

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Einfluss der Proteinphosphatase 2C $\beta$  auf die Funktion von  
Herzvorhöfen transgener Mäuse in vitro unter Hypoxie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Tom Alfred Bruns

geboren am 30.01.1995 in Lutherstadt Eisleben

Betreuer: Prof. Dr. med. Joachim Neumann

Gutachter:

PD Dr. med. Torsten Christ, Hamburg

Prof. Dr. med. Renke Maas, Erlangen

Datum der Verteidigung: 28.02.2023

## Referat

Proteinphosphatasen sind als Regulatoren des Phosphorylierungsstatus in jeder Zelle von Bedeutung. Damit haben sie ubiquitären Einfluss auf die unterschiedlichsten Vorgänge und Funktionen von Proteinen. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass eine erhöhte Expression verschiedener Proteinphosphatasen wie PP1, PP2A, PP2B oder PP5 in Mäusen die Funktion des Herzens verändern. Der Einfluss der Proteinphosphatase 2C (PP2C) auf die physiologischen Vorgänge in Kardiomyozyten und auf die Herzfunktion ist jedoch weitgehend unbekannt. Die Wirkung einer erhöhten PP2C-Expression auf die Funktion isolierter Herzvorhöfe gentechnisch veränderter Mäuse soll daher in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden Experimente an transgenen Mäusen (TG) und Wildtypen (WT) im Vergleich durchgeführt. Die transgenen Tiere zeichneten sich durch eine kardiomyozytenspezifische Überexpression der Proteinphosphatase 2C $\beta$  aus, die unter Kontrolle des Promotors der  $\alpha$ -Isoform der schweren Kette des Myosins erzielt wurde. Gemessen wurden Kontraktionskräfte und Frequenzen *in vitro* an elektrisch stimulierten (1 Hz) linken und spontan schlagenden rechten Herzvorhofpräparaten. Unter physiologischen Bedingungen (Begasung der Pufferlösung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>)) war hier bereits eine höhere Frequenz der rechten Vorhofpräparate von TG zu beobachten. In verschiedenen Versuchsreihen wurde dann eine Hypoxie durch eine Begasung der Pufferlösung mit Stickstoff-haltiger Gasmischung (95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) durchgeführt. Dabei zeigte sich vor, zwischen und nach den hypoxischen Intervallen eine höhere Frequenz der rechten Vorhofpräparate in TG. Die Kontraktionskräfte der isolierten linken Vorhofpräparate unterschieden sich nicht. Unter Hypoxie entwickelten WT mehr Kraft als TG. Des Weiteren zeigte sich in den Zyklen von Hypoxie und Reoxygenierung, dass TG schneller ihre Kraft verloren und auch langsamer regenerierten als WT. Ebenso entwickelten sich Kontrakturen in TG schneller als in WT, sie wurden jedoch in TG auch schneller wieder abgebaut.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PP2C $\beta$  einen Einfluss auf die Herzfrequenz haben könnte. Außerdem könnte PP2C $\beta$  einen schnelleren Verlust der Kontraktilität und eine schlechtere Erholung bei hypoxischen Zuständen mit erhöhtem Risiko für Kontrakturentwicklung bewirken. Damit scheint PP2C $\beta$  für die Funktion des Herzens unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen eine Rolle zu spielen.

Bruns, Tom Alfred: Einfluss der Proteinphosphatase 2C $\beta$  auf die Funktion von Herzvorhöfen transgener Mäuse *in vitro* unter Hypoxie. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 77 Seiten, 2023

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Proteinphosphorylierung durch Proteinkinasen und Proteinphosphatasen	1
1.2 Serin-/Threonin-Phosphatasen	2
1.3 Proteinphosphatase 2C	2
1.4 Isoformen der PP2C	3
1.5 Bedeutung der PP2C für die Herzfunktion	5
1.6 Hypoxie und Präkonditionierung im Herzen	7
1.7 Transgenes Mausmodell	9
2 Zielstellung	10
3 Material und Methoden	11
3.1 Eigenschaften und Haltung der Mäuse	11
3.2 PP2C $\beta$ -überexprimierende transgene Mäuse	11
3.3 Genotypisierung der Mäuse	12
3.3.1 Extraktion und Isolation der DNA	12
3.3.2 Konzentrationsbestimmung der DNA	13
3.3.3 PCR-Amplifikation der DNA	13
3.3.4 Agarosegelelektrophorese	14
3.4 Kontraktionsversuche	14
3.4.1 Vorbereitung des Organbades	14
3.4.2. Aufbau und Vorbereitung der Messanlage	14
3.4.3 Narkose und Organentnahme	16
3.4.4 Präparation der Herzvorhöfe	17
3.4.5 Versuchsdurchführung	18
3.4.6 Aufzeichnung der Mechanogramme	20
3.5 Statistische Auswertung	20
4 Ergebnisse	22
4.1 Genotypisierung der Versuchstiere	22
4.2 Aufzeichnung der Kontraktionsversuche	22
4.3 Kontraktionen der linken Vorhofpräparate unter einfacher Hypoxie	26
4.4 Kontraktionen der linken Vorhofpräparate bei Präkonditionierung	33
4.5 Kontraktionen der linken Vorhofpräparate bei doppelter Hypoxie	38
4.6 Abfall und Anstieg der Kontraktionskräfte der linken Vorhofpräparate	42
4.7 Kontraktionen der linken Vorhofpräparate	43
4.8 Schlagfrequenzen der rechten Vorhofpräparate	48

4.9 Erliegen und Wiedereinsetzen der Kontraktionen der rechten Vorhofpräparate unter Hypoxie	51
4.10 Arrhythmien der rechten Vorhofpräparate	53
5 Diskussion	56
5.1 Diskussion der Methoden	56
5.1.1 Mausmodell	56
5.1.2 Kontraktionsexperimente	57
5.2 Zeitkontrolle	59
5.3 Vorhofkontraktionen unter Hypoxie	60
5.4 Klinische Relevanz	64
6 Zusammenfassung	66
7 Literatur	68
8 Thesen	76
9 Anhang	VII

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$ -ARK	$\beta$ -Adrenozeptorkinase
$\beta$ -AR	$\beta$ -Adrenozeptor
bp	Basenpaare
bpm	beats per minute (Herzschläge pro Minute)
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium <sup>2+</sup> -Ionen
$\text{Cd}^{2+}$	Cadmium <sup>2+</sup> -Ionen
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CDKs	Cyclin-abhängige Kinasen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CICR	$\text{Ca}^{2+}$ -induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung
cm	Zentimeter
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
CSQ	Calsequestrin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d. h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
evtl.	eventuell
fmol	Femtomol
g	1. Gramm 2. Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GDP	Guanosindiphosphat
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hg <sup>2+</sup>	Quecksilber <sup>2+</sup> -Ionen
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheit
ICH	intermittierende hypoxieinduzierte Kardioprotektion
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
Ktr	Kontrolle
LA	Linker Vorhof
Log	Logarithmus
LV	Linker Ventrikel
M	molar (Mol/Liter)
m	Masse
mA	Milliampère
MAP-Kinase	Mitogen-activated Protein-Kinase
MDM2	Mouse-double-minute-2-Homolog
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium <sup>2+</sup> -Ion
MHC	schwere Kette des Myosins
min	Minute
mind.	Mindestens
Mn <sup>2+</sup>	Mangan <sup>2+</sup> -Ion
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
µM	Mikromolar (Mikromol/Liter)
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mmol	Millimol
mN	Millinewton
ms	Millisekunden
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt

n	Stichprobenumfang
n.b.	nicht berechenbar
NFκB	nukleärer Faktor „Kappa-Leichtketten-Verstärker“ aktivierter B-Zellen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (Nanomol/Liter)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
P	1. Präkonditionierung 2. Phosphor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHLPP	pleckstrin homology domain and leucine-rich repeat protein phosphatase
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PP	Proteinphosphatase
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PP2Cβ	Proteinphosphatase 2Cβ
PPP	Phosphoproteinphosphatase
PPM	Metallabhängige Proteinphosphatase
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
RA	Rechter Vorhof
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RyR	Ryanodin-Rezeptor (Ca <sup>2+</sup> -Freisetzungskanal)
RV	Rechter Ventrikel
s	Sekunde
s.	siehe
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TG	transgene Maus mit herzspezifischer Überexpression boviner PP2C $\beta$
TnC	Calcium-bindendes Troponin
TnI	Troponin I (Troponin-Inhibitor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
U	<i>units</i> , Einheiten
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
v. a.	vor allem
vs.	im Vergleich zu
WT	Wildtyp-Maus
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
Zn <sup>2+</sup>	Zink <sup>2+</sup> -Ionen



## 1 Einleitung

### 1.1 Proteinphosphorylierung durch Proteinkinasen und Proteinphosphatasen

Eine Phosphorylierung ist ein wichtiger Mechanismus der posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Hierbei werden durch Proteinkinasen der terminale Phosphatrest von Adenosintriphosphat auf bestimmte Aminosäuren unter Wasserfreisetzung übertragen. Diese Aminosäuren weisen dabei in der Regel eine Hydroxylgruppe im Rest auf. Da dies nur auf die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin zutrifft, werden die Phosphatreste hauptsächlich an diese drei gebunden, wenngleich auch Phosphorylierungen von Histidylresten bekannt sind (Attwood und Wieland 2015). Die Phosphorsäureesterbindung fügt dem Protein automatisch 2 negative Ladungen hinzu und verändert folglich die elektrostatischen Wechselwirkungen mit anderen Molekülen. Die Spezifität verschiedener Kinasen für Serin- und Threoninreste bzw. für Tyrosinreste ermöglicht eine Einteilung in Serin-/Threonin- und Tyrosinkinase (Horn et al. 2020).

Proteinphosphatasen sind dabei die Gegenspieler der Proteinkinasen, weil sie als Esterasen unter Wassereinlagerung Phosphatreste abspalten können. Vergleichbar zu den Proteinkinasen werden die Proteinphosphatasen je nach bevorzugtem Angriffspunkt in Serin-/Threoninphosphatasen und Tyrosinphosphatasen eingeteilt. Sie halten den Phosphorylierungsstatus der Zellen im Gleichgewicht.

Die kovalente Proteinmodifikation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung spielt eine bedeutende Rolle in der Kontrolle der Aktivität verschiedener Enzyme, die in Signaltransduktionswegen involviert sind und dabei zelluläre Aktivität und komplexe Funktionen wie Differenzierung oder Zelltransformation beeinflussen. Die Nettoaktivität eines Phosphoproteins wird dabei durch das Verhältnis phosphorylierter und dephosphorylierter Moleküle bestimmt, welches wiederum abhängig von den relativen Aktivitäten der Kinasen und Phosphatasen ist (Mumby und Walter 1993).

Bei Proteomanalysen der Phosphorylierungsstellen von 2244 menschlichen Proteinen zeigte sich, dass die meisten Phosphatreste an Serin gebunden werden (86,5 %), weniger an Threonin (11,8 %) und die wenigsten an Tyrosinreste (1,8 %) (Olsen et al. 2006). Dies ist gut vereinbar mit dem Überwiegen der putativen Serin-/Threoninkinasen gegenüber den Tyrosinkinase (ca. 428:90), die im menschlichen Genom zu finden sind (Shi 2009). Die Zahlen der Proteinphosphatasen zeigen jedoch ein anderes Verhältnis. Während etwa 107 Tyrosinphosphatasen bekannt sind, kennt man nur ca. 30 verschiedene Serin-/Threonin-Phosphatasen (Shi 2009).

## 1.2 Serin-/Threonin-Phosphatasen

Die Gruppe der Serin-/Threonin-Phosphatasen besteht aus drei großen Familien. Die Phosphoproteinphosphatasen (PPPs), die metallabhängigen Proteinphosphatasen (PPMs) und die Aspartat-basierten Proteinphosphatasen. Die PPPs bestehen meist aus einer katalytischen Untereinheit und unterscheiden sich in verschiedenen regulatorischen Untereinheiten. Wichtige Vertreter sind die Proteinphosphatase 1 (PP1), PP2A, PP2B (auch Calcineurin genannt) sowie PP4, PP5, PP6 und PP7. Die Enzyme der PPM-Familie benötigen ein zentrales zweiwertiges Metallion ( $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$ ) und besitzen - soweit wir bisher wissen - keine regulatorische Untereinheit, jedoch sind zusätzliche Proteindomänen und konservierte Motive an einer Substratspezifität beteiligt. Wichtige Vertreter sind die PP2C und die Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase (Neumann et al. 2021). Die dritte Familie nutzt einen Aspartat-basierten Enzymmechanismus. Bisher ist wenig über die Funktionen der Vertreter dieser PP-Familie bekannt (Shi 2009).

Der Großteil der Aktivität aller Serin-/Threonin-Phosphatasen wird durch PP1, PP2A, PP2B sowie durch PP2C der PPM-Familie ausgemacht (Barford 1998), wobei letztere in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden soll.

## 1.3 Proteinphosphatase 2C

Die PP2C umfasst als Subfamilie der metallabhängigen Proteinphosphatasen mehrere monomere Isoformen. Sie alle benötigen  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  als zentrales Metallion, um kovalente Bindungen aufzubauen. Gemeinsam ist ihnen auch die fehlende Inhibition durch den Breitspektrum-Proteinphosphataseinhibitor Okadasäure. Orthologe Proteine der PP2C lassen sich in beinahe allen Organismen finden (Lammers und Lavi 2007). Die PP2C spielt eine Rolle in der Regulation von Stress-Signalen sowie bei Zellwachstum und -differenzierung, bei Apoptose, Überleben und dem Zellstoffwechsel. Dabei sind einige Vertreter wie PP2C $\alpha$ , PP2C $\beta$  und PHLPP Tumorsuppressorproteine, während andere (z.B. PP2C $\delta$  oder auch Wip1) zur onkogenen Transformationen beitragen (Shi 2009, Bollmann et al. 2020).

Die Struktur der PP2C ist stark konserviert. Die katalytische N-terminale Domäne besteht aus einem  $\beta$ -Faltblatt, welches zwei Mangan-Ionen (bzw. Magnesium-Ionen) bindet. Einige  $\alpha$ -Helices umgeben diese zentrale Struktur. Die C-terminale Domäne besteht v.a. aus  $\alpha$ -Helices und ist vermutlich für die Substratspezifität der einzelnen Isoformen verantwortlich. Die Metall-Ionen spielen eine zentrale Rolle bei der Dephosphorylierung.

Sie binden Wassermoleküle und koordinieren die Phosphatgruppe des Substrates (Das et al. 1996).

Die Aktivität der PP2C lässt sich über Inhibition oder Stimulation bisher nur wenig spezifisch beeinflussen. Während PP2C nicht von Okadasäure gehemmt werden kann, so ist eine Hemmung mit Sanguinarin, einem pflanzlichen Alkaloid möglich. Diese Hemmung erwies sich *in vitro* als potent, *in vivo* hingegen zeigte sie sich weniger spezifisch für die PP2C (Aburai et al. 2010). Weiterhin wird die Aktivität der PP2C durch steigende Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  gehemmt (Neumann et al. 2021). Eine Stimulation kann hingegen durch verschiedene ungesättigte Fettsäuren erreicht werden, z.B. durch Arachidonsäure (Klumpp et al. 1998). Auch steigende Mangan- und/oder Magnesiumkonzentrationen können die PP2C-Aktivität stimulieren (Neumann et al. 2021).

#### 1.4 Isoformen der PP2C

Bisher sind 16 verschiedene Gene für PP2C im menschlichen Genom identifiziert worden. Diese kodieren (durch alternatives Spleißen) für mindestens 20 verschiedene Isoenzyme (Neumann et al. 2021). Sie unterscheiden sich in ihren Sequenzen und ihrer Struktur. Zudem hat jede Isoform unterschiedliche Funktionen, unterschiedliche Expressionsmuster und unterschiedliche Lokalisationen in der Zelle (Shi 2009).

In den durchgeführten Experimenten dieser Arbeit stand die Isoform PP2C $\beta$  im Mittelpunkt der Untersuchung. Dieses Isoenzym hat wiederum mehrere Unterformen, die sich v.a. in ihrer C-terminalen Domäne und damit wahrscheinlich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. Die wichtigsten Formen PP2C $\beta$ 1 und PP2C $\beta$ 2 sind ubiquitär im Zytoplasma zu finden, die höchste Expression zeigen sie in Herz und Skelettmuskel. Eine Überexpression hemmt das Zellwachstum (Seroussi et al. 2001). Zudem ist PP2C $\beta$  ein negativer Regulator der zellulären Antwort auf Stress-Signale, u.a. indem sie zwei Stress-aktivierte MAPK-Signalwege unterdrückt. Über die Hemmung einer aktivierenden Kinase von NF $\kappa$ B beeinflusst sie dessen Funktionen beim Zellüberleben, bei der Apoptosehemmung und bei der Verstärkung von Stress-Signalen negativ (Lammers und Lavi 2007).

Durch die Dephosphorylierung inaktivierender und aktivierender Aminosäuren verschiedener Cyclin-abhängiger Kinasen übt PP2C $\beta$  einen Einfluss auf die Steuerung der Zellzyklusprogression und des Zellwachstums aus (Cheng et al. 2000). Des Weiteren wirkt sie hemmend auf MDM2 (*Mouse-double-minute-2-Homolog*), einen wichtigen endogenen Inhibitor von p53, dem sog. „Wächter des Genoms“. Dadurch wirkt

PP2C $\beta$  stabilisierend und aktivierend auf das Tumorsuppressorprotein p53 und zeigt selbst tumorsupprimierende Funktionen (Lammers und Lavi 2007). Wie schon erwähnt wirken bestimmte ungesättigte Fettsäuren, u.a. die Oleinsäure, aktivierend auf die PP2C $\beta$ . Dies kann in Folge Apoptose in verschiedenen Zelltypen wie Neuronen oder Endothelzellen induzieren. Der Tod von Endothelzellen durch freigesetzte Fettsäuren aus Lipoproteinen ist ein initialer Schritt der Atherogenese. Damit scheinen PP2C $\beta$  und ebenso PP2C $\alpha$  eine Rolle in der Entstehung der Atherosklerose zu spielen (Klumpp et al. 2006).

Die PP2C $\alpha$  ist ebenfalls ein Isoenzym der PP2C. Sie ist in beinahe allen Geweben zu finden. Lokalisiert in Zytoplasma und Zellkern zeigt sie eine breite Substratspezifität. Sie reguliert ebenfalls die zelluläre Antwort auf Stress-Signale, u.a. indem sie die AMP-abhängige Kinase inaktiviert. Diese ist ein zentrales Element einer Proteinkinasekaskade, die durch Stress wie ATP-Mangel, Hypoxie oder Hitzeschock aktiviert wird. Über diese AMPK reguliert PP2C $\alpha$  die Fettsäure- und Sterolsynthese bei zellulärem Stress und ist wichtig für die Homöostase von Herzgewebe. Über eine Hemmung des TGF $\beta$ -Signalweges wirkt die PP2C $\alpha$  wachstumshindernd und tumorsuppressiv. Ebenso wie die PP2C $\beta$  beeinflusst sie zwei stressaktivierte MAP-Kinase-Signalwege und hemmt damit einen weiteren Weg der zellulären Stress-Signaltransduktion. Ihr Einfluss auf die Zellzykluskontrolle über CDKs sowie die Unterstützung von P53 ist vergleichbar mit der  $\beta$ -Isoform (Lammers und Lavi 2007).

PP2C $\gamma$  ist beim Menschen ubiquitär exprimiert, die meisten Transkripte findet man in Hoden, Herz und Skelettmuskel. Sie hat eine stark saure Domäne (viele Aspartat- und Glutamatreste) (Travis und Welsh 1997) und ist wichtig für die Formation der Spliceosomen und das Prä-mRNA-Splicing (Lammers und Lavi 2007).

Die  $\delta$ -Isoform der PP2C, auch Wip1 genannt, die ubiquitär exprimiert wird und im Zellkern zu finden ist, wird durch Stress-Signale und v.a. durch p53 verstärkt exprimiert. Auch sie ist in verschiedenen o.g. Signaltransduktionswegen involviert. (Tagad et al. 2018). Besonders ist, dass PP2C $\delta$  eine onkogene Wirkung besitzt, u.a. indem sie p53 - im Gegensatz zu PP2C $\alpha$  und - $\beta$  - unterdrückt. Ein Mangel an PP2C $\delta$  führt zu einer verstärkten p53-Aktivierung und damit zu einer Hemmung der Tumorgenese. Dabei führt eine Überexpression der PP2C $\delta$  in Mäusen nicht zu einer spontanen Tumorerneuerung. Sie erweitert jedoch die Möglichkeiten für die Tumorentwicklung. Zudem wurde gezeigt, dass PP2C $\delta$  in verschiedenen Tumorgeweben verstärkt exprimiert ist (Lammers und Lavi 2007). Weiterhin reguliert PP2C $\delta$  die Immunantwort und ist an Alterungsprozessen und Neurogenese beteiligt (Shen et al. 2017).

Die Isoform PP2C $\epsilon$  wird in verschiedenen Geweben exprimiert und ist verstärkt in Herz, Plazenta, Lunge, Niere und Pankreas zu finden (Jin et al. 2004). Sie ist ein Transmembranprotein des endoplasmatischen Retikulums, dessen katalytisches Zentrum dem Zytoplasma zugewandt ist. Ihre Funktion besteht ebenfalls in der Herabregulierung stressaktivierter Signaltransduktionswege, sie scheint jedoch auch am Ceramidtransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat beteiligt zu sein (Saito et al. 2008).

Weitere bekannte Formen sind u.a. die PP2C $\zeta$ , PP2C $\eta$ , PP2C $\kappa$  sowie die PHLPP, ein Protein mit einer PP2C-ähnlichen Domäne. Einige Unterformen sind speziell in den Mitochondrien zu finden, z.B. die PP2C $m$ , und beeinflussen dort die Phosphorylierung von Matrixproteinen und die Aktivität mitochondrialer Vorgänge (Guo et al. 2017). Damit scheinen sie an der Regulation des Metabolismus und des Energiehaushaltes der Zellen beteiligt zu sein.

Trotz einiger dargestellter Einwirkungen auf verschiedene zelluläre Vorgänge ist bisher jedoch nur ein Ausschnitt aus den möglichen Funktionen und Eigenschaften der PP2C und ihrer Isoformen bekannt.

### 1.5 Bedeutung der PP2C für die Herzfunktion

Die oben beschriebenen zellulären Mechanismen, die durch die PP2C beeinflusst werden, zeigen eine ubiquitäre Bedeutung für vermutlich jede Zelle. Es gibt jedoch auch Studien, die Hinweise für ihren Einfluss speziell auf die Herzfunktion liefern. So führt ein genetisches Ausschalten der mitochondrialen PP2C in Zebrafischen zu einer veränderten Herzentwicklung sowie zu einer Herzinsuffizienz, die mit einer induzierten Apoptose assoziiert ist (Lu et al. 2007). Ein Mangel an PP2C scheint also mit einer kardialen Dysfunktion assoziiert zu sein.

Eine erhöhte Expression von PP2C war hingegen in Herzen adipöser Mäuse zu finden. Dabei wurde eine Assoziation mit Lipotoxizität und der Entwicklung von Kardiomyopathien beobachtet (Wang und Unger 2005). Zudem wurden in Herzen trainierter Mäuse u.a. verringerte PP2C-Spiegel - bei gleichzeitig vermehrt phosphorylierter, also aktiver AMPK - gefunden. Nach einem 30-minütigen Koronarverschluss zeigten diese Mäuse mit verringerten PP2C-Konzentrationen deutlich kleinere Infarktnarben. Die Autoren führten dies auf die negative Regulation kardioprotektiver Signalwege durch die PP2C zurück (Pons et al. 2013). Diese Ergebnisse liefern Hinweise, dass auch ein Überangebot dieser Proteinphosphatase mit einer Beeinträchtigung der Herzfunktion assoziiert sein könnte.

Um dies weiter zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell mit kardialer Überexpression der PP2C generiert. Diese führte zu kardialer Hypertrophie, verminderter Auswurfleistung und Kontraktilität, sowie zu einer ventrikulären Dilatation (Bollmann et al. 2016). Die molekularen Signalwege, die dieser Wirkung zugrunde liegen, sind bisher jedoch unklar.

Bekannt war, dass PP2C an der Dephosphorylierung von Phospholamban beteiligt ist (MacDougall et al. 1991). Dieses Protein hemmt in seiner dephosphorylierten Form die SERCA, also den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), wodurch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen weniger schnell in das SR transportiert werden können und somit eine Relaxation des Herzmuskels gehemmt wird (negative Lusitropie) (Frank und Kranias 2000).

Beim Kontraktionsvorgang im Kardiomyozyten sind jedoch weitere Phosphorylierungen von Bedeutung, die u.a. von der Proteinkinase A (PKA) katalysiert werden. Die spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanäle, die den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellularraum ermöglichen, haben in phosphorylierter Form eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit. Durch den Einstrom der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kommt es zur Aktivierung des Ryanodinrezeptors (RyR), welcher dann weiteres Calcium aus dem SR freisetzt (sog. CICR) (Eisner 2014). Auch der RyR ermöglicht in phosphorylierter Form einen erhöhten Ionenstrom und damit eine Steigerung der Maximalkraft sowie eine Beschleunigung des Kraftanstiegs (positive Inotropie) (Andersson et al. 2012). Steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle, binden vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an das mit dem Aktinfilament assoziierte Regulatorprotein Troponin C. Durch Wechselwirkungen mit dem angelagerten Tropomyosin werden daraufhin Bindungsstellen für die Myosinköpfe freigegeben und eine Kontraktion wird ermöglicht. Wird dabei das Regulatorprotein Troponin I phosphoryliert, so kommt es zu einer beschleunigten Abdissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vom TnC (Zhang et al. 1995). Die Erschlaffung erfolgt schneller (positive Lusitropie). Außerdem braucht es höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, um die halbmaximale Kraft zu erreichen (im Sinne einer Desensitivierung). Eine Sensitivierung ist wiederum durch Phosphorylierung der regulatorischen leichten Myosinkette über die  $\beta$ 1-Adrenozeptor-vermittelte Phosphorylierung der MLCK möglich (Pape et al. 2019).

Hier wird deutlich, wie ein komplexes System an Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen die Kontraktionen der Herzmuskelzellen reguliert. Die PP2C scheint an einigen Dephosphorylierungen im Kardiomyozyten beteiligt zu sein und damit unterschiedlichste Wirkungen z.B. auf Kontraktionskraft, Kontraktionsgeschwindigkeit oder Relaxation zu haben (siehe Abb. 1).

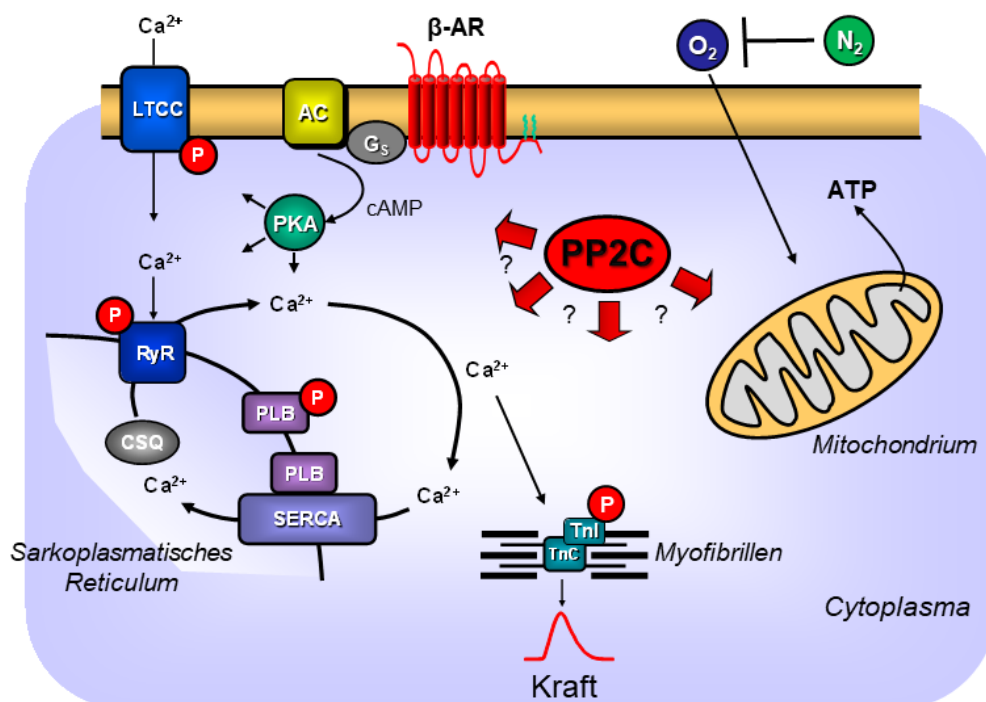


Abbildung 1:  
Schema der möglichen PP2C-Funktion im Kardiomyozyten.

Dargestellt sind unterschiedlichste Proteine, die u.a. durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden und damit ihre Aktivität erhöhen. Welche Moleküle von der PP2C dephosphoryliert werden, ist bisher nicht abschließend geklärt. LTCC, L-Typ-Calciumkanal; AC, Adenylcyclase;  $\beta$ -AR,  $\beta$ -adrenerger Rezeptor; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; RyR, Ryanodinrezeptor; PLB, Phospholamban; CSQ, Calsequestrin; SERCA, Sarkoplasmatisches/Endoplasmatisches-Retikulum-Calcium-ATPase; TnI, Troponin I; TnC, Troponin C.

### 1.6 Hypoxie und Präkonditionierung im Herzen

In den durchgeführten Experimenten wurde der Einfluss der PP2C nicht nur unter physiologischen, sondern auch unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Eine Hypoxie ist gekennzeichnet durch ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im Gewebe. Ursachen für eine kardiale Hypoxie umfassen u.a. koronare Ischämien und Kreislaufstillstände, bei denen zu wenig Blut das Herzgewebe erreicht, pulmonale Erkrankungen, Aspirationen oder Embolien, die die Oxygenierung des Blutes in der Lunge beeinträchtigen, oder auch Anämien, in deren Folge die Erythrozyten zu wenig Sauerstoff zum Myokard transportieren können. Dabei sind ischämische myokardiale Hypoxien im Gegensatz zu arteriellen Hypoxien i.d.R. lokalisiert anzutreffen. Auch ist zu beachten, dass sich der zelluläre Metabolismus zwischen ischämischem Myokard und perfundiertem hypoxischem Myokard unterscheidet. Die Ischämie als Minderdurchblutung bzw. Durchblutungsausfall stellt

damit eine relevante Ursache der Hypoxie im Allgemeinen dar. Hierbei kommt neben dem Sauerstoffmangel noch ein fehlender Abtransport von Abbauprodukten metabolischer Vorgänge hinzu (Ošťádal und Kolář 2011).

Die Effekte des Sauerstoffmangels beginnen mit einem Abfall des ATP-Spiegels durch den verminderten aeroben Stoffwechsel. Der Energiemangel bewirkt eine verstärkte Glucoseaufnahme und anaerobe Glykolyse. Das entstehende Pyruvat wird hauptsächlich in Lactat und Alanin umgewandelt. Wenn keine Ischämie besteht und die Abbauprodukte abtransportiert werden können, so kann die anaerobe Glykolyse länger aufrechterhalten werden und es entsteht weniger intrazelluläre Azidose. Zudem nehmen die Mitochondrien weniger Schaden und die ATP-Synthese erholt sich schneller nach nichtischämischer Hypoxie als nach Ischämie (Davies und Wedzicha 1993). Bleibt der ATP-Mangel bestehen, können weniger Aktin-Myosin-Interaktionen stattfinden und die Ionenpumpen können die notwendigen Konzentrationsgradienten nicht mehr aufrechterhalten. Die Kontraktionen der Kardiomyozyten werden schwächer und kommen im Verlauf zum Erliegen. Bei langanhaltendem Sauerstoffmangel kommt es auch zum Zelluntergang. In den durchgeführten Experimenten sollte dies mit einer begrenzten Hypoxiezeit jedoch vermieden werden.

Das Versagen der Kontraktionen durch den Sauerstoffmangel führt auch zur Ausbildung myokardialer Kontrakturen und ist ein wichtiger pathophysiologischer Mechanismus im hypoxischen bzw. ischämischen Myokard. (Ventura-Clapier et al. 1994).

Die Ausbildung von Kontrakturen unter Hypoxie wird durch den ATP-Mangel bewirkt und ist u.a. abhängig vom pH-Wert (Izumi et al. 1981). Es kommt zur Ansammlung von ADP, welches mit stetigem Verbrauch von Phosphokreatin nicht mehr ausreichend durch die Kreatinkinase rephosphoryliert werden kann. Dies bewirkt eine Zunahme der Anspannung der Myofibrillen und im Verlauf die Ausbildung hypoxischer Kontrakturen im Myokard (Veksler et al. 1997).

Um sich vor weiteren Sauerstoffmangelzuständen zu schützen, gibt es verschiedene kardioprotektive Mechanismen im Herzen. Einer davon ist die sog. „Präkonditionierung“. Dabei kommt es nach kurzen ischämischen Episoden zu einer kurzfristigen Anpassung des Myokards, die bei einer weiteren Ischämie Infarktgröße, postischämische kontraktile Dysfunktionen und Arrhythmien verringert (Heusch und Rassaf 2016). Die molekularen Mechanismen, die dazu führen, sind noch nicht vollständig untersucht. Die Signalwege der Präkonditionierung involvieren z.B. die Freisetzung von Adenosin, die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sowie verschiedene Proteinkinasen. Am Ende der Signalkaskaden steht die Aktivierung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle in den Mitochondrien und die Generierung freier Radikale (Heusch und Rassaf 2016; Ošťádal und Kolář 1999). Eine pharmakologische Öffnung dieser Kanäle bewirkt eine



Kardioprotektion, ihre Blockierung verhindert die Schutzwirkung ischämischer Präkonditionierungen (Garlid et al. 2003; Jabůrek et al. 1998). Mehrere Proteinkinasen scheinen in der Signaltransduktion involviert zu sein. Darunter sind z.B. die Proteinkinase C, die PI3K und die Proteinkinase B (Vigneron et al. 2011). Die Phosphorylierung ist also auch in dieser Signalkaskade ein wichtiger Mediator. Deshalb liegt es nahe, dass auch Proteinphosphatasen an der Regulation der kardioprotektiven Wirkungen durch Präkonditionierung beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit auch Experimente mit Präkonditionierungen durchgeführt.

### 1.7 Transgenes Mausmodell

Für die Untersuchung der PP2C wurde eine transgene Maus generiert, die diese Phosphatase herzspezifisch überexprimiert (Bollmann et al. 2020). Durch dieses Modell ist es möglich, die Auswirkungen der Überexpression *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen und dabei weitgehend intakte Vorhofpräparate mit funktionierenden Sinusknoten zu nutzen. Dabei können Herzfrequenz und Kontraktionen unter basalen Bedingungen sowie unter induzierter Hypoxie beurteilt werden. Die Isolierung der Vorhöfe erlaubt eine unkomplizierte Veränderung der Sauerstoffzufuhr sowie standardisierte Versuchsbedingungen unter kontinuierlicher Aufzeichnung der Kontraktionen.

Ein Vorteil des Mausmodells gegenüber z.B. menschlichen Herzmuskelpräparaten ist der Ausschluss von Vormedikationen und Vorerkrankungen, die das Myokard beeinflussen können. Die Wildtyp-Geschwistertiere bilden eine geeignete Kontrollgruppe, da hier eine normale PP2C $\beta$ -Expression vorherrscht. Mäuse sind zudem als Versuchstiere verbreitet etabliert und ermöglichen eine vergleichbar unkomplizierte Haltung.

Die kardiomyozytenspezifische Überexpression soll sicherstellen, dass ausschließlich der Einfluss auf die Herzfunktion untersucht wird und systemische Wirkungen die Ergebnisse nicht beeinflussen.

Zusammenfassend stellen die PP2C $\beta$ -überexprimierenden Mäuse ein gutes Modell dar, um den Einfluss dieser Proteinphosphatase auf die Vorhoffunktionen zu untersuchen.

## 2 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung des Einflusses einer erhöhten PP2C $\beta$ -Expression auf die Funktion von Vorhofpräparaten der Maus unter physiologischen sowie unter hypoxischen Bedingungen. Folgende Punkte sollten dabei genauer betrachtet werden:

- Wie verändert PP2C $\beta$  die Vorhofkontraktionen unter physiologischen Bedingungen?
- Welchen Einfluss hat PP2C $\beta$  auf die Vorhofpräparate unter Hypoxie und während der Reoxygenierung?
- In welchem Ausmaß beeinflusst PP2C $\beta$  die Reaktion auf eine Hypoxie nach einer vorhergehenden Präkonditionierung?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Eigenschaften und Haltung der Mäuse

Für die Experimente wurden Mäuse der Linie CD1 verwendet. Das Durchschnittsgewicht der 62 Versuchstiere betrug  $33,4 \pm 0,6$  Gramm, das Durchschnittsalter am Versuchstag 214 Tage. Es wurden männliche und weibliche Tiere in gleicher Anzahl verwendet (jeweils 31 Tiere). Beide Geschlechter wurden getrennt voneinander gehalten und nur über Nacht zur Verpaarung zusammengesetzt. Sie wurden mit handelsüblichem Labortierfutter und Leitungswasser *ad libitum* versorgt. Die Haltung und Zucht der Mäuse wurde durch die Core-Facility Tierhaltung des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gewährleistet.

#### 3.2 PP2C $\beta$ -überexprimierende transgene Mäuse

In den Experimenten kam eine transgene Mauslinie zum Einsatz, die die Proteinphosphatase 2C $\beta$  des Rindes herzspezifisch überexprimiert (Bollmann et al. 2020). Die cDNA für die Rinder-PP2C $\beta$  (GenBank: AJ005458.1) wurde freundlicherweise von der verstorbenen Professorin Dr. Susanne Klumpp (Münster, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die cDNA wurde dann in eine Expressionskassette eingefügt, welche den Promotor der  $\alpha$ -Isoform der schweren Kette des Myosins ( $\alpha$ -MHC) enthielt. Dadurch stand die Überexpression unter Kontrolle dieses gewebspezifischen Promotors. Zudem enthielt die Expressionskassette eine Simian-Virus-40-Poly-A-Signalsequenz, die die Transkription terminierte. Abbildung 2 zeigt ein Schema der Expressionskassette.

Die  $\alpha$ -MHC-PP2C $\beta$ -Expressionskassette wurde daraufhin in befruchtete Eizellen von FVB/N-Mäusen injiziert und die dabei generierten transgenen Tiere in einen CD1-Hintergrund eingekreuzt. Als Kontrollen dienten in den Versuchsreihen jeweils gleichaltrige Wildtyp-Geschwistertiere (Sambrook und Russell 2001; Bollmann et al. 2020).

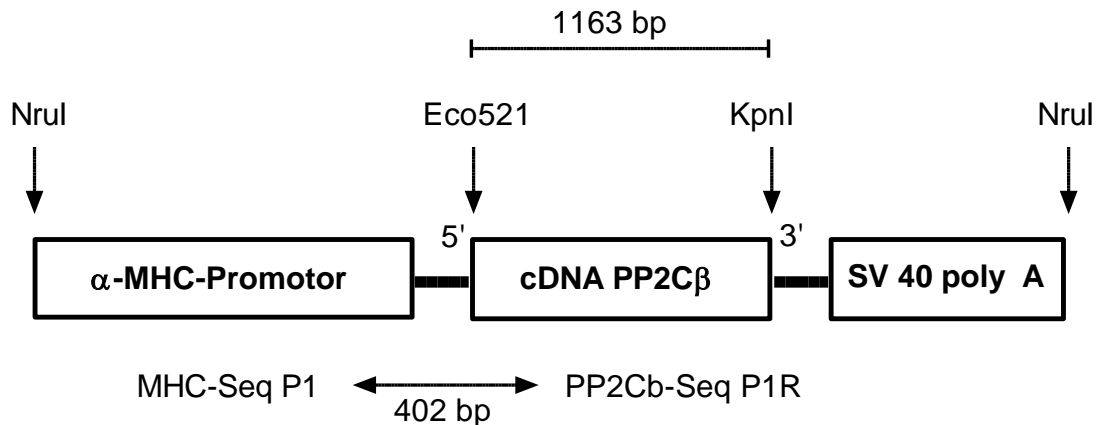


Abbildung 2:  
Schematische Darstellung der  $\alpha$ -MHC-PP2C $\beta$ -Expressionskassette

Um transgene Tiere mit einer kardiomyozytenspezifischen Überexpression der bovinen Proteinphosphatase 2C $\beta$  zu generieren, wurde die  $\alpha$ -MHC-Expressionskassette in befruchtete Eizellen von Mäusen injiziert. Durch die Restriktionsendonukleasen Eco521 und KpnI wurde zuvor die kodierende Sequenz der PP2C $\beta$  ausgeschnitten und in die Expressionskassette eingefügt. Die kodierende Sequenz enthielt 1163 Basenpaare (bp). Die Transkription der Sequenz stand unter gewebsspezifischer Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promotors und wurde durch eine SV-40-Poly-A-Sequenz terminiert. Mittels spezifischer Primer konnte das Transgen in der murinen DNA nachgewiesen werden. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Größe von 402 bp.

### 3.3 Genotypisierung der Mäuse

#### 3.3.1 Extraktion und Isolation der DNA

Zur Bestimmung des Genotyps wurde jeder Maus im Alter von vier Wochen ein ca. 5 mm langes Stück des Schwanzes abgetrennt. Durch eine spezifische Ohrmarkierung wurde die eindeutige Zuordnung der Tiere gewährleistet. Die Probe wurde in ein Kunststoffgefäß überführt und mit 700  $\mu$ l TE/SDS-Puffer und 30  $\mu$ l Proteinase K (10 mg/ml) versetzt. Über Nacht erfolgte der Verdau des Gewebes bei 55 °C auf einem Thermoschüttler bei 10.000 rpm (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland).

Am darauffolgenden Tag schloss sich zur Trennung der genomischen DNA von Lipiden und Proteinen eine Phenol-Chloroform-Extraktion an (modifiziert nach Sambrook und Russell 2001). Dazu wurde jede Probe mit 700  $\mu$ l Phenol vermischt und anschließend für 5 min bei 14 000 x g zentrifugiert, bis sich eine wässrige obere Phase und eine organische untere Phase bildeten. Die wässrige Oberphase enthielt die DNA, die organische Unterphase enthielt Proteine und andere Verunreinigungen.

Die wässrige Oberphase wurde in ein neues Kunststoff-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 700 µl eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 14 000 x g für 5 min. Anschließend wurde die wässrige obere Phase in ein neues Kunststoff-Reaktionsgefäß überführt und mit 70 µl Natriumacetat (3 Molar) und 700 µl reinem Ethanol versetzt, um die DNA auszufällen und von Phenolresten zu reinigen. Im darauffolgenden Schritt wurde das Gemisch 10 min bei 14 000 x g zentrifugiert, dabei bildete sich ein DNA-haltiges Sediment. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Sediment mit 1 ml 70-prozentigem Ethanol gewaschen und 10 min bei 14 000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend vom überständigen Ethanol befreit, bei Raumtemperatur getrocknet, in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und abschließend bei 65 °C für 15 min inkubiert. Bis zur Weiterverwendung erfolgte die Lagerung bei 4 °C über mind. 4 h (Sambrook und Russell 2001).

### 3.3.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Um die Konzentration der gewonnenen DNA zu bestimmen, wurde mit einem Photometer (Eppendorf-BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm ( $E_{260}$ ) gemessen. Beträgt die Schichtdicke der Messküvette 1 cm und wird eine optische Dichte ( $OD_{260}$ ) von 1,0 ermittelt, so enthält die Probe 50 µg/ml doppelsträngige DNA. Mit der Formel  $E_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = X \text{ µg/ml}$  kann man folglich den DNA-Gehalt der Probe berechnen.

Zusätzlich wurde die optische Dichte bei 280 nm gemessen und der Quotient aus der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm bestimmt. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 gilt hierbei als Hinweis für ein weitgehendes Fehlen von Proteinen und Verunreinigungen (Sambrook und Russell 2001).

### 3.3.3 PCR-Amplifikation der DNA

Zur Vervielfältigung des gesuchten DNA-Fragmentes wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die extrahierte DNA mit einem speziellen Reaktionsansatz in einem Kunststoff-Reaktionsgefäß inkubiert. Dabei wurde jeder Probe ein Reaktionspuffer mit 1,5 mM Magnesiumchlorid, 200 µM dNTP-Mix, 1 µM Forward-Primer, 1 µM Reverse-Primer und 2,5 U einer thermostabilen Taq-DNA-Polymerase (Details siehe Anhang) zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde mit DEPC-Wasser auf 50 µl Gesamtmenge aufgefüllt und die Reaktion in einem PCR-Gerät

(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 402 bp (Sambrook und Russell 2001).

### 3.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die Beurteilung von PCR-Produkten in der Agarosegelelektrophorese beruht auf dem Prinzip, nach welchem kleine Moleküle im elektrischen Feld schneller wandern als große. Um die Länge der DNA-Fragmente zu beurteilen, wurden die Proben im Anschluss an die PCR mit 8 µl Ladepuffer versehen und auf ein Agarosegel (1%) mit DNA-Farbstoff (SafeRed) aufgetragen. Zusätzlich wurden ein Marker, sowie eine Positiv- und Negativkontrolle aufgetragen. Bei einer Spannung von 80 mV betrug die Laufzeit der Proben etwa 45 Minuten. Die DNA-Banden konnten durch den hinzugefügten interkalierenden Farbstoff sichtbar gemacht werden (Sambrook und Russell 2001).

## 3.4 Kontraktionsversuche

### 3.4.1 Vorbereitung des Organbades

Vor jedem Versuch erfolgte die Herstellung einer Tyrode-Lösung aus vorbereiteten Stammlösungen. Dabei handelt es sich um eine Lösung aus Elektrolyten und Glukose in Wasser, die ein physiologisches Milieu für die isolierten Vorhofpräparate schaffen soll. Sie setzte sich aus 40 ml Stammlösung I, 38 ml Stammlösung II und 20 ml Stammlösung III zusammen (Bestandteile siehe Anhang). Dieses Gemisch wurde dann mit *aqua bidestillata* auf ein Gesamtvolumen von 1 l aufgefüllt. Auf eine 30-minütige Begasung mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) folgte die Zugabe von 0,8 ml Calciumchlorid-Lösung (33,2 g CaCl<sub>2</sub>/100 ml H<sub>2</sub>O), 1 g Glucose, 19 mg Na<sub>2</sub>EDTA und 49,3 mg Ascorbinsäure. Dabei betrug die Endkonzentration von CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM (weitere Endkonzentrationen der Tyrode siehe Anhang). Die Tyrode wurde kontinuierlich mit Carbogen begast. Dieses Gasmisch enthält neben Sauerstoff auch 5% Kohlenstoffdioxid, damit über die in der Tyrode enthaltenen Puffersubstanzen eine Stabilisierung des pH-Wertes ermöglicht wird. Zudem wurde das Organbad während des gesamten Versuches auf 37 °C temperiert (Bollmann et al. 2020).

### 3.4.2. Aufbau und Vorbereitung der Messanlage

Der Aufbau der Messanlage für isometrische Kontraktionen ist in Abbildung 3 dargestellt. Hierbei handelt es sich um Hohlzylinder, die 10 ml Flüssigkeit (Tyrode-Lösung) für das Organbad aufnehmen konnten. Am unteren Rand der Zylinder erfolgte - räumlich getrennt vom Präparat, damit die Gasbläschen die Aufzeichnung nicht störten - die Gaszufuhr mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) bzw. Stickstoff für hypoxische Bedingungen (95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) über eine angeschlossene Gasleitung. Der doppelwandige Aufbau der Zylinder ermöglichte gemeinsam mit einer Pumpe die kontinuierliche Erwärmung der Anlage über ein Wasserbad auf 37°C.

Im Organbad befanden sich an einer Kunststoffstange befestigte Reizelektroden für eine Feldstimulation sowie ein Haken für die Präparataufhängung. An diesem Haken wurde der jeweils untere Pol des Präparates eingehängt. Der obere Pol wurde an einem zweiten, längeren Metallhaken befestigt, der an einem isometrischen Kraftsensor angeschlossen war. Dieser Kraftsensor wurde über einen Brückenverstärker an ein PowerLab®-Datenerfassungssystem angeschlossen, welches eine kontinuierliche digitale Aufzeichnung der entwickelten Kraft der Präparate ermöglichte. Auf dem angeschlossenen Desktop-PC fand durch die entsprechende Software für jeden Zeitpunkt der Aufzeichnung die Darstellung der Daten statt.

Für die Präparate der linken Vorhöfe wurde durch ein Reizgerät über die Reizelektroden ein elektrischer Rechteckimpuls von 5 ms Dauer mit der Frequenz von 1 Hz abgegeben, um diese zur Kontraktion anzuregen. Die Spannung lag ca. 10% über der Reizschwelle. An den linken Vorhofpräparaten wurde die entwickelte Kraft gemessen und ausgewertet. Die Präparate der rechten Vorhöfe kontrahierten bei intaktem Reizleitungssystem spontan. Hier stand die Messung der spontanen Schlagfrequenz im Vordergrund.

Zur Kalibrierung der Messanlage wurde zunächst für alle Kanäle ein Nullpunkt festgelegt. Mit einem 500 mg schweren Drahring wurde dann eine Kraft von 5 mN erzeugt und die Empfindlichkeit der Sensoren diesbezüglich korrigiert. Nachfolgend konnte die Zugkraft der Muskelpräparate mit der Kalibrierung auf den Drahring korreliert werden.

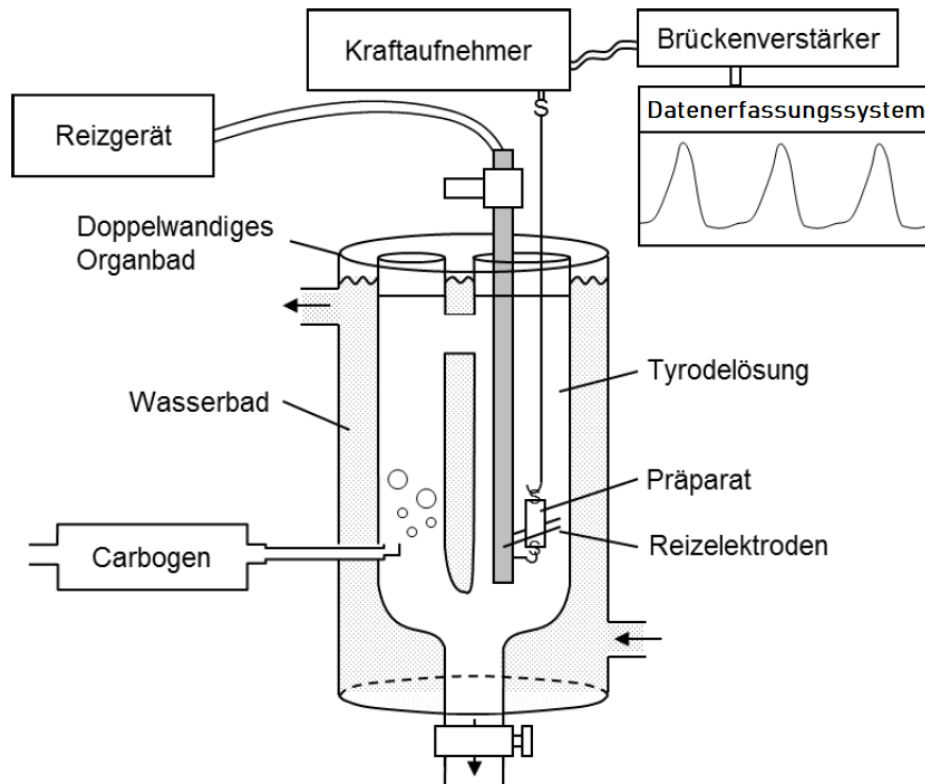


Abbildung 3:  
Schematischer Aufbau der Messapparatur für die isometrische Kontraktionsmessung

Zu erkennen sind der doppelwandige Hohlzylinder mit Organbad, die Gaszufuhr (hier Carbogen), die Reizelektroden, zwischen denen sich die Präparataufhängung befindet, der Kraftaufnehmer, der Brückenverstärker und das Datenerfassungssystem. Modifiziert nach Frenker (2013).

### 3.4.3 Narkose und Organentnahme

Bis zu Versuchsbeginn hatten die Tiere Zugang zu Wasser und Trockenfutter. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde ihr Gewicht bestimmt.

Für die Narkose der Mäuse wurden ihnen 50-75 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital gespritzt. Die möglichst tiefe Narkose sollte eine schmerzbedingte Katecholaminausschüttung während des Eingriffs vermeiden. Ein Atemstillstand musste jedoch unbedingt vermieden werden, um die Sauerstoffversorgung der Herzen nicht zu gefährden. Außerdem wurden den Versuchstieren 500 IE Heparin intraperitoneal injiziert, um eine Thrombusbildung während der Präparation zu verhindern.

Nach Eintritt der Bewusstlosigkeit der Versuchstiere wurden sie zunächst auf eine Petrischale gelegt. Auf die Kontrolle des Bewusstseinsverlustes folgte die Fixierung der Extremitäten. Erst bei vollkommen fehlender Reaktion auf äußere Schmerzreize wurde



der erste Schnitt gesetzt. Dabei wurde nach vorsichtigem Entfernen des Bauchfells mit einem Schnitt das Peritoneum eröffnet. Von dort ausgehend erfolgte auf beiden Seiten die laterale Durchtrennung der ventralen Brustwand. Nach dem vorsichtigen Einschneiden des Zwerchfells konnte mit Hilfe einer Klemme die vordere Brustwand mitsamt Sternum und Rippen nach oben umgeschlagen werden. Dies ermöglichte freie Sicht auf Herz und Lunge. Das Perikard wurde behutsam entfernt und das Herz mit einer geschwungenen Pinzette an der Herzbasis mobilisiert und leicht angehoben. Die herznahen Gefäße und weitere bindegewebige Strukturen wurden mit einem letzten Schnitt durchtrennt und das schlagende Herz umgehend in ein mit raumtemperierter Tyrode gefülltes Gefäß transferiert. Intrakardiale Blutreste wurden durch vorsichtige seitliche Kompression des schlagenden Herzens entfernt.

Zuletzt erfolgte eine weitere Entnahme einer Probe vom Schwanz der Versuchstiere, um ggf. eine erneute Genotypisierung zu ermöglichen.

#### 3.4.4 Präparation der Herzvorhöfe

Nach Entnahme wurden die schlagenden Herzen unverzüglich in eine Präparierschale überführt, welche mit Tyrode gefüllt war und mit Carbogen begast wurde. Zunächst wurde das Herz an der Herzspitze mit einer Nadel fixiert und der linke Vorhof exziiert. Zwei kleine Metallhaken wurden durch das Gewebe am oberen und unteren Pol des Präparates geführt und an den vorgesehenen Aufhängungen im Organbad (siehe Punkt 3.4.2) angebracht. Nach einer angemessenen Vorspannung des Herzmuskelpräparates wurde die Reizung über die beiden Elektroden eingeleitet und ein Mechanogramm der Kontraktionen aufgezeichnet. Innerhalb der ersten 30 Minuten erfolgte ein dreimaliges Wechseln der Tyrode. Die entwickelte Kraft stellte sich im Verlauf auf einen stabilen Wert ein. Meist war ein mehrmaliges Nachspannen der Präparate nötig. Die Vorspannung der Präparate wurde so lange schrittweise gesteigert, bis dies keine Erhöhung der Kontraktionskräfte mehr bewirkte.

Zur Präparation der rechten Herzvorhöfe mussten zunächst etwaige Reste der Lungen und der herznahen Gefäße entfernt werden. Bei der Exzision des rechten Vorhofs war besondere Sorgfalt nötig, um die Zellen des Sinusknotens und des Reizleitungssystems zu schonen und Arrhythmien vorzubeugen. Da sich der Sinusknoten im Bereich der Mündung der V. cava superior befindet, erfolgte die Insertion zweier Metallhaken an zwei gegenüberliegenden Polen senkrecht zu dieser Mündung. Die Aufhängung im Organbad erfolgte unverzüglich und nach leichtem Vorspannen wurden die spontanen Muskelkontraktionen aufgezeichnet und die Schlagfrequenz ermittelt. Hierbei galt es, auf mögliche Arrhythmien zu achten. Auch hier erfolgten in der ersten halben Stunde ein

dreimaliger Tyrodewechsel und eine Optimierung der Vorspannung. Wurden Arrhythmien beobachtet und blieben diese auch nach den Maßnahmen in der ersten halben Stunde bestehen, so wurde dies auf eine Schädigung bei der Präparation zurückgeführt und das Präparat nicht weiterverwendet.

#### 3.4.5 Versuchsdurchführung

Der Versuchsbeginn war für alle Präparate gleich. Nach dem Einhängen der Präparate erfolgte eine 30-minütige Äquilibrationsphase. In dieser fanden im Abstand von etwa 10 Minuten ein Wechsel der Tyrode statt. Außerdem wurde die Vorspannung der Präparate regelmäßig kontrolliert und korrigiert, um eine optimale und stabile Kraftentwicklung zu erreichen. Die aufgezeichneten Daten zum Ende der Äquilibrationsphase wurden jeweils als Ausgangszustand der Präparate gewertet. Danach begann der eigentliche Versuch, der sich in den vier großen Versuchsgruppen in seinem Ablauf unterschied. Diese Abläufe sind in Abb. 4 dargestellt. In jeder Versuchsreihe wurden die gleiche Anzahl an WT und TG sowie ein ausgeglichenes Verhältnis von männlichen und weiblichen Tieren eingeschlossen. Am Ende aller Versuche wurden die Vorhofpräparate aus dem Organbad entnommen, vorsichtig abgetupft und für biochemische Analysen in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und bei -80°C gelagert.

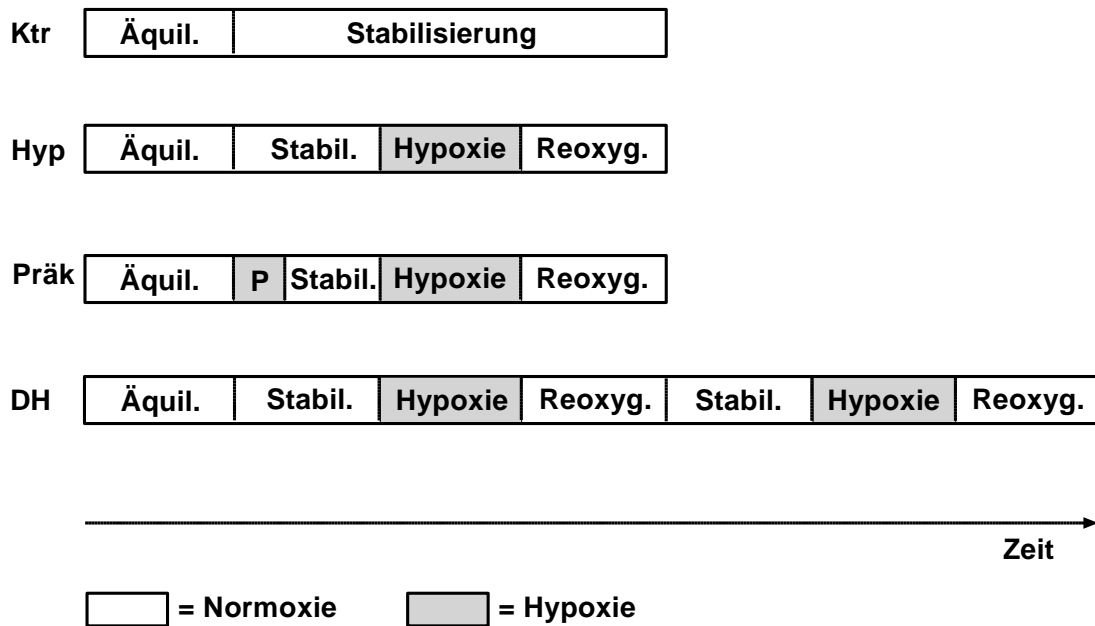


Abb. 4:  
Schematische Darstellung der einzelnen Versuchsprotokolle

Begonnen wurde stets mit einer halbstündigen Äquilibrationsphase. Der Versuchsablauf danach war für jedes Versuchsprotokoll verschieden. Die einzelnen Phasen unterschieden sich vor allem in der Auswahl des Gases, das dem Organbad zugeführt wurde. Dabei entsprach Carbogen (weiß hinterlegt) einem normoxischen Zustand, Stickstoff (grau hinterlegt) dagegen einem hypoxischen Zustand. Jede Versuchsreihe wurde zu gleichen Teilen mit TG und mit WT durchgeführt. Äquil., Äquilibration; Reoxyg., Reoxygenierung; Ktr, Kontrolle; Hyp, einfache Hypoxie; P, Präk, Präkonditionierung; DH, doppelte Hypoxie.

**Ktr:** In dieser Versuchsreihe wurde an die Äquilibration eine 90-minütige Stabilisierungsphase angeschlossen. Bei dieser Zeitkontrolle sollte das Verhalten der Präparate bei durchgängig physiologischen Bedingungen festgehalten werden, um den Einfluss der Zeit auf die Daten beurteilen zu können. In den 90 Minuten nach der Äquilibration fand kein Badwechsel mehr statt, lediglich die Aufrechterhaltung des Sauerstoffangebotes und der physiologischen Temperaturverhältnisse.

**Hyp:** In der zweiten Versuchsreihe wurde eine einfache Hypoxie durchgeführt. Nach einer halbstündigen Stabilisierungsphase wurde die Carbogenzufuhr beendet und das Organbad mit Stickstoff begast, um den Sauerstoff aus der Tyrode zu entfernen. Dies sollte eine 30-minütige Hypoxie des Gewebes simulieren, um die Reaktion der Präparate auf den Sauerstoffmangel zu beleuchten. Im Anschluss erfolgte eine Reoxygenierung, also eine erneute Begasung mit Carbogen für weitere 30 Minuten. Hier sollte beobachtet

werden, in welchem Umfang sich die Vorhofpräparate von der Hypoxie erholen konnten und welchen Einfluss diese auf die regenerierten Kontraktionen hatte.

**Präk:** Diese dritte Versuchsreihe begann gleich nach der Äquilibrationsphase mit einer 10-minütigen Präkonditionierung der Präparate, also eine kurz andauernde Hypoxie mittels Stickstoffbegasung. Nach diesem kurzen Sauerstoffmangel erfolgte eine 20-minütige Stabilisierung gefolgt von einer regulären 30-minütigen Hypoxie. Nachfolgend fand wieder eine halbstündige Reoxygenierung statt. Ziel dieses Versuchsprotokolls war die Untersuchung des Einflusses einer kurzen vorgeschalteten Hypoxie auf die Präparataktivität während der längeren Hypoxie sowie auf die Erholungsvorgänge während der Reoxygenierung.

**DH:** Die letzte Versuchsreihe bestand aus einer doppelten Hypoxie. Das bedeutete, dass sich an den oben erwähnten Ablauf der einfachen Hypoxie nochmals eine weitere Stabilisierung, eine weitere Hypoxie und eine weitere Reoxygenierung anschlossen, wobei jede der Phasen erneut 30 Minuten andauerten. Hierbei wurde das Verhalten der Präparate bei einer zweiten hypoxischen Episode untersucht und Vergleiche zwischen den einzelnen Phasen der ersten und zweiten Hypoxie angestellt.

#### 3.4.6 Aufzeichnung der Mechanogramme

Die Erfassung der entwickelten Kraft der Präparate erfolgte mit Hilfe eines PowerLab®-Datenerfassungssystems (PowerLab 8/35, ADInstruments, Bella Vista, Australia). Die Darstellung der Daten wurde durch die zugehörige LabChart®-Software ermöglicht, die auf einem angeschlossenen Windows-PC installiert war. Jeder einzelne Versuch wurde als Datei festgehalten und konnte mit Hilfe des Programms bezüglich unterschiedlichster Messgrößen ausgewertet werden.

#### 3.5 Statistische Auswertung

Die Angabe der dargestellten Daten erfolgt als arithmetischer Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die Analyse der Daten erfolgte mit dem t-Test nach Student für verbundene und unverbundene Stichproben oder bei mehr als zwei Gruppen mit einer Varianzanalyse (ANOVA) und einem Bonferroni-Posttest. Hierbei galt ein p-Wert kleiner als 0,05 als signifikant. Die Darstellung der Graphen sowie die

einfaktoriellen Varianzanalysen (ANOVA) erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 5.0 für Windows (GraphPad Prism Inc., San Diego, USA).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Um die transgenen Tiere zu identifizieren, wurde zunächst eine Genotypisierung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde mit der aus den Schwanzstücken extrahierten DNA eine PCR durchgeführt (siehe 3.3.1 und 3.3.3). Damit konnte nachgewiesen werden, welche der Tiere das eingefügte Gen für die PP2C $\beta$  in ihrem Genom besitzen. Die Abbildung 5 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer solchen Genotypisierung an mehreren Versuchstieren.

Die Qualität der Proben wurde jeweils vorhergehend beurteilt. Dazu wurde der Quotient aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt. Dieser befand sich bei allen Proben zwischen 1,8 und 2,0. Damit zeigte er einen hohen Reinheitsgrad der isolierten DNA an.

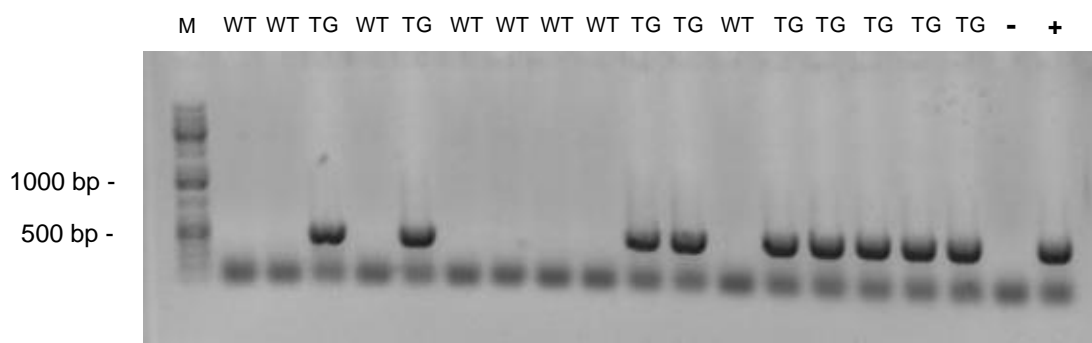


Abb.5:  
Genotypisierung der Versuchstiere durch PCR und Gelelektrophorese

Zu sehen sind die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte. Die amplifizierte DNA-Sequenz besitzt eine Größe von 402 bp. Am Rand lief eine 1kbp-DNA-Leiter zur Beurteilung der Länge der DNA-Fragmente. M, Marker; +, Positivprobe; -, Negativprobe; WT, Wildtyp; TG, transgenes Tier.

### 4.2 Aufzeichnung der Kontraktionsversuche

Wie in 3.4.4 beschrieben wurden die Herzvorhöfe der Versuchstiere präpariert und an Metallhaken in die Messanlage eingehängt. Die Kraft und Frequenz der Kontraktionen der elektrisch gereizten linken sowie der spontan schlagenden rechten Vorhofpräparate wurden von einem Messinterface erfasst und vom dazugehörigen Programm im Zeitverlauf dargestellt.

Während sich die Kontraktionskraft der linken Vorhofpräparate von TG und WT in ihrer Ausgangslage nicht unterschied, zeigte sich bei den rechten Vorhofpräparaten jedoch

ein deutlicher Frequenzunterschied. Die Schlagfrequenz der TG-Präparate war dabei mit  $399 \pm 18$  bpm höher als die der WT-Präparate, die eine Frequenz von  $333 \pm 22$  bpm zeigten ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ). Dieser Unterschied wurde in allen Versuchsreihen zu Versuchsbeginn beobachtet.

In den ersten Experimenten wurde zunächst eine Zeitkontrolle durchgeführt. Hierbei wurden die rechten und linken Vorhofpräparate unter physiologischen Bedingungen (Isolation in Tyrode-Lösung, Erwärmung auf  $37^\circ\text{C}$  über ein Wasserbad, Begasung mit Carbogen) über 90 Minuten beobachtet und ihre Kontraktionen aufgezeichnet. Während dieser Zeit nahmen die Kontraktionskräfte der Vorhofpräparate langsam, aber stetig ab. In der Zeitkontrolle konnten keinerlei Unterschiede zwischen den linken Vorhofpräparaten von TG und WT festgestellt werden. Anders verhielt es sich mit den rechten Vorhofpräparaten. Die zu Versuchsbeginn beobachtete Differenz der Schlagfrequenzen persistierte auch während des Beobachtungszeitraumes der Zeitkontrolle. Die Frequenzveränderungen der rechten Vorhofpräparate werden gesondert in Punkt 4.8 beschrieben.

Die Abbildungen 6A und 6C zeigen eine Auswahl repräsentativer Mechanogramme rechter und linker Vorhofpräparate der Zeitkontrolle.

Auf die Durchführung der Kontrollversuche folgten die ersten Experimente mit einer induzierten Hypoxie (Abb. 6B). Diese wurde nach einer halbstündigen Stabilisierungsphase durch Begasung der Tyrode-Lösung mit Stickstoff anstelle von Carbogen erreicht. Hier zeigten sich bereits nach wenigen Minuten erste Veränderungen. Die Kontraktionskraft der Vorhofpräparate nahm stetig ab, bis sie nur noch schwach kontrahierten.

Während die linken Vorhofpräparate auch unter Sauerstoffmangel bei elektrischer Stimulation stetig auf sehr niedrigem Niveau weiter schlugen, kamen die Kontraktionen der rechten Vorhofpräparate nach einigen Minuten zum Erliegen.

Ein weiterer Effekt der Hypoxie war die Ausbildung von Kontrakturen. Diese entwickelten sich bei einem Großteil der rechten und linken Vorhofpräparate gegen Ende der 30-minütigen Hypoxiezeit. Sichtbar waren diese an der unvollständigen Entspannung der isolierten Vorhöfe, wodurch die Grundlinie der aufgezeichneten Kraftentwicklung anstieg und die schwachen Restkontraktionen auf einem erhöhten Kraftniveau fortgeführt wurden. Dieses Phänomen wurde bei vielen, jedoch nicht bei allen Präparaten beobachtet.

Nach Ablauf der 30 Minuten wurde die Begasung erneut gewechselt und statt Stickstoff wieder Carbogen in die Tyrode-Lösung der Organbäder eingeleitet. Die Effekte waren hier ebenfalls nach wenigen Minuten sichtbar. Die Kontraktionen der rechten

Vorhofpräparate setzten zunächst unregelmäßig ein, jedoch erreichten sie nach kurzer Zeit wieder einen regelmäßigen Schlagrhythmus. Die Schläge aller Präparate nahmen stetig an Kraft zu und stabilisierten sich schließlich auf einem konstanten Kraftniveau. Dieses war stets geringer als zu Beginn der Versuche. Auch die von einem Teil der Präparate entwickelten Kontrakturen bildeten sich bei Reoxygenierung ganz oder zum größten Teil zurück. Die Grundlinie der aufgezeichneten Kontraktionen im Mechanogramm sank also wieder auf ein Niveau ab, das mit dem prähypoxischen Zustand vergleichbar war.

Jede Reoxygenierungsphase wurde für 30 Minuten aufgezeichnet, bis das Experiment beendet werden konnte (Abb. 6B).



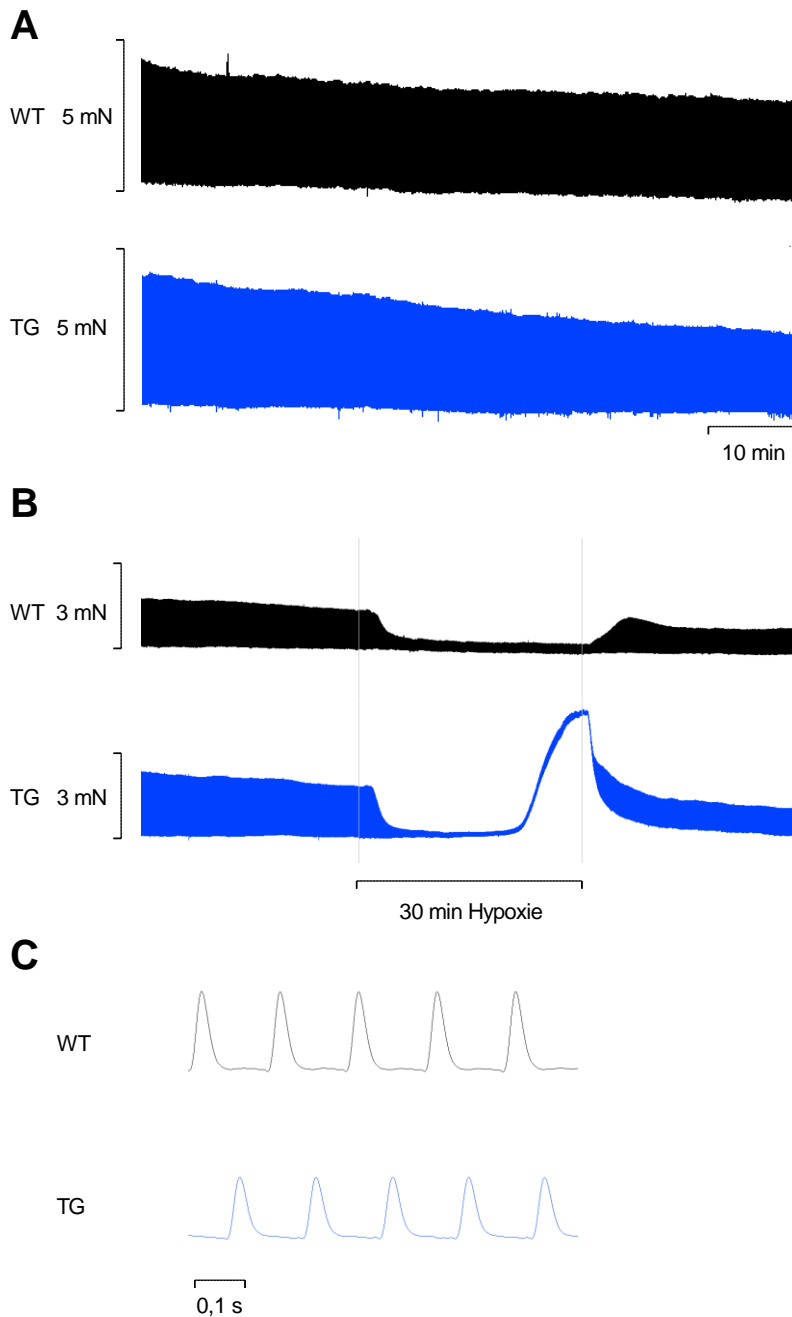


Abb. 6:

## Repräsentative Mechanogramme

Dargestellt sind Originalmechanogramme durchgeführter Versuche mit und ohne Hypoxie. Verglichen werden elektrisch gereizte linke Vorhofpräparate und spontan schlagende rechte Vorhofpräparate der transgenen (TG) und der Wildtyp-Mäuse (WT).

**A** Elektrisch gereizte linke Vorhofpräparate zur Zeitkontrolle. Abszisse: Zeit in min; Ordinate: Kontraktionskraft in mN

**B** Mechanogramme isolierter linker Vorhofpräparate, die einer 30-minütigen Hypoxie ausgesetzt werden. Hier entwickelt das Vorhofpräparat des transgenen Tieres (TG) gegen Ende der Hypoxie eine deutliche Kontraktur, während das Wildtyp-Präparat (WT) keine ausbildet. Abszisse: Zeit in min; Ordinate: Kontraktionskraft in mN.

**C** Einzelkontraktionen spontan schlagender rechter Vorhofpräparate. Abszisse: Zeit in s

### 4.3 Kontraktionen der linken Vorhofpräparate unter einfacher Hypoxie

In der zweiten Versuchsreihe kontrahierten die linken Vorhofpräparate von TG und WT zu Beginn ohne Unterschiede, obgleich sich eine geringere Kontraktionskraft der transgenen Tiere im Vergleich zu den Wildtypen andeutete, die aber statistisch nicht signifikant verringert war. Mit Beginn der Hypoxie nahm die entwickelte Kraft in den ersten Minuten deutlich ab. Ab der 10. Minute unter Sauerstoffmangel stellte sich dann ein relativ konstanter Wert ein. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich ab dieser 10. Minute erstmals ein Kraftunterschied zwischen den transgenen Tieren ( $0,19 \pm 0,02$  mN,  $n = 8$ ) und den Wildtyp-Tieren ( $0,35 \pm 0,05$  mN,  $n = 8$ ). Diese Differenz blieb bis zur 30. Minute der Hypoxie (60. Minute nach Versuchsbeginn) fast durchgängig bestehen. Einzige Ausnahme bildete die 20. Minute unter Sauerstoffmangel; hier deutete sich ein Unterschied an, erwies sich jedoch aufgrund von Schwankungen als nicht signifikant ( $0,2 \pm 0,04$  mN in TG vs.  $0,38 \pm 0,1$  mN in WT;  $p > 0,05$ ,  $n = 8$ ). Unter dem induzierten Sauerstoffmangel entwickelten die Vorhofpräparate der transgenen Tiere also deutlich geringere absolute Kontraktionskräfte als die Wildtyp-Mäuse (Abb. 7).

Nach Ende der halbstündigen Hypoxie wurde die Gaszufuhr umgestellt und mit Hilfe von Carbogen die Normoxie in der Tyrode-Lösung wiederhergestellt. Daraufhin nahmen die Kontraktionen der Präparate wieder zu. Auch hier zeigten die transgenen Atrien eine geringere Kraftentwicklung als die Wildtypen. Obwohl in den ersten Minuten noch kein Unterschied dargestellt werden konnte, so war die absolute Kontraktionskraft der transgenen linken Vorhofpräparate ab Minute 70 (10 min nach Reoxygenierung) mit  $1,11 \pm 0,18$  mN geringer als die der Wildtyp-Vorhofpräparate mit  $1,88 \pm 0,2$  mN ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ). Bis zum Ende der Aufzeichnung, also 30 Minuten nach der Reoxygenierung, war diese Kraftdifferenz zu beobachten. Die angedeutete Differenz der absoluten Kontraktionskraft der transgenen Präparate wurde also unter Hypoxie apparent und persistierte während der Versuche auch nach wiederhergestellter Sauerstoffzufuhr. Bei einer Varianzanalyse mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur ergab sich zwischen den Kurven der absoluten Kontraktionskräfte ein deutlicher Unterschied ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ).

Da die TG-Präparate scheinbar schon vor der Hypoxie weniger Kraft entwickelten als WT, wurden die aufgebrachten Kontraktionskräfte für jeden Zeitpunkt in Relation zur Kontraktionskraft zu Versuchsbeginn gesetzt. Dabei ergab sich, dass sich die Präparate von Wildtyp- und transgenen Mäusen vor und während der Hypoxie nicht unterschieden und in etwa gleiche Prozentwerte besaßen. Sie verloren durch den Sauerstoffmangel also in etwa den gleichen Anteil an Kontraktionskraft von ihrer Ausgangskraft. Lediglich

nach der Reoxygenierung schien sich die Kraft der Präparate der transgenen Tiere schlechter zu erholen als die der Wildtypen. Unterschiede bestanden hierbei nur zu zwei Messzeitpunkten; bei Minute 75 (nach 15 Minuten Reoxygenierung) ( $36,1 \pm 2,9$  % in TG vs.  $50,5 \pm 4,3$  % in WT, n = 8) sowie zum Ende des Versuches (nach 30 Minuten Reoxygenierung) ( $40,5 \pm 2,6$  % in TG vs.  $51,3 \pm 4,0$  % in WT, n = 8). Dennoch deutete sich an, dass die relative Kraft der transgenen Präparate während der gesamten Reoxygenierungsphase geringer war als die der Wildtyp-Präparate.

Abbildung 7 zeigt die absoluten und relativen Kontraktionskräfte der linken Atrien während der Experimente mit einfacher Hypoxie.

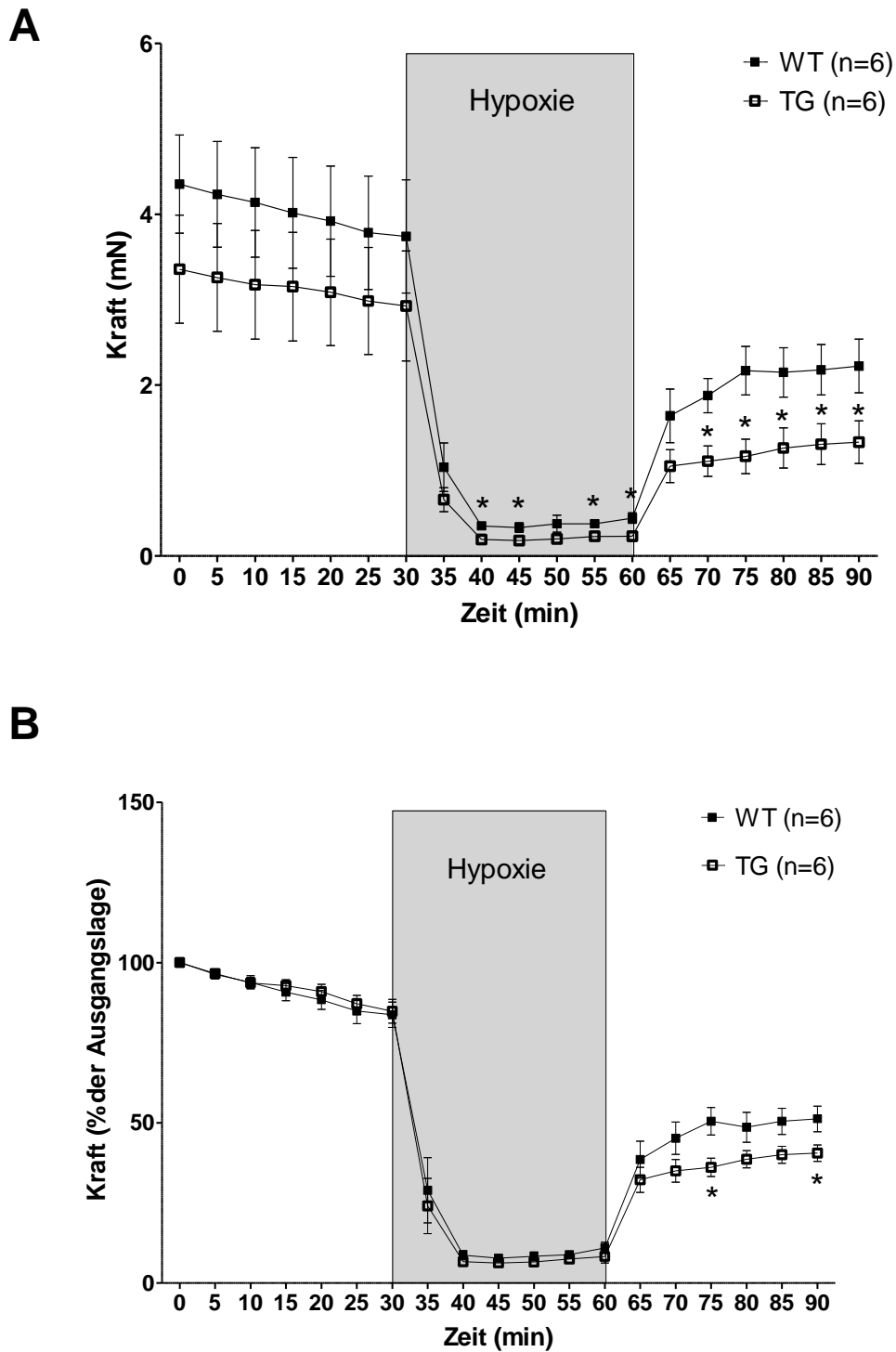


Abb. 7  
Kontraktionskraft der linken Vorhofpräparate bei 30-minütiger Hypoxie

Abgebildet ist die entwickelte Kraft der Kontraktionen der linken Vorhofpräparate vor, während und nach der halbstündigen Hypoxie. \*  $p < 0,05$  vs. WT.

**A** Absolute Kraft. Ordinate: Kraft in mN. Abszisse: Zeit in min.

**B** Kraft relativ zum Zustand bei Versuchsbeginn. Ordinate: Verhältnis der aktuellen Kontraktionskraft zur Ausgangskraft in %. Abszisse: Zeit in min.

Von dem aufgezeichneten Mechanogramm konnte mit Hilfe des Auswertungsprogramms für jeden Zeitpunkt die erste Ableitung der Kraftkurve nach der Zeit bestimmt werden. Dadurch war die Geschwindigkeit der Kraftänderung jeder einzelnen Kontraktion beurteilbar. Die Maxima der ersten Ableitung der Kraft stellen somit die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit dar. Vergleichbar zur Kurve der Kräfte schienen auch die Maxima der 1. Ableitung vor und während der Hypoxie bei den Vorhofpräparaten von TG kleiner zu sein als bei den Vorhofpräparaten von WT. Ein statistisch gesicherter Unterschied bestand jedoch nur in Minute 40 nach 10 min Hypoxie ( $11,2 \pm 1,7$  mN/s bei TG vs.  $19,7 \pm 2,9$  mN/s bei WT,  $n = 8$ ). Die Differenzen verdeutlichten sich nach der Reoxygenierung. Ab Minute 70 zeigten die Maxima der 1. Ableitung bei transgenen Präparaten mit  $63,8 \pm 10,4$  mN/s geringere Werte als bei Wildtyp-Präparaten mit  $104,2 \pm 10,5$  mN/s ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ). Dies setzte sich fort bis Minute 85, nach diesem Zeitpunkt trat eine verstärkte Streuung auf (Abb. 8).

Während die Maxima der 1. Ableitung der Kraft nach der Zeit eine Aussage über die Geschwindigkeit der Kontraktionsentwicklung ermöglichen, so gaben die Minima der 1. Ableitung Hinweise über die Geschwindigkeit der Entspannung der Vorhofpräparate. Sie zeigten an, wie schnell die Präparate vom Kontraktionsmaximum zum relaxierten Zustand übergehen konnten. Die absoluten Minima der 1. Ableitung der Kraft nach der Zeit waren in dieser Versuchsreihe bei TG-Vorhofpräparaten während und nach der Hypoxie geringer im Vergleich zu den WT-Vorhofpräparaten. Dieser Unterschied stellte sich ab der 40. Minute ein ( $-6,7 \pm 0,5$  bei TG vs.  $-13,3 \pm 2,0$  mN/s bei WT,  $n = 8$ ) und blieb bis zum Versuchsende bestehen. Die Relaxation der Wildtyp-Präparate war also rascher als die der transgenen Präparate.

Die Maxima und Minima der 1. Ableitung der Kraft nach der Zeit für die Versuchsreihe der einfachen Hypoxien sind in Abbildung 8 zu sehen.

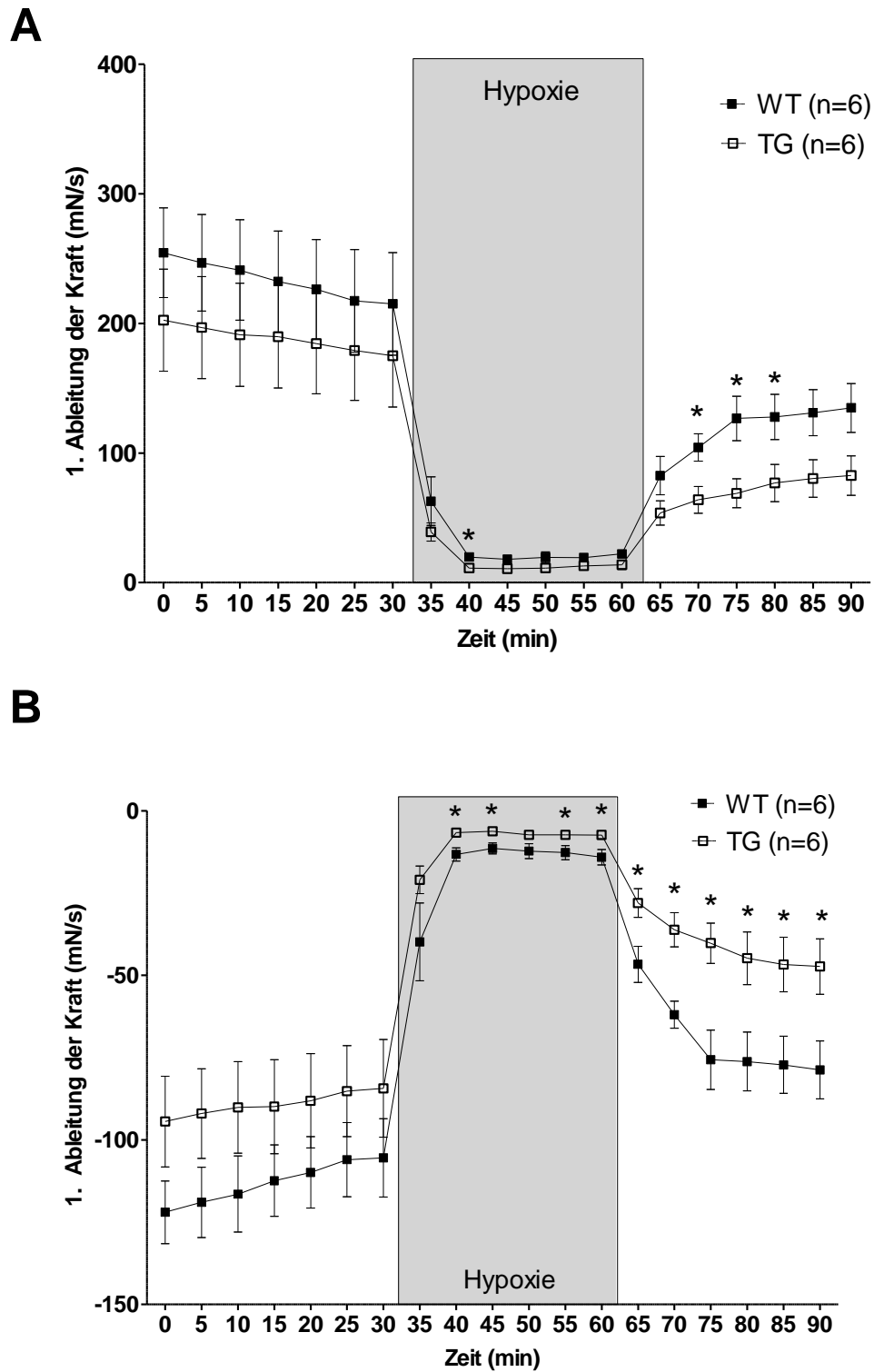


Abb. 8  
Maxima und Minima der 1. Ableitung (Kraft nach Zeit) der linken Vorhofpräparate unter einfacher Hypoxie

**A** Abszisse: Zeit in min; Ordinate: 1. Ableitung der Kraft nach der Zeit in mN/s.

**B** Abszisse: Zeit in min; Ordinate: 1. Ableitung der Kraft nach der Zeit in mN/s.

\* $p < 0,05$

Außerdem wurden auch die Zeitparameter der Vorhofkontraktionen ermittelt. Dazu wurden die Einzelkontraktionen wie folgt analysiert: Zunächst wurde der untere Teil der Kurve (genauer: 10% der Maximalkraft) ausgeblendet, um Störungen durch Schwankungen der Grundlinie zu minimieren. Dann wurde die Zeit in ms vom 1. Punkt der 10-prozentigen Kontraktion bis zur Maximalkraft gemessen und T1 genannt. Entsprechend ergab die Zeit vom Kontraktionsmaximum bis zum 2. Punkt der 10-prozentigen Kontraktion T2 (siehe auch schematische Darstellung in Abbildung 9A). Der Durchschnitt dieser Zeiten sollte damit zum jeweiligen Zeitpunkt im Versuchsprotokoll zeigen, wie schnell die Präparate die maximale Anspannung aufbauen und auch wieder abbauen.

Bei Vergleich der T1-Zeiten (Anspannungszeiten) transgener Präparate mit den Wildtyp-Präparaten fiel auf, dass erstere von Versuchsbeginn an geringere Werte zeigten ( $15,6 \pm 0,2$  ms vs.  $16,5 \pm 0,3$  ms in WT,  $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) und dieser Unterschied bis zur Hypoxie persistierte. Nach Einleitung des Sauerstoffmangels fielen dann die T1-Werte beider Gruppen ab und zeigten eine breitere Streuung als zuvor. Im Verlauf der Hypoxie stiegen die T1-Werte wieder an und überstiegen sogar die Ausgangswerte. Während der 30 Minuten ohne Sauerstoff waren die T1-Zeiten von WT dabei länger als von TG. Deutliche Unterschiede bestanden u.a. nach 35 Minuten ( $13,3 \pm 0,5$  ms bei TG vs.  $15,2 \pm 0,5$  ms bei WT,  $n = 8$ ) und dann wieder ab der 55. Minute ( $13,8 \pm 0,9$  ms bei TG vs.  $17,1 \pm 0,7$  ms bei WT,  $n = 8$ ). Eine ANOVA-Analyse des hypoxischen Zeitraumes verdeutlichte zudem die Unterscheidung beider Kurven (Abb. 9).

Nach Wechseln der Begasung auf Carbogen sanken die T1-Werte in beiden Gruppen allmählich wieder ab und befanden sich bei Versuchsende auf einem geringeren Niveau als zu Versuchsbeginn. Auch hier stellten sich bei TG geringere T1-Werte verglichen mit den Wildtyp-Vorhofpräparaten ein. Diese Differenz wurde ab Minute 85 apparent ( $14,8 \pm 0,2$  ms in TG vs.  $15,6 \pm 0,2$  ms in WT,  $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ).

Die Analyse der T2-Zeiten (Relaxationszeit) zeigte zunächst deutlich höhere Werte als die der T1-Zeiten. Der Verlauf während des Versuchsprotokoll ähnelte sich jedoch. Auch hier zeigten sich zu Beginn konstante Werte, bei Einleitung der Hypoxie kam es dann zum Abfall der Werte und später zum Anstieg, und bei Reoxygenierung fielen sie stetig wieder ab, um auf einem Niveau unterhalb der Ausgangslage zu enden.

Im Vergleich der T2-Werte von WT und TG zeigten sich im ganzen Verlauf dieser Versuchsreihe keinerlei Unterschiede.

Ein Schema der T1- und T2-Berechnung sowie der Verlauf dieser Werte in den Hypoxieversuchen sind in Abbildung 9 dargestellt.

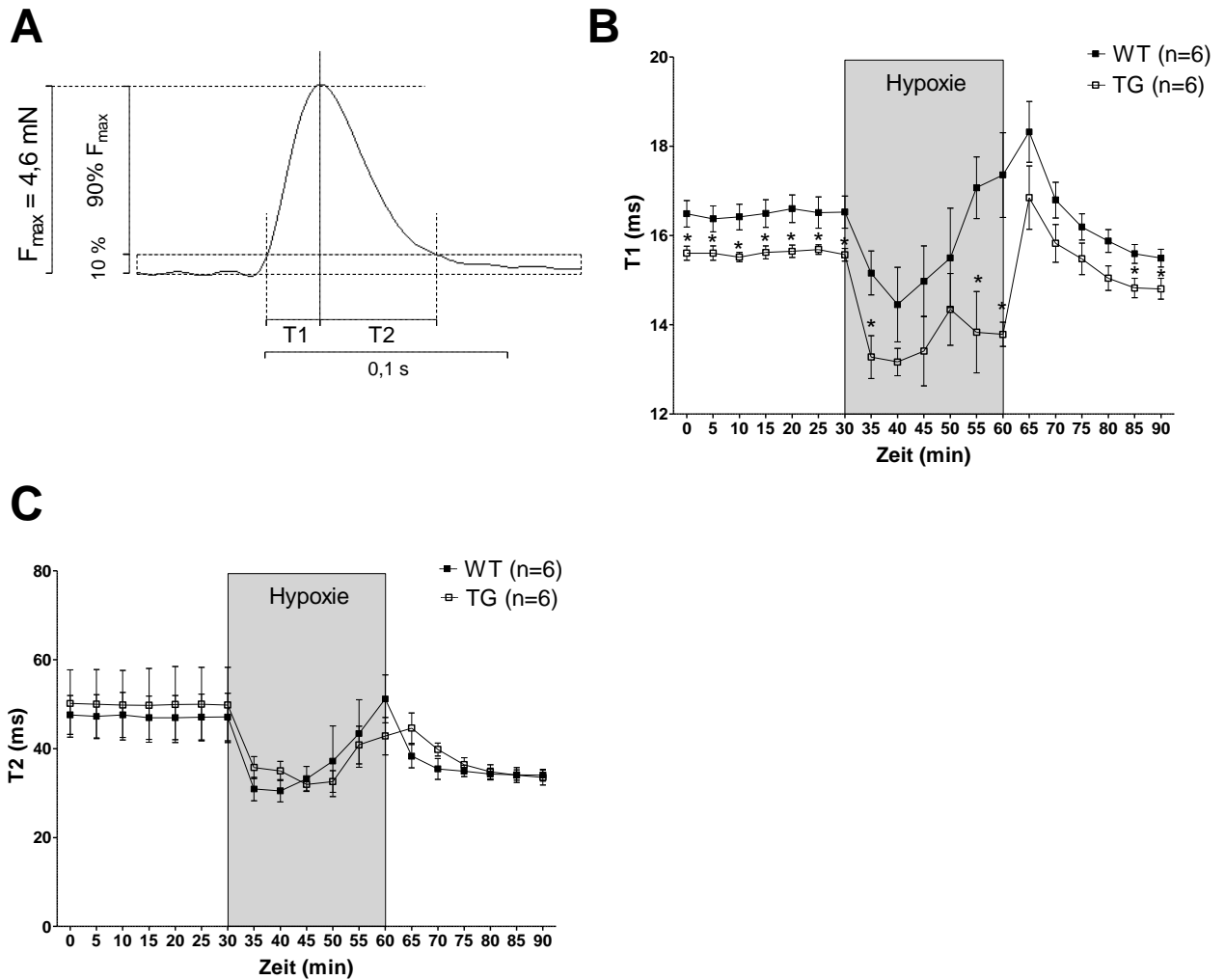


Abb. 9  
 T1 und T2 während der Hypoxie-Versuche

Zu sehen sind die Anspannungszeit T1 und Relaxationszeit T2 der linken Vorhofpräparate von transgenen (TG) und Wildtyp-Mäusen (WT) aus der Versuchsreihe der einfachen Hypoxie.

**A** Schema der Messung von T1 und T2. Nach Ausblenden der unteren 10 % der Maximalkraft  $F_{\max}$  (in diesem Fall 4,6 mN) wird für die Einzelkontraktion die Zeit bis zur maximalen Anspannung (T1) sowie die Zeit nach der maximalen Anspannung (T2) bis zum Kontraktionsende gemessen. Abszisse: Zeit in s. Ordinate: Kraft in mN.

**B** T1 während des gesamten Hypoxieversuches. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: T1 in ms. \* $p < 0,05$  vs. WT

**C** T2 während des gesamten Hypoxieversuches. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: T2 in ms. \* $p < 0,05$  vs. WT



#### 4.4 Kontraktionen der linken Vorhofpräparate bei Präkonditionierung

In der dritten Versuchsreihe wurde gleich zu Versuchsbeginn (nach Äquilibration) eine 10-minütige Präkonditionierung durchgeführt. Dabei handelte es sich um eine kurze Phase der Begasung mit Stickstoff anstelle von Sauerstoff. Darauf folgte eine 20-minütige normoxische Stabilisierungsphase, sodass nach insgesamt einer halben Stunde nach Versuchsbeginn die reguläre Hypoxie eingeleitet wurde. Diese dauerte 30 Minuten und ging in eine ebenso lange Reoxygenierung über.

In dieser Versuchsreihe begannen die Präparate mit ähnlicher Kraft zu Versuchsbeginn zu kontrahieren. Durch den gleich darauffolgenden Sauerstoffmangel kam es zunächst zum Abfall der Kontraktionskräfte aller Präparate. Am Ende der 10-minütigen Präkonditionierung zeigten sich erste Unterschiede der Kontraktionskräfte, die TG-Vorhofpräparate entwickelten mit  $0,32 \pm 0,08$  mN weniger Kraft als die WT-Vorhofpräparate mit  $0,54 \text{ mN} \pm 0,06 \text{ mN}$  ( $n = 8$ ) (Abb. 10).

Die anschließende Stabilisierungsphase, die einer kurzen Reoxygenierung entsprach, ermöglichte eine Erholung der Kraftentwicklung beider Gruppen. Hier wurden keine Unterschiede deutlich. Der erneute Sauerstoffmangel in der halbstündigen Hypoxiephase ließ die Kontraktionskräfte erneut absinken. Hier wurde wieder ein Defizit der transgenen Präparate nach 40 Minuten deutlich ( $0,19 \pm 0,04$  mN in TG vs.  $0,41 \pm 0,07$  in WT,  $n = 8$ ), das sich auch in die 45. Minute fortsetzte. Nach 20 Minuten Sauerstoffmangel (Minute 50) nahmen die Unterschiede ab und bis zum Ende der Hypoxie kontrahierten die Wildtyp-Präparate mit ähnlicher Kraft wie die transgenen Präparate. Schließlich wurde die Reoxygenierung eingeleitet und die Kontraktionen wurden kräftiger. Hier deutete sich eine geringere Kontraktionskraft der transgenen Präparate im Vergleich zu WT an. Obgleich keine Unterschiede der Einzelwerte sichtbar wurden, zeigte eine ANOVA-Analyse, dass sich beide Kurven nach Reoxygenierung deutlich unterschieden ( $p < 0,05$ ).

Abbildung 10A zeigt den Kraftverlauf während des Präkonditionierungsprotokolls.

Um einen Effekt der Präkonditionierung ermitteln zu können, wurden die Kontraktionskräfte der Vorhofpräparate zu verschiedenen Zeitpunkten unter Hypoxie sowie zum Ende der Reoxygenierung verglichen (Abb. 10B). Sowohl für WT als auch für TG bewirkte die Präkonditionierung keine Veränderung der aufgebrauchten Kräfte unter Hypoxie. Bei Vergleich der Kontraktionskräfte am Ende der Aufzeichnungen schien jedoch für beide Gruppen ein Anstieg der entwickelten Kontraktionskraft bei vorhergehender Präkonditionierung sichtbar zu werden. Obwohl kein deutlicher

Unterschied erreicht wurde ( $p > 0,05$ ), so schien die Präkonditionierung für beide Gruppen tendenziell eine verbesserte Krafterholung nach Hypoxie zu ermöglichen.

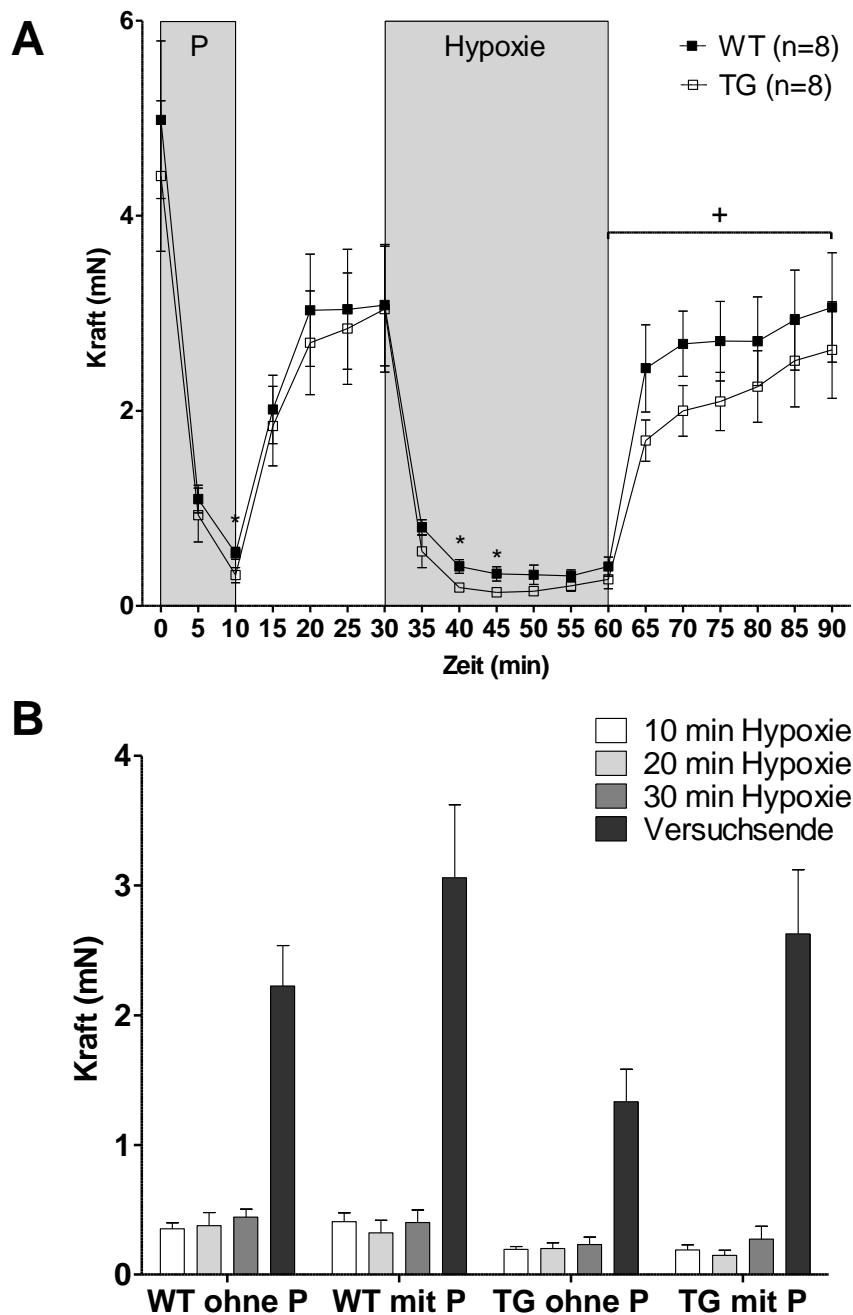


Abb. 10  
Kraftentwicklung der linken Vorhofpräparate bei Präkonditionierung

**A** Kraftverlauf der linken Vorhofpräparate von Wildtypen (WT) und Transgenen (TG) unter Präkonditionierung. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: Kraft in mN. P, Präkonditionierung; \* $p < 0,05$ ; + $p < 0,05$ , durch ANOVA ermittelt.

**B** Vergleich der Kontraktionskräfte von WT und TG zu verschiedenen Zeitpunkten der Hypoxie und zu Versuchsende sowohl mit als auch ohne vorhergehende Präkonditionierung (P).

Um ein Maß für die Geschwindigkeit des Aufbaus der Einzelkontraktionen zu bekommen, wurden auch für diese Versuchsreihe die Maxima und Minima der 1. Ableitung bestimmt (siehe Abb. 11). Unterschiede waren hierbei jedoch kaum vorhanden. Lediglich der Verlauf nach der Reoxygenierung unterschied sich. Dort zeigten transgene Präparate wieder kleinere absolute Maximal- und Minimalwerte der 1. Ableitung. Eine ANOVA-Analyse dieses Kurvenabschnittes belegte die Unterschiede ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ).

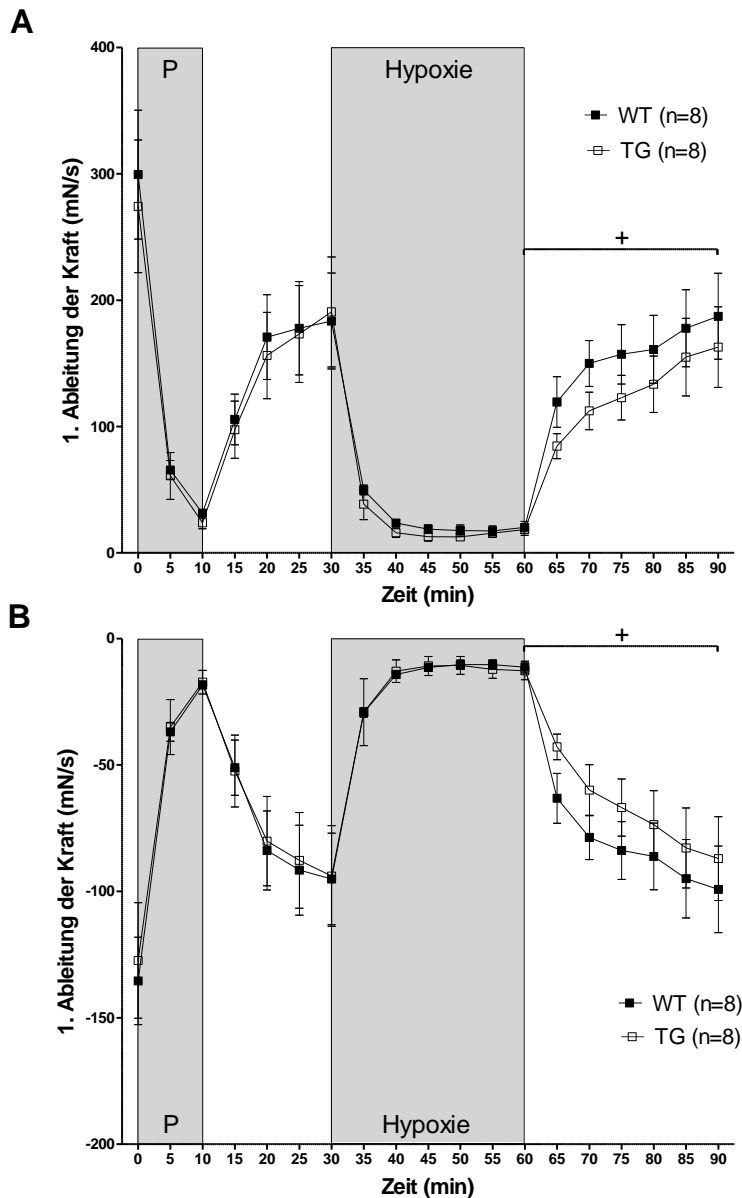


Abb. 11

Maxima und Minima der 1. Ableitung (Kraft nach Zeit) der linken Vorhofpräparate während der Präkonditionierung

**A** Maxima der 1. Ableitung. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: 1. Ableitung der Kraft nach der Zeit in mN/s. + $p < 0,05$  nach ANOVA.

**B** Minima der 1. Ableitung. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: 1. Ableitung der Kraft nach der Zeit in mN/s. + $p < 0,05$  nach ANOVA.

Ebenfalls wurden für die Versuchsreihe der Präkonditionierung die T1- und T2-Zeiten bestimmt. Ähnlich dem Verlauf zur einfachen Hypoxie, kam es auch hier zum Absinken von T1 und T2 während des Sauerstoffmangels, sowohl in der Präkonditionierung als auch in der Hypoxie (Abb. 12).

Für T1 ergaben sich sowohl in der 5. Minute unter Präkonditionierung ( $13 \pm 0,9$  ms in TG vs.  $15,4 \pm 0,44$  ms in WT,  $n = 8$ ) als auch ab Minute 45 (15. Minute unter Hypoxie;  $10,0 \pm 1,2$  ms in TG vs.  $15,7 \pm 1,6$  ms in WT,  $n = 8$ ) bis zur Einleitung der Reoxygenierung sichtbare Unterschiede zwischen TG und WT. Der hypoxische Abschnitt unterschied sich nach ANOVA-Varianzanalyse deutlich ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ). Nur unter normoxischen Bedingungen, also in der 20-minütigen Stabilisierungs- und in der 30-minütigen Reoxygenierungsphase, glichen sich die T1-Werte von WT und TG an.

Ein vergleichbarer Verlauf war für die T2-Zeiten zu beobachten. Hier zeigten sich keinerlei Unterschiede bis zur Einleitung der Hypoxie. Dort begannen die TG geringere T2-Werte auszubilden als die WT-Vorhofpräparate. Von Minute 40 bis zur Reoxygenierung war diese Differenz nach ANOVA-Analyse signifikant. In der 55. Minute unterschieden sich auch die Einzelwerte ( $22,9 \pm 6,4$  ms in TG vs.  $43,3 \pm 3,0$  ms in WT,  $n = 8$ ). Nach Reoxygenierung glichen sich WT und TG wieder an.

Bei Vergleich mit den T1- und T2-Werten der Versuchsreihe der einfachen Hypoxie fällt auf, dass die Unterschiede unter Hypoxie nach vorhergehender Präkonditionierung deutlicher ausfallen. Differenzen der T1-Zeiten unter Hypoxie wurden zu mehreren Zeitpunkten festgestellt. Eine T2-Differenz zeigte sich sogar erst durch die Präkonditionierung (Vgl. Abbildung 9).

Der Verlauf der T1- und T2-Zeiten ist in Abbildung 12 zu erkennen.

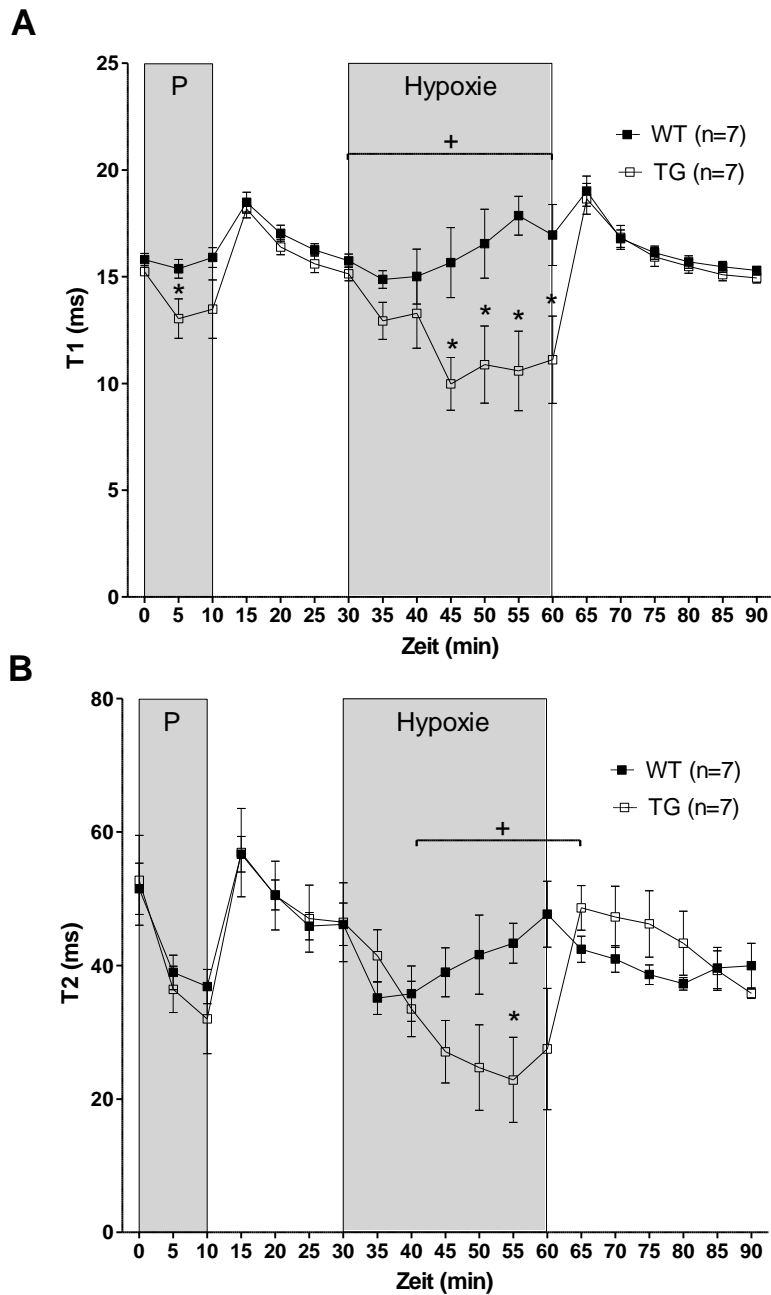


Abb. 12  
Anspannungszeit T1 und Relaxationszeit T2 während der Präkonditionierung

**A** T1-Werte der linken Vorhofpräparate unter Präkonditionierung. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: T1 in ms. \* $p < 0,05$ . + $p < 0,05$  nach ANOVA.

**B** T2-Werte der linken Vorhofpräparate unter Präkonditionierung. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: T2 in ms. \* $p < 0,05$ . + $p < 0,05$  nach ANOVA.

#### 4.5 Kontraktionen der linken Vorhofpräparate bei doppelter Hypoxie

In der vierten Versuchsreihe schloss sich an das Protokoll der einfachen Hypoxie (Vgl. Abschnitt 4.3) ein zweites Hypoxieprotokoll an, das ebenso aus einer 30-minütigen Stabilisierung, einer 30-minütigen Hypoxie und einer 30-minütigen Reoxygenierung bestand. Damit verlängerte sich der Versuchsablauf auf insgesamt 180 Minuten. Da die Abläufe der ersten Hälfte des Versuches denen der einfachen Hypoxie entsprachen, fiel das Verhalten der Präparate in dieser Phase ähnlich aus (nicht gezeigt). Deshalb liegt hier besonderer Fokus auf der zweiten Hypoxie, welche in Abb. 13 dargestellt ist.

Bei Betrachtung der Kraftentwicklung wurde ein Unterschied zwischen transgenen und Wildtyp-Präparaten erneut erst nach Einleitung der Hypoxie sichtbar. Ab Minute 135 in der 2. Hypoxie kontrahierten die transgenen Präparate mit  $0,17 \pm 0,06$  mN schwächer als die Wildtypen mit  $0,38 \pm 0,08$  mN ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ). Bis zum Ende der 2. Hypoxie verstärkte sich diese Differenz sogar ( $0,12 \pm 0,04$  mN in TG vs.  $0,50 \pm 0,12$  mN in WT,  $n = 8$ ). Im Gegensatz zur ersten Hypoxie unterschieden sich hier auch die aufgebrauchten relativen Kontraktionskräfte, also die Kräfte im Verhältnis zur Ausgangskraft; ab Minute 135 (15 Minuten unter Hypoxie) waren die transgenen Präparate schwächer ( $7,0 \pm 2,3$  % vs.  $16,6 \pm 2,3$  % bei WT,  $n = 8$ ). Nach Wiederherstellung der Normoxie gingen die Unterschiede der Einzelwerte verloren, lediglich die relativen Kräfte nach 160 Minuten zeigten eine Differenz ( $50,2 \pm 10,9$  % bei TG vs.  $81,0 \pm 8,8$  % bei WT,  $n = 8$ ). Die Varianzanalyse mittels ANOVA bestätigte jedoch sowohl für die absoluten als auch für die relativen Kräfte einen Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Kurvenverläufe von TG und WT in den ersten 20 Minuten der Reoxygenierung. Die transgenen Vorhofpräparate entwickelten also unter Hypoxie und auch zum größten Teil unter der Reoxygenierung weniger Kraft als die Wildtyp-Präparate.

Absolute und relative Kräfte sind in Abb. 13A und B dargestellt.

Bei einem Vergleich der absoluten Kraftverläufe in der zweiten Hypoxie mit denen der ersten sowie mit denen der Hypoxie nach Präkonditionierung, ließen sich keine Unterschiede feststellen (siehe Abb. 13C). Es zeigte sich, dass die absoluten Kontraktionskräfte bei transgenen und Wildtyp-Vorhofpräparate nach zwei Hypoxien wieder ähnlich stark waren wie nach einer einfachen Hypoxie, obgleich eine 10-minütige Präkonditionierung die Kraft nach Ende der Hypoxie scheinbar leicht ansteigen ließ. Dieser Effekt ging im Versuchsprotokoll der doppelten Hypoxie verloren.

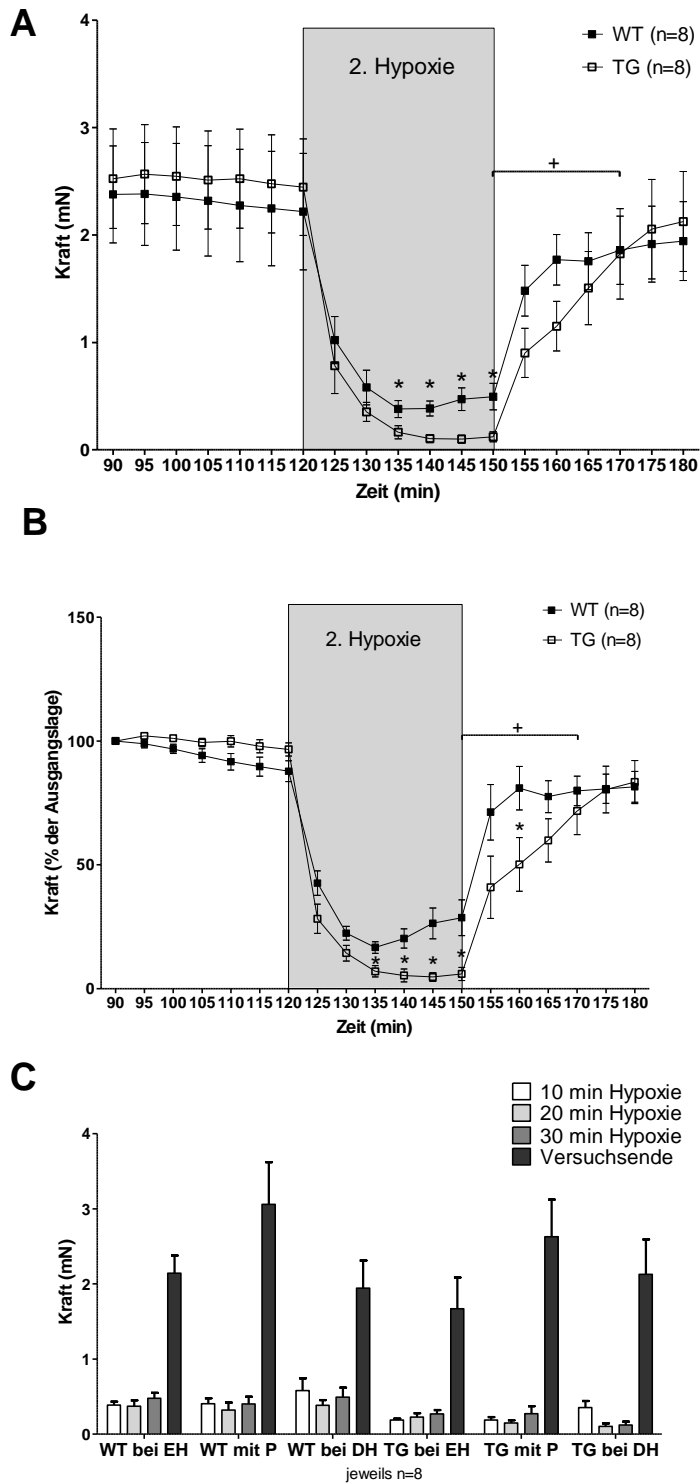


Abb. 33  
Kraftkurven der linken Vorhofpräparate unter der zweiten Hypoxie

**A** Absolute Kräfte. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: Kraft in mN. \* $p < 0,05$ .

**B** Kräfte im Verhältnis zur Ausgangskraft. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: Relative Kraft in %. \* $p < 0,05$ .

**C** Vergleich der absoluten Kontraktionskräfte unter Hypoxie und zu Versuchsende bei den drei verschiedenen Versuchsprotokollen. Ordinate: Kraft in mN. WT, Wildtyp; TG, Transgene; EH, einfache Hypoxie; P, Präkonditionierung; DH, doppelte Hypoxie.

Vergleichbar zu den Verläufen der Kontraktionskräfte während der zweiten Hypoxie verhielten sich auch die Maxima und Minima der 1. Ableitung der Kraft nach der Zeit. Sichtbare Unterschiede traten ab der 15. Minute unter der 2. Hypoxie auf und blieben bis Ende der Hypoxie bestehen. Zudem konnte durch ANOVA-Varianzanalyse ein Unterschied der Verläufe in den ersten 20 Minuten der Reoxygenierung nachgewiesen werden. Demnach zeigten WT zu diesen Zeitpunkten deutlich steilere Anstiege und auch Abfälle der Kräfte während der Einzelkontraktionen als TG.

Die Berechnung der T1- und T2-Zeiten für die zweite Hypoxie zeigte einige Besonderheiten. Während die T1-Werte der transgenen Präparate in der zweiten Stabilisierungsphase, also vor der zweiten Hypoxie, geringer waren als die der Wildtyp-Präparate (ANOVA:  $p < 0,05$ ), so konnte unter der eigentlichen Hypoxie kein Unterschied dargestellt werden. Dies trifft ebenso für die Reoxygenierungsphase zu.

Die T2-Werte wiederum ähnelten sich sowohl vor als auch nach der zweiten Hypoxie. Während dieser zeigten sich jedoch ab Minute 140 ( $24,0 \pm 4,2$  ms bei TG vs.  $40,1 \pm 3,6$  ms bei WT,  $n = 8$ ) bis zum Ende der Hypoxie geringere Werte bei Transgenen. Auch die Analyse von der 130. Minute (10. Minute der zweiten Hypoxie) bis zur 160. Minute (10. Minute der zweiten Reoxygenierung) zeigt Unterschiede der T2-Verläufe zwischen beiden Gruppen in diesem Zeitfenster (ANOVA:  $p < 0,05$ ). Bei der zweiten Hypoxie verdeutlichten sich also die Unterschiede in den Zeiten von der maximalen Anspannung bis zur Entspannung der Einzelkontraktionen in transgenen und Wildtyp-Präparaten.

Abbildung 14 zeigt die Maxima und Minima der 1. Ableitung der Kraft nach der Zeit sowie die T1- und T2-Werte der linken Vorhofpräparate während der zweiten Hypoxie.



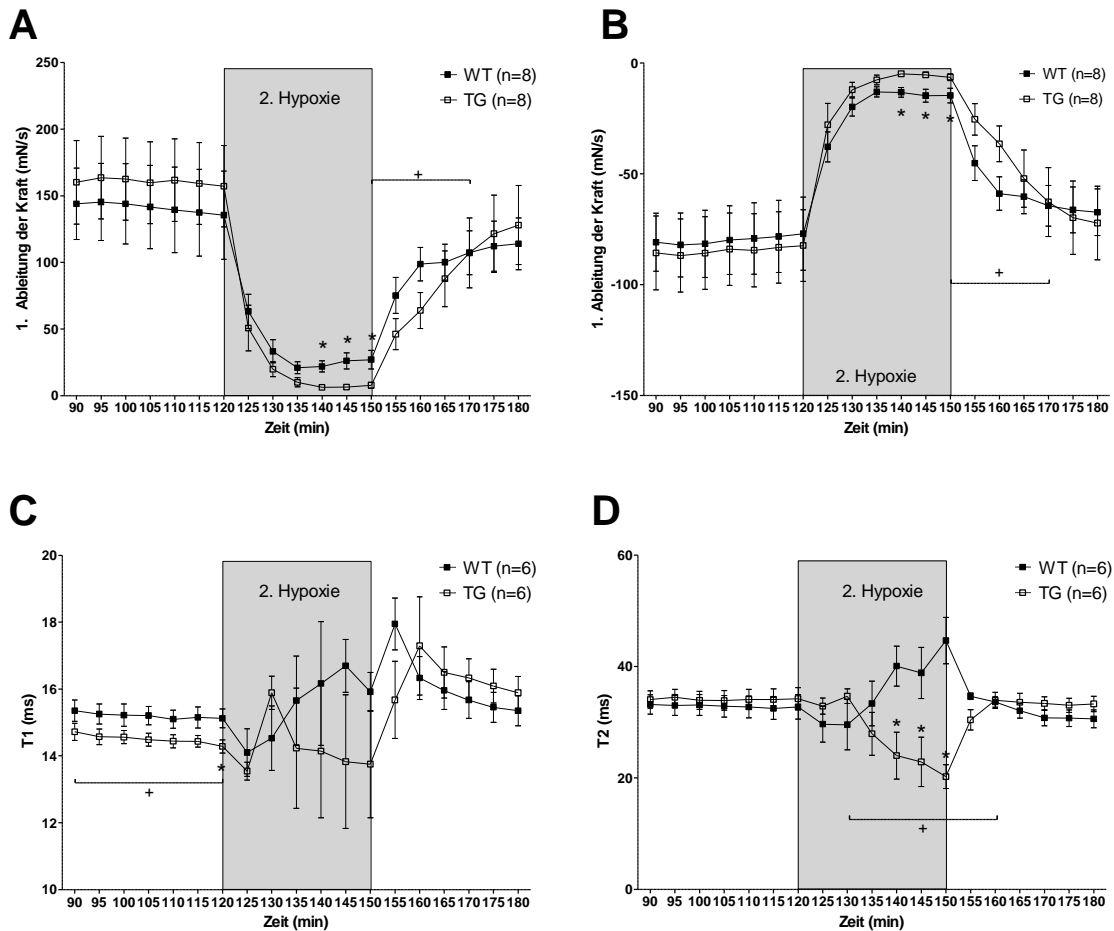


Abb. 14

Maxima und Minima der 1. Ableitung sowie T1 und T2 während der zweiten Hypoxie

**A** Maxima der 1. Ableitung. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: 1. Ableitung der Kraft nach der Zeit in mN/s. +p < 0,05 nach ANOVA.

**B** Minima der 1. Ableitung. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: 1. Ableitung der Kraft nach der Zeit in mN/s. +p < 0,05 nach ANOVA.

**C** T1-Werte der linken Vorhofpräparate während der 2. Hypoxie. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: T1 in ms. \*p < 0,05. +p < 0,05 nach ANOVA.

**D** T2-Werte der linken Vorhofpräparate während der 2. Hypoxie. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: T2 in ms. \*p < 0,05. +p < 0,05 nach ANOVA.

#### 4.6 Abfall und Anstieg der Kontraktionskräfte der linken Vorhofpräparate

Nachdem in den Experimenten die Begasung gewechselt wurde, dauerte es bei jedem Präparat unterschiedlich lange, bis es seine Kraft einbüßte bzw. diese sich wieder erholte. Um diesen Vorgang zu quantifizieren, wurde für jedes Präparat die Zeit gemessen, die es benötigte, um auf 50% der Ausgangskraft abzufallen bzw. wieder auf 50% der konstanten nach Reoxygenierung erreichten Kraft anzusteigen. Für die Bezugsgrößen (also 100%) wurde beim Kraftabfall die Ausgangskraft vor Einleitung der jeweiligen hypoxischen Phase und beim Kraftanstieg die Kraftwerte nach 10 Minuten Reoxygenierung verwendet. Der letztere Zeitpunkt wurde gewählt, da zu Beginn und auch gegen Ende der Reoxygenierungsphasen größere Schwankungen der aufgebrauchten Kräfte auftraten und der 10-Minuten-Wert in den durchgeführten Versuchen am ehesten den stabilsten Maximalwert der wiedergewonnenen Kraft darstellte. Eine erneute Verwendung der prähypoxischen Kraftwerte für die Berechnung der Zeit des Kraftanstieges erschien nicht zielführend, da einige Präparate 50% der Ausgangskraft nur sehr spät oder teilweise gar nicht mehr erreichten. (Die Angabe der Minuten erfolgt in Dezimalzahlen, demnach gilt: 0,5 min = 30 s; 0,1 min = 6 s.)

Bei Betrachtung der Zeiten des Verlustes der Hälfte der Kraft nach Einleitung der 10-minütigen Präkonditionierung in der dritten Versuchsreihe werden keinerlei Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Vorhofpräparate deutlich. Auch bei der Reoxygenierung nach dieser kurzen hypoxischen Phase bauten beide Gruppen die Hälfte der Kraft etwa gleich schnell wieder auf. Jedoch wurden bei der Auswertung der darauffolgenden Hypoxie Unterschiede sichtbar. Die transgenen Präparate verloren die Hälfte ihrer Ausgangskraft in  $3,08 \pm 0,45$  min ( $n = 6$ ), also rascher als die Wildtyp-Präparate, die sie in  $4,74 \pm 0,39$  min ( $n = 6$ ) verloren. Die Regeneration von 50% der Kraft nach Reoxygenierung dauerte bei den TG-Präparaten mit  $3,84 \pm 0,57$  min deutlich länger als bei WT mit  $2,05 \pm 0,51$  min. Schlussfolgernd verloren TG in der Hypoxie nach Präkonditionierung schneller die Hälfte ihrer Kraft als WT und konnten danach ihre Kontraktionskraft auch nur langsamer regenerieren.

Die analoge Berechnung der Zeiten für den Verlust und die Wiedererlangung der Hälfte der Kraft der linken Vorhofpräparate in der Versuchsreihe der Doppelten Hypoxie brachte vergleichbare Ergebnisse. Hier wurde bereits in der ersten regulären halbstündigen Hypoxiephase deutlich, dass die transgenen Präparate schneller an Kontraktionskraft verloren als die Wildtyp-Präparate ( $2,77 \pm 0,39$  min in TG vs.  $4,72 \pm 0,42$  min in WT;  $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ). Nach Ende dieser ersten Hypoxie benötigten sie mehr

Zeit als die WT, um die Hälfte der posthypoxischen Kraft aufzubauen ( $3,37 \pm 0,48$  min bei TG vs.  $2,10 \pm 0,29$  min bei WT,  $n = 7$ ).

In der zweiten Hypoxie verhielt es sich ähnlich. Die transgenen Vorhofpräparate bauten 50% der Ausgangskraft zügiger ab ( $3,53 \pm 0,37$  min in TG vs.  $5,60 \pm 0,61$  min in WT,  $n = 7$ ) und benötigten wiederholt mehr Zeit als die Wildtyp-Vorhofpräparate, um die Hälfte der Kraft bei Reoxygenierung zu regenerieren ( $3,62 \pm 0,54$  in TG vs.  $1,45 \pm 0,48$  in WT,  $n = 7$ ).

Während der beiden Hypoxien verloren TG also deutlich schneller ihre Kraft und bauten sie auch nur langsamer wieder auf.

Abbildung 15 zeigt die Vergleiche der Zeiten des Kraftverlusts und des Kraftanstiegs.

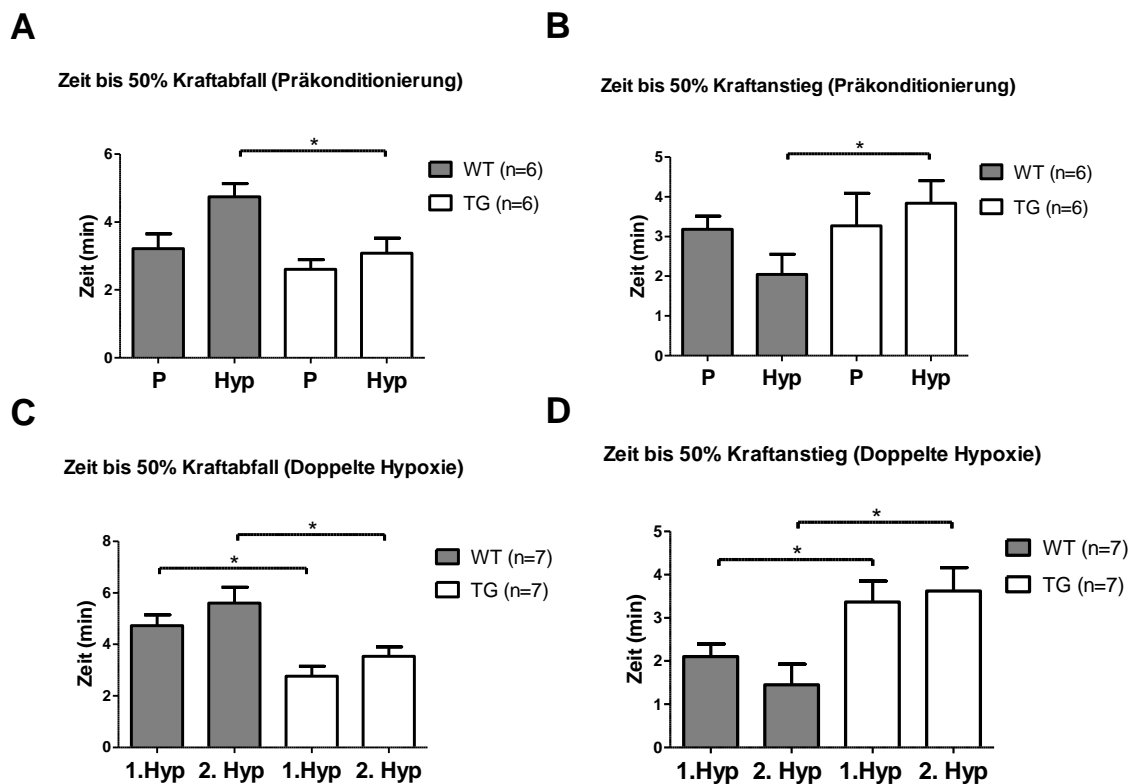


Abb. 15

Kraftverlust und Kraftanstieg bei Präkonditionierung und doppelter Hypoxie

Ordinaten: Zeit in min; WT, Wildtyp-Vorhofpräparate; TG, transgene Vorhofpräparate; P, Präkonditionierung; Hyp, Hypoxie; \* $p < 0,05$ .

#### 4.7 Kontrakturen der linken Vorhofpräparate

Gegen Ende der Hypoxie bildeten ein Großteil der rechten und linken Vorhofpräparate eine Kontraktur aus (siehe Abbildung 6). Diese zeichnete sich durch einen Anstieg der

Grundlinie des Mechanogramms aus und kam durch unvollständige Relaxation nach den Kontraktionen zustande. Statt sich vollständig zu entspannen, blieben die Präparate zu einem gewissen Teil kontrahiert und schlugen auf einem höheren Kraftniveau weiter. Mit Fortbestehen des Sauerstoffmangels wuchs dieses Relaxationsdefizit weiter an und bildete sich erst nach Reoxygenierung zurück.

Um diese Kontrakturen zu untersuchen, wurde zunächst die maximale Kontraktur ermittelt, also die maximale Differenz der angestiegenen Grundlinie des Mechanogramms zur Grundlinie vor der Hypoxie. Dann wurde die Zeit gemessen, in der die Präparate nach Einleitung der Hypoxie die Hälfte dieser maximalen Kontraktur entwickelt hatten. Schließlich berechnete man die Zeit, die die Vorhofpräparate benötigten, um nach der Reoxygenierung wieder die Hälfte der maximalen Kontraktur abzubauen.

In der Versuchsreihe der Präkonditionierung wurde unter der 10-minütigen initialen Hypoxie keine Kontraktur beobachtet. In der darauffolgenden Hypoxie entwickelten sich jedoch zahlreiche Kontrakturen. Bei Vergleich dieser maximalen Relaxationsdefizite konnten keine Unterschiede ermittelt werden, obgleich sich in den transgenen Vorhofpräparate leicht stärkere Kontrakturen andeuteten. Deutlich kürzer war jedoch die Zeit, nach welcher die transgenen Präparate die halbmaximale Kontraktur entwickelten. Mit  $14,76 \pm 3,27$  min ( $n = 6$ ) zeigte sich ein Unterschied zu den Zeiten der Wildtyp-Präparate, die  $26,14 \pm 1,73$  min ( $n = 6$ ) betrug. Zudem konnte in der Reoxygenierung gezeigt werden, dass transgene Vorhofpräparate bereits nach  $1,41 \pm 0,28$  min die Hälfte ihrer Kontraktur wieder abbauen konnten, während Wildtyp-Präparate dafür  $2,92 \pm 0,52$  min benötigten ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). In der Hypoxie nach vorhergehender Präkonditionierung entwickelten die transgenen Vorhofpräparate ihre Kontrakturen also schneller, bauten sie nach Wiederherstellung der Normoxie aber auch schneller wieder ab.

Eine Darstellung der Kontrakturanalyse während der Präkonditionierung ist in Abbildung 16 zu sehen.

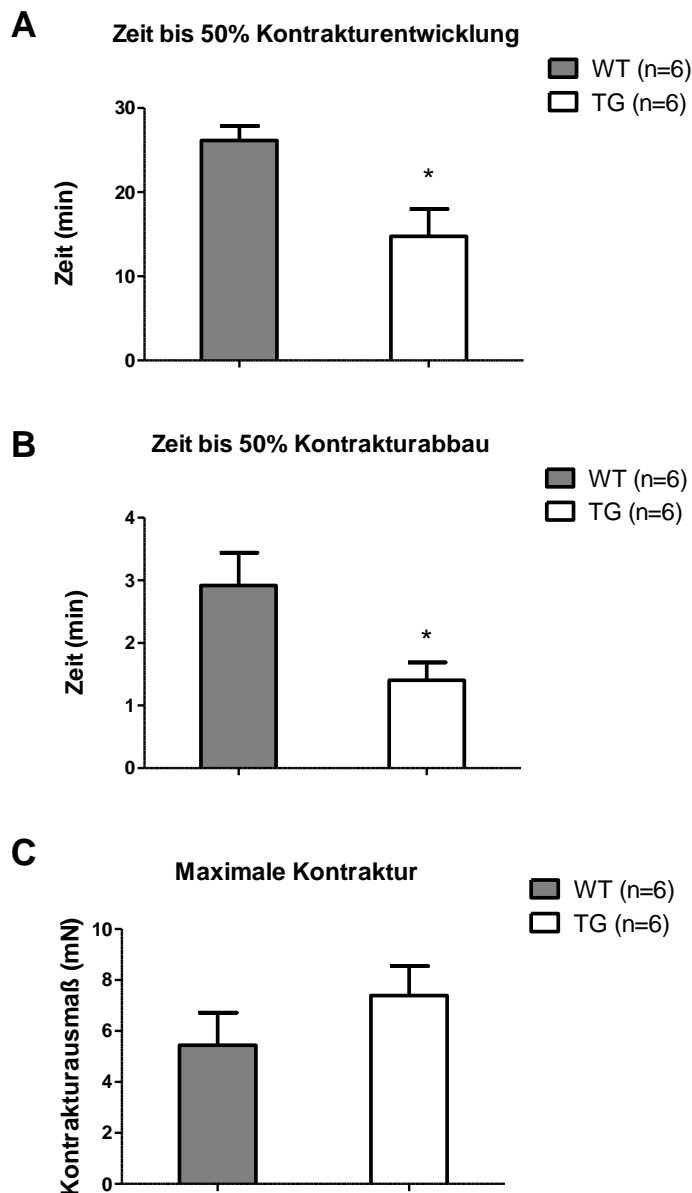


Abb. 16  
Kontrakturen der linken Vorhofpräparate unter Hypoxie nach Präkonditionierung

**A** Zeit bis zur Entwicklung von 50% der maximalen Kontraktur. Ordinate: Zeit in min.  
**B** Zeit bis zum Abbau von 50% der maximalen Kontraktur. Ordinate: Zeit in min.  
**C** Maximal entwickelte Kontrakturen. Ordinate: Differenz des Kraftniveaus in mN.  
 WT, Wildtyp-Präparate; TG, transgene Präparate; \* $p < 0,05$ .

Die Präparate der Versuchsreihe der Doppelten Hypoxie bildeten ebenfalls Kontrakturen aus. Der Vergleich der Zeiten der Kontraktionsentwicklung ließ zunächst erkennen, dass sowohl transgene als auch Wildtyp-Vorhofpräparate in der zweiten Hypoxie weniger Zeit benötigten, um die halbmaximale Kontraktur zu entwickeln ( $9,96 \pm 0,85$  min in der 2. Hypoxie vs.  $21,26 \pm 1,49$  min in der 1. Hypoxie bei TG sowie  $19,06 \pm 1,87$  min in der 2.

Hypoxie vs.  $26,43 \pm 1,08$  min in der 1. Hypoxie bei WT,  $n = 6$ ). In beiden Gruppen bildeten sich die Kontrakturen in der zweiten Hypoxie also schneller aus.

In der 1. Hypoxie zeigten die transgenen Präparate 50% der Kontraktur nach  $21,26 \pm 1,49$  min, also schneller als die Wildtyp-Präparate, die 50% der Kontraktur erst nach  $26,43 \pm 1,08$  min erreichten ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). Auch in der 2. Hypoxie war die Zeit der halbmaximalen Kontraktorentwicklung bei transgenen Vorhofpräparate kürzer als bei Wildtyp-Präparaten ( $9,96 \pm 0,85$  min in TG vs.  $19,06 \pm 1,87$  min in WT,  $n = 6$ ).

In der Darstellung der Zeiten bis zum Abbau von 50% der maximalen Kontraktur war keine Veränderung zwischen 1. und 2. Hypoxie zu beobachten, auch wenn diese Zeiten in beiden Gruppen leicht anzusteigen schienen. Nach beiden Hypoxien bauten die transgenen Vorhofpräparate die Hälfte ihrer Kontrakturen zügiger ab als die Wildtyp-Präparate (in der 1. Hypoxie nach  $1,61 \pm 0,37$  min bei TG vs.  $3,31 \pm 0,5$  min bei WT und in der 2. Hypoxie  $1,30 \pm 0,14$  min bei TG vs.  $2,77 \pm 0,40$  min bei WT;  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).

Wenn man nun die Werte der maximalen Kontrakturen von TG und WT-Vorhofpräparaten miteinander vergleicht, so war in der ersten Hypoxie erneut kein Unterschied sichtbar, auch wenn sich in der transgenen Gruppe größere maximale Kontrakturen andeuteten. In der zweiten Hypoxie jedoch kam es erstmals zu einer Differenz der maximalen Relaxationsdefizite zwischen TG ( $7,1 \pm 0,6$  mN,  $n = 6$ ) und WT ( $4,7 \pm 0,9$  mN,  $n = 6$ ).

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass auch in der doppelten Hypoxie die transgenen Präparate die halbmaximalen Kontrakturen im Vergleich zu den Wildtyp-Präparaten schneller ausbildeten, sie jedoch auch schneller wieder abbauten. Zudem entwickelten sie zumindest in der zweiten Hypoxie ausgeprägtere Kontrakturen als die WT.

In Abbildung 17 sind die Kontrakturanalysen der Doppelten Hypoxie dargestellt.

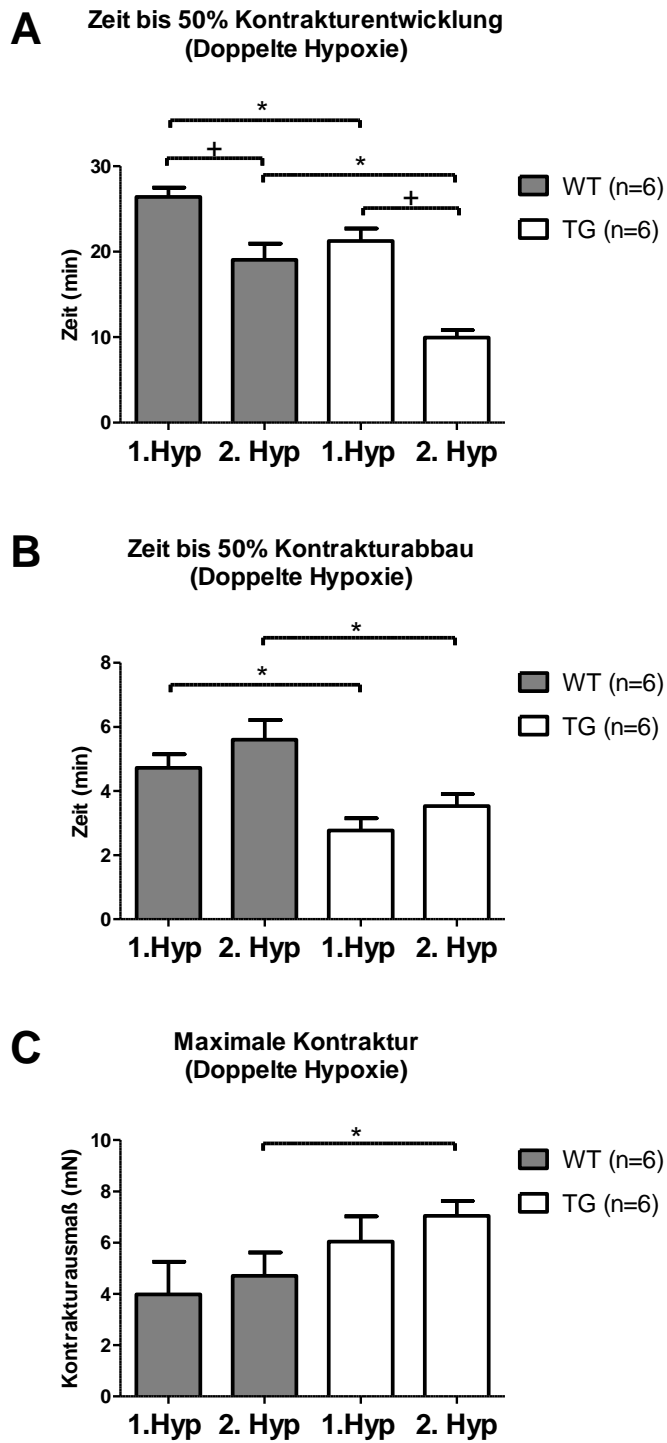


Abb. 17  
Kontrakturen der linken Vorhofpräparate unter Doppelter Hypoxie

**A** Zeit bis zur Entwicklung von 50% der maximalen Kontraktur. Ordinate: Zeit in min.  
**B** Zeit bis zum Abbau von 50% der maximalen Kontraktur. Ordinate: Zeit in min.  
**C** Maximal entwickelte Kontrakturen. Ordinate: Differenz des Kraftniveaus in mN.  
 WT, Wildtyp-Präparate; TG, transgene Präparate; \* $p < 0,05$  TG vs. WT; + $p < 0,05$  1. Hypoxie vs. 2. Hypoxie.

#### 4.8 Schlagfrequenzen der rechten Vorhofpräparate

Während bei der Untersuchung der elektrisch gereizten linken Vorhofpräparate die Messung der Kontraktionskräfte im Vordergrund stand, so konnten in den spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten die Schlagfrequenzen untersucht werden.

Wie in Punkt 4.2 beschrieben, wurde während der Zeitkontrolle schon zu Versuchsbeginn ein Frequenzunterschied zwischen TG und WT deutlich. Dieser war von der ersten ( $399 \pm 18$  bpm in TG vs.  $333 \pm 22$  bpm in WT,  $n = 6$ ) bis zur 50. Minute (mit  $385 \pm 18$  bpm in TG vs.  $316 \pm 25$  bpm in WT) vorhanden. Danach glichen sich die Frequenzen allmählich an. Transgene Präparate schlugen also von Beginn an mit einer höheren Frequenz als die Wildtyp-Präparate.

Bei Beobachtung des Einflusses der Zeit unter 90 Minuten normoxischen Bedingungen konnte keine Auswirkung auf die Schlagfrequenzen der rechten Vorhofpräparate gefunden werden, weder bei transgenen noch bei Wildtyp-Präparaten. Eine minimale Abnahme schien sich jedoch anzudeuten (bei TG mit  $380 \pm 22$  bpm nach 90 Minuten vs.  $399 \pm 19$  bpm zu Beginn, sowie bei WT mit  $327 \pm 26$  bpm nach 90 Minuten vs.  $333 \pm 22$  bpm zu Beginn, jeweils  $p > 0,05$ ,  $n = 6$ ).

Auch vor dem Einleiten der einfachen Hypoxie stellte sich in transgenen rechten Vorhofpräparaten bei Beginn der Aufzeichnung ( $376 \pm 10$  bpm in TG vs.  $324 \pm 14$  bpm in WT,  $n = 8$ ) bis zur Einleitung der ersten Hypoxie ( $349 \pm 10$  bpm in TG vs.  $297 \pm 17$  bpm in WT,  $n = 8$ ) eine erhöhte Frequenz im Vergleich zu WT ein.

Darauf folgte die Einleitung des Sauerstoffmangels. Während die Kontraktionen der linken Vorhofpräparate durch die elektrische Stimulation dauerhaft fortliefen, so begannen die Kontraktionen der rechten Vorhofpräparate zunächst mit einer geringeren Frequenz fortzulaufen und nach einer gewissen Dauer der Hypoxie zu sistieren. Die Schlagfrequenzen sanken also in jeder Hypoxie spätestens nach 10 Minuten auf 0. Nach wenigen Minuten der Reoxygenierung setzten die Kontraktionen dann spontan wieder ein und erreichten ein Niveau, das unter den prähypoxischen Werten lag.

Nach der ersten Hypoxie stiegen also die Schlagfrequenzen beider Gruppen an. Die der transgenen Vorhofpräparate erreichten hier wieder höhere Werte als die Wildtypen, ab Minute 40 der ersten Reoxygenierung wurden diese deutlich ( $325 \pm 13$  bpm in TG vs.  $258 \pm 28$  bpm in WT,  $n = 8$ ), der Unterschied deutete sich jedoch schon ab der 10. Minute nach Ende der Hypoxie an.

In der zweiten Hypoxie sanken die Schlagfrequenzen erneut auf 0. In der zweiten Reoxygenierung stiegen sie wieder in beiden Gruppen an. Hier erreichten die TG-



Vorhofpräparate ab Minute 20 der zweiten Reoxygenierung höhere Frequenzen als die WT-Präparate ( $280 \pm 17$  bpm in TG vs.  $222 \pm 16$  bpm in WT,  $n = 8$ ), was sich bis Versuchsende fortsetzte.

In der Versuchsreihe der Präkonditionierung konnte kein anfänglicher Frequenzunterschied gemessen werden. Hier begann der Versuch jedoch gleich mit einer 10-minütigen kurzen Hypoxiephase, sodass die Frequenzen zunächst auf 0 abfielen. In der darauffolgenden kurzen Reoxygenierungsphase konnte kein Unterschied festgestellt werden. Erst nach der eigentlichen Hypoxie und der daran anschließenden Reoxygenierung erreichten die transgenen Präparate 20 Minuten nach Ende der Hypoxie höhere Schlagfrequenzen als die WT-Präparate ( $334 \pm 21$  bpm in TG vs.  $259 \pm 26$  bpm in WT,  $n = 8$ ). Auch dieser Unterschied persistierte bis Versuchsende. TG-Präparate entwickelten also bei normoxischen Bedingungen fast immer höhere Schlagfrequenzen als WT-Präparate.

Bei einem Vergleich der Schlagfrequenzen beider Gruppen 30 Minuten nach jeder Hypoxie fiel zudem auf, dass alle Vorhofpräparate mit jeder Hypoxie an Frequenz einbüßten. Ein Unterschied zur Kontrollfrequenz nach 90 Minuten Normoxie entstand bei den WT erst nach zwei Hypoxiephasen ( $191 \pm 25$  bpm nach 2. Hypoxie vs.  $327 \pm 26$  bpm nach 90 min Normoxie,  $n = 8$ ). Bei den TG verringerten sowohl die doppelte Hypoxie ( $278 \pm 15$  bpm nach 2. Hypoxie vs.  $380 \pm 22$  bpm nach 90 min Normoxie) als auch die Hypoxie nach Präkonditionierung ( $337 \pm 16$  bpm nach Hypoxie mit Präkonditionierung vs.  $380 \pm 22$  bpm nach 90 min Normoxie) die Schlagfrequenz im Vergleich zum Zustand nach 90-minütiger Zeitkontrolle.

Abbildung 18 zeigt die Verläufe der Schlagfrequenzen der rechten Vorhofpräparate in den jeweiligen Versuchsreihen sowie einen Vergleich der Schlagfrequenzen zu dem jeweiligen Versuchsende für Wildtyp- und transgene Vorhofpräparate.

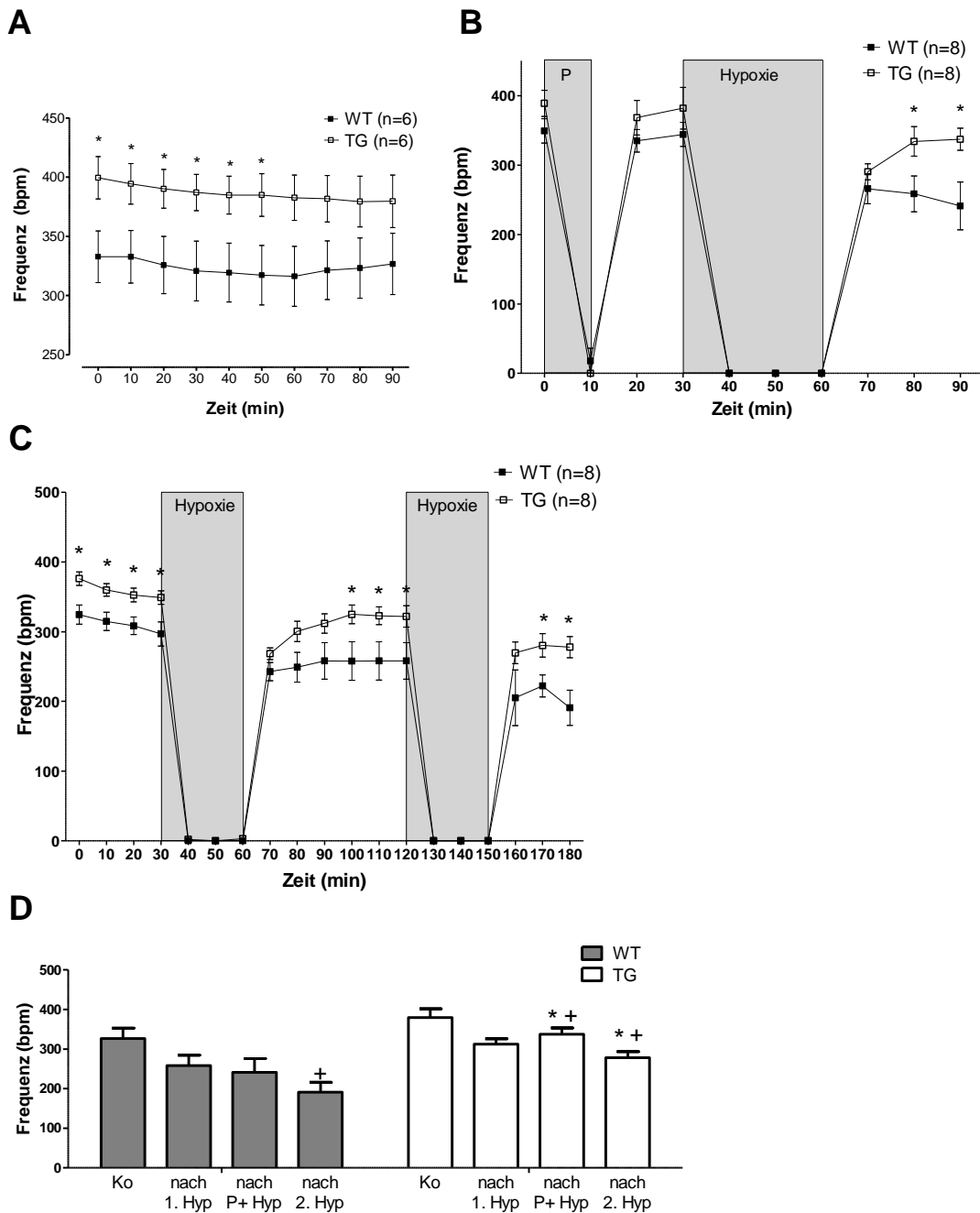


Abb. 18  
Schlagfrequenzen der spontan schlagenden rechten Vorhofpräparate im Vergleich WT vs. TG

**A** Frequenzen der Zeitkontrolle. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: Schlagfrequenz in bpm.  
**B** Frequenzen der Präkonditionierungsversuche. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: Schlagfrequenz in bpm.  
**C** Frequenzen der Doppelten Hypoxie. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: Schlagfrequenz in bpm.  
**D** Vergleich der Frequenzen zu Versuchsende der verschiedenen Versuchsprotokolle. Ordinate: Schlagfrequenz in bpm. Ko, Kontrollfrequenz nach 90 min Normoxie; Hyp., Hypoxie; P, Präkonditionierung.

\* $p < 0,05$  vs. WT; + $p < 0,05$  vs. Kontrolle; bpm, beats per minute, Schläge pro Minute.

#### 4.9 Erliegen und Wiedereinsetzen der Kontraktionen der rechten Vorhofpräparate unter Hypoxie

Wie bereits erwähnt stellten die Präparate der rechten Vorhöfe unter Hypoxie nach einigen Minuten ihre Kontraktionen ein und setzten diese kurze Zeit nach Wiederherstellung der Sauerstoffzufuhr fort. In Abb. 19A ist beispielhaft ein Mechanogramm eines rechten Vorhofs dargestellt. Man kann erkennen, dass bereits in der 10-minütigen Präkonditionierungsphase, aber auch in der tatsächlichen Hypoxie die Kontraktionen zum Erliegen kamen.

Da bei jedem Präparat unterschiedlich viel Zeit bis zum Ende und zum Wiedereinsetzen der Vorhofaktionen verging, wurden diese gemessen und miteinander verglichen. Schaut man sich diese zunächst für die kürzeste der Hypoxiephasen an, also für die 10 Minuten dauernde Präkonditionierung, so traten die Asystolien in TG- und WT-Vorhofpräparate etwa nach gleicher Zeit ein, wobei die transgenen Präparate scheinbar ein wenig eher zum Stillstand kamen. In der darauffolgenden 30-minütigen Hypoxie gab es ebenfalls keine Unterschiede der Zeiten bis zur Asystolie.

Beim Vergleich der Zeiten, nach denen im Präkonditionierungsversuch die Kontraktionen nach Reoxygenierung wieder einsetzten, gab es jedoch sichtbare Differenzen. Die transgenen Präparate brauchten länger als die Wildtyp-Präparate, um nach Herstellung der Normoxie wieder zu kontrahieren. Das galt sowohl für die Zeit nach der Präkonditionierung ( $2,44 \pm 0,53$  min in TG vs.  $1,03 \pm 0,27$  min in WT,  $n = 6$ ) als auch für die Zeit nach der halbstündigen Hypoxie ( $3,84 \pm 0,62$  min in TG vs.  $2,23 \pm 0,34$  min in WT,  $n = 6$ ).

Zudem fiel bei den Zeiten bis zum Wiedereinsetzen der Kontraktionen auf, dass sie bei den transgenen Vorhofpräparaten nach der 30-minütigen Hypoxie länger waren als nach der 10-minütigen Präkonditionierung. Scheinbar brauchten auch WT nach der eigentlichen Hypoxie mehr Zeit als nach der kurzen Präkonditionierung, jedoch konnte kein deutlicher Unterschied ermittelt werden.

Abbildung 19 B und C stellt die Zeiten bis zur Asystolie und bis zum Kontraktionseinsetzen vergleichend für die Hypoxie bei Präkonditionierung dar.

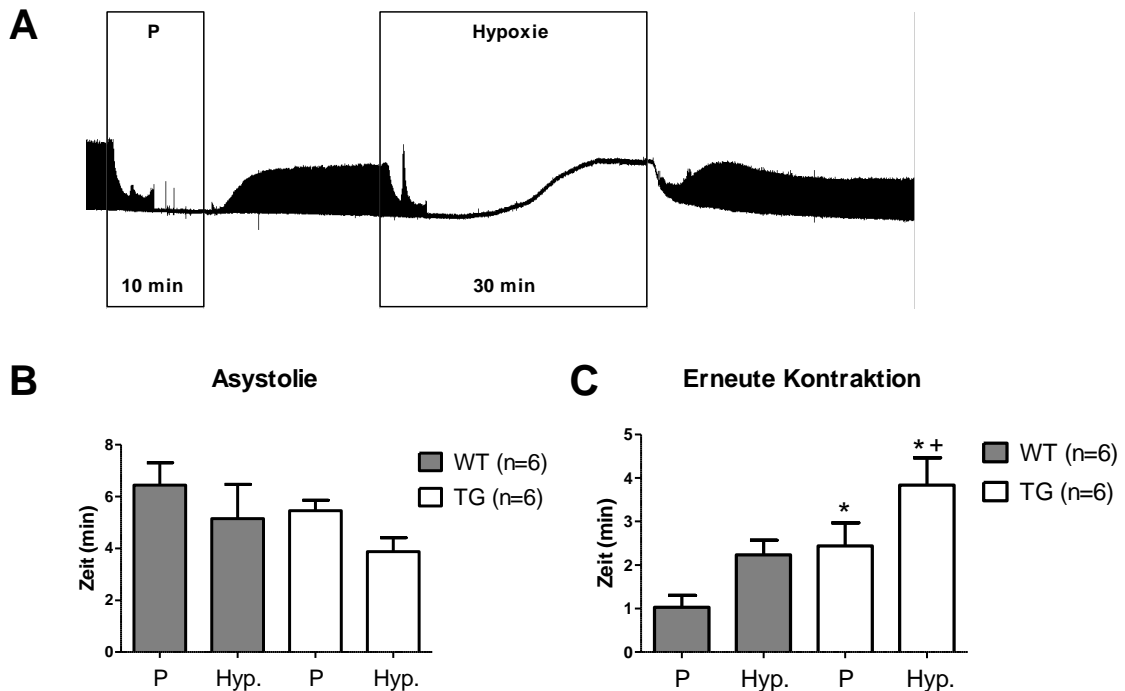


Abb. 19

Asystolien und Wiedereinsetzen der Kontraktion bei Präkonditionierung

**A** Mechanogramm eines rechten Vorhofpräparates unter Hypoxie mit Präkonditionierung. Die Asystolie ist durch den Abfall der Kontraktionskräfte zu erkennen. Zu sehen sind außerdem Arrhythmien nach Einsetzen der Hypoxie sowie kurz nach der Reoxygenierung, da hier die Konturen des Mechanogramms unregelmäßig werden. In der Hypoxie wurde eine Kontraktur entwickelt. Abszisse: Zeit in min. Ordinate: Kraft in mN.

**B** Zeiten bis zur Asystolie der rechten Vorhofpräparate für die Hypoxie bei Präkonditionierung. Ordinate: Zeit in min.

**C** Zeiten bis zum Wiedereinsetzen der Kontraktionen der rechten Vorhofpräparate für die Hypoxie bei Präkonditionierung. Ordinate: Zeit in min.

P, Präkonditionierung; Hyp., Hypoxie; WT, Wildtyp-Präparate; TG, transgene Präparate; \* $p < 0,05$  vs. WT; \*\* $p < 0,05$  vs. Wert nach Präkonditionierung.

Untersucht man analog die Versuche der doppelten Hypoxie bezüglich der Zeit bis zum Einsetzen der Asystolie, so gab es in keiner der beiden Hypoxien einen Unterschied zwischen TG und WT. Auffällig ist jedoch, dass im Verlauf der zweiten Hypoxie die transgenen Vorhofpräparate schneller ihre Kontraktionen einstellten als in der ersten Hypoxie. Ein ähnliches Verhalten deutete sich bei WT ebenfalls an. Es scheint also, dass eine zweite Hypoxie schneller zum Erliegen der Vorhofaktionen führte als die erste.

Auch in dieser Versuchsreihe setzten die Kontraktionen der transgenen Vorhofpräparate später wieder ein als die der Wildtyp-Präparate. Nach Beendigung der ersten Hypoxie geschah dies in der Gruppe der TG nach  $3,00 \pm 0,40$  min und in der Gruppe der WT schon nach  $1,83 \pm 0,30$  min ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). Auch nach dem Ende der zweiten Hypoxie

erholten sich die Kontraktionen der TG-Vorhofpräparate später als die der WT ( $3,49 \pm 0,37$  min in TG vs.  $2,40 \pm 0,23$  min in WT,  $n = 6$ ).

Abbildung 20 vergleicht die Zeiten bis zum Erliegen und Wiedereinsetzen der Kontraktionen der rechten Atrien während der Doppelten Hypoxie.

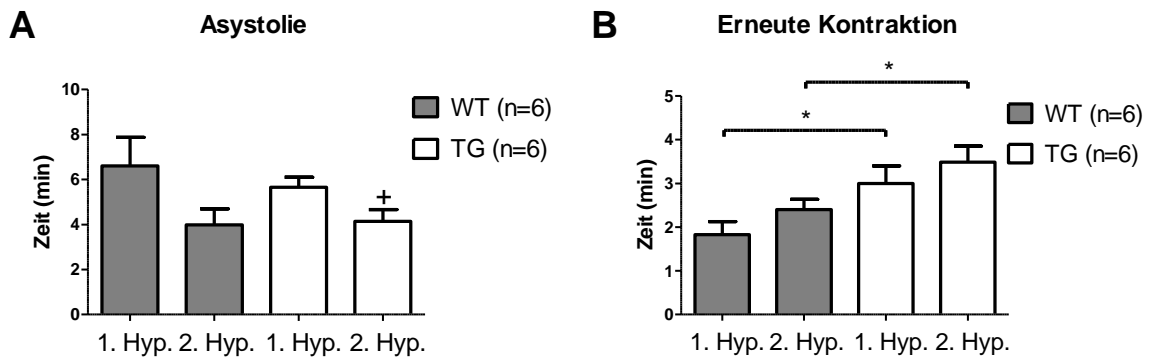


Abb. 20  
Asystolien und Wiedereinsetzen der Kontraktion bei doppelter Hypoxie

**A** Zeiten bis zur Asystolie der rechten Vorhofpräparate. Ordinate: Zeit in min.

**B** Zeiten bis zum Wiedereinsetzen der Kontraktionen der rechten Vorhofpräparate. Ordinate: Zeit in min.

Hyp., Hypoxie; WT, Wildtyp-Präparate; TG, transgene Präparate; \* $p < 0,05$  vs. WT; + $p < 0,05$  vs. Wert nach 1. Hypoxie.

Es lässt sich also feststellen, dass transgene rechte Mäusevorhöfe nach einer Hypoxie etwas später mit ihren Kontraktionen wieder einsetzten als Wildtyp-Vorhofpräparate. Die Einstellung einer Asystolie fand jedoch in beiden Gruppen etwa zur gleichen Zeit statt.

#### 4.10 Arrhythmien der rechten Vorhofpräparate

Bei Einleitung der Hypoxiephasen wurden die Kontraktionen der rechten Vorhofpräparate zunächst langsamer und bildeten dann Arrhythmien aus, bevor sie endgültig stillstanden. Auch nach Reoxygenierung traten solche Abweichungen von einem regelmäßigen Rhythmus regelhaft auf. Dargestellt ist eine solche Arrhythmie in Abb. 20A. Unterschiedlich für jedes Präparat waren die Zeiten, nach denen sich unter Hypoxie die ersten Arrhythmien ausbildeten bzw. die letzten Arrhythmien nach Reoxygenierung auftraten. Es ist zu bemerken, dass praktisch alle Vorhofpräparate gegen Ende der Versuchsaufzeichnung vereinzelte arrhythmische Kontraktionen aufzeigten. Deshalb wurde für die Zeit bis zur letzten Arrhythmie nach Reoxygenierung der Zeitpunkt verwendet, zu dem das Präparat mind. eine Minute keine arrhythmischen Kontraktionen durchführte. Diese Arrhythmie-freie Zeit wurde von wenigen Präparaten

auch bis Versuchsende nicht erreicht, weswegen sie nicht für die Berechnung verwendet wurden.

Bei der Untersuchung der Zeit bis zur ersten Arrhythmie in der Versuchsreihe der Präkonditionierung konnte keine Differenz zwischen TG und WT gefunden werden.

Vergleicht man hingegen die Zeiten bis zur letzten Arrhythmie, so waren diese bei TG länger als bei WT. Das traf sowohl auf die Reoxygenierung nach der Präkonditionierung ( $3,79 \pm 0,41$  min in TG ( $n = 5$ ) vs.  $2,10 \pm 0,45$  min in WT ( $n = 6$ )) als auch auf die Reoxygenierung nach der halbstündigen Hypoxie zu ( $15,25 \pm 3,82$  min in TG ( $n = 5$ ) vs.  $5,18 \pm 0,85$  in WT ( $n = 6$ )).

Abbildung 21 zeigt eine Übersicht über die Arrhythmieausbildung in der Versuchsreihe der Präkonditionierung.

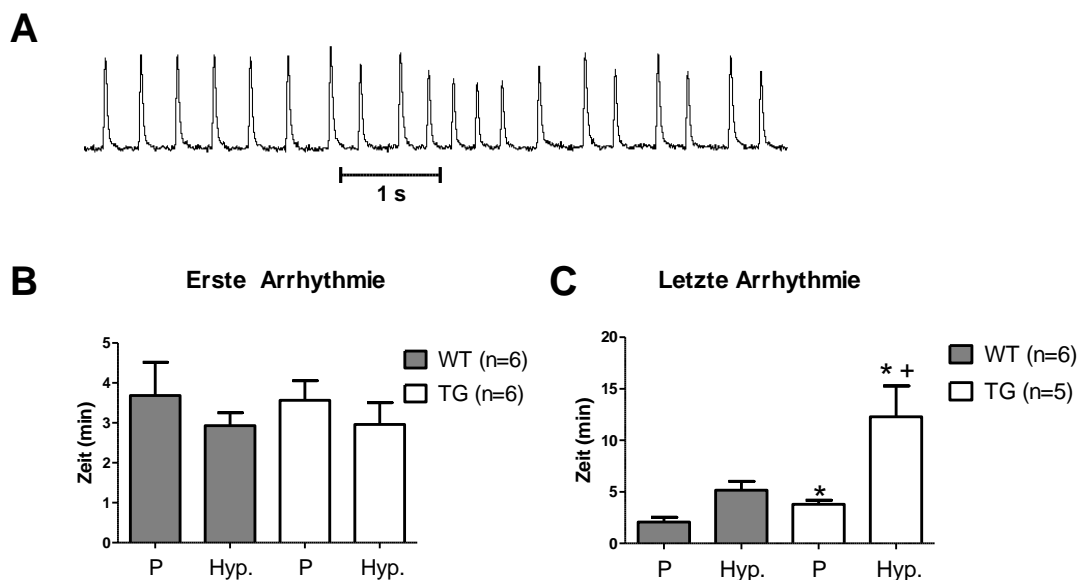


Abb. 21

Arrhythmien der rechten Vorhofpräparate unter Hypoxie bei Präkonditionierung

**A** Ausschnitt mit arrhythmischen Einzelkontraktionen eines rechten Vorhofpräparates. Die zunächst gleichmäßigen Kontraktionen gehen in Kontraktionen mit unterschiedlicher Frequenz und Kraft über. Abszisse: Zeit in s. Ordinate: Kraft in mN.

**B** Zeiten von der Hypoxieeinleitung bis zur ersten Arrhythmie der rechten Vorhofpräparate während der Präkonditionierung und der Hypoxie nach Präkonditionierung. Ordinate: Zeit in min.

**C** Zeiten vom Beginn der Reoxygenierung bis zur letzten Arrhythmie der rechten Vorhofpräparate für die Präkonditionierung und die Hypoxie nach Präkonditionierung. Ordinate: Zeit in min.

P, Präkonditionierung; Hyp., Hypoxie; WT, Wildtyp-Präparate; TG, transgene Präparate; \* $p < 0,05$  vs. WT; + $p < 0,05$  vs. Wert nach Präkonditionierung

Die Analyse der Zeiten der Arrhythmien in der doppelten Hypoxie ergab ähnliche Ergebnisse. Die Zeiten von Hypoxieeinleitung bis zum Auftreten der ersten Arrhythmien

waren nicht unterschiedlich zwischen TG- und WT-Vorhofpräparate. Doch auch hier war diese Zeit für beide Gruppen in der zweiten Hypoxie tendenziell geringer als in der ersten Hypoxie, wenngleich die Unterschiede nicht signifikant waren (TG 1. vs. 2. Hypoxie:  $p = 0,069$ ; WT 1. Vs 2. Hypoxie:  $p = 0,103$ ,  $n = 6$ ).

Die Zeit bis zur letzten Arrhythmie nach Beginn der Reoxygenierung war bei transgenen Präparaten wiederum länger als bei Wildtyp-Präparaten. Dieser Unterschied wurde hier ebenfalls in der ersten ( $9,01 \pm 0,97$  min bei TG vs.  $5,44 \pm 0,78$  min bei WT,  $n = 6$ ) und auch in der zweiten Hypoxie ( $7,91 \pm 0,89$  min bei TG vs.  $4,53 \pm 0,71$  min bei WT,  $n = 6$ ) beobachtet. Vergleicht man hier die Zeiten bis zur letzten Arrhythmie der zweiten Hypoxie mit denen der ersten Hypoxie, war bei WT und TG kein Unterschied festzustellen.

Dargestellt sind die Vergleiche der Arrhythmiezeiten der doppelten Hypoxie in Abbildung 22.

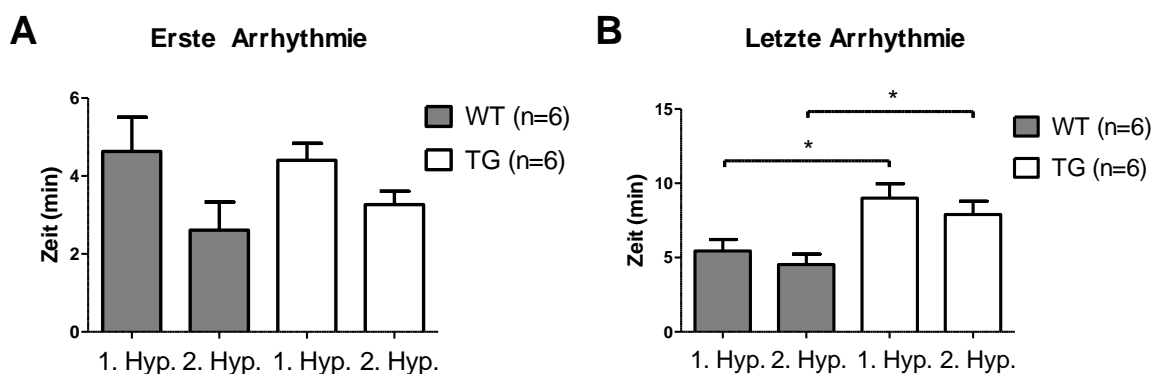


Abb. 42

Arrhythmien der rechten Vorhofpräparate unter doppelter Hypoxie

**A** Zeiten von Hypoxieeinleitung bis zur ersten Arrhythmie der rechten Vorhofpräparate für beide Phasen der Hypoxie bei doppelter Hypoxie. Ordinate: Zeit in min.

**B** Zeiten vom Beginn der Reoxygenierung bis zur letzten Arrhythmie der rechten Vorhofpräparate für beide Reoxygenierungsphasen bei doppelter Hypoxie. Ordinate: Zeit in min.

Hyp., Hypoxie; WT, Wildtyp-Präparate; TG, transgene Präparate; \* $p < 0,05$  vs. WT.

Die transgenen Präparate zeigen nach einer hypoxischen Phase also länger arrhythmische Kontraktionen als die Wildtyp-Präparate. Sowohl nach einfachen und doppelten Hypoxien als auch nach einer Hypoxie mit vorhergehender Präkonditionierung. Dass sie nach Beginn des Sauerstoffmangels schneller Arrhythmien ausbildeten, konnte nicht gezeigt werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methoden

#### 5.1.1 Mausmodell

In den Experimenten wurde ein transgenes Mausmodell genutzt, das wie in Punkt 3.2 beschrieben generiert wurde.

Aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten genetischer Manipulationen und einer einfachen Zucht und Haltung ist die Maus ein etabliertes Versuchstier für die Untersuchung kardialer Funktionen. Trotz der Unterschiede in der Größe und der Herzfrequenz ist das Herz der Maus dem des Menschen anatomisch ähnlich. Damit gilt es als geeignetes Modell zur Erforschung des menschlichen Herzens (Wessels und Sedmera 2003). Es ermöglicht eine einfachere Manipulation und Untersuchung, die an menschlichen Herzen nicht möglich wären. Die dabei gewonnenen Ergebnisse lassen sich jedoch nicht uneingeschränkt auf das menschliche Herz übertragen. Sie geben zuvorderst Aufschluss über grundlegende Funktionen z.B. der PP2C $\beta$  im Herzen.

Besonders bei der Untersuchung der Schlagfrequenzen ist zu beachten, dass Mausherzen *in vivo* eine Herzfrequenz zwischen 500 und 790 bpm aufweisen. Die Dauer eines Herzzyklus beträgt damit nur etwa 1/10 der Dauer eines menschlichen Herzzyklus (James et al. 1998). In den Kontrollexperimenten betragen die Schlagfrequenzen nur  $399 \pm 18$  bpm in TG bzw.  $333 \pm 22$  bpm in WT. Damit liegen alle Präparate dieser experimentellen Arbeit deutlich unter den physiologischen Werten. Dies wird in vielen Untersuchungen an murinen Herzen beobachtet, obgleich eine verminderte Herzfrequenz die kardiale Physiologie stark modifiziert (Kass et al. 1998). Eine mögliche Ursache ist das Fehlen der komplexen Einflüsse auf die Herzaktivität im lebenden Organismus wie zirkulierende Hormone, hämodynamische Reflexe und die autonome Innervation durch sympathische und parasympathische Nervenfasern (Choate und Feldman 2003). Auch ist nicht auszuschließen, dass der Prozess der Gewinnung und Isolierung der Vorhofpräparate bleibende Auswirkungen auf die Funktion der Schrittmacherzellen hat. Als Auslöser kämen u.a. das Anästhetikum, mechanische Belastungen oder kurzzeitige Temperaturabfälle in Frage. Wie die gefundenen Differenzen zwischen TG und WT *in vivo* ausfallen würden, lässt sich deshalb also eingeschränkt beurteilen, ebenso wie sie im humanen Herzen anzutreffen wären.



Die Proteinphosphatase 2C ist in allen Organismen stark konserviert und weist eine hohe Sequenzähnlichkeit in Menschen, Mäusen, Kühen und anderen Säugetieren auf (Lammers und Lavi 2007). Aus diesem Grunde kann spekuliert werden, dass auch ihre Funktionen in diesen Spezies weitgehend ähnlich sind. Bekannt ist, dass die PP2C eine negative Regulation von Stress-Signalen in Bakterien, Pflanzen, Säugetieren und Hefe bewirkt (Fjeld und Denu 1999). Die Wirkungen der erhöhten Expression auf ein Mäuseherz könnten also mit den Wirkungen auf ein menschliches Herz vergleichbar sein. Auch die Gewinnung der kodierenden DNA für die PP2C $\beta$  aus bovinen Retinae scheint die Übertragbarkeit der Ergebnisse aufgrund der starken Sequenzhomologie nicht bedeutsam einzuschränken, denn die Sequenzen der einzelnen Isoformen sind innerhalb der Säugetiere zu über 90% identisch (Travis und Welsh 1997).

Da in den durchgeführten Experimenten die  $\beta$ -Isoform der PP2C verwendet wurde und die Isoformen sich (wie in der Einleitung beschrieben) in ihren Funktionen unterscheiden, sind die gefundenen Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf die anderen Isoenzyme übertragbar. Während PP2C $\beta$  wie die meisten PP2C-Formen in allen Geweben zu finden ist, so zeigt sie ihre höchste Konzentration u.a. im Herzgewebe (Lammers und Lavi 2007). Eine besondere Bedeutung für die kardiale Funktion scheint bei ihr demnach wahrscheinlich.

Um die gefundenen Unterschiede auch auf die Überexpression der PP2C $\beta$  zurückführen zu können, muss sichergestellt werden, dass sich TG von WT in dieser Überexpression unterscheiden. Das Vorhandensein der PP2C $\beta$ -Sequenz im Genom der transgenen Mäuse wurde mittels Genotypisierung nachgewiesen. Dies allein gibt jedoch keine Sicherheit, dass die Phosphatase auch verstärkt exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde für diese transgene Mauslinie in vorhergehenden Experimenten eine kardiale Überexpression mittels Western Blot und eine erhöhte kardiale Phosphataseaktivität dargestellt (Bollmann et al. 2020).

### 5.1.2 Kontraktionsexperimente

Für die Kontraktionsexperimente wurden die isolierten Herzvorhöfe der Versuchstiere verwendet. Sie stellen modellhaft die Kontraktionen lebendiger Vorhofmuskulatur dar, nicht aber des kompletten Organs. Die Verwendung isolierter Organe verhindert den Einfluss modulierender nichtkardialer Reaktionen des Organismus, u. a. neuronaler und humoraler Reaktionen (z.B. über Katecholaminausschüttungen). Mögliche Veränderungen der Herzfunktion durch die PP2C $\beta$  könnten daher *in vivo* andere Folgen zeigen als *in vitro*. Auch kann trotz Narkotisierung der Versuchstiere nicht komplett

ausgeschlossen werden, dass eine präterminale Stressreaktion oder auch die Präparation der Vorhöfe Myokardschädigungen nach sich ziehen, die die Unterschiede zwischen WT und TG beeinflussen.

Um eine mechanische Schädigung zu minimieren, wurden die Vorhöfe beider Gruppen mit äußerster Sorgfalt präpariert. Eine solche Schädigung äußerte sich mit verminderter Kontraktionskraft in den linken sowie vermehrten Arrhythmien und Bradykardien in den rechten Vorhofpräparaten. Beschädigte Präparate (basale Kraft  $F < 1$  mN; basale Arrhythmien) traten in beiden Versuchsgruppen auf und wurden für die Berechnungen nicht verwendet.

Makroskopisch sichtbare Unterschiede zwischen WT und TG bezüglich der Größe der Herzvorhöfe sind bei den eingeschlossenen Tieren nicht beobachtet worden. Bei hypertrophierten Vorhöfen wäre ein Unterschied in der Präparation denkbar gewesen, da größere Vorhöfe vermeintlich leichter zu isolieren wären. Doch obwohl eine erhöhte PP2C $\beta$ -Konzentration eine kardiale Hypertrophie zu verursachen scheint, zeigten die Vorhöfe bisher keine Unterschiede in ihrer Größe (Bollmann et al. 2020).

Die Versuchsanlagen wurden für die jeweiligen Präparate von TG und WT regelmäßig getauscht, um eventuelle Messungenauigkeiten der einzelnen Anlagen auszugleichen. Da die Tyrode-Lösung an allen Versuchstagen frisch hergestellt wurde, sind tagesabhängige minimale Schwankungen der jeweiligen Stoffkonzentrationen nicht vollständig auszuschließen. Die Versuche wurden aber immer parallel an WT und TG durchgeführt, sodass zeitabhängige Störfaktoren immer beide Versuchsgruppen betrafen.

Eine Verblindung war aufgrund des Versuchsaufbaus nicht möglich. Von Versuchsbeginn an war der genetische Status der Versuchstiere bekannt und wurde regelmäßig dokumentiert, um eine Verwechslung auszuschließen. Auch bei der Auswertung der Experimente war keine Verblindung gewährleistet. Eine mögliche Verzerrung durch den Rosenthaleffekt kann also nicht ausgeschlossen werden (Rosenthal und Lawson 1964).

In den Experimenten wurden intermittierend Hypoxien an den Vorhofpräparaten simuliert, indem die Begasung gewechselt und der gelöste Sauerstoff aus der Tyrode-Lösung verdrängt wurde. Diese reine Hypoxie ist mit einer Ischämie nur bedingt zu vergleichen. Eine Ischämie bedeutet Minderdurchblutung oder Durchblutungsstopp und stellt die klinisch wohl bedeutsamste Ursache einer Hypoxie der Herzmuskulatur dar (v. a. im Rahmen eines Koronararterienverschlusses). Dabei kommen jedoch zu dem Sauerstoffmangel noch eine versiegende Nährstoffversorgung, ein fehlender

Abtransport von Abbauprodukten und ein mangelnder Ausgleich des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes (Ošťádal und Kolář 2011). All diese Faktoren konnten mit dem genutzten Versuchsaufbau nicht simuliert werden. Dafür sind andere Modelle wie die Langendorff-Apparatur besser geeignet (Lossi et al. 2016) und in anderen Untersuchungen bereits genutzt worden (Bollmann et al. 2020).

In den durchgeführten Versuchen mit Präkonditionierung konnte kein Effekt dieser Behandlung für die Vorhoffunktion gezeigt werden. Dafür könnten – neben der geringen Versuchstierzahl – verschiedene Ursachen in Frage kommen. In unseren Experimenten wurde die Hypoxie mit folgender Reoxygenierung bereits 20 Minuten nach der Präkonditionierung eingeleitet. Eine größere protektive Wirkung wurde bisher in der Regel erst nach längeren Zeiträumen nach der Präkonditionierung beobachtet, nämlich bis zu 24h später (Mallet et al. 2018). Zudem sahen viele Protokolle der intermittierenden Hypoxie-induzierten Kardioprotektion (ICH) mehrere Zyklen kurzen Sauerstoffmangels vor, zum Beispiel vier fünfminütige Episoden (Sprick et al. 2019). Zu erwähnen ist auch, dass viele dieser Untersuchungen als Endpunkt die Infarktgröße der Herzen bei künstlich erzeugter Ischämie bewerteten. In den hier durchgeführten Versuchen wurde hingegen nur eine (nicht-ischämische) Hypoxie bei erhaltener Perfusion simuliert und ein Zelluntergang sollte weitgehend vermieden werden. Zudem wurde lediglich die Funktion der Vorhofpräparate beurteilt, nicht die histopathologischen Folgen der hypoxischen Phasen.

## 5.2 Zeitkontrolle

Bereits zu Beginn der Versuche konnte ein Unterschied in der Ausgangslage beider Gruppen festgestellt werden. In den transgenen rechten Vorhofpräparaten war die Schlagfrequenz höher als in denen der WT. In allen Versuchsreihen zeigten transgene Präparate der rechten Vorhöfe vor und nach der Hypoxie höhere Frequenzen.

Hierfür kommen verschiedene Erklärungsansätze in Frage, da die Herzfrequenz eines Mäuseherzen durch unterschiedliche Mechanismen beeinflusst wird. In vorhergehenden Experimenten konnten unter Überexpression von PP2C $\beta$  eine kardiale Hypertrophie sowie eine verringerte linksventrikuläre Ejektionsfraktion beobachtet werden (Bollmann et al. 2020). Auch die gefundenen Defizite myokardialer Kontraktilität könnten Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Auswurfleistung transgener Herzen liefern. Für die Aufrechterhaltung eines ausreichenden Herzzeitvolumens und eine suffiziente Organperfusion ist damit eine erhöhte Schlagfrequenz auch in Ruhe notwendig. Dieser

Mechanismus der Gegenregulation könnte *in vivo* dazu führen, dass eine permanente Erhöhung der Basalfrequenz (zum Beispiel durch erhöhte Aktivität der  $I_f$ -Kanäle) notwendig wird, die sich dann *in vitro* nachweisen lässt.

Eine Frequenzbeeinflussung durch Dephosphorylierung wurde bereits beobachtet. Die Proteinphosphatase 2A verringert bei erhöhter Aktivität die basalen Schlagraten in transgenen Mäusen (Little et al. 2015). Die Proteinphosphatase 2C dagegen scheint durch substratspezifische Dephosphorylierung in andere Signalwege einzugreifen und die Herzfrequenz damit direkt oder indirekt zu beeinflussen. In den Untersuchungen von Bollmann et al. (2020) wurde gezeigt, dass unter den Substraten der PP2C $\beta$  u.a. der Ryanodinrezeptor (RyR) und Phospholamban (PLB) zu finden sind. Dies sind beides Moleküle, die in der „*membrane clock*“ und in der „*Ca<sup>2+</sup>-clock*“ der Schrittmacherzellen von Bedeutung sind (Vinogradova und Lakatta 2021). Diese sog. „*clocks*“ sind zyklische zelluläre Vorgänge, die über Ionenströme das Potential der kardialen Schrittmacherzellen regelmäßig beeinflussen und so den typischen Rhythmus der Depolarisierung nach sich ziehen. Damit sind also bereits Mechanismen bekannt, über die die PP2C $\beta$  möglicherweise eine Wirkung auf die Schlagfrequenzen ausüben kann.

Abgesehen von der Schlagfrequenz verhielten sich die Präparate unter physiologischen Versuchsbedingungen ähnlich. Dies legt nahe, dass eine funktionelle Beeinflussung der linken Vorhöfe durch die Überexpression der PP2C $\beta$  erst unter pathologischen Bedingungen beobachtbar wird.

Im Zeitverlauf nahm die Schlagkraft in allen Präparaten kontinuierlich ab. Vermutlich liegt hier die Abnahme der Spannung der Aufhängung der Präparate zugrunde. Die andauernden isometrischen Kontraktionen und die Aufhängung an den Metallhaken ziehen mechanische Veränderungen des Gewebes nach sich. In Folge vermindert sich die Vorspannung und die Kontraktionen verlieren an Kraft.

### 5.3 Vorhofkontraktionen unter Hypoxie

Nach hypoxischer Belastung der Vorhofpräparate beider Versuchsgruppen konnten Unterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden werden. Die Überexpression von PP2C $\beta$  beeinträchtigte die Kontraktionskraft unter Hypoxie sowie die Erholung der Präparate, und begünstigte die Entwicklung von Kontrakturen, Arrhythmien und erhöhten Schlagfrequenzen.

Es ist bekannt, dass Proteinphosphatasen bei der Reaktion der Herzzellen auf Hypoxien von Bedeutung sind. Viele Proteine, die unter hypoxischem Stress induziert werden, werden über Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen reguliert.

Zu ihnen zählt die Hämoxigenase-1. Diese ist ein Stressprotein, das für den Häm-Abbau bei Sauerstoffmangel von Bedeutung ist. Ihre Expression wird durch Dephosphorylierung (hauptsächlich durch die Proteinphosphatase 1) vermindert (Wu et al. 2004). Auch die kardioprotektive Wirkung der Proteinkinase C wird durch Phosphatasen antagonisiert, indem ihren Substraten (u. a. Phospholamban, Troponin I, mitochondriale ATP-sensitive Kaliumkanäle) der Phosphat-Rest entzogen wird (Yamamura et al. 2005). Phosphatasen scheinen im Herzmuskel also die physiologischen Reaktionen auf Sauerstoffmangel allgemein zu beeinträchtigen.

Die Annahme, dass aktive Proteinphosphatasen bei Hypoxie eher ungünstig für die Zellen sind, wird von Untersuchungen aus Zellkulturen unterstützt. Diese zeigten, dass Hypoxien Auswirkungen auf die Phosphataseaktivität u. a. in menschlichen Herzmuskelzellen haben. Mediiert durch den Hypoxie-induzierten Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ) sinkt bei Sauerstoffmangel die allgemeine Phosphataseaktivität im Herzmuskel (Elgenaidi und Spiers 2019). Die gesunde Myokardzelle reguliert demnach die Phosphataseaktivität herunter, sobald die Sauerstoffversorgung knapp wird.

Wenngleich diese allgemeine Phosphataseaktivität nur zu einem kleinen Teil durch die Proteinphosphatase 2C übernommen wird, so scheint auch ihre Überexpression negative Auswirkungen auf die Reaktionen auf hypoxischen Stress zu haben. Es ist anzunehmen, dass auch die PP2C die physiologischen Hypoxie-induzierten Signalwege unterbrechen und damit einer Kardioprotektion entgegenwirken kann. Dies wiederum kann als Erklärung für die in dieser Arbeit beschriebenen funktionellen Defizite der Vorhofpräparate unter Hypoxie dienen.

So wurde zum Beispiel gezeigt, dass verringerte PP2C-Spiegel in sportlich aktiven Mäusen mit verminderter Infarktgröße und verstärkten kardioprotektiven Signalwegen assoziiert sind (Pons et al. 2013). Damit lässt sich im Umkehrschluss vermuten, dass erhöhte PP2C-Spiegel verminderte kardioprotektive Signalwege nach sich ziehen und damit eine schlechtere Reaktion auf hypoxische Zustände bewirken. Einige dieser Schnittstellen, an denen die PP2C eingreift, sind bereits gefunden worden.

Bisher wurde ein Einfluss der PP2C auf Differenzierung, Proliferation, Wachstum, Überleben und Metabolismus von Zellen beschrieben (Lu und Wang 2008).

Ein wichtiges Substrat der PP2C ist die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), ein durch ATP-Mangel aktiviertes Enzym, welches wie ein zellulärer Energiesensor die energieaufwendigen Reaktionen (wie Protein- oder Lipidsynthese) abschalten kann. Die Aktivierung der AMPK erfolgt durch Phosphorylierung am Threonin-172-Rest bei ATP-Mangel (Salminen et al. 2016). Die Dephosphorylierung an dieser Stelle und damit die Hemmung der AMPK erfolgt u.a. durch die PP2C (Chida et al. 2013). Die Inhibition der AMPK hat eine gestörte Energiehomöostase zur Folge und wirkt sich über verschiedene Langlebigkeits-Signalwege negativ auf die Lebensspanne von Zellen aus (Salminen et al. 2016). Damit kann die verstärkte PP2C-Aktivität die Energiehomöostase stören, was in Energiemangelzuständen - wie sie u.a. unter Hypoxie herrschen - besonders von Bedeutung ist.

Sichtbar wird der Effekt auf die AMPK in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. Dieses Krankheitsbild ist mit erhöhten Spiegeln von Angiotensin II (AT II) assoziiert. Die Effekte des AT II auf die AMPK werden dabei durch eine Hochregulierung der PP2C $\alpha$  mediiert (Tabony et al. 2011). Die Folgen sind mitochondriale Funktionsstörungen durch gestörte Autophagie, verringerte ATP-Spiegel und vermehrter Schwund von Skelettmuskel (Tabony et al. 2014). Hier wurde also eine deutliche Assoziation von erhöhter PP2C-Aktivität mit Herzinsuffizienz gezeigt.

Auch die NF- $\kappa$ B-Wirkung wird von PP2C beeinflusst. Die Isoenzyme PP2C $\alpha$  und - $\beta$  dephosphorylieren die  $\beta$ -Untereinheit des I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase-Komplex (IKK $\beta$ ) und terminieren damit die TNF $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Sun et al. 2009). Sie begrenzen die NF- $\kappa$ B-vermittelten Effekte, die u.a. für Entzündung, Immunantwort und antiapoptotische Antworten auf Stress-Signale von Bedeutung sind (Karin und Ben-Neriah 2000). Somit scheint die Überexpression der PP2C auch in diesem Signalweg die Reaktion auf Stressreize zu beeinträchtigen.

Weiterhin greifen einige der PP2C-Isoenzyme in verschiedene MAP-Kinase-Kaskade-Signalwege ein und ändern so die zelluläre Antwort auf Stress-Signale. Beispielsweise wird die Apoptose-Signal-regulierende Kinase 1 (ASK1) durch PP2C $\epsilon$  negativ reguliert (Saito et al. 2007). Die ASK1 wird u. a. durch Fas, TNF- $\alpha$  und auch durch oxidativen Stress aktiviert. Eine verlängerte ASK-1-Aktivität führt zu mitochondrial vermittelter Apoptose (Matsukawa et al. 2004). Sie begünstigt Herzdilatation und Myokardfibrose (Watanabe und Otsu 2004).

Die PP2C beeinflusst auch verschiedene Komponenten des Phosphoinositol-3-Kinase-Akt Signalweges. So dephosphoryliert PP2C $\alpha$  die p85-Untereinheit der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K) und verstärkt ihre Lipidkinaseaktivität in Adipozyten (Yoshizaki et al. 2004). Die Isoenzyme PHLPP1 und -2 dephosphorylieren das Akt-Protein und deaktivieren es (Brognard et al. 2007). Über diese Mechanismen ist die PP2C an der Regulation von Zellwachstum, -differenzierung und -überleben beteiligt (Lu und Wang 2008).

Die aktivierenden Phosphorylierungen der Cyklin-abhängigen Kinase 2 (Cdk2) im Menschen werden ebenfalls durch PP2C-Formen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) entfernt (Cheng et al. 2000). Die Cdk2 wirkt als Mediator für die Apoptose in Herzzellen, u. a. nach Hypoxie (Hauck et al. 2002). Eine inhibierte Cdk2 stört die Progression des Zellzyklus und kann eine vorzeitige Seneszenz bewirken (Volkart et al. 2019). Dieser Mechanismus kann in Tumorzellen von Vorteil sein. In gesundem Myokard hingegen ist eine (PP2C-vermittelte) vorzeitige Zellerterung, die durch Stress-Signale wie Sauerstoffmangel beschleunigt wird, von Nachteil.

Die PP2C-Unterformen sind auch im Mitochondrium von Bedeutung. Aufgrund phylogenetischer Sequenzanalysen ist sogar anzunehmen, dass die Vorgänger der PP2C-Gruppe in Bakterien entstanden und erst über die mitochondriale Endosymbiose den Weg in eukaryotische Zellen fanden (Kerk et al. 2015).

Im Menschen ist z.B. die mitochondriale PP2C (PP2Cm) von Bedeutung für die Membranpermeabilität von Mitochondrien. Ein Knockout in Zebrafischen war mit Zelluntergang und kardialen Fehlbildungen assoziiert (Lu et al. 2007). Während die PP2Cm keine Auswirkung auf die oxidative Phosphorylierung zu haben scheint, ist sie dennoch ein Regulator im Zellüberleben (Lu et al. 2009). Die PP2C $\alpha$  hingegen ist bei AT-II-vermittelter Hochregulation mit mitochondrialen Funktionsstörungen assoziiert (Tabony et al. 2014).

Damit übt die PP2C Einfluss auf die Funktion der Mitochondrien und folglich den Energiehaushalt und das Überleben der Zelle aus. Diese sind wichtige Faktoren für die Funktion der Herzzelle, deren Bedeutung unter hypoxischem Stress sogar zunimmt.

Die vielfältigen bisher beschriebenen Signalwege, die durch die PP2C beeinflusst werden, wirken sich also auch auf die Herzfunktion aus. Bislang gibt es jedoch keine Untersuchungen zur Wirkung der PP2C auf die kardiale Funktion unter Hypoxieeinfluss.

## 5.4 Klinische Relevanz

Herzerkrankungen sind weltweit als Gesundheitsproblem von größter Bedeutung. Laut WHO stehen sie auf Platz 1 der globalen Todesursachen (World Health Organization 2018) und besonders in unserer alternden Gesellschaft nimmt ihre Relevanz stetig zu. Ein genaues Verständnis der verschiedenen kardialen Krankheitsbilder kann dabei neue Therapien ermöglichen und vielen Menschen von Nutzen sein. Unter den kardialen Erkrankungen steht die Herzinsuffizienz an der Spitze der häufigsten Todesursache der westlichen Welt. Sie wird durch verschiedene Mechanismen ausgelöst, zu denen auch die Koronare Herzkrankheit gehört. Hier kommt es durch Gefäßveränderungen in verschiedenem Ausmaß zu ischämischen Episoden im Myokard. Um die Herzinsuffizienz behandeln zu können, ist ein möglichst genaues Verständnis über die Mechanismen nötig, die ihr zugrunde liegen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente an isolierten Vorhofpräparaten simulieren modellhaft verschiedene nicht-ischämische hypoxische Ereignisse am Herzmuskel und geben Hinweise, welche Veränderungen auch im lebenden Organ beobachtbar sein könnten. Zudem ermöglichen sie eine Untersuchung des Einflusses der PP2C $\beta$  unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Die Funktion vieler Proteine im Herzen ist durch posttranslationale Modifikation über verschiedene Signalwege reguliert. Die vorherrschende Form dieser posttranslationalen Modifikation im Herzen ist die Phosphorylierung von Proteinen. Damit erlangt auch die Dephosphorylierung dieser Proteine eine ebenso große Relevanz. Aus diesem Grunde spielen Proteinphosphatasen eine bedeutende Rolle in diesen zellulären Signalwegen des Myokards (Biesiadecki und Ziolo 2015). Es gibt bereits Hinweise, dass die Herzinsuffizienz in Versuchstieren sowie in Menschen mit einer erhöhten Aktivität der Proteinphosphatasen 1 und 2A assoziiert ist bzw. durch diese sogar verstärkt wird (Neumann et al. 1997, Neumann 2002, Gergs et al. 2004, Gergs et al. 2019). Das legt nahe, dass weitere Proteinphosphatasen eine Rolle in der Pathophysiologie des Herzens spielen könnten.

Eine Beeinträchtigung des Myokards durch eine erhöhte PP2C-Aktivität konnte bereits beobachtet werden. Beispielsweise zeigten Experimente mit Aktivierung der PP2C durch ungesättigte Fettsäuren in Meerschweinchen eine Apoptose von Kardiomyozyten und folglich ein verringertes Herzgewicht (Krieglstein et al. 2010). Auch eine Assoziation einer AT-II-vermittelten erhöhten PP2C $\alpha$ -Aktivität mit chronischer Herzinsuffizienz wurde bereits beobachtet (Tabony et al. 2014). Die dargestellten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen den Eindruck, dass die verstärkte Aktivität der



Proteinphosphatase 2C $\beta$  einen Einfluss auf die funktionsmodulierenden Signalwege im Myokard hat. Die myokardialen Kontraktionen scheinen dabei weniger resistent gegenüber hypoxischen Zuständen zu sein. Die Kraft wird unter Sauerstoffmangel verringert, die Erholung von Kraft und Frequenz nach Hypoxie verzögern sich und Arrhythmien treten prolongiert auf. Die bereits bekannten Wirkungen auf stressinduzierte Signalwege, u.a. über eine Beeinflussung der MAP-Kinasekaskade (Lu und Wang 2008), lässt eine nachfolgende Störung der zellulären Reaktionen auf den hypoxischen Stress vermuten. Damit liegt eine pathophysiologische Bedeutung dieser Phosphatase in hypoxischen und vermutlich auch ischämischen Episoden, wie sie bei der KHK auftreten können, nahe. Gleichmaßen könnte sie, in Zusammenschau mit den Ergebnissen von Bollmann et al. 2020, an der Entstehung einer Herzinsuffizienz beteiligt und damit von Bedeutung für eine Vielzahl an Patienten sein.

Für die Nutzbarmachung dieser Erkenntnisse fehlt aktuell das Wissen um die genauen Mechanismen, die die Veränderungen durch die PP2C $\beta$ -Überexpression bedingen. Hier müssen weiterführende molekularbiologische Analysen nachfolgen.

Eine mögliche Prävention schädlicher Einflüsse dieser Proteinphosphatase wird durch das aktuelle Fehlen eines spezifischen Inhibitors stark erschwert. Des Weiteren würde ein künstliches Eingreifen in die Phosphataseaktivität der PP2C $\beta$  das Risiko einer schlecht vorhersehbaren Wirkung bergen, da es vielfältige mögliche Signalwege gibt, die dadurch beeinflusst werden könnten. Untersuchungen an anderen Phosphatasen, für die es spezifische Inhibitoren gibt, wie die Proteinphosphatase 1, liefern bereits Hinweise, dass eine allgemeine Hemmung einer Phosphatase viele unspezifische Wirkungen nach sich zieht. Ein gezieltes Eingreifen in Phosphorylierungsschritte verschiedener Signalwege verspricht daher einen besseren Nutzen (Biesiadecki und Ziolo 2015).

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente bergen also aktuell keine unmittelbaren Vorteile für die Patientenversorgung, solange keine selektiven Inhibitoren existieren. Sie veranschaulichen jedoch den Einfluss dieser Phosphatase auf die Herzfunktion und erweitern somit das Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie des Herzens.

## 6 Zusammenfassung

Die PP2C gehört zu der Gruppe der Serin-Threonin-Phosphatasen und ist damit an der Regulation von Proteinphosphorylierungen, einer wichtigen Form der posttranslationalen Modifikation von Proteinen, in den Kardiomyozyten beteiligt. Es ist bekannt, dass sie in allen Zellen u.a. an der Regulation von Stress-Signalen, Zellwachstum und -differenzierung sowie dem Zellstoffwechsel beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss einer PP2C $\beta$ -Überexpression auf die kardialen Funktionen untersucht werden. Im Vorfeld wurde ein Tiermodell mit herzspezifischer Überexpression der bovinen PP2C $\beta$  generiert (Bollmann et al. 2016). Mit Hilfe von Frequenz- und Kontraktionskraftmessungen an isolierten rechten und linken Vorhofpräparaten wurden die atrialen Auswirkungen der gesteigerten PP2C $\beta$ -Aktivität untersucht.

Unter Kontrollbedingungen konnten bereits Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyppräparaten gefunden werden. Die basalen Schlagfrequenzen der rechten Vorhofpräparate waren größer in Transgenen als in Wildtypen. Bei Vergleich der Kontraktionskräfte unterschieden diese sich unter Kontrollbedingungen nicht. Jedoch konnte unter Hypoxie sowie danach wiederholt eine geringere Kraftentwicklung in transgenen Präparaten beobachtet werden. Diese Differenz schien bei einer zweiten Hypoxie zuzunehmen. Die transgenen Präparate verloren unter Sauerstoffmangel, mit Ausnahme der kurzen Präkonditionierung, schneller die Hälfte ihrer Kraft als Wildtyppräparate. Die Regeneration ihrer Kontraktionskraft dauerte in transgenen Vorhofpräparaten deutlich länger als in den WT-Vorhofpräparaten. Unter hypoxischen Bedingungen konnte also eine Beeinträchtigung der entwickelten Kontraktionskräfte der linken Vorhofpräparate im Zusammenhang mit einer PP2C $\beta$ -Überexpression beobachtet werden.

Ein positiver Effekt einer 10-minütigen Präkonditionierung auf die nachfolgenden Kontraktionen mit und ohne Sauerstoff konnte nicht beobachtet werden, weder bei Transgenen noch bei Wildtypen.

Die erhöhte Expression der PP2C $\beta$  korrelierte mit der Ausbildung von Kontrakturen der linken Atrien nach längerdauernden Hypoxien. Diese entwickelten sich in Transgenen schneller und waren in der zweiten Hypoxie in Transgenen deutlich stärker ausgeprägt im Vergleich zu Wildtypen. Gleichzeitig konnten die transgenen Vorhofpräparate ihre Kontrakturen schneller abbauen als die Wildtyp-Vorhofpräparate.

Die erhöhten Schlagfrequenzen der rechten Vorhofpräparate in Transgenen waren auch nach hypoxischen Phasen weiterhin zu beobachten. Unter Hypoxie kamen die spontanen Kontraktionen zum Erliegen. Dies geschah in beiden Versuchsgruppen in etwa gleich schnell. Für das Wiedereinsetzen in der Reoxygenierung benötigten transgene Präparate deutlich mehr Zeit als Wildtyp-Präparate. Dieser Unterschied konnte bereits nach einer 10-minütigen Präkonditionierungsphase beobachtet werden. Bei der Ausbildung der ersten Arrhythmien nach Einleitung des Sauerstoffmangels wurden bei Transgenen und Wildtypen ähnliche Ergebnisse gefunden. Differenzen wurden beim Vergleich der Zeiten bis zur letzten Arrhythmie nach Reoxygenierung gezeigt. Hier benötigten transgene Vorhofpräparate mehr Zeit unter Normoxie, um einen regelmäßigen Rhythmus zu erreichen.

Die erfolgreiche herzspezifische Überexpression von PP2C $\beta$  in den transgenen Mäusen hatte somit einen Einfluss auf die Funktionalität des atrialen Myokards. Besonders unter hypoxischem Stress wurde deutlich, dass eine erhöhte Aktivität der PP2C $\beta$  die Kontraktilität der isolierten Vorhofpräparate modifiziert. Die zugrundeliegenden Mechanismen für die gefundenen Unterschiede müssen in weiteren Studien untersucht werden.

## 7 Literatur

### Literatur

Aburai N, Yoshida M, Ohnishi M, Kimura K-i (2010) Sanguinarine as a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 2C in vitro and induces apoptosis via phosphorylation of p38 in HL60 cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74:548–552. doi:10.1271/bbb.90735

Andersson DC, Betzenhauser MJ, Reiken S, Umanskaya A, Shiomi T, Marks AR (2012) Stress-induced increase in skeletal muscle force requires protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor. *The Journal of physiology* 590:6381–6387. doi:10.1113/jphysiol.2012.237925

Attwood PV, Wieland T (2015) Nucleoside diphosphate kinase as protein histidine kinase. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 388:153–160. doi:10.1007/s00210-014-1003-3

Barford DAK (1998) The Structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into Catalysis and Regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1998.27. doi:10.1146/annurev.biophys.27.1.133

Biesiadecki BJ, Ziolo MT (2015) Should we treat heart failure with phosphatase inhibitors? Better to start at the end. *Journal of molecular and cellular cardiology* 89:116–118. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.10.020

Bollmann P, Gergs U, Neumann J, Boknik P (2016) Overexpression of PP2C $\beta$  leads to cardiac hypertrophy in mice and alters cardiac function. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 389 Suppl 1:38. doi:10.1007/s00210-016-1213-y

Bollmann P, Werner F, Jaron M, Bruns TA, Wache H, Runte J, Boknik P, Kirchhefer U, Müller FU, Buchwalow IB, Rothmund S, Neumann J, Gergs U (2020) Initial Characterization of Stressed Transgenic Mice With Cardiomyocyte-Specific Overexpression of Protein Phosphatase 2C. *Frontiers in pharmacology* 11:591773. doi:10.3389/fphar.2020.591773

Brognaard J, Sierrecki E, Gao T, Newton AC (2007) PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Molecular cell* 25:917–931. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.017

Cheng A, Kaldis P, Solomon MJ (2000) Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C alpha and beta 2 isoforms. *The Journal of biological chemistry* 275:34744–34749. doi:10.1074/jbc.M006210200

Chida T, Ando M, Matsuki T, Masu Y, Nagaura Y, Takano-Yamamoto T, Tamura S, Kobayashi T (2013) N-Myristoylation is essential for protein phosphatases PPM1A and PPM1B to dephosphorylate their physiological substrates in cells. *The Biochemical journal* 449:741–749. doi:10.1042/BJ20121201

Choate JK, Feldman R (2003) Neuronal control of heart rate in isolated mouse atria. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285:H1340-6. doi:10.1152/ajpheart.01119.2002

Das AK, Helps NR, Cohen PT, Barford D (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *The EMBO Journal* 15:6798–6809

Davies SW, Wedzicha JA (1993) Hypoxia and the heart. *British heart journal* 69:3–5. doi:10.1136/hrt.69.1.3

Eisner D (2014) Calcium in the heart: from physiology to disease. *Experimental physiology* 99:1273–1282. doi:10.1113/expphysiol.2013.077305

Elgenaidi IS, Spiers JP (2019) Hypoxia modulates protein phosphatase 2A through HIF-1 $\alpha$  dependent and independent mechanisms in human aortic smooth muscle cells and ventricular cardiomyocytes. *British Journal of Pharmacology* 176:1745–1763. doi:10.1111/bph.14648

Fjeld CC, Denu JM (1999) Kinetic analysis of human serine/threonine protein phosphatase 2 $\alpha$ . *The Journal of biological chemistry* 274:20336–20343. doi:10.1074/jbc.274.29.20336

Frank K, Kranias EG (2000) Phospholamban and cardiac contractility. *Annals of medicine* 32:572–578. doi:10.3109/07853890008998837

Frenker J (2013) Desensitivierung humaner 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren in Vorhöfen von Herzen transgener Mäuse [Dissertation]. Halle: Universität.

Garlid KD, Dos Santos P, Xie Z-J, Costa ADT, Paucek P (2003) Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1606:1–21. doi:10.1016/S0005-2728(03)00109-9

Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W, Neumann J (2004) Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *The Journal of biological chemistry* 279:40827–40834. doi:10.1074/jbc.M405770200

Gergs U, Trapp T, Bushnaq H, Simm A, Silber R-E, Neumann J (2019) Age-Dependent Protein Expression of Serine/Threonine Phosphatases and Their Inhibitors in the Human Cardiac Atrium. *Advances in medicine* 2019:2675972.

doi:10.1155/2019/2675972

Guo X, Niemi NM, Hutchins PD, Condon SGF, Jochem A, Ulbrich A, Higbee AJ, Russell JD, Senes A, Coon JJ, Pagliarini DJ (2017) Ptc7p Dephosphorylates Select Mitochondrial Proteins to Enhance Metabolic Function. *Cell reports* 18:307–313.

doi:10.1016/j.celrep.2016.12.049

Hauck L, Hansmann G, Dietz R, Harsdorf R von (2002) Inhibition of hypoxia-induced apoptosis by modulation of retinoblastoma protein-dependent signaling in cardiomyocytes. *Circulation research* 91:782–789.

doi:10.1161/01.res.0000041030.98642.41

Heusch G, Rassaf T (2016) Time to Give Up on Cardioprotection? *Circulation research* 119:676–695. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308736

Horn F, Armbruster M, Berghold S, Blaeschke F, Grillhösl C, Harrasser S, Koch D, Moc I, Nassrallah J, Nassrallah L, Otte B, Pritsch M, Schneider N, Ziegler P (2020) *Biochemie des Menschen*. 8. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 97.

Izumi K, Ito T, Fukazawa T (1981) Effect of ATP concentration and pH on rigor tension development and dissociation of rigor complex in glycerinated rabbit psoas muscle fiber. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 678:364–372.

doi:10.1016/0304-4165(81)90116-1

Jabůrek M, Yarov-Yarovoy V, Paucek P, Garlid KD (1998) State-dependent inhibition of the mitochondrial KATP channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate. *The Journal of biological chemistry* 273:13578–13582

James JF, Hewett TE, Robbins J (1998) Cardiac physiology in transgenic mice. *Circulation research* 82:407–415. doi:10.1161/01.res.82.4.407

Jin F, Ji C, Liu L, Dai J, Gu S, Sun X, Xie Y, Mao Y (2004) Molecular cloning and characterization of a novel human protein phosphatase 2C cDNA (PP2C epsilon\*). *Molecular biology reports* 31:197–202. doi:10.1023/b:mole.0000043624.96006.eb

Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annual review of immunology* 18.

doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.621

- Kass DA, Hare JM, Georgakopoulos D (1998) Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circulation research* 82:519–522. doi:10.1161/01.res.82.4.519
- Kerk D, Silver D, Uhrig RG, Moorhead GBG (2015) "PP2C7s", Genes Most Highly Elaborated in Photosynthetic Organisms, Reveal the Bacterial Origin and Stepwise Evolution of PPM/PP2C Protein Phosphatases. *PloS one* 10:e0132863. doi:10.1371/journal.pone.0132863
- Klumpp S, Selke D, Hermesmeier J (1998) Protein phosphatase type 2C active at physiological Mg<sup>2+</sup> : stimulation by unsaturated fatty acids. *FEBS Letters* 437:229–232. doi:10.1016/S0014-5793(98)01237-X
- Klumpp S, Thissen M-C, Krieglstein J (2006) Protein phosphatases types 2C $\alpha$  and 2C $\beta$  in apoptosis. *Biochemical Society transactions* 34:1370–1375. doi:10.1042/BST0341370
- Krieglstein J, Kewitz T, Kirchhefer U, Hofnagel O, Weissen-Plenz G, Reinbold M, Klumpp S (2010) Damage of guinea pig heart and arteries by a trioleate-enriched diet and of cultured cardiomyocytes by oleic acid. *PloS one* 5:e9561. doi:10.1371/journal.pone.0009561
- Lammers T, Lavi S (2007) Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 42:437–461. doi:10.1080/10409230701693342
- Little SC, Curran J, Makara MA, Kline CF, Ho H-T, Xu Z, Wu X, Polina I, Musa H, Meadows AM, Carnes CA, Biesiadecki BJ, Davis JP, Weisleder N, Györke S, Wehrens XH, Hund TJ, Mohler PJ (2015) Protein phosphatase 2A regulatory subunit B56 $\alpha$  limits phosphatase activity in the heart. *Science signaling* 8:ra72. doi:10.1126/scisignal.aaa5876
- Lossi L, D'Angelo L, Girolamo P de, Merighi A (2016) Anatomical features for an adequate choice of experimental animal model in biomedicine: II. Small laboratory rodents, rabbit, and pig. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 204:11–28. doi:10.1016/j.aanat.2015.10.002
- Lu G, Wang Y (2008) Functional diversity of mammalian type 2C protein phosphatase isoforms: new tales from an old family. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 35:107–112. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04843.x
- Lu G, Ren S, Korge P, Choi J, Dong Y, Weiss J, Koehler C, Chen J-n, Wang Y (2007) A novel mitochondrial matrix serine/threonine protein phosphatase regulates the

- mitochondria permeability transition pore and is essential for cellular survival and development. *Genes & development* 21:784–796. doi:10.1101/gad.1499107
- Lu G, Sun H, Korge P, Koehler CM, Weiss JN, Wang Y (2009) Chapter 14 Functional Characterization of a Mitochondrial Ser/Thr Protein Phosphatase in Cell Death Regulation Mitochondrial Function, Part B: Mitochondrial Protein Kinases, Protein Phosphatases and Mitochondrial Diseases. Elsevier, S 255–273
- MacDougall LK, Jones LR, Cohen P (1991) Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *European journal of biochemistry* 196:725–734
- Mallet RT, Manukhina EB, Ruelas SS, Caffrey JL, Downey HF (2018) Cardioprotection by intermittent hypoxia conditioning: evidence, mechanisms, and therapeutic potential. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 315:H216-H232. doi:10.1152/ajpheart.00060.2018
- Matsukawa J, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H (2004) The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *Journal of biochemistry* 136:261–265. doi:10.1093/jb/mvh134
- Mumby MC, Walter G (1993) Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth.
- Neumann J (2002) Altered phosphatase activity in heart failure, influence on Ca<sup>2+</sup> movement. *Basic research in cardiology* 97 Suppl 1:I91-5. doi:10.1007/s003950200036
- Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997) Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29:265–272. doi:10.1006/jmcc.1996.0271
- Neumann J, Boknik P, Kirchhefer U, Gergs U (2021) The role of PP5 and PP2C in cardiac health and disease. *Cellular signalling* 85:110035. doi:10.1016/j.cellsig.2021.110035
- Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127:635–648. doi:10.1016/j.cell.2006.09.026
- Ošťádal B, Kolář F (2011) Myocardial Hypoxia and Ischemia. In: Ošťádal B, Kolář F (Hrsg) *Cardiac ischemia. From injury to protection*. Springer, New York, London, S 1–44



- Ošťádal B, Kolář F (1999) *Cardiac Ischemia: From Injury to Protection*. Springer US, Boston, MA
- Ošťádal B, Kolář F (Hrsg) (2011b) *Cardiac ischemia; From injury to protection*. Springer, New York, London
- Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (2019) *Physiologie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 161-164.
- Pons S, Martin V, Portal L, Zini R, Morin D, Berdeaux A, Ghaleh B (2013) Regular treadmill exercise restores cardioprotective signaling pathways in obese mice independently from improvement in associated co-morbidities. *Journal of molecular and cellular cardiology* 54:82–89. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.11.010
- Rosenthal R, Lawson R (1964) A longitudinal study of the effects of experimenter bias on the operant learning of laboratory rats. *Journal of Psychiatric Research* 2:61–72. doi:10.1016/0022-3956(64)90003-2
- Saito J-i, Toriumi S, Awano K, Ichijo H, Sasaki K, Kobayashi T, Tamura S (2007) Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by protein phosphatase 2Cepsilon. *The Biochemical journal* 405:591–596. doi:10.1042/BJ20070231
- Saito S, Matsui H, Kawano M, Kumagai K, Tomishige N, Hanada K, Echigo S, Tamura S, Kobayashi T (2008) Protein phosphatase 2Cepsilon is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes. *The Journal of biological chemistry* 283:6584–6593. doi:10.1074/jbc.M707691200
- Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A (2016) Age-related changes in AMPK activation: Role for AMPK phosphatases and inhibitory phosphorylation by upstream signaling pathways. *Ageing research reviews* 28:15–26. doi:10.1016/j.arr.2016.04.003
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning; A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y
- Seroussi E, Shani N, Ben-Meir D, Chajut A, Divinski I, Faier S, Gery S, Karby S, Kariv-Inbal Z, Sella O, Smorodinsky NI, Lavi S (2001) Uniquely conserved non-translated regions are involved in generation of the two major transcripts of protein phosphatase 2Cbeta. *Journal of molecular biology* 312:439–451. doi:10.1006/jmbi.2001.4967
- Shen X-F, Zhao Y, Jiang J-P, Guan W-X, Du J-F (2017) Phosphatase Wip1 in Immunity: An Overview and Update. *Frontiers in immunology* 8:8. doi:10.3389/fimmu.2017.00008

- Shi Y (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 139:468–484. doi:10.1016/j.cell.2009.10.006
- Sprick JD, Mallet RT, Przyklenk K, Rickards CA (2019) Ischaemic and hypoxic conditioning: potential for protection of vital organs. *Experimental physiology* 104:278–294. doi:10.1113/EP087122
- Sun W, Yu Y, Dotti G, Shen T, Tan X, Savoldo B, Pass AK, Chu M, Zhang D, Lu X, Fu S, Lin X, Yang J (2009) PPM1A and PPM1B act as IKKbeta phosphatases to terminate TNFalpha-induced IKKbeta-NF-kappaB activation. *Cellular signalling* 21:95–102. doi:10.1016/j.cellsig.2008.09.012
- Tabony AM, Yoshida T, Galvez S, Higashi Y, Sukhanov S, Chandrasekar B, Mitch WE, Delafontaine P (2011) Angiotensin II upregulates protein phosphatase 2C $\alpha$  and inhibits AMP-activated protein kinase signaling and energy balance leading to skeletal muscle wasting. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 58:643–649. doi:10.1161/hypertensionaha.111.174839
- Tabony AM, Yoshida T, Sukhanov S, Delafontaine P (2014) Protein phosphatase 2C-alpha knockdown reduces angiotensin II-mediated skeletal muscle wasting via restoration of mitochondrial recycling and function. *Skeletal muscle* 4:20. doi:10.1186/2044-5040-4-20
- Tagad HD, Debnath S, Clause V, Saha M, Mazur SJ, Appella E, Appella DH (2018) Chemical Features Important for Activity in a Class of Inhibitors Targeting the Wip1 Flap Subdomain. *ChemMedChem* 13:894–901. doi:10.1002/cmdc.201700779
- Travis SM, Welsh MJ (1997) PP2C $\gamma$ : a human protein phosphatase with a unique acidic domain 1. *FEBS Letters* 412:415–419. doi:10.1016/S0014-5793(97)00837-5
- Veksler VI, Lechene P, Matrougui K, Ventura-Clapier R (1997) Rigor tension in single skinned rat cardiac cell: role of myofibrillar creatine kinase. *Cardiovascular research* 36:354–362. doi:10.1016/S0008-6363(97)00178-8
- Ventura-Clapier R, Veksler V, Hoerter JA (1994) Myofibrillar creatine kinase and cardiac contraction. *Molecular and cellular biochemistry* 133-134:125–144. doi:10.1007/bf01267952
- Vigneron F, Dos Santos P, Lemoine S, Bonnet M, Tariosse L, Couffinhal T, Duplaà C, Jaspard-Vinassa B (2011) GSK-3 $\beta$  at the crossroads in the signalling of heart preconditioning: implication of mTOR and Wnt pathways. *Cardiovascular research* 90:49–56. doi:10.1093/cvr/cvr002

- Vinogradova TM, Lakatta EG (2021) Dual Activation of Phosphodiesterase 3 and 4 Regulates Basal Cardiac Pacemaker Function and Beyond. *IJMS* 22:8414. doi:10.3390/ijms22168414
- Volkart PA, Bitencourt-Ferreira G, Souto AA, Azevedo WF de (2019) Cyclin-Dependent Kinase 2 in Cellular Senescence and Cancer. A Structural and Functional Review. *Current drug targets* 20:716–726. doi:10.2174/1389450120666181204165344
- Wang M-y, Unger RH (2005) Role of PP2C in cardiac lipid accumulation in obese rodents and its prevention by troglitazone. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 288:E216-21. doi:10.1152/ajpendo.00004.2004
- Watanabe T, Otsu K (2004) Signal transduction in heart failure. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine* 62:2337–2342
- Wessels A, Sedmera D (2003) Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiological genomics* 15:165–176. doi:10.1152/physiolgenomics.00033.2003
- World Health Organization (2018) *Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016*
- Wu G, Marín-García J, Rogers TB, Lakatta EG, Long X (2004) Phosphorylation and hypoxia-induced heme oxygenase-1 gene expression in cardiomyocytes. *Journal of cardiac failure* 10:519–526. doi:10.1016/j.cardfail.2004.02.002
- Yamamura K, Steenbergen C, Murphy E (2005) Protein kinase C and preconditioning: role of the sarcoplasmic reticulum. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 289:H2484-90. doi:10.1152/ajpheart.00590.2005
- Yoshizaki T, Maegawa H, Egawa K, Ugi S, Nishio Y, Imamura T, Kobayashi T, Tamura S, Olefsky JM, Kashiwagi A (2004) Protein phosphatase-2C alpha as a positive regulator of insulin sensitivity through direct activation of phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 279:22715–22726. doi:10.1074/jbc.M313745200
- Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD (1995) Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circulation research* 76:1028–1035. doi:10.1161/01.res.76.6.1028

## 8 Thesen

1. Die rechten Vorhofpräparate der Proteinphosphatase-2C $\beta$ (PP2C $\beta$ ) - überexprimierenden Mäuse (TG) zeigten bereits unter Kontrollbedingungen erhöhte Schlagfrequenzen im Vergleich zu den Wildtypen (WT).
2. Die Differenz der Schlagfrequenzen blieb auch nach hypoxischen Phasen bestehen.
3. Unter Sauerstoffmangel und danach wiesen linke Vorhofpräparate von TG geringere Kontraktionskräfte auf als von WT.
4. TG-Präparate verloren ihre Kraft während der Hypoxien schneller und regenerierten sie langsamer während der Reoxygenierungsphasen als WT-Präparate.
5. Vorhöfe mit erhöhter PP2C $\beta$ -Aktivität zeigten eine schnellere Ausprägung von Kontrakturen, jedoch auch einen schnelleren Abbau dieser im Vergleich zu WT.
6. Die Asystolie in rechten Vorhofpräparaten unter Hypoxie stellte sich in beiden Gruppen gleich schnell ein, das Wiedereinsetzen der Kontraktionen dauerte bei TG jedoch länger als bei WT-Präparaten.
7. Erste Arrhythmien unter Sauerstoffmangel traten bei TG und WT-Vorhofpräparaten vergleichbar schnell auf, TG-Präparate zeigten nach Reoxygenierung jedoch länger unregelmäßige Rhythmen.

## 9 Anhang

**Puffer und Lösungen**

Alle Chemikalien wurden in *pro analysi*-Qualität oder im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, wurde das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser als Reinstwasser (*aqua bidestillata*) aus einer Wasseraufbereitungsanlage gewonnen.

Genotypisierung der Versuchstiere

Proteinase K-Lösung	Proteinase K 10 mg/ml
TE/SDS-Puffer	Tris HCl 50 mM, EDTA 100 mM, SDS 0,5 %, pH 8,0; Sterilisierung durch Autoklavieren
TE-Puffer	Tris HCl 10 mM, EDTA 0,25 mM; Sterilisierung durch Autoklavieren
Natriumacetat-Lösung	Natriumacetat 3 M, pH 6,0
DEPC-Wasser	DEPC 0,1 % (V/V)
dNTP-Mix	
Agarosegel	Agarose 1 %, TAE-Puffer, Ethidiumbromid 0,01 %
TAE-Puffer	Tris Base 1,99 M, Eisessig 0,99 M, EDTA 59,5 mM
Ladepuffer	TAE-Puffer 50 %, Glycerol 50 %, Bromphenolblau

Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an MäusevorhofpräparatenTyrode

Stamm I	NaCl 17,5 % (g/V), KCl 1,005 % (g/V), MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O 0,56 % (g/V)
Stamm II	NaHCO <sub>3</sub> 5,00 % (g/V)
Stamm III	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 0,29 % (g/V)
NaCl	119,8 mM
KCl	5,4 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1,1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	22,6 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,42 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,8 mM

Glucose	5,05 mM
Ascorbinsäure	0,28 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	0,05 mM
pH 7,4	

### Verwendete Substanzen

Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, Philadelphia, USA
L (+) – Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Chloroform	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Leiter GeneRuler™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dNTP	MBI Fermentas, Heidelberg
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol 100 %	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Heparin	Biochrom AG, Berlin
Isoamylalkohol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> -EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Pentobarbital	Spofa, Prag, Tschechien
Phenol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
PCR-Puffer, 15 mM MgCl <sub>2</sub>	Ampliqon, Odense, Dänemark
SafeRed-DNA-Farbstoff	ABP Biosciences, USA
Taq-DNA-Polymerase	Ampliqon, Odense, Dänemark
HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base) Fluka AG, Buch

## Geräte und Bezugsquellen

PCR-Gerät Mastercycler gradient; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Zentrifuge Modell 5415 C; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Biophotometer; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Elektrophoresekammer Typ Horizon 58; Life Technologies, Gaithersburg, USA

Waage Typ AT261 DeltaRange; Mettler Instruments GmbH, Gießen

pH-Meter; WTW GmbH, STH 600, Weilheim

Kontraktionskraftmessanlage (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim)

- Reizgerät mit 4 Kanälen (ELV Takt- und Impulsgenerator TIG 7000)
- Wärmebad (CS Lauda)
- 4 Transducer (Kent, Scientific corporation, Isometric Transducer)
- Datenerfassungsgerät (PowerLab 8/35, ADInstruments, Bella Vista, Australia)
- 4 Doppelwandgefäße, 4 Stative, 4 Elektroden, Halterungsstäbe, Haken

Prism 5; GraphPad Software, San Diego, USA

## Primer

Forward Primer MHC-SEQ-P1, biomers.net GmbH, Ulm

5'-ACC CTT ACC CCA CAT AGA CC-3'

Reverse Primer PP2C-SEQ-P1R, biomers.net GmbH, Ulm

5'-AAA CAC CTC CCC ATA AAT CC-3'

## PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	1 Zyklus
Denaturierung	94 °C	45 s	
Annealing	56 °C	15 s	30 Zyklen
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1 Zyklus

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Einfluss der Proteinphosphatase 2C $\beta$  auf die Funktion von Herzvorhöfen transgener Mäuse in vitro unter Hypoxie

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. J. Neumann)

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen habe.

Halle (Saale), den 03.08.2022



**Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, Tom Alfred Bruns, keine weiteren Promotionsversuche, weder im Inland noch im Ausland, unternommen zu haben. Die vorliegende Dissertation wird erstmalig eingereicht. Es wurde kein anderer Antrag an einer anderen Universität oder Hochschule gestellt.

Halle (Saale), den 03.08.2022

## Danksagung

Ich möchte all denen meinen Dank aussprechen, die mich während der gesamten Promotionszeit begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Prof. Joachim Neumann danke ich herzlich für die Überlassung dieses spannenden Forschungsthemas, die gut strukturierte Betreuung und Unterstützung und das geduldige Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten.

Bei Herrn Dr. Ulrich Gergs bedanke ich mich für die stets freundliche, geduldige Unterstützung und große Hilfsbereitschaft. Insbesondere bei den vielen großen und kleinen Fragen im letzten Abschnitt der Promotion war er eine große Hilfe.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie danke ich herzlich für die freundliche Atmosphäre, die offene Hilfsbereitschaft und die geduldige Einarbeitung. Die vielen Fragen zur Methodik, zur Interpretation und zum Verständnis der Zusammenhänge fanden immer ein offenes Ohr. Insbesondere Frau Sonja Reber war mit ihrer geduldigen und empathischen Art sowohl in der Einarbeitung als auch danach eine große Stütze bei der Anfertigung dieser Dissertation. Dafür danke ich ihr von Herzen.

Ich bedanke mich zudem bei meinen Freunden, die mir in den schönen und weniger schönen Zeiten immer beistanden und die mir sowohl bei fachlichen Problemen, aber auch bei den anderweitigen Belastungen jederzeit eine große Stütze waren. Mit ihnen vergingen auch die härtesten Monate im Augenblickszwinkern.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie. In all den Jahren konnte ich immer mit ihrer Unterstützung rechnen. So konnte ich mich jederzeit voll auf meine Studien konzentrieren.

Egal wie weit man voneinander entfernt ist - es ist unbezahlbar, einen Ort zu haben, den man Heimat nennen kann.

## Publikationen

Bruns T, Gergs U, Neumann J (2018) Overexpression of PP2C in mice alters cardiac response to hypoxia. Abstracts of the 84th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) and the 20th Annual Meeting of the Association of the Clinical Pharmacology Germany (VKliPha) With contribution of the Arbeitsgemeinschaft für Angewandte Humanpharmakologie e. V. (AGAH). Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 391, 1–93 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1477-5>

Bollmann P, Werner F, Jaron M, Bruns TA, Wache H, Runte J, Boknik P, Kirchhefer U, Müller FU, Buchwalow IB, Rothemund S, Neumann J, Gergs U (2020) Initial Characterization of Stressed Transgenic Mice With Cardiomyocyte-Specific Overexpression of Protein Phosphatase 2C. *Frontiers in pharmacology* 11:591773. doi:10.3389/fphar.2020.591773