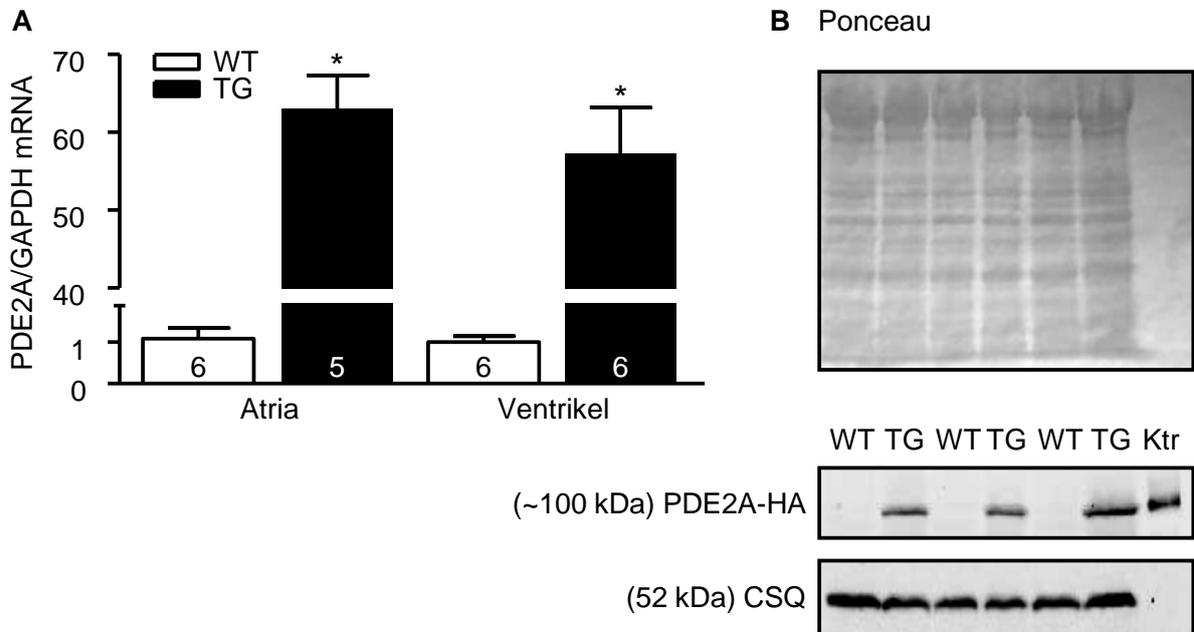
Parallel zur Etablierung der Linie 27 wurde eine weitere Pronukleusinjektion desselben Ausgangskonstrukts (siehe Kap. 3.2, Abb. 3.3) durchgeführt. Ziel war es, eine zweite transgene Mauslinie aufzuziehen, um zu einem späteren Zeitpunkt die Versuchsergebnisse in einer separaten Linie verifizieren und so mögliche Integrationsartefakte ausschließen zu können. Nach erfolgreicher Injektion konnten 25 neue Gründungstiere der F<sub>0</sub>-Generation mittels Southern-Blot genotypisiert werden. Es zeigten sich bei allen Mäusen das erwartete Signal der endogenen PDE2A bei ca. 15,5 kb und bei der Maus 60 zusätzlich eine Signalbande der transgenen PDE2A bei ca. 5,1 kb (Abb. 3.20 A; siehe auch Kap. 3.2). Die Ergebnisse konnten mittels PCR bestätigt werden. Auch die ersten Nachkommen dieses Männchens nach Kreuzung mit einem C57BL/6J Weibchen zeigten mit einer Verteilung von 50% den transgenen Genotyp (Abb. 3.20 B).



**Abb. 3.20 Genotypisierung der Linie 60.** (A) Ausschnitt des Southern-Blots. Die benutzte Sonde und die weiteren Bedingungen entsprechen denen aus Kap. 3.2. Das Signal der transgenen PDE2A des Männchens 60 ist rot umrandet. (B) Das transgene Männchen 60 (F<sub>0</sub>) und dessen Nachkommen der F<sub>1</sub>-Generation konnten in der PCR bestätigt werden. TG-Tiere sind mit \* markiert. MW=Molekulargewichtsmarker.

In der F<sub>1</sub>-Generation wurde die Konzentration der PDE2A-mRNA in den Atria und Ventrikeln acht Wochen alter Tiere mittels RT-PCR quantifiziert. Auf Proteinebene erfolgte der Nachweis zur Expression des Transgens über die immunologische Detektion des HA-Tags im Western-Blot. Untersucht wurden in beiden Fällen TG-Tiere im Vergleich zu WT-Geschwistertieren. Hierbei zeigte sich in den transgenen Tieren sowohl in den Vorhöfen als auch in den Ventrikeln eine ~60-fach erhöhte

mRNA-Konzentration (Abb. 3.21 A). Auf Proteinebene konnte die Expression der transgenen PDE2A anhand des HA-Tags ebenfalls eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3.21 B).



**Abb. 3.21 Quantifizierung der PDE2A auf mRNA-Ebene und Proteinnachweis der transgenen PDE2A in der Linie 60.** (A) PDE2A-mRNA-Daten der quantitativen RT-PCR nach Normalisierung auf GAPDH. \* $p < 0,05$  vs. WT. Die Zahl in den Säulen gibt die Anzahl der untersuchten Tiere an. (B) Ponceau-Färbung der Membran und Nachweis der transgenen PDE2A mittels Antikörper gegen das HA-Peptid der transgenen PDE2A. Als Ktr diente das HEK-Zell Lysat (siehe Kap. 3.4.1).

## 4 Diskussion

### 4.1 Hauptergebnisse

Die kontinuierliche Herzaktion unterliegt auf molekularer Ebene permanenten Regulierungsprozessen. Diese dienen der situationsangepassten Physiologie der Herzleistung in Stresssituationen und auch in Ruhe. Für die molekulare Steuerung der Herzaktion sind als wichtige Signalwege das  $\beta$ -AR/cAMP/PKA-System ( $\beta$ -Adrenozeptor; zyklisches Adenosinmonophosphat; Proteinkinase A), die direkte  $\beta$ -AR-vermittelte cAMP-Wirkung auf HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels*), die cGMP-Signalwege (zyklisches Guanosinmonophosphat) über die natriuretischen Peptide bzw. Stickstoffmonoxid (NO) und für die Regulation innerhalb und zwischen diesen Signalwegen die Phosphodiesterasen (PDEs) zu nennen. Kommt es klinisch zu einer Fehlfunktion des Herzens im Sinne einer Herzinsuffizienz, sind neben den funktionellen Einschränkungen, die sich in einer Minderversorgung des peripheren Stoffwechsels in Ruhe und/oder bei Belastung äußern, auch typische molekulare Veränderungen der genannten Signalwege nachzuweisen (siehe Kap. 1.3.4).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der ventrikuläre Proteingehalt der Isoform PDE2A in einem Isoprenalin-induzierten Herzinsuffizienz-Modell der Maus um rund 40% erhöht ist. Um weitere Untersuchungen bezüglich einer physiologischen und auch pathophysiologischen Bedeutung der PDE2A vornehmen zu können, konnte eine transgene Mauslinie generiert werden, welche die PDE2A2 unter Kontrolle des Promotors der  $\alpha$ -Isoform der schweren Myosinkette ( $\alpha$ -MHC) herzspezifisch überexprimiert. In der folgenden Charakterisierung der transgenen Tiere konnte eine isolierte Reduktion der basalen Herzfrequenz um ca. 10% nachgewiesen werden. Das Frequenzmaximum unter adrenerger Stimulation war unverändert. Es zeigten sich des Weiteren keine Hinweise auf eine kardiale Hypertrophie oder kontraktile Fehlfunktion. Ebenso fanden sich keine Hinweise auf eine Verschiebung PKA-abhängiger Phosphorylierungen oder eine Beeinflussung des Proteingehalts wichtiger  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierender Proteine wie Phospholamban (PLB), sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) oder Troponin I (TnI).

## 4.2 Dysregulation der PDEs

Über mögliche Regulationen der PDEs während einer Herzinsuffizienz ist noch nicht viel bekannt. Bisherige Untersuchungen befassen sich größtenteils mit Isoformen der Familien PDE3, PDE4 und PDE5. Für die PDE3A gibt es Hinweise einer verminderten Expression bei einer Herzinsuffizienz in humanen Proben und im Mausmodell (Ding et al. 2005). Auch die PDE4D3 zeigt in insuffizienten humanen Herzen eine verminderte Expression (Lehnart et al. 2005). Bei Untersuchungen der PDE5 in menschlichen Kardiomyozyten konnten Nagendran et al. (2007) im gesunden Myokard keine PDE5-Expression nachweisen. In hypertrophierten rechten Ventrikeln war die PDE5 allerdings auf mRNA- und Protein-Ebene stark hochreguliert. Pokreisz et al. (2009) konnten in gesunden menschlichen Ventrikelproben auch nur einen sehr geringen Proteingehalt der PDE5 detektieren. Sie konnten aber zusätzlich in insuffizienten linken Ventrikeln einen gesteigerten PDE5-Proteingehalt nachweisen. In Hundeherzen hingegen konnten Senzaki et al. (2001) einen um 50% verminderten Proteingehalt und eine um 30% verminderte Enzymaktivität der PDE5 in einem Herzinsuffizienzmodell zeigen. Diesen noch geringen Erkenntnissen über eine Herunterregulation der PDE3 und PDE4 sowie der vermehrten Expression der PDE5 in humanen Proben ist gemein, dass sie entweder direkt zu einer Verstärkung der cAMP-abhängigen Signalwege oder zu einer Abschwächung der cGMP-Kaskade führen können. Diese Regulation könnte dazu dienen, trotz einer zunehmenden  $\beta$ -adrenergen Desensitivierung (El-Armouche und Eschenhagen 2009) den Blutdruck und somit die Versorgung der Peripherie vorübergehend aufrechtzuerhalten. Auch die paradox erscheinenden Ergebnisse von Senzaki et al. (2001) über eine verminderte Expression der cGMP-hydrolysierenden PDE5 in insuffizienten Hundeherzen müssen nicht unbedingt als kontrovers angesehen werden. Möglicherweise ist die Herunterregulation durch das gewählte Insuffizienzmodell (*tachypacing-model*) bedingt oder generelle speziesspezifische Unterschiede zwischen Mensch und Hund sind der Grund. Denkbar wäre im Hundemodell auch eine indirekte cGMP-vermittelte Hemmung der PDE3, vergleichbar mit den Ergebnissen von Qvigstad et al. (2010). Diese konnten zeigen, dass ein cGMP-Anstieg, vermittelt durch das C-Typ natriuretische Peptid (CNP), ebenfalls zu einem verstärkten cAMP-Anstieg nach  $\beta_1$ -AR-Stimulation in

Rattenherzen führt. Dieser Effekt könnte über eine cGMP-abhängige Inhibition der PDE3 erklärt werden. Auf ähnlichem Wege wäre auch eine verminderte PDE5-Expression auf Grund des dann erhöhten cGMP-Spiegels indirekt über eine Inhibition der PDE3 in der Lage, zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels im Hundeherzen zu führen. So käme es letztlich auch hier zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels.

Es ist bekannt, dass in Rattenherzen mit einer Leberzirrhose-assoziierten Kardiomyopathie der Gehalt der PDE2A auf mRNA- und Proteinebene gesteigert ist (Ceolotto et al. 2008). Um die Regulation der PDE2A auch in einem klassischen Herzinsuffizienz-Modell untersuchen zu können, wurde das in unserer Arbeitsgruppe sicher etablierte Modell der chronischen Isoprenalin-induzierten Herzhypertrophie der Maus gewählt (El-Armouche et al. 2008; Wittköpper et al. 2010). Dieses Modell ist gut geeignet, die menschliche Herzhypertrophie/ Herzinsuffizienz auf molekularer Ebene zu simulieren. Zunächst ist seit langem bekannt, dass ein positiver Zusammenhang zwischen dem Katecholaminspiegel und der Mortalität in der menschlichen Herzinsuffizienz besteht (Cohn et al. 1984). Zudem simuliert das gewählte Modell die Pathophysiologie der menschlichen Herzinsuffizienz auf molekularer Ebene in vielen weiteren Punkten. So führt die chronische Applikation von Isoprenalin in Ratten unter anderem (i) zu einer Reduktion der  $\beta$ -AR-Dichte (Mende et al. 1992), (ii) zu einer verminderten Expression von PLB und der SERCA2a (Linck et al. 1998) und (iii) zu einer gesteigerten Expression von inhibitorischen G-Proteinen (Eschenhagen et al. 1991; Mende et al. 1992).

In dem gewählten Herzinsuffizienz-Modell der Maus konnte nachgewiesen werden, dass der Proteingehalt der PDE2A bei einer Isoprenalin-induzierten Herzhypertrophie um rund 40% erhöht ist. Dies impliziert bereits eine mögliche pathophysiologische Bedeutung der PDE2A in der kardialen Hypertrophie. Möglicherweise könnte die gesteigerte PDE2A-Expression, ähnlich wie der Anstieg des atrialen (ANP) und des B-Typ natriuretischen Peptides (BNP; Nishikimi et al. 2006), einer Art kardioprotektiven Kompensation während einer Herzinsuffizienz dienen. Es wäre auch denkbar, dass die gesteigerte Expression der PDE2A im verwendeten Modell nicht generell dem Anstieg des cAMP und somit einer verstärkten Inotropie mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch entgegenwirkt, sondern vielmehr einer gezielten

Feinregulation der cAMP-Spiegel in bestimmten intrazellulären Kompartimenten dient.

Yanaka et al. (2003) konnten in Druck-belasteten Rattenkardiomyozyten eine Steigerung der Hydrolyseaktivität der PDE2A nachweisen. In unserer Arbeitsgruppe wird daher intensiv daran gearbeitet, auch im Herzinsuffizienz-Modell der Maus die tatsächliche hydrolytische Aktivität der PDE2A zu bestimmen. Des Weiteren sollte in Zukunft auch eine Analyse der PDE2A-Expression in humanen insuffizienten Ventrikelproben erfolgen. Ein dort ebenfalls gesteigerter Proteingehalt der PDE2A würde das Insuffizienzmodell der Isoprenalin-induzierten Herzhypertrophie um einen weiteren Aspekt als gute Simulationsmöglichkeit der menschlichen Herzhypertrophie/ Herzinsuffizienz bestätigen.

#### **4.3 Generierung und Identifizierung PDE2A-transgener Mäuse**

Erkenntnisse über die vielfältigen molekularen Veränderungen insuffizienter Herzen liefern ein immer besseres Verständnis für die Pathophysiologie und mögliche Therapien der Herzinsuffizienz. Die PDE2 kann cGMP-stimuliert sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren (Zaccolo und Movsesian 2007). Auf der Suche nach Regelmechanismen, die eine Quervernetzung der cAMP- und cGMP-Kaskaden ermöglichen und auch bei einer gerichteten Signaltransduktion in bestimmten Mikrodomänen von Bedeutung sind, erweckt die PDE2 großes Interesse. So konnten beispielsweise Mongillo et al. (2006) Hinweise auf den Einfluss der PDE2 auf eine intrazelluläre Kompartimentierung liefern. Andere Ergebnisse zeigen deutlich die Möglichkeit einer Vernetzung der cGMP- und cAMP-Kaskaden über die cGMP-stimulierte cAMP-Hydrolyse durch die PDE2 (Simmons und Hartzell 1988; Han et al. 1996; Nikolaev et al. 2005). Des Weiteren machen die bereits erwähnten Erkenntnisse über einen gesteigerten Proteingehalt der PDE2A im Herzinsuffizienz-Modell der Maus und einer damit implizierten pathophysiologischen Bedeutung der PDE2A in der kardialen Hypertrophie weitere Analysen lohnenswert.

Um *in vivo* Untersuchungen vornehmen zu können, sollte durch eine herzspezifische Expression einer transgenen PDE2A2 der Proteingehalt der kardialen PDE2A erhöht werden. Prinzipiell werden zur Herstellung transgener Tiere drei Methoden routinemäßig angewendet: (i) die Transfektion von rekombinanten Retroviren in die sich entwickelnde Blastozyste, (ii) der Gentransfer in pluripotente embryonale Stammzellen, die dann in die Blastozyste integriert werden und (iii) die Mikroinjektion von DNA in den Pronukleus einer frisch befruchteten Eizelle (Palmiter und Brinster 1986; Rüllicke und Hübscher 2000). Die gewählte Pronukleusinjektion ist heute das populärste und am besten etablierte Verfahren. Neben einer permanenten Expression des Transgens wäre auch der Einsatz eines regulierbaren Modells möglich gewesen. Eine solche Variante hätte beispielsweise das Tet-Off-System geboten, bei dem die Transgenexpression Tetracyclin- bzw. Doxycyclin-abhängig reguliert werden kann (Furth et al. 1994; Wittköpper et al. 2010). Ein solches Modell wäre nötig gewesen, um *in vivo* die Reversibilität eines Phänotyps nachweisen zu können. Zudem hätte ein solches Modell die Möglichkeit geboten, durch eine verspätete Aktivierung der transgenen Expression erst in ausgewachsenen Mäusen mögliche Anpassungsmechanismen während der Entwicklung der Tiere zu verhindern. Dieses Verfahren ist allerdings sehr aufwendig und teuer. Da es bis heute noch keine Untersuchungen an PDE2A-transgenen Tieren gegeben hat, wurde zur Orientierung zunächst eine klassische Überexpression gewählt.

Im Southern-Blot konnten nach der ersten Injektionsreihe drei von 46 und nach dem zweiten Injektionszyklus eins von 25 potenziellen Gründungstieren als transgen identifiziert werden. Dies entspricht einer Effizienz von rund 4-7%. Diese liegt deutlich unter der erwarteten Erfolgsrate von durchschnittlich 20% (Kupriyanov et al. 1998; Rüllicke und Hübscher 2000). Mögliche Gründe für die schlechtere Effizienz der Transgen-Integration können in dem genetischen Hintergrund des verwendeten Mausstammes liegen. Dem in dieser Arbeit verwendeten Mausstamm FVB/N wird allerdings eine hohe Effizienz zugesprochen (Auerbach et al. 2003), so dass dieser Einflussfaktor als unwahrscheinlich angesehen werden kann. Auch Verunreinigungen des DNA-Konstrukts oder eine zu hohe DNA-Konzentration können die Effizienz beeinträchtigen. Eine Kontamination des injizierten Konstrukts mit Ethidiumbromid, Enzymen, Salzen etc. wurde nahezu ausgeschlossen, da die gelelektrophoretische

Auftrennung zunächst Ethidiumbromid-frei erfolgte und das Konstrukt mit einem speziellen Kit aus dem Gel aufgereinigt wurde. Durch die Konzentrationsbestimmung der DNA mittels Absorption und anhand eines Molekulargewichtsmarkers wurde versucht, zu hohe Konzentrationen während der Injektion zu vermeiden. Die exakte Verdünnung auf die optimale Konzentration von 1-5 ng/µl (Auerbach 2004) im Anschluss bleibt wegen möglicher Ungenauigkeiten der Messungen allerdings schwierig. Neben der nicht vollständig auszuschließenden Möglichkeit, zu hohe DNA-Konzentrationen injiziert und damit die Injektionseffizienz reduziert zu haben, könnte ebenso eine direkte Integration des DNA-Konstrukts in wichtige aktive Genabschnitte erfolgt sein. Dies könnte direkt zum pränatalen Absterben der betroffenen transgenen Tiere geführt haben (Auerbach 2004) und somit der Grund für die verminderte Effizienz sein.

Nach erfolgreicher Identifizierung der insgesamt vier transgenen Gründungstiere bestand der nächste kritische Schritt in der Etablierung stabiler Linien, die auf einen C57BL/6J-Hintergrund zurückgekreuzt werden sollten. Voraussetzung dafür ist die Weitergabe des Transgens an die nachfolgenden Generationen. Grundsätzlich ist nach stabiler Integration des Transgens in das Genom des Gründungstieres eine Transmission des heterozygoten Genotyps in die nachfolgenden Generationen nach Mendel zu erwarten. Kommt es zu Abweichungen der Transmissionsrate, kann dies mehrere Ursachen haben. Die Integration des Konstrukts kann gonosomal erfolgt sein. Eine Y-chromosomale Integration würde zu einer Weitergabe des Transgens ausschließlich an männliche Nachkommen führen. Bei einer X-chromosomalen Integration des Transgens wäre eine unvorhersehbare Verteilung des Transgens auf Grund der unterschiedlichen Abschaltung je eines X-Chromosoms in den unterschiedlichen Geweben der Nachkommen die Folge. Des Weiteren könnten auch schädliche Mutationen durch die Integration selber direkt zu einer unbeständigen Weitergabe führen (Rülicke und Hübscher 2000). Außerdem kann es in ca. 30% der Fälle zu Mosaikbildungen innerhalb des Genoms (Keimbahn- und Somazellen) kommen. Möglich wird dies, wenn die injizierte DNA erst nach den ersten DNA-Replikationen in einzelne Blastomere integriert. Eine unterschiedliche Genomausstattung der sich entwickelnden Zellen bezüglich des Transgens wäre die Folge (Palmiter und Brinster 1986).

Außer in der Linie 60 traten während der Generierung stabiler PDE2A-transgener Mauslinien Probleme in der Transmission auf. Das transgene Gründungstier der Linie 43 zeigte nach mehreren Verpaarungen keine Transmission in nachfolgende Generationen. Über die Ursachen kann nur spekuliert werden. Am wahrscheinlichsten scheint entweder ein direkter negativer Einfluss auf die Transmission durch Integrations-Mutationen (Rülicke und Hübscher 2000) oder eine uneinheitliche Mosaikbildung im Vergleich der Zellen der Keimbahn und somatischen Zellen zu sein. Letzteres passiert selten, wenn es zu einer sehr späten Integration des Transgens in differenzierte somatische Vorläuferzellen, nicht aber in Vorläuferzellen der Keimbahn kommt (Wilkie et al. 1986). Bei dem Gründungstier der Linie 27 kam es zwar zu einer Weitergabe des transgenen Genotyps in die F<sub>1</sub>-Generation, allerdings nur bei ca. jedem achten Tier, unabhängig von dessen Geschlecht. Bei den weiteren Verpaarungen in die F<sub>2</sub>-Generation kam es zu einer stabilen Transmission von 50%. Auf Grund dieser Beobachtungen kann fast sicher von einer Integration des Transgens in ein Blastomer später als dem Zweizellstadium ausgegangen werden. Nicht jede zweite Zelle der Keimbahn des Gründungstieres trug somit das Transgen in sich, sondern möglicherweise nur ca. jede achte. In allen folgenden transgenen Tieren dieser Linie kam es dann zu einer normalen heterozygoten Verteilung und somit auch zu der beobachteten Transmission nach Mendel. Des Weiteren konnte das Weibchen 33 nur im Southern-Blot als transgen identifiziert werden, nicht aber mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Für das Gründungstier 33 scheint daher eher ein technisches Problem, möglicherweise eine Kontamination oder ein Artefakt während der Untersuchung im Southern-Blot und weniger ein Problem in der Transmission wahrscheinlich zu sein.

Zur Phänotypisierung wurden bis heute ausschließlich Tiere der Linie 27 untersucht. In Zukunft müssen die erhobenen Daten in der Linie 60 bestätigt werden, um mögliche PDE2A-unabhängige Integrationsartefakte weitestgehend ausschließen zu können.

#### 4.4 Expressionsnachweis

Nach erfolgreicher Etablierung der Linien 27 bzw. 60 konnte im nächsten Schritt die Überexpression der PDE2A auf mRNA-Ebene quantifiziert werden. Der mRNA-Gehalt der gesamten PDE2A im Ventrikelgewebe war in transgenen Tieren der Linie 27 rund 55-fach und der Linie 60 ca. 60-fach erhöht. Die Überexpression in den Geweben der Vorhöfe zeigte innerhalb der Linien keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Ventrikelproben. Da keine Differenz in der Expression zwischen Ventrikel und Vorhof bestand, kann davon ausgegangen werden, dass der Isoformen-Wechsel von  $\beta$ -MHC zu  $\alpha$ -MHC nahezu vollständig erfolgt war. Denn während im Vorhof durchweg die  $\alpha$ -Isoform der schweren Kette des Myosins dominant ist, erfolgt im Ventrikel erst postnatal ein Wechsel von der  $\beta$ -Isoform zur  $\alpha$ -Isoform (Subramaniam et al. 1991). Eine zu frühe Untersuchung der Expression auf Ventrikel-Ebene hätte demnach zu falsch-niedrigen Expressionswerten der, durch den  $\alpha$ -MHC-Promotor kontrollierten, ventrikulären transgenen PDE2A führen können. Allerdings können in nachfolgenden Generationen veränderte Methylierungen des Transgens noch immer zu einer Veränderung der Expression führen (Palmiter et al. 1982). Daher scheinen regelmäßige Kontrollen des Expressionslevels über die verschiedenen Generationen hinweg sinnvoll zu sein.

Die gewünschte  $\alpha$ -MHC-abhängige herzspezifische Expression der transgenen PDE2A wurde in der Linie 27 auf mRNA- und mittels des Hämagglutinin (HA)-Tags auch auf Protein-Ebene eindeutig nachgewiesen. Die gezeigte zusätzliche Expression in der Lunge ist Promotor-bedingt bekannt. Subramaniam et al. (1991) beschreiben eine  $\alpha$ -MHC-Expression in der lungennahen Hohlvene und in pulmonalen Venolen. Eine mögliche Erklärung könnte die Einwanderung von atrialen Kardiomyozyten in das venöse System der Lunge während der Embryogenese sein (Jones et al. 1994).

Die Quantifizierung der Überexpression der PDE2A auf Protein-Ebene blieb auf Grund technischer Probleme mit dem verwendeten kommerziell erhältlichen PDE2A-Antikörper (FabGennix) bis heute erfolglos. Da der HA-Tag endogen gekoppelt an die PDE2A nicht vorkommt, ist auch die Bestimmung einer relativen

Expressionserhöhung über den HA-Tag nicht möglich gewesen. Die jüngste Etablierung eines weiteren PDE2A-Antikörpers (Santa Cruz Biotechnology) in unserer Arbeitsgruppe gibt Zuversicht, bald auch die transgene Überexpression anhand des PDE2A-Proteingehalts quantifizieren zu können. Sollten sich dennoch auch weiterhin Schwierigkeiten bezüglich der Spezifität oder Sensitivität des Antikörpers ergeben, wäre im nächsten Schritt die eigene Generierung monoklonaler Antikörper möglich. Zunächst müsste dann ein sicheres Protokoll, beispielsweise der klassischen Hybridom-Technik oder neuerer Weiterentwicklungen wie z.B. der genetischen Immunisierung, etabliert werden (Köhler und Milstein 1975; Garcia et al. 2006). Es besteht die Hoffnung, mit einem neu etablierten Antikörper zusätzlich auch immunhistologische Untersuchungen durchführen zu können. Dies könnte interessante Erkenntnisse über die intrazelluläre Lokalisation sowohl der endogenen als auch der transgenen PDE2A liefern.

#### **4.5 Echokardiographische Untersuchungen**

In den echokardiographischen Untersuchungen transgener Tiere und deren Wildtyp-Geschwistertieren fanden sich anhand der Ejektionsfraktion (EF) und der linksventrikulären Flächenverkürzungsfraction (FAS) keine Anzeichen auf eine kontraktile Dysfunktion. Auch fanden sich in keiner Gruppe Hinweise auf eine Hypertrophie. Die linksventrikuläre enddiastolische Vorderwandstärke (AWTh d) war nicht verändert. Die Beurteilung der Relaxation ist mittels Sonographie nicht eindeutig möglich. Ein veränderter Phänotyp zeigte sich aber interessanterweise in der um ca. 10% erniedrigten basalen Herzfrequenz der transgenen Tiere. Das Frequenz-Maximum war unter Dobutamin-Stimulation wiederum in beiden Gruppen gleich.

Grundsätzlich müssen jegliche Aussagen über Veränderungen der Herzfunktion unter Narkose kritisch betrachtet werden. Es kann bereits durch das verwendete Narkosemittel zu Veränderungen der kardialen Funktionen kommen. Das in den beschriebenen Untersuchungen verwendete Isofluran zeichnet sich allerdings durch eine eher geringe Beeinflussung aus. Roth et al. (2002) konnten zeigen, dass es

unter Verwendung von Isofluran zu einer sehr stabilen FAS bei einer relativ hohen Herzfrequenz kommt. Zusätzlich sind diese Daten gut reproduzierbar. Bei wachen Mäusen liegt die Herzfrequenz zwischen 450 und 600 Schlägen pro Minute (Takuma et al. 2001). Die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse hatten unter der leichten Isofluran-Narkose Frequenzen in diesem Bereich. Es lässt sich ein Einfluss der Narkose auf die gemessene Herzfrequenz trotzdem nicht vollständig ausschließen. Es erscheint aber unwahrscheinlich, dass ausschließlich die transgenen Tiere eine tiefere Narkose und damit niedrigere Herzfrequenz hatten, zumal die Untersuchungen verblindet erfolgten. Zur Verifizierung dieses Phänotyps wären in Zukunft telemetrische elektrokardiographische Messungen sinnvoll (Wittköpper et al. 2010). Diese hätten den Vorteil, dass sich die Mäuse nach Implantation eines Telemetriesenders frei in gewohnter Umgebung bewegen könnten. Es wären somit Messungen der Herzfrequenz während verschiedener körperlicher Aktivitäten bzw. unter Berücksichtigung des Tag-Nacht-Rhythmus möglich. Zudem würde eine Beeinflussung der Herzfrequenz durch die Narkose oder eine manuelle Manipulation an den Tieren zum Zeitpunkt der Messung minimiert.

Erweitert werden sollte die Phänotypisierung der PDE2A-transgenen Tiere durch die Anwendung chronischer kardialer Stressmodelle, beispielsweise durch das beschriebene Modell der Isoprenalin-induzierten Herzhypertrophie, aber auch in aufwendigeren Modellen wie z.B. einem Insuffizienz-Modell nach Myokardinfarkt. In PDE5-transgenen Mäusen konnte beispielsweise erst nach dem Provozieren eines solchen Myokardinfarkts eine Zunahme der kardialen Hypertrophie und Dysfunktion in den transgenen Tieren verglichen mit Mäusen vom Wildtyp gemessen werden (Pokreisz et al. 2009). Zudem sollten weitere Experimente an isolierten Kardiomyozyten folgen, um einen isolierten Einfluss der transgenen PDE2A auf die Schlagfrequenz ohne Einfluss auf die Kontraktilität bestätigen zu können.

### **Isolierte Reduktion der Herzfrequenz**

Die Herzfrequenz lässt sich grundsätzlich über sympathische  $\beta$ -adrenerge Stimulation steigern und über parasympathische muskarinerge Stimulation senken.

Mitentscheidend für einen Frequenzanstieg scheint die Sympathikus-induzierte zeitliche Verkürzung der diastolischen Depolarisation in den Schrittmacherzellen durch die Aktivierung von HCN-Kanälen zu sein (DiFrancesco 2010). Die sympathische Aktivitätssteigerung der HCN-Kanäle erfolgt dabei nicht über PKA-abhängige Phosphorylierungen, sondern durch direkte Bindung des cAMP an die zytosolische Seite des Rezeptors (DiFrancesco und Tortora 1991). HCN4-Kanäle dominieren in den Zellen des Sinusknotens, während die bedeutendsten Kanäle in den Atria und Ventrikeln Proteine der HCN2-Isoform sind (Biel et al. 2002). Es müssen allerdings noch weitere Mechanismen in die Frequenzregulation involviert sein. Alig et al. (2009) konnten zeigen, dass Mäuse mit einer Mutation des HCN4-Kanals, welche dessen cAMP-abhängige Regulation verhindert, zwar eine erniedrigte Ausgangs- und Maximalfrequenz haben, die relative Frequenzadaptation während körperlicher Belastung aber unverändert bleibt.

Evidenz, dass die HCN-Kanäle entscheidend für die Schrittmacheraktivität des Sinusknotens sind, ergibt sich unter anderem auch aus pharmakologischen Untersuchungen mit Ivabradin. Die selektive Blockade der HCN-Kanäle mittels Ivabradin führt zu einer isolierten Reduktion der Herzfrequenz. Erklärt wird dies durch einen flacheren Anstieg der diastolischen Depolarisation, ohne Veränderungen des Aktionspotenzials oder weitere kardiale Effekte hervorzurufen (DiFrancesco 2010). Auch familiär auftretende Mutationen des Genoms stützen die Bedeutung der HCN-Kanäle für die kardiale Schrittmacheraktivität. So zeigen genetische Analysen bei einer familiären Sinus-Bradykardie eine Mutation des HCN4-Kanals. Funktional führt dies während der Repolarisation erst bei negativeren Spannungszuständen zu einer Öffnung der Kanäle (Milanesi et al. 2006). Auch Schulze-Bahr et al. (2003) konnten bei einer Patientin mit reduzierter Ruhe- und Maximalfrequenz, intermittierendem Vorhofflimmern und einem inkompetenten Ansprechen auf cAMP eine Mutation des HCN4-Kanals feststellen.

Der senkende Einfluss der PDE3 und PDE4 auf die basale Herzfrequenz der Maus ist bekannt (Galindo-Tovar und Kaumann 2008). Einen generellen Beweis, dass die PDEs in die Regulation der HCN-Kanäle eingreifen, konnten interessanterweise bereits DiFrancesco und Tromba (1988) während ihrer *in vitro* Experimente an

isolierten Sinusknoten-Zellen aus Kaninchen liefern. Sie konnten nachweisen, dass die Gabe des unspezifischen PDE-Inhibitors 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) zu einem Anstieg der HCN-Aktivität führt, wahrscheinlich durch eine verringerte cAMP-Hydrolyse.

Die in dieser Arbeit gemessene basal reduzierte Herzfrequenz der transgenen Tiere ohne Einfluss auf die Kontraktilität lässt mehrere Hypothesen zu. Zum einen ist bekannt, dass der basale cAMP-Spiegel in Zellen des Sinusknotens höher ist als in Zellen des Arbeitsmyokards (Vinogradova et al. 2006). Es wäre denkbar, dass die cAMP-hydrolysierende Wirkung der transgenen PDE2A daher einen besonders großen und dadurch gut messbaren Effekt im Sinusknoten erlangt haben könnte, während möglicherweise nur marginale Änderungen des generell niedrigeren cAMP-Spiegels im Arbeitsmyokard keine messbaren Unterschiede erbringen konnte. Zum anderen lässt sich über eine gezielt gesteigerte hydrolytische Aktivität der transgenen PDE2A in einer Mikrodomäne der HCN-Kanäle des Sinusknotens auf Grund einer Kompartimentierung spekulieren. Für diese Hypothese einer Koexistenz der transgenen PDE2A in einer Mikrodomäne der membranständigen HCN4-Kanäle spricht das ebenfalls membranständige Vorkommen der verwendeten Isoform PDE2A2 (Yang et al. 1994; Rosman et al. 1997). Die gemessene normale maximale Herzfrequenz in den transgenen Tieren unter starker adrenerger Stimulation steht in keinem Widerspruch zu beiden Hypothesen. Es ist denkbar, dass die cAMP-Konzentration unter einer maximalen adrenergen Stimulation soweit ansteigt, dass die hydrolytische Aktivität der transgenen PDE2A nicht mehr ausreicht, die Aktivierung der HCN-Kanäle zu verhindern. Zudem spielen, wie bereits erwähnt, auch HCN4-Kanal-unabhängige Mechanismen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Herzfrequenz (Alig et al. 2009).

Um die Hypothese einer Koexistenz der PDE2A und des HCN-Kanals zu stützen, müssen weitere Experimente folgen, die Hinweise auf eine tatsächliche gemeinsame Lokalisation liefern können. Zum einen wären hier parallele immunhistologische Untersuchungen der PDE2A und des HCN-Kanals sinnvoll. Diese könnten bereits Aufschluss über ein gemeinsames Vorkommen geben. Auf der anderen Seite könnten auch Analysen mittels Proteinkomplex-Immunoprecipitation Hinweise für

eine Anreicherung der PDE2A im Komplex des HCN-Kanals liefern. Aber auch diese Analysemöglichkeiten machen, wie schon die Quantifizierung des PDE2A-Proteins, zunächst die Erprobung potenter Antikörper notwendig. Im Falle der Proteinkomplex-Immunoprecipitation bzw. des immunhistologischen Nachweises der HCN-Kanäle müssten zudem nicht nur Antikörper gegen die PDE2A, sondern ebenfalls gegen den HCN-Kanal bzw. dessen Isoformen sicher etabliert sein.

Parallel wäre es zukünftig sinnvoll, Vergleichsgruppen kardialer Insuffizienzmodelle, wie z.B. nach Myokardinfarkt, von Wildtyp-Tieren und transgenen Geschwistertieren für Langzeitstudien zu bilden. In diesen Gruppen könnten dann erweiterte Analysen auf molekularer und funktionaler Ebene stattfinden, um Hinweise auf mögliche Langzeiteffekte der transgenen PDE2A unter pathologischen Bedingungen zu bekommen. Da bei Menschen mit koronarer Herzkrankheit und Herzinsuffizienz eine gesteigerte Herzfrequenz mit einer erhöhten kardialen Mortalität assoziiert ist (Fox et al. 2008), wäre beispielsweise ein besseres Überleben in PDE2A-transgenen Tieren zu erwarten. Als Vergleichsgruppe könnte neben Geschwistertieren vom Wildtyp auch eine Kohorte dienen, die pharmakologisch mit Ivabradin behandelt wird. Sollten die Effekte in der transgenen Gruppe und der Ivabradin-Gruppe ähnlich sein, wäre dies bereits ein weiterer Hinweis auf die Wirkung der PDE2A in einer Mikrodomäne der HCN-Kanäle.

#### **4.6 Molekularbiologische Phänotypisierung**

Für die molekulare Phänotypisierung wurde zum einen mittels *realtime*-PCR (RT-PCR) der ventrikuläre mRNA-Gehalt bekannter Markerproteine untersucht, die charakteristischerweise während der Herzinsuffizienz eine Änderung erfahren. Zum anderen wurden in Western-Blot-Analysen zentrale Regulatorproteine des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels untersucht. Charakteristische Veränderungen hätten auch hier Hinweise auf einen möglicherweise gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt und somit eine gestörte Kontraktilität geben können. Außerdem sollten die Untersuchungen spezifischer PKA-abhängiger Phosphorylierungsstellen Hinweise auf eine mögliche PDE2A-bedingte Veränderung der cAMP-abhängigen PKA-

Aktivität geben. Eine Reduktion PKA-abhängiger Phosphorylierungen an einzelnen Substrat-Proteinen hätte dabei als Hinweis auf eine veränderte intrazelluläre cAMP-Kompartimentierung gewertet werden können.

Die RT-PCR-Analysen von ANP und BNP zeigten keine Veränderungen im myokardialen mRNA-Gehalt der PDE2A-transgenen Tiere. Auch in den Western-Blot-Analysen der zentralen  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierenden Proteine SERCA2a, PLB und TnI konnte für die PDE2A-transgenen Tiere gezeigt werden, dass es zu keinen Veränderungen der Proteinmengen oder der PKA-abhängigen Phosphorylierungszustände kommt.

Die fehlende Expressionssteigerung der Hypertrophiemarker ANP und BNP spricht gegen eine ventrikuläre Dysfunktion und eine damit verbundene Dehnung des Herzmuskels in den transgenen Tieren (Yasue et al. 1994). Auch die nachgewiesene fehlende Regulation des SERCA2a-Proteingehalts spricht gegen eine mögliche kontraktile Fehlfunktion der transgenen Tiere im Sinne einer kardialen Insuffizienz (Hasenfuss et al. 1994; Hasenfuss 1998; Linck et al. 1998). Ebenso deuten die fehlenden Änderungen sowohl des Proteingehalts als auch der untersuchten Phosphorylierungszustände von PLB und TnI auf eine normale kardiale Kontraktion und Relaxation in den transgenen Tieren hin (Luo et al. 1994; Li et al. 2000). Die Ergebnisse lassen auch vermuten, dass es zu keinen Verschiebungen der  $\beta$ -adrenergen Signalwege auf Grund von Kompartimentierung der transgenen PDE2A in einer Mikrodomäne von PLB oder TnI gekommen ist.

Zusammenfassend decken sich die erhobenen molekularbiologischen Daten mit den beschriebenen echokardiographischen Befunden, die ebenfalls keinen Hinweis auf eine verminderte Kontraktilität oder kardiale Hypertrophie lieferten.

Die  $\beta$ -adrenerge Stimulation führt neben den untersuchten Signalwegen auch zu einer gesteigerten Offenwahrscheinlichkeit der Ryanodin (RyR2)-Rezeptoren und der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (LTCC), wie sie auch bei bestehender Herzinsuffizienz gefunden wurde (Schröder et al. 1998; Marx et al. 2000). Leider konnten im Rahmen dieser Arbeit bis heute noch keine Untersuchungen dieser beiden Rezeptorkomplexe

durchgeführt werden. Eine Veränderung der Phosphorylierungen im Sinne einer globalen kardialen Insuffizienz scheint auf Grund der bestehenden Daten eher unwahrscheinlich zu sein. Allerdings sollte die Phosphorylierung des RyR2-Rezeptors und des LTCC in Bezug auf eine mögliche Kompartimentierung der PDE2A an diesen Rezeptor-Komplexen zukünftig untersucht werden.

#### **4.7 Ausblick**

Die entscheidende Rolle einer gesteigerten Herzfrequenz in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz ist bekannt. In der klinischen SHIFT-Studie (*Systolic Heart failure treatment with the I<sub>f</sub>-inhibitor ivabradine Trial*) konnten Swedberg et al. (2010) nachweisen, dass die isolierte Senkung der Herzfrequenz durch Ivabradin, ergänzend zu einer Leitlinien-konformen Therapie, den klinischen Ausgang einer Herzinsuffizienz verbessert. Auf Grund des bereits diskutierten isolierten inhibitorischen Einflusses der PDE2A auf die Herzfrequenz könnte die PDE2A zukünftig ein interessantes Zielprotein für eine erweiterte pharmakologische Therapie während der Herzinsuffizienz zur Frequenzregulation darstellen.

#### **4.8 Nachträgliche Anmerkung**

Nach Fertigstellung dieser Arbeit wurde in dem verwendeten PDE2A-Konstrukt – trotz einer anfänglich angeblich korrekten Sequenzierung – bei einer weiteren Analyse der Nukleotidsequenz unerwarteterweise eine bis dato unerklärliche Mutation in der GAF-B-Domäne identifiziert. Durch diese Mutation könnte eine konstitutiv aktive PDE2A-Form mit einer cGMP-unabhängigen katalytischen Aktivität für cAMP entstanden sein (siehe Kap. 1.4.2). Diese Vermutung konnte durch nachträgliche Aktivitätsmessungen der cGMP-abhängigen cAMP-Hydrolyse in *human embryonic kidney* (HEK)-293-Zellen bestätigt werden, welche mit dem mutierten bzw. einem nicht-mutierten PDE2A-Plasmid transfiziert worden waren. Es

zeigte sich die gleiche basale Aktivität des mutierten Konstrukts verglichen mit der nicht-mutierten PDE2A. Nach Stimulation mit cGMP kam es in den Zellen, welche die nicht-mutierte Variante trugen, zu einem rund 5-fachen Anstieg der Hydrolyse-Aktivität, während in den Zellen mit der mutierten PDE2A keine weitere Verstärkung der cAMP-Hydrolyse nachweisbar war. Es muss nun untersucht werden, inwiefern sich die hydrolytische Gesamt-Aktivität der PDE2A in den transgenen Mäusen in Abhängigkeit vom Grad der Überexpression verändert hat.

## 5 Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Viele pathophysiologische Veränderungen sind bereits bekannt. Im Zentrum stehen unter anderem die  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung und eine Störung der intrazellulären Calciumhomöostase. Zusammen mit  $\text{Ca}^{2+}$  bilden die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP (zyklisches Adenosin- und Guanosinmonophosphat) eine zentrale molekulare Grundlage zur Regulation des kardiovaskulären Systems. Die intrazelluläre Kompartimentierung dieser Botenstoffe hat dabei entscheidende Wirkung auf deren Effektoren. Den Phosphodiesterasen (PDEs) kommt für diese Kompartimentierung eine entscheidende Funktion zu. PDEs sind Metallophosphohydrolasen, die cAMP und/oder cGMP spalten und somit inaktivieren. Die PDE2A hydrolysiert sowohl cAMP als auch cGMP. Allerdings wird die cAMP-Hydrolyse durch cGMP stark gesteigert. Es besteht somit die Möglichkeit über Signalwege, die die intrazelluläre cGMP-Konzentration anheben, die Konzentration von cAMP zu reduzieren. Über die Funktion der PDE2A im Herzen und ihre Regulation während einer Herzinsuffizienz ist kaum etwas bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in der Maus gezeigt werden, dass eine 5-tägige Isoprenalin-Injektion zu einer 40%igen Erhöhung des PDE2A-Proteingehalts in den hypertrophierten Ventrikeln führt. Dies impliziert, dass der PDE2A eine pathophysiologische Bedeutung in der kardialen Hypertrophie zukommt. Für ein besseres Verständnis der physiologischen und pathologischen kardialen Funktionen der PDE2A wurde eine transgene Mauslinie generiert und die PDE2A unter Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promotors herzspezifisch überexprimiert. In der folgenden basalen Charakterisierung der transgenen Tiere fanden sich keine Veränderungen der Organgewichte, die auf eine Herzhypertrophie oder einen Rückstau vor dem Herzen im Sinne einer Insuffizienz schließen ließen. Auch Untersuchungen auf molekularer Ebene und mittels Herz-Ultraschall zeigten keine kardiale Hypertrophie oder Störung der Kontraktilität. Damit übereinstimmend zeigten sich in Western-Blot-Analysen keine Unterschiede im Proteingehalt oder im Phosphorylierungszustand zentraler  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierender Proteine wie Phospholamban, sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase oder Troponin I. Interessanterweise ließ sich aber eine Reduktion der basalen Herzfrequenz in den transgenen Tieren um ca. 10% nachweisen. Das

Frequenzmaximum unter adrenerger Stimulation war unverändert. Diese Ergebnisse könnten für eine PDE2A-abhängige Regulation basaler cAMP-Konzentrationen in Sinusknotenzellen, nicht oder weniger aber in Zellen des Arbeitsmyokards des Herzens sprechen. Durch eine PDE2A-abhängige gesteigerte cAMP-Hydrolyse in Sinusknotenzellen könnte es zu einer Reduktion der bekanntermaßen hohen cAMP-Konzentration, einer dadurch verringerten Aktivität der HCN-Kanäle und somit zu einer Abnahme der Herzfrequenz gekommen sein. Weitere Untersuchungen werden klären müssen, ob diese Hypothese zutrifft und wie sich die Überexpression der PDE2A unter pathologischen Bedingungen auswirkt.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AC	Adenylzyklase
ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i> , Angiotensin-Konversions-Enzym
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
Area d/s	Innere linksventrikuläre Fläche in der Diastole bzw. der Systole
ATP	Adenosintriphosphat
AWTh d	<i>Anterior wall thickness, end-diastolic</i> , linksventrikuläre enddiastolische Vorderwandstärke
β-AR	β-Adrenozeptor
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bp	Basenpaare
bpm	<i>Beats per minute</i> , Schläge pro Minute
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
cAMP/GMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat/Guanosinmonophosphat
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CMV	Zytomegalie-Virus
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CO	<i>Cardiac output</i> , Herzminutenvolumen
cpm	<i>Counts per minute</i>
CSQ	Calsequestrin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF	Ejektionsfraktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Epi s	Äußere linksventrikuläre Fläche in der Systole
ERK1/2	<i>Extracellularly responsive kinases 1/2</i>

---

FAS	<i>Fractional area shortening</i> , linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion
FhIA	<i>Formate hydrogen-lyase transcriptional activator</i>
for	Forwärts 5'-3' Primer
g	Gramm
GAF-Domäne	cGMP, AC und FhIA Bindungsdomäne
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GRK2	Desensitivierende $\beta$ -Adrenozeptorkinase
GTC	Guanin Thiocyanat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCN-Kanal	<i>Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels</i>
HF	Herzfrequenz
hGh	<i>Human growth hormone</i> , humanes Wachstumshormon
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HRPO	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettich Peroxidase
HW	Herzgewicht
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
I-1	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaeliskonstante
KG	Körpergewicht
Ktr	„Positivkontrolle“
l	Liter
Ld/s	Linksventrikulärer enddiastolischer/endsystolischer Längendurchmesser
LTCC	L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal
LVEDV/LVESV	Linksventrikuläres enddiastolisches/endsystolisches Volumen
LVIDd/s	Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. -systolischer Durchmesser
LVM	Linksventrikuläre Masse

---

m	Meter
M	Mol/l
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Kinase
MHC	<i>Myosin heavy chain</i> , schwere Kette des Myosins
MHz	Megahertz
min	Minute
mol	Mol
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
MyBPC	Myosin-bindendes Protein C
MW	<i>Molecular Weight Marker</i> , Protein- bzw. DNA-Größenstandard
NCX	Natrium/Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OG	Organgewicht
pA	PolyA
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pGC	<i>Particulate guanylate cyclase</i> , transmembranöse Guanolylyzyklase
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PLB	Phospholamban
PolyA	Polyadenylierungs-Region
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rcf	<i>Relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalbeschleunigung
rev	Rückwärts 3'-5' Primer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	<i>Rrealtime-PCR</i> , Echtzeit PCR
RyR2	Ryanodin-Rezeptor
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SERCA2a	Sarkoplasmatische Ca <sup>2+</sup> -ATPase

sGC	<i>Soluble guanylyl cyclase</i> , lösliche Guanylylzyklase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SV	Schlagvolumen
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TG	Transgen, transgene Tiere
TnI	Troponin-I
U	<i>Units</i> ; Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
$V_{\max}$	Maximale Enzymgeschwindigkeit
Vol. %	Volumenprozent
vs.	<i>Versus</i>
WT	Wildtyp, Wildtyp-Tiere

## 7 Literaturverzeichnis

- Aktorics** K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier, Urban & Fischer, München
- Alig** J, Marger L, Mesirca P, Ehmke H, Mangoni ME, Isbrandt D (2009) Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12189-12194
- Auerbach** AB, Norinsky R, Ho W, Losos K, Guo Q, Chatterjee S, Joyner AL (2003) Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production. *Transgenic Res* 12: 59-69
- Auerbach** AB (2004) Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochim Pol* 51: 9-31
- Bartel** S, Stein B, Eschenhagen T, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Krause EG, Karczewski P, Scholz H (1996) Protein phosphorylation in isolated trabeculae from nonfailing and failing human hearts. *Mol Cell Biochem* 157: 171-179
- Beavo** JA, Hardman JG, Sutherland EW (1971) Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate hydrolysis by guanosine 3',5'-monophosphate. *J Biol Chem* 246: 3841-3846
- Bender** AT, Beavo JA (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58: 488-520
- Bers** DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205
- Biel** M, Schneider A, Wahl C (2002) Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med* 12: 206-212
- Boyett** MR (2009) 'And the beat goes on.' The cardiac conduction system: the wiring system of the heart. *Exp Physiol* 94: 1035-1049
- Bristow** MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307: 205-211
- Burley** DS, Ferdinandy P, Baxter GF (2007) Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br J Pharmacol* 152: 855-869

- Carrier L** (2007) Cardiac myosin-binding protein C in the heart. *Arch Mal Coeur Vaiss* 100: 238-243
- Ceolotto G**, Papparella I, Sticca A, Bova S, Cavalli M, Cargnelli G, Semplicini A, Gatta A, Angeli P (2008) An abnormal gene expression of the beta-adrenergic system contributes to the pathogenesis of cardiomyopathy in cirrhotic rats. *Hepatology* 48: 1913-1923
- Cheng SM**, Schildkraut CL (1980) A family of moderately repetitive sequences in mouse DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 4075-4090
- 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* 311: 819-823
- Colucci WS**, Denniss AR, Leatherman GF, Quigg RJ, Ludmer PL, Marsh JD, Gauthier DF (1988) Intracoronary infusion of dobutamine to patients with and without severe congestive heart failure. Dose-response relationships, correlation with circulating catecholamines, and effect of phosphodiesterase inhibition. *J Clin Invest* 81: 1103-1110
- Deutsche Gesellschaft für Kardiologie** – Herz und Kreislaufforschung e.V. Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz (abgerufen am 06.03.2011) <http://www.dgk.org/leitlinien/leitlinienherzinsuffizienz.pdf>
- DiFrancesco D**, Tromba C (1988) Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol* 405: 493-510
- DiFrancesco D**, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351: 145-147
- DiFrancesco D** (2010) The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res* 106: 434-446
- Ding B**, Abe J, Wei H, Huang Q, Walsh RA, Molina CA, Zhao A, Sadoshima J, Blaxall BC, Berk BC, Yan C (2005) Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation* 111: 2469-2476
- El-Armouche A**, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jackel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J, Eschenhagen T (2003) Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J* 17: 437-439

- El-Armouche** A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh YH, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T, Carrier L (2007) Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 43: 223-229
- El-Armouche** A, Wittkopper K, Degenhardt F, Weinberger F, Didie M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsold B, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T (2008) Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res* 80: 396-406
- El-Armouche** A, Eschenhagen T (2009) Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* 14: 225-241
- Engelhardt** S, Bohm 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* 27: 146-154
- Eschenhagen** T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Warnholtz A, Wustel JM (1991) Isoprenaline-induced increase in mRNA levels of inhibitory G-protein alpha-subunits in rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 343: 609-615
- Eschenhagen** T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, Hirt S, Doring V, Kalmar P, Hoppner W, et al. (1992) Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein alpha subunit Gi alpha-2 in human end-stage heart failure. *Circ Res* 70: 688-696
- Feil** R, Lohmann SM, de Jonge H, Walter U, Hofmann F (2003) Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res* 93: 907-916
- Fischmeister** R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J, Vandecasteele G (2006) Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 99: 816-828
- Fox** K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Robertson M, Ferrari R (2008) Heart rate as a prognostic risk factor in patients with coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a subgroup analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* 372: 817-821

- Furth** PA, St Onge L, Boger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H, Hennighausen L (1994) Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9302-9306
- Galindo-Tovar** A, Kaumann AJ (2008) Phosphodiesterase-4 blunts inotropism and arrhythmias but not sinoatrial tachycardia of (-)-adrenaline mediated through mouse cardiac beta(1)-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 153: 710-720
- Garcia** JF, Maestre L, Lucas E, Sanchez-Verde L, Romero-Chala S, Piris MA, Roncador G (2006) Genetic immunization: a new monoclonal antibody for the detection of BCL-6 protein in paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 54: 31-38
- Gauthier** C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H (1996) Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 98: 556-562
- Gauthier** C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, Le Marec H (1998) The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 102: 1377-1384
- Gordon** JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 7380-7384
- Han** X, Kobzik L, Balligand JL, Kelly RA, Smith TW (1996) Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca<sup>2+</sup> current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. *Circ Res* 78: 998-1008
- Hasenfuss** G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994) Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75: 434-442
- Hasenfuss** G (1998) Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 37: 279-289
- 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* 119: 515-523
- Jones** WK, Sanchez A, Robbins J (1994) Murine pulmonary myocardium: developmental analysis of cardiac gene expression. *Dev Dyn* 200: 117-128

- Kobayashi T**, Solaro RJ (2005) Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. *Annu Rev Physiol* 67: 39-67
- Köhler G**, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497
- Kuhn M** (2004) Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic Res Cardiol* 99: 76-82
- Kupriyanov S**, Zeh K, Baribault H (1998) Double pronuclei injection of DNA into zygotes increases yields of transgenic mouse lines. *Transgenic Res* 7: 223-226
- Lakatta EG**, Maltsev VA, Vinogradova TM (2010) A coupled SYSTEM of intracellular Ca<sup>2+</sup> clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ Res* 106: 659-673
- Lehnart SE**, Wehrens XH, Reiken S, Warriar S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SL, Conti M, Marks AR (2005) Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 123: 25-35
- Lehnart SE**, Maier LS, Hasenfuss G (2009) Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart Fail Rev* 14: 213-224
- Li L**, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM (2000) Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H769-779
- Linck B**, Boknik P, Baba HA, Eschenhagen T, Haverkamp U, Jackel E, Jones LR, Kirchhefer U, Knapp J, Laer S, Müller FU, Schmitz W, Scholz H, Syska A, Vahlensieck U, Neumann J (1998) Long-term beta adrenoceptor-mediated alteration in contractility and expression of phospholamban and sarcoplasmic reticulum Ca(++)-ATPase in mammalian ventricle. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 531-538
- Lohse MJ**, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003) What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93: 896-906
- Lucas KA**, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52: 375-414
- Luo W**, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman 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

- Ma** TK, Kam KK, Yan BP, Lam YY (2010) Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *Br J Pharmacol* 160: 1273-1292
- Maier** LS, Bers DM (2007) Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* 73: 631-640
- Martinez** SE, Beavo JA, Hol WG (2002a) GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides. *Mol Interv* 2: 317-323
- Martinez** SE, Wu AY, Glavas NA, Tang XB, Turley S, Hol WG, Beavo JA (2002b) The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13260-13265
- Marx** SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101: 365-376
- McKee** PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB (1971) The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med* 285: 1441-1446
- McMurray** JJ, Stewart S (2000) Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83: 596-602
- 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 Schmiedebergs Arch Pharmacol* 345: 44-50
- Milanesi** R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscione T, DiFrancesco D (2006) Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med* 354: 151-157
- Mokni** W, Keravis T, Etienne-Selloum N, Walter A, Kane MO, Schini-Kerth VB, Lugnier C (2010) Concerted regulation of cGMP and cAMP phosphodiesterases in early cardiac hypertrophy induced by angiotensin II. *PLoS One* 5: e14227
- Mongillo** M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V, Terrin A, Huston E, Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD, Zaccolo M (2004) Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res* 95: 67-75

- Mongillo** M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung YF, Dostmann WR, Pozzan T, Kass DA, Paolocci N, Houslay MD, Zaccolo M (2006) Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res* 98: 226-234
- Nagendran** J, Archer SL, Soliman D, Gurtu V, Moudgil R, Haromy A, St Aubin C, Webster L, Rebeyka IM, Ross DB, Light PE, Dyck JR, Michelakis ED (2007) Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* 116: 238-248
- 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: 1450-1457
- Ng** WA, Grupp IL, Subramaniam A, Robbins J (1991) Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. *Circ Res* 68: 1742-1750
- Nikolaev** VO, Gambaryan S, Engelhardt S, Walter U, Lohse MJ (2005) Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells: hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis. *J Biol Chem* 280: 1716-1719
- Nishikimi** T, Maeda N, Matsuoka H (2006) The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 69: 318-328
- Omori** K, Kotera J (2007) Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 100: 309-327
- Packer** M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML, et al. (1991) Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med* 325: 1468-1475
- Palmiter** RD, Chen HY, Brinster RL (1982) Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* 29: 701-710
- Palmiter** RD, Brinster RL (1986) Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet* 20: 465-499

- Pandit J**, Forman MD, Fennell KF, Dillman KS, Menniti FS (2009) Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18225-18230
- Pokreisz P**, Vandewijngaert S, Bito V, Van den Bergh A, Lenaerts I, Busch C, Marsboom G, Gheysens O, Vermeersch P, Biesmans L, Liu X, Gillijns H, Pellens M, Van Lommel A, Buys E, Schoonjans L, Vanhaecke J, Verbeken E, Sipido K, Herijgers P, Bloch KD, Janssens SP (2009) Ventricular phosphodiesterase-5 expression is increased in patients with advanced heart failure and contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 119: 408-416
- Qvigstad E**, Moltzau LR, Aronsen JM, Nguyen CH, Hougen K, Sjaastad I, Levy FO, Skomedal T, Osnes JB (2010) Natriuretic peptides increase beta1-adrenoceptor signalling in failing hearts through phosphodiesterase 3 inhibition. *Cardiovasc Res* 85: 763-772
- Rosman GJ**, Martins TJ, Sonnenburg WK, Beavo JA, Ferguson K, Loughney K (1997) Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 191: 89-95
- Roth DM**, Swaney JS, Dalton ND, Gilpin EA, Ross J, Jr. (2002) Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H2134-2140
- Rülicke T**, Hübscher U (2000) Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Exp Physiol* 85: 589-601
- Schillace RV**, Scott JD (1999) Organization of kinases, phosphatases, and receptor signaling complexes. *J Clin Invest* 103: 761-765
- Schröder F**, Handrock R, Beuckelmann DJ, Hirt S, Hullin R, Priebe L, Schwinger RH, Weil J, Herzig S (1998) Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* 98: 969-976
- Schulze-Bahr E**, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D (2003) Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest* 111: 1537-1545

- Senzaki H**, Smith CJ, Juang GJ, Isoda T, Mayer SP, Ohler A, Paolocci N, Tomaselli GF, Hare JM, Kass DA (2001) Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *FASEB J* 15: 1718-1726
- Simmons MA**, Hartzell HC (1988) Role of phosphodiesterase in regulation of calcium current in isolated cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 33: 664-671
- Skeberdis VA**, Gendviliene V, Zablockaite D, Treinys R, Macianskiene R, Bogdelis A, Jurevicius J, Fischmeister R (2008) beta3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca<sup>2+</sup> current. *J Clin Invest* 118: 3219-3227
- Statistisches-Bundesamt** (2008) Herzinsuffizienz häufigster Grund für einen Krankenhausaufenthalt in 2006. In: Pressemitteilung Nr. 095 vom 06.03.2008. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden
- Statistisches-Bundesamt** (2010) Todesursachen in Deutschland. In: Bundesamt S (ed.) Fachserie 12 Reihe 4 – 2008, Wiesbaden
- Studer R**, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Bohm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994) Gene expression of the cardiac Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75: 443-453
- 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* 266: 24613-24620
- Swedberg K**, Komajda M, Bohm M, Borer JS, Ford I, Dubost-Brama A, Lerebours G, Tavazzi L (2010) Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 376: 875-885
- Takuma S**, Suehiro K, Cardinale C, Hozumi T, Yano H, Shimizu J, Mullis-Jansson S, Sciacca R, Wang J, Burkhoff D, Di Tullio MR, Homma S (2001) Anesthetic inhibition in ischemic and nonischemic murine heart: comparison with conscious echocardiographic approach. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2364-2370
- 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: 454-463

- Verkerk** AO, van Ginneken AC, Wilders R (2009) Pacemaker activity of the human sinoatrial node: role of the hyperpolarization-activated current, I(f). *Int J Cardiol* 132: 318-336
- Vinogradova** TM, Lyashkov AE, Zhu W, Ruknudin AM, Sirenko S, Yang D, Deo S, Barlow M, Johnson S, Caffrey JL, Zhou YY, Xiao RP, Cheng H, Stern MD, Maltsev VA, Lakatta EG (2006) High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca<sup>2+</sup> store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. *Circ Res* 98: 505-514
- Wilkie** TM, Brinster RL, Palmiter RD (1986) Germline and somatic mosaicism in transgenic mice. *Dev Biol* 118: 9-18
- Wittköpper** K, Fabritz L, Neef S, Ort KR, Grefe C, Unsold B, Kirchhof P, Maier LS, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T, El-Armouche A (2010) Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging. *J Clin Invest* 120: 617-626
- Yanaka** N, Kurosawa Y, Minami K, Kawai E, Omori K (2003) cGMP-phosphodiesterase activity is up-regulated in response to pressure overload of rat ventricles. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 973-979
- Yang** Q, Paskind M, Bolger G, Thompson WJ, Repaske DR, Cutler LS, Epstein PM (1994) A novel cyclic GMP stimulated phosphodiesterase from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 1850-1858
- Yasue** H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K (1994) Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 90: 195-203
- Zaccolo** M, Movsesian MA (2007) cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* 100: 1569-1578
- Zaccolo** M, Pozzan T (2002) Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* 295: 1711-1715

## 8 Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen für die Möglichkeit zur Promotion und die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen in seinem Institut in Hamburg.

Mein ganz besonderer Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Ali El-Armouche für die Vergabe dieser interessanten und vielseitigen Promotionsarbeit. Er hat mich herzlich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und integriert. Seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung und freundschaftliche Art hat mir die Zusammenarbeit immer angenehm gemacht. Danken möchte ich ihm auch dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, ihn in die Pharmakologie nach Göttingen zu begleiten, um einen großen Teil meiner experimentellen Arbeit dort durchführen zu können.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Katrin Wittköpper bedanken, die mir vor dem Umzug nach Göttingen, besonders aber während meiner Zeit in der Pharmakologie dort und auch beim Erstellen meiner Dissertation eine sehr große Hilfe war. Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, fachliche Kompetenz und immer freundschaftliche Art hat das Entstehen dieser Arbeit erst möglich gemacht.

Ein großer Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe El-Armouche. Jutta Starbatty danke ich für die herzliche Aufnahme und ihre Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen Aufgaben im Labor. Hannieh Sotoud und Christiane Neuber danke ich ebenso für die schnelle Integration, die tolle Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfe bei fachlichen Problemen. Thomas Schulze danke ich ganz besonders für die vielen Tage und Wochen, in denen er mich in alle grundlegenden Techniken des Labors eingearbeitet hat. Danken möchte ich ihm auch für seine stets zuverlässige und akkurate großartige Hilfe bei den späteren Experimenten, sowohl in Hamburg als auch in Göttingen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Sandra Maak und Thomas Lutz für ihre Hilfe bei der Durchführung der Southern-Blot-Analysen in Hamburg. Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer danke ich für ihre Hilfe bei der Generierung der transgenen

Mauslinien. Susanne Conrad danke ich ganz besonders für ihre ausgezeichnete und zuverlässige Arbeit als Tierpflegerin in Hamburg.

Allen weiteren Kollegen aus den Instituten in Hamburg und Göttingen danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, das hervorragende Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft.

Außerdem möchte ich mich auch noch ganz besonders bei meinen Eltern und meiner Schwester sowie bei Hermann für die vielfältige Unterstützung während meiner Arbeit danken. Tanja danke ich für ihre stetige Hilfe und Liebe.

---

## 9 Lebenslauf

Name	Fabian Johannes Brunner
Geburtstag	05. Juli 1984
Geburtsort	Hamburg

### **Ausbildung**

Juni 2003	Abitur am Walddörfer-Gymnasium, Hamburg
2003 bis 2004	Zivildienst in der Walddörfer Dialyse, Hamburg
2005 bis 2011	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Universität Hamburg
September 2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2009 bis Oktober 2011	Dissertation am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
November 2009 bis März 2010	Forschungsaufenthalt in der Abteilung Pharmakologie, Universitätsmedizin Göttingen
Oktober 2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## 10 Anhang

### 10.1 Echokardiographische Parameter

Alle Werte werden angegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes. Mit n wird die Anzahl der untersuchten Tiere bezeichnet.

**Tab. 10.1** Echokardiographische Ergebnisse unter basalen Bedingungen:

Parameter	WT (n=14)	TG (n=14)
KG (g)	24,4 $\pm$ 1,2	24,3 $\pm$ 1,1
Ld (mm)	8,1 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,1
Ls (mm)	7,3 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,1
LVIDd (mm)	4,1 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,1
LVIDs (mm)	3,4 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,1
Area d (mm)	12,6 $\pm$ 0,4	13,0 $\pm$ 0,5
Area s (mm)	8,3 $\pm$ 0,4	8,8 $\pm$ 0,5
Epi s (mm)	20,9 $\pm$ 0,7	20,9 $\pm$ 1,0
LVM (mg)	99,0 $\pm$ 5,2	95,1 $\pm$ 5,4
LVM/KG (mg/g)	4,1 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,1
LVEDV ( $\mu$ l)	85,1 $\pm$ 3,3	86,6 $\pm$ 4,5
LVESV ( $\mu$ l)	50,6 $\pm$ 2,9	54,1 $\pm$ 3,3
LVEDV/KG ( $\mu$ l/g)	3,5 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,1

Die untersuchten Mäuse hatten ein Alter von 11-12 Wochen.

## **11 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: .....