

# **Charakterisierung der Herzfunktion von Proteinphosphatase 2A – überexprimierenden Mäusen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Nico Schulz

geb. am 20.11.1978 in Halle

Gutachter /in

1. Prof. Dr. E. Wahle

2. Prof. Dr. J. Neumann

3. Prof. Dr. F. U. Müller

Halle (Saale), 01.12.2011

## Inhaltsverzeichnis

Überschrift	Seite
1. Einleitung	
1.1. Phosphorylierung	1
1.2. Serin/Threonin – Proteinphosphatasen	1
1.3. Kontraktionskraft im Herzen	3
1.4. Pathophysiologische Bedeutung von Proteinphosphatasen im kardiovaskulären System	4
1.5. Ischämie und Proteinphosphatasen	4
1.6. Sepsis und Proteinphosphatasen	6
1.7. Überexpression der katalytischen C – Untereinheit in Mäusen	9
2. Fragestellung	10
3. Material und Methoden	12
3.1. Untersuchungsmaterial	12
3.1.1. Beschreibung der Mauslinie	12
3.1.2. Beschreibung der E. coli Stämme	12
3.1.3. Beschreibung der Plasmide	12
3.1.4. Beschreibung der Antikörper	14
3.2. Arbeitstechniken	14
3.2.1. Arbeitstechniken mit RNA	14
3.2.1.1. Gesamt – RNA – Präparation aus Mäuseherzen	14
3.2.1.2. RNA – Gelelektrophorese	15
3.2.1.3. Northern Blot	15
3.2.1.4. cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase	16
3.2.1.5. Radioaktive Markierung der Sonden	17
3.2.1.6. Hybridisierung	17
3.2.1.7. Microarray – Analyse	18
3.2.1.8. Quantitative Real Time PCR zur Bestimmung der TRPV 1 – Expression	19

3.2.1.8. Quantitative Real Time PCR zur Bestimmung der TNF $\alpha$ – und IL – 6 – Expression	20
3.2.2. Arbeitstechniken mit DNA	21
3.2.2.1. Herstellung kompetenter Bakterien	21
3.2.2.2. Transformation von Plasmid – DNA in Bakterienzellen	21
3.2.2.3. Präparation von Plasmid – DNA aus Bakterienkulturen	22
3.2.2.4. DNA – Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	23
3.2.2.5. Klonierung in den pJET1/blunt – Klonierungsvektor	23
3.2.2.6. Agarosegelelektrophorese	23
3.2.2.7. Extraktion von DNA aus Agarosegelen	24
3.2.2.8. Herstellung der Sonden für TNF $\alpha$ und ANP	24
3.2.3. Proteinchemische Arbeitstechniken	26
3.2.3.1. Herstellung von Homogenaten	26
3.2.3.2. Proteinbestimmung nach Lowry	26
3.2.3.3. Gemeinsame Immunpräzipitation von PLB und PP2A <sub>C</sub>	26
3.2.3.4. SDS – PAGE	27
3.2.3.5. Coomassie – Färbung	27
3.2.3.6. Western Blot	28
3.2.3.8. Nachweis biologischer IL – 6 – Aktivität mittels 7TD1 – Proliferationstest	29
3.2.3.9. Nachweis der NADPH – Oxidaseaktivität mittels Lucigenin – Assay	29
3.2.4. Tierexperimentelles Arbeiten	30
3.2.4.1. Narkose und Organentnahme	30
3.2.4.2. Injektion von WT und TG Mäusen mit LPS	30
3.2.4.3. Bestimmung der Katecholaminspiegel	31
3.2.5. Häodynamische Arbeitsmethoden	32
3.2.5.1. Versuche am arbeitsleistenden Herz der mit LPS injizierten Mäuse	32
3.2.5.2. Versuche am arbeitsleistenden Herz mit 120 Minuten globaler Ischämie	32

3.2.6. Histologische Färbung	32
3.3. Statistische Auswertung	32
3.4. Behördliche Genehmigungen und Sicherheitsbestimmungen	33
4. Ergebnisse	34
4.1. Einfluss verschiedener Stressfaktoren	34
4.1.1. Einfluss von No-Flow-Ischämie	34
4.1.1.1. Messung kontraktile Parameter im Modell des arbeitleistenden Herzen an den Herzen von WT und TG Mäusen	34
4.1.1.2. Proteinexpression von eNOS und nNOS	38
4.1.1.3. NADPH – Oxidase – Aktivität	40
4.1.1.4. Katecholaminbestimmung	41
4.1.2. Einfluss von Lipopolysacchariden	43
4.1.2.1. Temperatur und Körpergewicht LPS – behandelte Mäuse	43
4.1.2.2. Messung kontraktile Parameter im Modell des arbeitleistenden Herzens an den Herzen von LPS – vorbehandelten WT und TG Mäusen	45
4.1.2.3. Bestimmung der Interleukin – 6 – Konzentration	48
4.1.2.4. Nachweis von TNF $\alpha$ und ANP	49
4.1.2.5. Real – Time – PCR der Stressproteine TNF $\alpha$ und IL – 6	50
4.1.2.6. Expression von SR – Proteinen	51
4.1.2.7. NADPH – Oxidase – Aktivität	52
4.1.2.8. Katecholaminbestimmung	53
4.1.2.9. Histologische Färbung	54
4.3. Gemeinsame Präzipitation der katalytischen C – Untereinheit der PP2A mit PLB	55
4.4. Expression des TRPV 1 im Ventrikel von WT und TG Mäusen	56
4.5. Affymetrix Gene – Chip Daten	57
5. Diskussion	62
5.1. Einfluss verschiedener Stressfaktoren	62
5.1.1. Einfluss von No – Flow – Ischämie	62
5.1.2. Einfluss von Lipopolysacchariden	68

5.2. Gemeinsame Immunpräzipitation der katalytischen C – Untereinheit der PP2A mit PLB	75
5.3. Affymetrix Gene – Chip Daten	76
6. Zusammenfassung	92
7. Literaturverzeichnis	94
8. Danksagung	119
9. Veröffentlichungen	120

## Abkürzungen

<b>Abkürzung:</b>	<b>Bedeutung:</b>
$\alpha$ MHC	schwere Kette der $\alpha$ – Isoform des Myosins (engl. $\alpha$ – myosin heavy chain)
ACC	Acetyl – CoA – Carboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	aktivierender Transkriptionsfaktor (engl. activating transcription factor)
ANP	Atrionatriuretisches Protein
APC	Aktiviertes Protein C
ATP	Adenosintri-phosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ARC	Apoptoserepressor mit einer Caspase Aktivierungs – und Rekrutierungsdomäne (engl. apoptosis repressor with a caspase activation and recruitment domain)
BCIP – T	5 – Brom – 4 – chlor – 3 – indolyhydrogenphosphat – p – toluidin
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
bzw.	beziehungsweise
CaM Kinasen	$\text{Ca}^{2+}$ – Calmodulin – abhängige Proteinkinase
cDNA	komplementäre DNA
COX – 2	Cyclooxygenase – 2
CSQ	Calsequestrin
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
DD	Todesdomäne (engl. death domain)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGDP	Desoxyguanosintri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)

dp/dt <sub>max</sub>	Geschwindigkeit der Kraftentwicklung
dp/dt <sub>min</sub>	Geschwindigkeit der Relaxation
DPI	Diphenyleneiodoniumchlorid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure – dinatriumsalz – dihydrat
EGTA	Ethylenglykol – bis(β – aminoethylether) N,N,N',N' – tetraessigsäure
EndoG	Endonuklease G
ERK	Extrazellulär – signalregulierte Kinase
FCS	fötales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
GAPDH	Glycerinaldehyd – 3 – phosphat – dehydrogenase
HSF1	Hitzeschockfaktor 1
HEPES	2 – [4 – (2 – Hydroxyethyl) – 1 – piperaziny] – ethansulfonsäure
ICAM – 1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (engl. intercellular adhesion molecule – 1)
IκB	NF – κB – Inhibitor
IKK	IκB – Kinase
IL – 6	Interleukin – 6
IPTG	Isopropyl – β – D – thiogalactopyranosid
IRAK	IL – 1 – Rezeptor – assoziierte Kinase
IRF3	Interferonregulierter Faktor 3
JNK	c – Jun N – terminale Kinase
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LB	engl. lysogeny broth
LBP	LPS – bindendes Protein
L - NAME	Methyl – N <sup>5</sup> – [imino(nitroamino)methyl] – L – ornithinmonohydrochlorid
LPS	Lipopolysaccharide
LTCC	L – Typ Calciumkanal
LVP	linksventrikulärer Druck
MAPK	Mitogen – aktivierte Proteinkinase
MOPS	3 – (N – Morpholino) – propansulfonsäure
MTT	3 – [4,5 – Dimethylthazol – 2 – yl] – 2,5 – diphenyltetrazolium Bromid

MPTP	mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore (engl. mitochondrial permeability transition pore)
MyD88	Myeloiddifferenzierungsfaktor 88
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblau – tetrazolium
NF – $\kappa$ B	Nuklearfaktor – kappa – B (engl. nuclear factor 'kappa – light – chain – enhancer' of activated B – cells)
NOS	NO – Synthase
NOX	NADPH – Oxidase
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid – Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PITK	(engl. phosphatase interactor targeting K protein)
PHAP 1	Inhibitor I <sub>1</sub> der PP2A
PHAP 2	Inhibitor I <sub>2</sub> der PP2A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLB	Phospholamban
RLU	relative Lichteinheit (engl. relative light units)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RPMI	Roswell – Park – Memorial – Institut – Kulturmedium
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
RyR	Ryanodinrezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	Sarko/Endoplasmatische retikuläre Ca <sup>2+</sup> – abhängige ATPase
SR	Sarcoplasmatisches Retikulum
SSC	salzhaltiger Natriumzitatpuffer (engl. saline – sodium citrate)
TAE	Trisacetat – EDTA



TAK	Transformationswachstumsfaktor $\beta$ aktivierte Kinase (engl. transforming growth factor $\beta$ activated kinase)
TBK1	TRAF Familien – assoziierte NF – $\kappa$ B – bindende Kinase 1 (engl. TRAF familie member – associated NF – $\kappa$ B activator binding kinase 1)
TBST	Tris – gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N' – Tetramethyl – Ethylendiamin
TFB	Transformationspuffer
TG	herzspezifische Überexpression der katalytischen Untereinheit der PP2A
TIR	TIR – Toll/IL – 1R
TIRAP	TIR – Domäne – enthaltende Adapterproteine
TLR 4	Toll – like Rezeptor 4
$T_m$	Schmelztemperatur der PCR – Primer
$TNF\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TnC	$Ca^{2+}$ – bindende Untereinheit des Troponin
TnI	Inhibitorische Untereinheit des Troponin
TnT	Tropomyosin – bindende Untereinheit des Troponin
TRAF6	TNF – Rezeptor – assoziierter Faktor 6
TRAM	TRIF – bezogenes Adaptermolekül (engl. TRIF related adaptor molecule)
TRIF	TIR – Domänen – enthaltender Interferon – $\beta$ – induzierender Adapter (engl. TIR domain – containing adaptor – inducing interferon – $\beta$ )
TRPV 1	Transienter Vanilloidrezeptor Typ 1 (engl. transient receptor vanilloid type 1)
U	Unit(s)
WT	Wildtyp
YT <sup>++</sup> – Medium	Hefeextrakt – Trypton – Kulturmedium mit Magnesiumsulfat und Kaliumchlorid
z.B.	zum Beispiel

# 1. Einleitung

## 1.1. Phosphorylierung

Die Regulierung vieler zellulärer Prozesse basiert auf der reversiblen Phosphorylierung verschiedener Proteine. Dabei werden durch Konformationsänderungen die Eigenschaften der Proteine, wie eventuelle enzymatische Aktivität, die Bindungseigenschaften und die subzelluläre Lokalisation, beeinflusst. Etwa ein Drittel aller Proteine in einer Säugetierzelle kann phosphoryliert werden (Hubbard und Cohen 1993; DePaoli – Roach et al. 1994; Grimsrud et al. 2010). Die relative Aktivität phosphorylierender Proteinkinasen und dephosphorylierender Phosphatasen spiegelt sich dabei im Phosphorylierungszustand wieder. Mit Hilfe dieses Mechanismus können Zellen kurzfristig und flexibel auf veränderte Bedingungen reagieren.

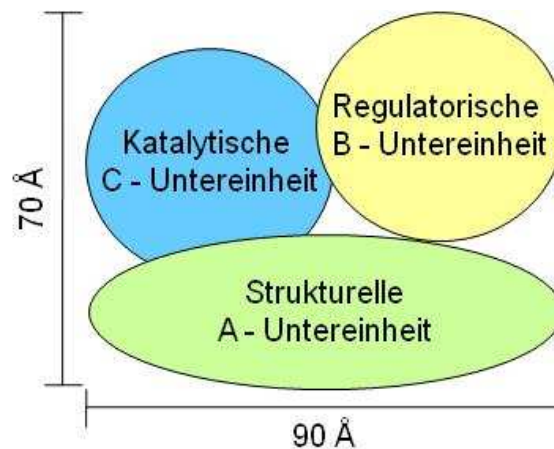
## 1.2. Serin/Threonin – Proteinphosphatasen

Die Proteinphosphatasen (PP), welche die phosphorylierten Aminosäuren Serin und Threonin dephosphorylieren, werden klassischerweise in die Typen 1 bis 7 unterteilt (Cohen und Cohen 1989; Cohen 1989; Shenolikar und Nairn 1991; Cohen 1997; Herzig und Neumann 2000; Shi 2009; País et al. 2009).

Im Säugetierherzen machen die Phosphatasen PP1 und PP2A 90 % der gesamten Phosphataseaktivität aus (Cohen 1989; MacDougall 1991), diese können durch spezifische Inhibitoren gehemmt werden. Für die PP1 existieren die beiden Inhibitoren I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub>, welche allerdings nicht die Aktivität der PP2A inhibieren. Auch für PP2A existieren zwei Inhibitoren I<sub>1</sub> (PHAP 1) und I<sub>2</sub> (PHAP 2). PP1, PP2A, PP4 und PP5 besitzen eine spontane katalytische Aktivität, während PP2B, PP2C und PP7 von bivalenten Kationen abhängig sind. Proteinphosphatasen können aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sein. Dabei handelt es sich meist um eine katalytische und verschiedene regulatorische Untereinheiten.

Die regulatorischen Untereinheiten können mit den katalytischen Untereinheiten assoziieren und auf diese Weise deren Aktivität, Substratspezifität und subzelluläre Lokalisation (Hubbard und Cohen 1993; Mumby und Walter 1993; Herzig und Neumann 2000; Shi 2009) beeinflussen.

Die PP2A besteht aus drei Untereinheiten, der katalytischen C –, der strukturellen A – und der regulatorischen B – Untereinheit (siehe Abbildung 1.1.).



**Abb. 1.1.: Schematische Struktur der PP2A.**

Von allen Untereinheiten sind verschiedene Isoformen bekannt, welche in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden (Herzig und Neumann 2000). Für die strukturelle A – Untereinheit existieren zwei Isoformen, die als  $A\alpha$  und  $A\beta$  bezeichnet werden. Ihre Molmasse beträgt ca. 65 kDa. Der Effekt der Isoformen auf die Aktivität der PP2A ist substratabhängig.

Für die regulatorische B – Untereinheit existieren drei Hauptvarianten, die als B, B' und B'' bezeichnet werden. Bei B handelt es sich um ein 52 kDa, bei B' um ein 53 kDa und bei B'' um ein 72 kDa großes Protein mit einer 130 kDa großen Splicevariante. Für die B – Untereinheit existieren drei Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Die B' – Untereinheit teilt sich noch weiter in  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  auf. B' $\alpha$  kann weiterhin alternativ gespleißt werden, um B' $\alpha_1$  und B' $\alpha_2$  zu erzeugen. Für B' $\gamma$  können ebenfalls noch vier Isoformen unterschieden werden.

Die katalytische C – Untereinheit der PP2A kommt in zwei verschiedenen Isoformen vor:  $C\alpha$  und  $C\beta$ , die sich auf unterschiedlichen Genen befinden. Das  $C\alpha$  – Protein der Ratte unterscheidet sich in lediglich acht Aminosäuren vom  $C\beta$  – Protein. Die Proteinexpression ist für  $C\alpha$  höher als für  $C\beta$  (Herzig und Neumann 2000). Allerdings unterscheiden sich beide Untereinheiten nicht in ihrer katalytischen Aktivität oder ihren Bindungseigenschaften (Zhou et al. 2003). Die Phosphataseaktivität der C – Untereinheit kann durch kovalente Modifikation gesteigert oder gesenkt werden.

### 1.3. Kontraktionskraft im Herzen

Die Kontraktionskraft des Herzens wird hauptsächlich durch die Konzentration des freien Calciums im Intrazellularraum bestimmt. Die Erhöhung der Konzentration des intrazellulären Calciums erfolgt durch das Einströmen aus dem Extrazellularraum sowie dem Sarkoplasmatischen Retikulum (Morano 1992; Bers 2001; Bers 2008).

Auf diese Weise können die  $\text{Ca}^{2+}$  – Bindestellen des Calmodulins besetzt werden, welches mit der Kinase der leichten Kette des Myosins assoziiert ist (Bayley et al. 1996; Johnson et al. 1996). Durch die Absättigung des Calmodulin mit  $\text{Ca}^{2+}$  – Ionen kommt es zu einer Konformationsänderung der Kinase, die das Myosin für sie als Substrat zugänglich macht (Pearson et al. 1988; Rhoads und Friedberg 1997). Durch den, auf diese Weise aktivierten, Enzymkomplex wird eine Phosphatgruppe auf das Serin – 19 der leichten Kette des Myosins übertragen (Gallagher et al. 1997). Daraus folgt wiederum die Aktivierung der Actin – abhängigen ATPase – Aktivität des Myosins. Durch die Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat kommt es zur Vorspannung des Myosinköpfchens. Gleichzeitig wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  auch Troponin C (TnC) abgesättigt, was zu einer Konformationsänderung führt. Dadurch verändert der Troponin – Tropomyosin – Komplex seine Position am Actin und gibt auf diese Weise die Myosinbindestellen des Actins frei (Zot und Potter 1987)

Durch die Bindung des Myosins an Actin und die anschließende Freisetzung von ADP und Phosphat kommt es zum sogenannten „Kraftschlag“, bei dem das Myosin wieder seine ursprüngliche Konformation einnimmt. Durch die erneute Bindung eines ATP – Moleküls löst sich die Querverbindung zwischen Actin und Myosin wieder. Dieser Mechanismus wird als Querbrücken – Zyklus bezeichnet.

Sinkt die  $\text{Ca}^{2+}$  – Konzentration wieder, dann relaxiert das kontraktile System.  $\text{Ca}^{2+}$  wird aus dem intrazellulären Raum hauptsächlich durch den Natrium – Calcium – Austauscher und die Sarko/Endoplasmatische retikuläre  $\text{Ca}^{2+}$  – abhängige ATPase (SERCA) entfernt. Durch die Abnahme der Konzentration dissoziiert  $\text{Ca}^{2+}$  vom Calmodulin und Troponin C. Auf diese Weise wird ein weiterer Querbrücken – Zyklus verhindert (Voet und Voet 1994).

#### 1.4. Pathophysiologische Bedeutung von Proteinphosphatasen im kardiovaskulären System

Die Pathogenese vieler kardiovaskulärer Erkrankungen geht mit einer Veränderung der Phosphataseaktivität einher. So ist diese bei terminaler Herzinsuffizienz deutlich erhöht im Vergleich zu nicht – insuffizienten Herzen (Neumann et al. 1997; Mishra 2002). Dies gilt nicht nur für den Menschen, sondern auch für verschiedene Tiermodelle (Gupta et al. 2003; Boknik et al. 2000). Diese erhöhte Phosphataseaktivität führt wiederum zu einer verminderten Phospholamban – Phosphorylierung (Boknik et al. 2000). Phospholamban inhibiert im dephosphorylierten Zustand die Aktivität der SERCA. Durch die Phosphorylierung wird diese Hemmung aufgehoben und die SERCA kann mehr  $Ca^{2+}$  ins sarkoplasmatische Retikulum transportieren.

Auch bei Patienten mit Herzversagen sind wichtige regulatorische Proteine wie PLB und Tnl dephosphoryliert (Bartel et al. 1996; Schwinger et al. 1999; Bodor et al. 1997; Zakhary et al. 1999; Carr et al. 2002).

Tnl verhindert die Bindung von Myosin an Actin im entspannten Zustand. Durch die Phosphorylierung wird die Sensitivität der Myofilamente gegenüber  $Ca^{2+}$  verändert. Durch eine erhöhte Expression der katalytischen C – Untereinheit der PP2A in den Herzen von transgenen (TG) Mäusen, die mit einer erhöhten Phosphataseaktivität einhergeht, entwickeln TG Mäuse eine leichte Herzinsuffizienz und eine Hypertrophie (Gergs et al. 2004, siehe 1.7.). Ähnlich führt auch die herzspezifische Überexpression der PP1 bei Mäusen zu einer verringerten Herzfunktion, Kardiomyopathie und erhöhter Mortalität (Carr et al. 2002).

#### 1.5. Ischämie und Proteinphosphatasen

Im Jahr 2005 starben in Deutschland über 360.000 Menschen an Erkrankungen des Kreislaufsystems, davon starben mehr als 145.000 an ischämischen Herzkrankheiten (Statistisches Bundesamt 2006). Die Ursachen von kardialer Ischämie sind meist Verengungen der Blutgefäße, wie sie beispielsweise durch Arteriosklerose oder Thrombose auftreten können. Dabei kommt es zu einer Unterversorgung des Gewebes mit Blut und darausfolgend mit Sauerstoff. Der zelluläre Stoffwechsel wird beeinträchtigt und kommt schließlich zum Erliegen. Dadurch kann es, bei längerer

Dauer der Ischämie, zur Nekrose (Infarkt) kommen. Wird das ischämische Gewebe erneut mit Blut versorgt, erleidet es erneut starke Schäden. Die Ursachen des Reperfusionsschadens sind noch nicht vollständig geklärt. Eine Störung der Mitochondrienaktivität, eine veränderte  $\text{Ca}^{2+}$  – Homöostase und die Erzeugung von ROS werden dabei allerdings als Schlüsselfaktoren betrachtet (Di Lisa et al. 1998; Duchon 2000; Lesnefsky et al. 2001; Crow et al. 2004).

Dabei kommt es zunächst zum Aufbrauchen des vorhandenen ATP, das führt zur Verringerung der Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  – ATPase. Diese benötigt ein Molekül ATP für den Austausch von drei  $\text{Na}^+$  – Ionen gegen zwei  $\text{K}^+$  – Ionen über die Zellmembran. Auf Grund dessen steigt die intrazelluläre  $\text{Na}^+$  –Konzentration, was zum Umschalten der Transportaktivität des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$  – Austauschers führt. Dadurch kommt es zum Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$  – Konzentration innerhalb der Zelle. In Verbindung mit der Veränderung des pH – Wertes und der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl. reactive oxygen species) wie Superoxid, führt das zur ROS – induzierten ROS – Freisetzung (Zorov et al. 2006).

In der Vergangenheit ergaben sich Hinweise auf eine Beteiligung von Proteinphosphatasen am Verlauf der Ischämie. So zeigten Versuche mit dem selektiven PP2A – Hemmstoff Fostriecin eine Verringerung der Infarktgröße während einer regionalen Ischämie in Kaninchenherzen (Weinbrenner et al. 1998).

Versuche an Rattenherzen mit den Phosphatasehemmstoffen Cantharidin und Okadasäure zeigten eine Beeinflussung der Wirkung von Präkonditionierung auf die Erholung nach globaler Ischämie durch Proteinphosphatasen. Abhängig vom Zeitpunkt der Verabreichung kann die Wirkung positiv oder negativ für die Erholung sein (Ladilov et al. 2002, Fan et al. 2010).

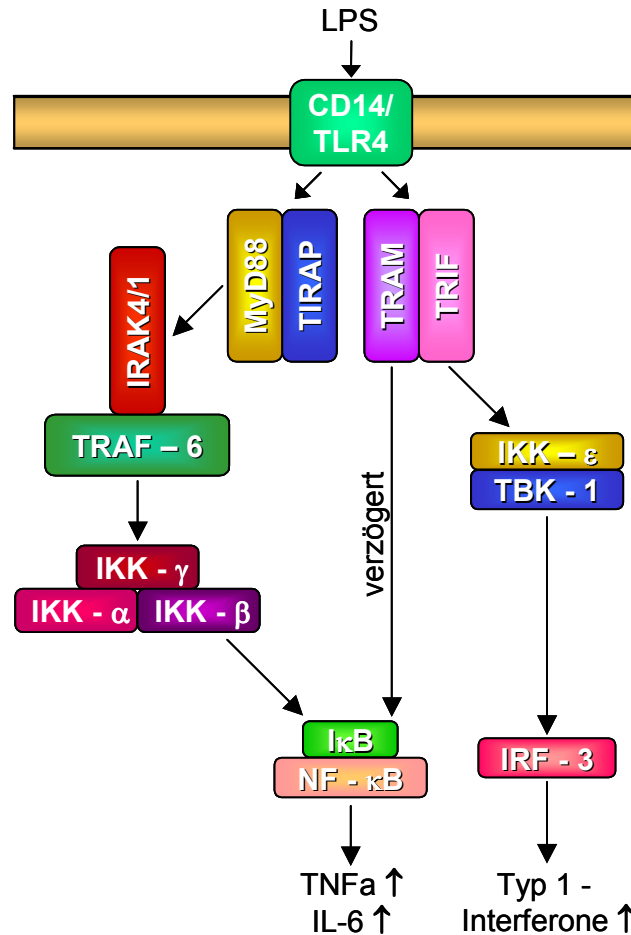
Cantharidin hemmt sowohl die PP1 als auch die PP2A, welche zusammen etwa 90 % der Phosphataseaktivität im Herzen ausmachen. Okadasäure hemmt konzentrationsabhängig mehrere Phosphatasen. Cantharidin besitzt für PP1 einen  $\text{IC}_{50}$  – Wert von 500 nM und für PP2A von 40 nM. Der  $\text{IC}_{50}$  – Wert für Okadasäure liegt für PP2A bei 1,6 nM, für PP1 jedoch bei 272 nM (Herzig und Neumann 2000). In den Versuchen mit Rattenherzen wurde ein Konzentrationsbereich gewählt, der eine Unterscheidung in der Hemmung der PP1 und PP2A ermöglichte.

Auch der Phosphorylierungszustand wichtiger Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) ist unter dem Einfluss von ischämischem Stress verändert. Dieser ist bei SERCA und PLB nach Ischämie verringert (Netticadan et al. 1999).

Nach längeren Ischämie – Perioden kann es zur  $\text{Ca}^{2+}$  – ausgelösten Hyperkontraktilität der Myofilamente kommen (Ganote und Kaltenbach 1979). Die Anfälligkeit dafür steigt während einer Ischämie zeitabhängig an, so dass dafür geringere Dosen an  $\text{Ca}^{2+}$  nötig sind. Der Phosphataseinhibitor Cantharidin kann diese Dosisverringern verhindern (Ladilov et al. 1997).

#### 1.6. Sepsis und Proteinphosphatasen

Die Sepsis ist eine aggressive Form einer Infektion, hervorgerufen durch Mikroorganismen oder deren Toxine. Diese können eine Entzündungsreaktion in allen Organen auslösen. Laut dem Kompetenznetz Sepsis (SepNet) starben im Jahr 2004 täglich 167 Menschen an den Folgen einer außer Kontrolle geratenen Sepsis. Ein anerkanntes wissenschaftliches Modell stellt die durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierte Sepsis dar. Während der Sepsis werden verschiedene Entzündungsmediatoren produziert, zu denen auch Tumornekrosefaktor  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ , Kapadia et al. 1995) und Interleukin – 6 (IL – 6) gehören. IL – 6 führt wiederum zu einer Inhibierung der PP2A (de la Torre et al. 2005).



**Abb. 1.4.: TLR4 – Signale über MyD88 – abhängigen und – unabhängigen Signalweg induzieren Cytokine (verändert übernommen aus Tavener und Kubes 2005).**

Die Signaltransduktion des LPS ist komplex und erfolgt über den Toll – like Rezeptor 4 (TLR 4, siehe Abbildung 1.4). Dabei bindet LPS zunächst im Plasma an das LPS – bindende Protein (LBP), welches das LPS zur Zelloberfläche bringt und dort mit dem LPS – Rezeptorprotein CD14 einen Komplex bildet. Der LPS – CD14 – Komplex erleichtert den Transfer von LPS auf den Rezeptorkomplex aus TLR 4 und MD2 (Glycoprotein, welches vermutlich die Ligandenerkennung unterstützt). Nach der Bindung kann die Signaltransduktion über zwei Wege erfolgen. Der erste Signalweg ist abhängig vom Myeloiddifferenzierungsfaktor 88 (MyD88), der zweite Weg ist davon unabhängig.

MyD88 ist ein Adapterprotein mit einer C – terminalen TIR – Domäne (TIR – Toll/IL – 1R) und einer N – terminalen Todes – Domäne (DD). Während der LPS – Stimulation assoziieren weitere TIR – Domäne – enthaltende Adapterproteine (TIRAP) mit dem TLR4, welche essentiell für den MyD88 vermittelten Signalweg sind.



Dieser Komplex rekrutiert die IL – 1 – Rezeptor – assoziierten Kinase (IRAK) 1 und 4 über die DD von MyD88.

Durch die Bindung von IRAK 4 kommt es zur Transphosphorylierung von IRAK 1, wodurch deren Kinaseaktivität induziert wird. Dies resultiert in der Möglichkeit den TNF – Rezeptor – assoziierten Faktor 6 (TRAF6) zu binden. Der IRAK 1/TRAF – Komplex dissoziiert vom Rezeptor und sorgt für die TAK1 – vermittelte (Transformationswachstumsfaktor  $\beta$  aktivierte Kinase) Phosphorylierung des I $\kappa$ B – Kinase – Komplexes (IKK). Dieser Komplex besteht aus den katalytischen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  und der regulatorischen Untereinheit  $\gamma$ .

Die Aktivierung des IKK – Komplexes sorgt für die Phosphorylierung eines Inhibitors der NF –  $\kappa$ B – Familie (I $\kappa$ B), der dann Proteosom – vermittelt abgebaut wird.

Dadurch wird NF –  $\kappa$ B (Nuklearfaktor – kappa – B) freigesetzt und in den Nucleus transportiert, wo es zur Expression von TNF $\alpha$  und IL – 6 kommt.

Neben dem MyD88 – abhängigen Signalweg gibt es auch einen MyD88 – unabhängigen. Dieser beginnt mit der Bindung von TRAM (TRIF – bezogenes Adaptermolekül) gefolgt von TRIF (TIR – Domänen – enthaltender Interferon –  $\beta$  – induzierender Adapter).

TBK1 (TRAF Familien – assoziierte NF –  $\kappa$ B – bindende Kinase 1) und IKK $\epsilon$  interagieren mit TRIF, wodurch IRF3 (Interferonregulierter Faktor 3) aktiviert wird. Dies führt zur Expression von Typ 1 Interferonen (IFN).

Parallel dazu kommt es über TRAM zu einer verzögerten Freisetzung von NF -  $\kappa$ B vom I $\kappa$ B und der daraus folgenden Expression von TNF $\alpha$  und IL – 6 (Dauphinee und Karsan 2006, siehe Abbildung 1.4.).

Abbildung 1.5. zeigt schematisch den Einfluss der PP2A auf verschiedene Zielproteine in Kardiomyocyten. Bei einer LPS – induzierten Sepsis kommt es zu einer verstärkten Tnl – Phosphorylierung an der N – terminalen PKA – sensitiven Phosphorylierungsstelle. Dadurch verringert sich die Sensitivität der Myofilamente für Ca<sup>2+</sup> (Layland et al. 2005).

Außerdem führt die LPS – induzierte Sepsis zur Aktivierung der NADPH – Oxidase (Nicotinamidadenindinukleotidphosphatoxidase) und dadurch zu einer erhöhten Superoxidaniongenerierung (Babior 2002; Ben – Shaul 2001).

Eine Inhibierung der PP2A – Aktivität durch Okadasäure führt zu einer erhöhten Aktivität der c – Jun N – terminalen Kinase (JNK) und damit zu einer verstärkten c – Jun – Phosphorylierung (Shanley et al. 2001). Phosphoryliertes c – Jun besitzt eine

höhere Aktivität als unphosphoryliertes. Unter dem Einfluss von Endotoxinen kommt es zu einer Hochregulierung von c – Jun, was zur Expression von Cytokinen führt.

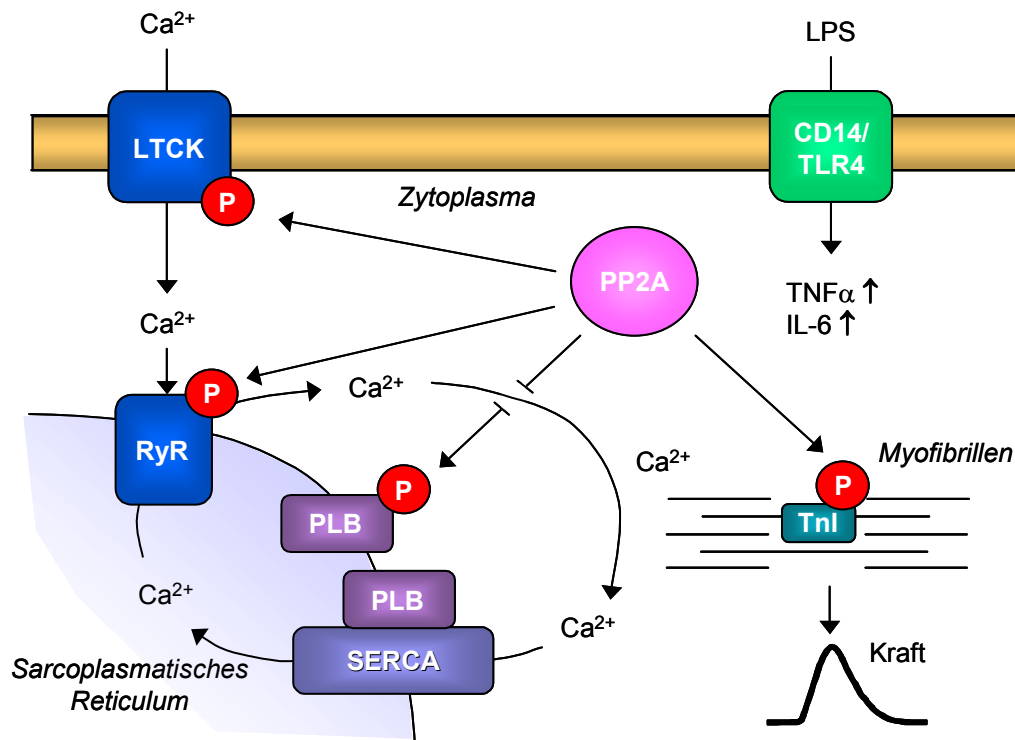


Abb. 1.5.: Die Rolle der PP2A in der Regulation der Kardiomyocytenkontraktion.

### 1.7. Überexpression der katalytischen C – Untereinheit in Mäusen

Die katalytischen C – Untereinheit der PP2A wurde in TG Mäusen unter der Kontrolle des  $\alpha$ MHC – Promotors herzspezifisch überexprimiert. Diese Mäuse entwickeln eine Hypertrophie. Damit verbunden sind eine verringerte Kontraktilität, eine Dilatation der Ventrikel und eine verringerte Reaktion auf  $\beta$  – adrenerge Stimulation. Die Zeit bis auf 50 % Abfall der Ca<sup>2+</sup> – Transienten und die Zeit bis zur 90 %-Relaxation der Kardiomyocyten sind verlängert (Gergs et al. 2004).

Die Phosphorylierung wichtiger Zielproteine wie Troponin I (TnI) und Phospholamban (PLB) ist verringert. Es zeigte sich allerdings keine Veränderung der Expressionslevel der SR – Proteine wie Calsequestrin (CSQ), SERCA und PLB. Allerdings kommt es bei diesen Mäusen zu keinem Anstieg der Mortalität.

## 2. Fragestellung

Die reversible Phosphorylierung vieler Proteine gehört zu den wichtigsten posttranslationalen Regulationsmechanismen bei der Anpassung von Zellen an verschiedenste Stimuli. Die Rolle von Proteinkinasen wurde bereits umfangreich studiert, dem gegenüber ist die Rolle von Proteinphosphatasen noch zu einem großen Teil ungeklärt.

Während der Einfluss der PP1 bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz sehr gut untersucht ist (Carr et al. 2002), ist die Bedeutung der PP2A größtenteils noch nicht erforscht. Ein möglicher Mechanismus der durch Phosphatasen – Überexpression vermittelten Herzinsuffizienz in Verbindung mit Nekrose und Fibrose (Gergs et al. 2004) könnte die Induktion einer Apoptose sein (Chatfield und Eastman 2004).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden transgene Mäuse, welche die katalytische C – Untereinheit der PP2A (PP2A<sub>Cα</sub>) herzspezifisch überexprimieren, hämodynamisch und molekularbiologisch untersucht. Zwar wurde diese Tierlinie teilweise charakterisiert (Gergs et al. 2004), es wurde aber noch nicht geklärt, welche Auswirkungen die Überexpression dieser Phosphatase auf die Reaktion dieser Mäuse gegenüber Stressbedingungen hat.

Aus diesem Grund wurden die Tiere typischen, klinisch relevanten Stressbedingungen ausgesetzt. Die Auswahl von Ischämie und Sepsis erfolgte wegen der hohen klinischen Bedeutung dieser Stressbedingungen. Beide Stressfaktoren induzieren komplexe regulatorische Mechanismen und in beiden Fällen existieren deutliche Anzeichen für eine regulierende Beteiligung von Phosphatasen im Allgemeinen und PP2A im Besonderen.

Die globale Ischämie wurde in der Versuchsanlage für das arbeitende Herz durch Abschalten der Pufferperfusion verursacht. Damit sollte unter in vitro Bedingungen eine möglichst hohe Ähnlichkeit zum physiologischen Vorgang erreicht werden, bei dem ebenfalls der Blutfluss im Herzen unterbrochen wird.

Für die Untersuchung des Einflusses von septischem Stress wurde das etablierte Modell einer Induktion durch injiziertes LPS gewählt. In Vorversuchen wurde dazu zunächst die benötigte LPS – Konzentration ermittelt.

Die Herzen der Tiere wurden anschließend mit Hilfe der Methode des arbeitenden Herzens hämodynamisch untersucht, um mögliche funktionelle Änderungen in der Stressantwort der TG Mäuse festzustellen.

Die molekularbiologischen Untersuchungen beinhalteten unter anderem die Bestimmung der Expressionsmenge der typischen SR – Proteine und Stressfaktoren mittels Western Blot, PCR und Northern Blot.

Weiterhin wurde die Genexpression mit Hilfe einer Mikroarray – Analyse untersucht. Dabei sollten Veränderungen möglicher Kandidaten – mRNAs identifiziert werden, welche die Stressantwort der TG Mäuse beeinflussen könnten.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Untersuchungsmaterial

##### 3.1.1. Beschreibung der Mauslinie

In den Experimenten wurden TG Mäuse vom CD – 1 – Stamm in unterschiedlichem Alter verwendet, welche die katalytische C – Untereinheit der PP2A unter dem Einfluss des  $\alpha$ MHC – Promotors (Promotor der schweren Kette der  $\alpha$  – Isoform des Myosins, siehe 3.1.3.) herzspezifisch überexprimieren (Gergs et al. 2004). Als Kontrollen wurden gleichaltrige Wildtyp (WT) Geschwistertiere verwendet.

Die Tiere wurden in schallisolierten Räumen mit 12 h Tag – Nacht – Rhythmus gehalten. Sie wurden mit handelsüblichem Labortierfutter (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und Leitungswasser versorgt.

##### 3.1.2. Beschreibung der E. coli Stämme

Bakterienstämme:

Stamm	Eigenschaften	Herkunft
E. coli XL1 Blue	RecA1, endA1, gyrA96 tji-1, hsdR17 supE44 relA1 [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)</i> ] c	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
E. coli BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> , <i>dcm, hsdS (r<sup>m</sup>) gal, lon, ompT</i>	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland

##### 3.1.3. Beschreibung der Plasmide

Plasmid	Resistenzgen
$\alpha$ MHC – Vektor	Ampicillin
pJET1/blunt - Vektor	Ampicillin

$\alpha$ MHC – PP2A – Vektor

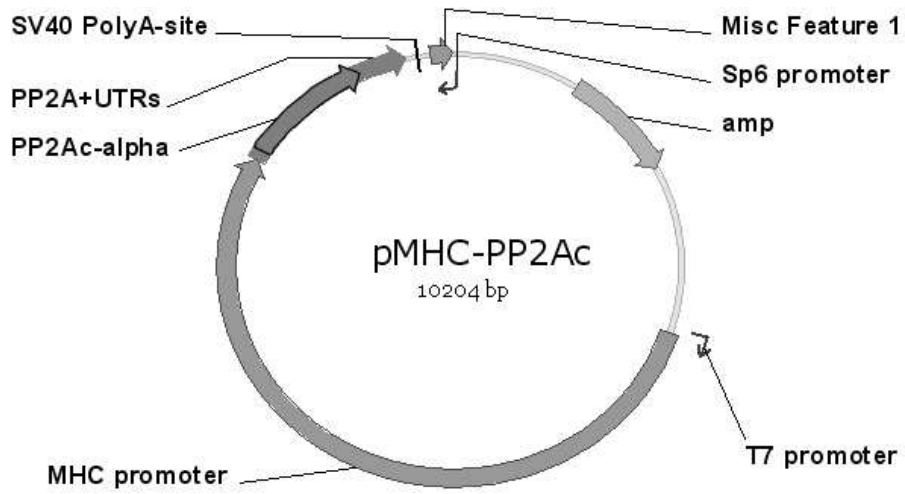


Abb. 3.1.: Karte des  $\alpha$ MHC – Vektors (Gergs et al 2004).

pJET1/blunt – Vektor

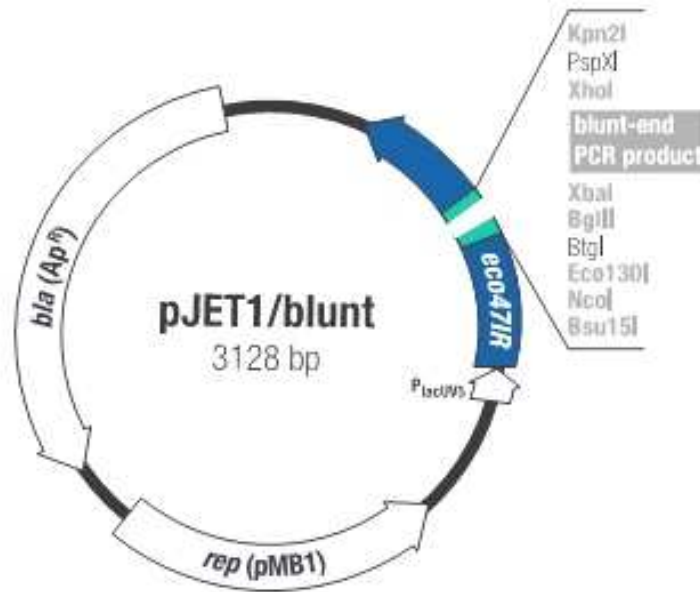


Abb. 3.4.: Karte des pJET1/blunt – Vektors (Fermentas, St. Leon – Rot, Deutschland).

### 3.1.4. Beschreibung der Antikörper

Verwendete Antikörper	Herkunft
2D12 – Anti – PLB – Antikörper	Zur Verfügung gestellt von Larry R. Jones (Krannert Institute of Cardiology, Indianapolis, USA)
Anti – PP2A - Antikörper	BIOMOL GmbH, Hamburg; Deutschland
Anti – SERCA - Antikörper	Zur Verfügung gestellt von Larry R. Jones (Krannert Institute of Cardiology, Indianapolis, USA)
CSQ - Antikörper	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Deutschland
Polyclonal Rabbit Anti-nNOS/NOS Type I	BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland
Polyclonal Rabbit Anti-eNOS/NOS Type III	BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland

## 3.2. Arbeitstechniken

### 3.2.1. Arbeitstechniken mit RNA

#### 3.2.1.1. Gesamt – RNA – Präparation aus Mäuseherzen

Zur Vorbereitung der RNA – Extraktion wurde DEPC – Wasser (DEPC – Diethylpyrocarbonat) hergestellt. Dazu wurde 1 ml DEPC zu 1 l deionisiertem Wasser gegeben und nach dem Mischen für 12 h bei 30°C und konstantem Schütteln inkubiert. Dabei wurde das Gefäß leicht geöffnet, um entstehenden Druck abzulassen. Verbliebenes DEPC wurde durch Autoklavieren entfernt.

Die Gewinnung der Gesamt – RNA erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987). Die eingefrorenen Herzen von WT und TG Mäusen wurden in 1 ml/50 mg Gewebe TRIzol™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) im Mikro – Dismembrator S (Sartorius, Göttingen, Deutschland) für 1 Minute bei 2100 rpm homogenisiert. Nach dem Auftauen (auf Eis) erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml TRIzol™. Die Isolationsansätze wurden gemischt und für 5

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C in einer Eppendorf 5415C Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zur Phasentrennung. Dabei trennten sich 3 Phasen, die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, die mittlere Interphase, in der die DNA enthalten war und die untere phenolische Phase, in der sich die Proteine befanden. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 0,5 ml Isopropanol pro ml TRIzol versetzt. Für 15 Minuten erfolgte ein Fällungsschritt mit anschließender Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4°C. Das Pellet wurde 2 Mal mit 0,9 ml 75 % Ethanol gewaschen und jeweils für 5 Minuten bei 10000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die RNA wurde getrocknet und in 20 µl DEPC – Wasser aufgenommen. Zum vollständigen Lösen der RNA wurde diese für 10 Minuten auf 60°C erhitzt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

#### 3.2.1.2. RNA – Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der RNA erfolgte in einem einprozentigen Agarosegel, unter denaturierenden Bedingungen (Sambrook et al. 1989). Die Herstellung des Gels erfolgte unter Verwendung von MOPS – Puffer (20 mM MOPS; 5 mM Na – Acetat; 1 mM EDTA; pH 7,0), es enthielt 2 Prozent Formaldehyd. Der Gellauf wurde ebenfalls mit einem denaturierenden Laufpuffer (20 mM MOPS; 5 mM Na – Acetat; 1 mM EDTA; 0,75 % Formaldehyd; pH 7,0) durchgeführt. Die RNA wurde mit einem Viertel Volumen Ladepuffer (80 mM MOPS; 20 mM Na – Acetat; 8 mM EDTA; 2,7 % Formaldehyd; 20 % Glycerin; 30 % Formamid; pH 7,0) aufgenommen und 12 µg pro Spur aufgetragen. Die Qualität der RNA wurde durch Betrachten der Ethidiumbromid – gefärbten Gele unter UV – Licht überprüft. Dabei sollte das Verhältnis der 28S – rRNA zur 18S – rRNA 2:1 betragen.

#### 3.2.1.3. Northern Blot

Das RNA – Gel (siehe 3.2.1.2.) wurde in 10x SSC – Puffer (1,5 M NaCl; 150 mM Na – Citrat; pH 7,0) in einem Vakuum – Blotter (Biometra, Göttingen, Deutschland) auf eine Nylon – Membran (Amersham Biosciences, Little Chalfont, England) transferiert. Die RNA wurde anschließend bei einem angelegten Vakuum von 100 mbar für 3 h auf die Nylon – Membran übertragen und danach mittels Bestrahlung



durch UV – Licht (254 nm, 120 J/cm<sup>2</sup>) auf der Membran fixiert. Die feuchte Membran wurde, zur Lagerung, in Haushaltsfolie eingeschweißt.

#### 3.2.1.4. cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase

Die Synthese von cDNA aus der RNA von Herzen LPS – behandelte Mäuse erfolgte mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon – Rot, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde zunächst auf Eis ein Master – Mix vorbereitet:

Komponente	Menge
Template – RNA	5 µl
Primer ( <i>random hexamer</i> ; 0,2 µg/µl)	1 µl
DEPC – Wasser	6 µl

Dieser wurde vorsichtig gemischt und dann für 5 Sekunden abzentrifugiert. Im Anschluss wurde der Master – Mix für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt und erneut abzentrifugiert. Auf Eis erfolgte die Zugabe folgender Komponenten:

Komponente	Menge
5x Reaktionspuffer	4 µl
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
10 mM dNTP – Mix	2 µl

Der Ansatz wurde wiederum vorsichtig gemischt, kurz abzentrifugiert und anschließend für 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Nun erfolgte die Zugabe von 1 µl RevertAid™ H Minus M – MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl).

Für weitere 10 Minuten wurde der Ansatz bei 25°C und anschließend für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch das Erhitzen auf 70°C für 10 Minuten. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt und es erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung bei 260 nm. Eine OD (optische Dichte) von eins entspricht hier einer Konzentration von 50 µg/ml. Gleichzeitig wurde die OD

bei 280 nm bestimmt, bei der das Absorptionsmaximum der Proteine liegt. Die Bestimmung der Reinheit der cDNA erfolgte durch Berechnung des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  (Sambrook et al. 1989), dieser Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

#### 3.2.1.5. Radioaktive Markierung der Sonden

Die unter 3.2.2.8. hergestellten Sonden wurden mit Hilfe zufällig bindender Hexamer-Primer radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein 1983). Dazu wurde das Random Primed DNA Labeling Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden ca. 20 ng Template – DNA verwendet, welche zunächst für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt wurde, um eine Renaturierung zu vermeiden. Anschließend wurde der Reaktions – Mix hinzugegeben. Dieser enthielt, neben dATP, dGTP, dTTP, dem Oligonucleotidprimer zufälliger Sequenz und 1 U/ $\mu$ l Klenow – Enzym, 50  $\mu$ Ci [ $\alpha^{32}$ P]dCTP. In einer 30 minütigen Polymerasereaktion bei 37°C wurde das [ $\alpha^{32}$ P]dCTP in den zur eingesetzten Template – DNA komplementären Strang eingebaut. Durch Erhitzen des Ansatzes für 10 Minuten auf 65°C wurde die Reaktion gestoppt.

Anschließend wurden die Sonden mit Hilfe von ProbeQuant<sup>TM</sup> G – 50 Micro Columns (Amersham Biosciences, Little Chalfont, England) von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt. Dazu wurde der Ansatz zunächst auf 50  $\mu$ l mit STE – Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris – HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) aufgefüllt und danach auf die vorbereitete Säule gegeben. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 3000 rpm wurde der Durchlauf, welcher die markierten Sonden enthielt, für weitere 10 Minuten bei 95°C denaturiert und zum Hybridisierungsansatz gegeben.

#### 3.2.1.6. Hybridisierung

Die Nylon – Membran mit der fixierten RNA (siehe 3.2.1.3.) wurde in 10 ml Hybridisierungslösung (sechsfach SSC – Puffer; 0,1 % Ficoll (400); 0,1 % PVP; 0,1 % BSA; 0,5 % SDS; 100  $\mu$ g/ml Salmon Sperm; 50 % Formamid; pH 7,0) in einem Prä – Hybridisierungsschritt bei 42°C für 1 h rotierend inkubiert. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Sonden (siehe 3.2.1.5.) direkt zum Hybridisierungsansatz gegeben und die rotierende Inkubation wurde bei 42°C über Nacht fortgesetzt.

Am folgenden Tag wurde die hybridisierte Membran in 5 Schritten für jeweils 20 Minuten gewaschen. Zunächst wurde einmal mit zweifach SSC mit 0,1 % SDS, danach zweimal mit einfach SSC mit 0,1 % SDS, anschließend mit 0,5 – fach SSC mit 0,1 % SDS und im letzten Schritt mit 0,1 – fach SSC mit 0,1 % SDS gewaschen. Die Membran wurde in Haushaltsfolie eingeschweißt und in einer Phosphoimagerkassette über Nacht exponiert. Die radioaktiven Sonden wurden für weitere Hybridisierungen durch Waschen der Membran in 2 x SSC mit 0,1 % SDS über Nacht bei 60°C entfernt. Anschließend wurde die Membran erneut in Haushaltsfolie eingeschweißt und die vollständige Entfernung der Sonden durch erneute Exposition in einer Phosphoimagerkassette überprüft.

#### 3.2.1.7. Microarray – Analyse

Vor der Microarray – Analyse wurde die RNA mit Hilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) auf ihre Qualität und Konzentration hin untersucht. Dafür wurde das RNA 6.000 LabChip Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die Microarray – Analyse wurde am Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (IZKF) in Leipzig (Medizinische Fakultät, Universität Leipzig) durchgeführt. 5 µg RNA wurden zur cDNA – Synthese eingesetzt (Superscript II, Life Technologies, Gaithersburg, USA). Die cDNA enthielt einen T7 – RNA – Polymerase – Promotor (Genset SA, Paris, France). Anschließend wurde sie durch Phenol – Chlorophorm – Extraktion gereinigt und mit Hilfe des IVT labeling Kits (Affymetrix, Santa Clara, USA) in cRNA umgeschrieben. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch das RNeasy Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) entfernt.

Die cRNA wurde fragmentiert und auf dem Affymetrix GeneChip MG 430 2.0 Array hybridisiert. Das Waschen und Färben des Arrays wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Danach wurde der Array mit einem Affymetrix GeneChipScanner 3000 gescannt.

Die Affymetrix GeneChip – Daten wurden aus der Fluoreszenzintensität ermittelt und mit Hilfe der MAS 5.0 Software nach Angaben des Herstellers skaliert. Diese Daten repräsentieren annähernd 29.000 Gene, welche das komplette Maus – Genom abdecken.

### 3.2.1.8. Quantitative Real Time PCR zur Bestimmung der TRPV 1 - Expression

Die Bestimmung der TRPV 1 – mRNA – Expression (Transienter Vanilloidrezeptor Typ 1, *transient receptor vanilloid type 1*) wurde wie in Thilo et al. 2008 beschrieben durchgeführt. Die RNA – Isolation erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Die erhaltene RNA wurde in cDNA umgeschrieben (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Die mRNA – Menge wurde mittels quantitativer Real Time PCR (LightCycler, Roche Diagnostics) bestimmt. Die genspezifischen Primer wurden mit dem Programm Lasergene7 (DNA-Star, Madison, Wisconsin, USA) abgeleitet. Als interne Kontrolle wurde Glycerinaldehyd – 3 –phosphat – Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Verwendete Primer	Sequenz
GAPDH forward	ACCTCAACTACATGGTCTAC
GAPDH reverse	TTGTCATTGAGAGCAATGCC
TRPV 1 forward	TGCCCTATCATCACCGTCAG
TRPV 1 reverse	GTGTTGCCACCGAATCC

Komponente	Menge
Template-cDNA	2 µl
LightCycler-Fast Start DNA SYBR Green I Mix	4 µl
forward – Primer	500 nmol/l
reverse – Primer	500 nmol/l
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Verwendetes PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	600 s	1 Zyklus
2	95°C	10 s	45 Zyklen
3	54°C	10 s	
4	72°C	15 s	

Am Ende jeder Verlängerungsphase wurde die Fluoreszenz gemessen. Um die korrekte Amplifikation sicher zu stellen, wurde anschließend eine Schmelzkurve von 65°C bis 95°C und 0,1°C – Intervallen durchgeführt.

Die TRPV 1 Expression wurde im Verhältnis zum konstitutiv exprimierten Gen GAPDH bestimmt und normalisierte Verhältnisse wurden unter Einbeziehung einer Effizienzkorrektur und einer Eichkonstante berechnet. Die Auswertung erfolgte wie in Thilo et al. 2008.

### 3.2.1.8. Quantitative Real Time PCR zur Bestimmung der TNF $\alpha$ – und IL – 6 – Expression

Die RNA wurde, mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), nach Herstellerangaben isoliert und anschließend mit DNase I verdaut, um eventuelle DNA – Reste zu entfernen. Die reverse Transkription wurde mit 1  $\mu$ g RNA durchgeführt. Die cDNA wurde unter Verwendung von, mit qScript (Quanta Biosciences) erzeugten, Zufallsprimern amplifiziert.

Als Kontrolle wurde jede Probe auch ohne reverse Transkription analysiert. Die erhaltenen Signale waren vernachlässigbar (< 1 %).

Die Real Time Amplifikation wurde in einem Stratagene Mx 3005P durchgeführt. Dabei wurde das Platinum SYBR Green Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet wie vom Hersteller angegeben. Die relative Expression der untersuchten Gene wurde mit der 2DDC – Methode (Livak et al. 2001) errechnet, wobei das Signal der 18S – RNA zur Normalisierung verwendet wurde. Es wurden Dreifachbestimmungen für jede Probe durchgeführt.

Primer	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
18 S	GTTGGTGGAGCCGATTTGTCTGG	AGGGCAGGGACTTAATCAACGC
IL-6	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	TTCTGCAAGTGCATCATCGT
TNF $\alpha$	CACACTCAGATCATCTTCTCAAAA	GTAGACAAGGTACAACCCATCG

### 3.2.2. Arbeitstechniken mit DNA

#### 3.2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgte mit Hilfe der RbCl – Methode, welche Transformationsraten von mehr als  $5 \times 10^8$  Kolonien pro eingesetztem  $\mu\text{g}$  Plasmid – DNA erlaubt (Hanahan 1983). Von den E. coli – Stämmen XL1 Blue und BL21 (DE3) wurden im  $\text{YT}^{++}$  – Medium (8 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 20 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 10 mM KCl; pH 7,5) 2,5 ml – Übernachtskulturen bei  $37^\circ\text{C}$  angesetzt. Danach wurden 5 ml –  $\text{YT}^{++}$  – Vorkulturen mit 50  $\mu\text{l}$  der Übernachtskulturen angeimpft und ebenfalls bei  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,8 inkubiert. Nach einer zweiten Verdünnung der 5 ml – Vorkulturen auf 100 ml  $\text{YT}^{++}$  – Medium wurden die Bakterien bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4 bis 0,55 kultiviert und dann schnell auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei  $4^\circ\text{C}$  und 7000 rpm in einer Beckman Avanti™ Zentrifuge mit einem F2402H Rotor (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) für 5 Minuten. Die Zellen einer 100 ml – Kultur wurden in 20 ml eiskaltem TFB I – Puffer (30 mM Kaliumacetat; 50 mM  $\text{MnCl}_2$ ; 100 mM RbCl; 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 15 % Glycerin; pH 5,8) resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei  $4^\circ\text{C}$  und 7000 rpm. Danach wurden die Zellen in 4 ml eiskaltem TFB II – Puffer (10 mM MOPS; 75 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 10 mM RbCl; 15 % Glycerin; pH 7,0) gelöst, in Vielfache von 200 ml aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 3.2.2.2. Transformation von Plasmid – DNA in Bakterienzellen

Die unter 3.2.2.1. hergestellten kompetenten Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. 100  $\mu\text{l}$  der Bakterienzellen wurden mit ca. 50 ng Plasmid – DNA bzw. einem Ligationsansatz gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 2 Minuten auf  $42^\circ\text{C}$  erhitzt und nach diesem Hitzeschock für 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 900  $\mu\text{l}$  LB – Medium (10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl) wurde der Ansatz für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Thermoblock mit Schüttelfunktion inkubiert. Danach wurden die Bakterien kurz abzentrifugiert, in etwa 100  $\mu\text{l}$  des Überstands resuspendiert und auf LB – Agar – Platten (LB – Medium + 20 g/l Agar), welche das für das Plasmid

entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert. Nach einer Übernachtinkubation bei 37°C wurde das Vorhandensein von Kolonien überprüft.

### 3.2.2.3. Präparation von Plasmid – DNA aus Bakterienkulturen

Die Präparation von Plasmid – DNA aus Bakterienkulturen erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly 1979). Dazu wurden 5 ml Bakterienkultur für 5 Minuten bei 5000xg zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Resuspensionspuffer P1 (50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A; pH 8,0) resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer P2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) wurden die Bakterien Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Durch die Lyse in Anwesenheit von SDS wurden die chromosomale DNA, die Plasmid – DNA und die Proteine denaturiert. Zur Neutralisation wurden 150 µl Neutralisationspuffer P3 (3 M Kaliumacetat; pH 5,5) zum Ansatz hinzugegeben und dieser für 5 Minuten inkubiert. Das vorhandene SDS fällt als unlösliches K – SDS aus, wobei chromosomale DNA und Proteine in Salz – Detergens – Komplexen gebunden werden und ebenfalls ausfallen. Die Plasmid – DNA kann auf Grund ihrer geringen Größe unter diesen Bedingungen schneller als die chromosomale DNA renaturieren und bleibt in Lösung. Der Ansatz wurde, zum Abtrennen des weißen Niederschlages, für 30 Minuten bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der Plasmid – DNA erfolgte durch Zugabe von 100 %igen Ethanol. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur und 13000 rpm für 20 Minuten in einer Eppendorf 5415C Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das DNA – Sediment wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend unter Vakuum (Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 50 µl DEPC – Wasser (siehe 3.2.1.1.) aufgenommen und für 10 Minuten bei 65°C gelöst. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter 3.2.1.4. beschrieben. Die Lagerung der DNA erfolgte bei –20°C.

#### 3.2.2.4. DNA – Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte unter den für das jeweilige Enzym vorgegebenen Bedingungen nach Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon – Rot, Deutschland).

#### 3.2.2.5. Klonierung in den pJET1/blunt – Klonierungsvektor

Die Klonierung von DNA – Fragmenten in den pJET1/blunt – Vektor erfolgte mit Hilfe des GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Heidelberg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Dazu erfolgte eine Reaktion zur Entfernung überstehender Basen der DNA – Fragmente. Zunächst wurden 10 µl zweifach konzentrierter Reaktionspuffer zusammen mit 8 µl Gel – aufgereinigtem (siehe 3.2.2.7.) PCR – Produkt und einem µl einer Exonuklease für einsträngige DNA zur Glättung der PCR – Produktenden für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis abgestoppt. Anschließend erfolgte die Ligations – Reaktion. Dafür wurden zum Ansatz 1 µl pJET1/blunt (50 µg/µl) und 1 µl T4 DNA – Ligase hinzugegeben und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde, wie unter 3.2.2.2. beschrieben, in E. coli XL1 blue transformiert.

#### 3.2.2.6. Agarosegelelektrophorese

Die Trennung von DNA – Fragmenten erfolgte mittels nativer Agarosegelelektrophorese. Dabei wurde eine Trennung im Größenbereich von 250 bp bis 10000 bp erreicht. Die Agarosekonzentration lag dabei bei 1 %. Die entsprechende Agarosemenge wurde in TAE – Puffer (40 mM Tris – Base; 0,11 % Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8,0) durch Erhitzen gelöst. Das Gel enthielt Ethidiumbromid, um die DNA später im UV-Licht sichtbar machen zu können. Die Proben wurden in Probenpuffer (10 % TAE – Puffer; 10 % Glycerin; Bromphenolblau) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer bei 60 mA.



### 3.2.2.7. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe eines DNA Extractions Kits (Fermentas, St. Leon – Rot, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde die entsprechende DNA – Bande unter schwachem UV – Licht bei 312 nm aus dem Gel ausgeschnitten und in ein vorgewogenes Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Gewicht des Gelfragments wurde bestimmt und 3 µl Bindungslösung pro mg Gel zugegeben. Der Ansatz wurde bei 55°C inkubiert, bis sich das Gel vollständig gelöst hatte. Es wurden nun etwa 5 µl Silica – Suspension hinzugefügt und weiter bei 55°C inkubiert. Im Abstand von ein bis 2 Minuten wurde der Ansatz gerüttelt, um die Silica –Kügelchen in Suspension zu halten. Im Anschluß wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 3 Mal mit 500 µl eiskaltem Waschpuffer gewaschen und dieser nach dem letzten Waschschrift vollständig entfernt. Das Sediment wurde für 15 Minuten bei 30°C getrocknet. Die DNA wurde anschließend 2 Mal mit DEPC – Wasser (siehe 3.2.1.1.) für 5 Minuten bei 55°C eluiert und die Eluate zusammengeführt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

### 3.2.2.8. Herstellung der Sonden für TNF $\alpha$ und ANP

Die PCR zur Herstellung der TNF $\alpha$  – und ANP – Sonden (Atrionatriuretisches Protein) erfolgte mit cDNA (siehe 3.2.1.4.) von LPS – vorbehandelten Mäusen als Template – DNA. Dafür wurden PCR –Reaktionen mit Primern für kurze Sequenzstücke des jeweiligen Gens durchgeführt. Anschließend wurden die Sonden mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese (siehe 3.2.2.6.) und Gelextraktion (siehe 3.2.2.7.) überprüft und gereinigt.

#### PCR der ANP – Sonde

Verwendete Primer:

Name	Sequenz	T <sub>m</sub>
mANP-for-327	5'-TGT ACA GTG CGG TGT CCA AC-3'	59,4°C
mANP-rev-327	5'-TGT CAA TCC TAC CCC CGA AG-3'	59,4°C
Erwartetes PCR-Produkt	327 bp	

Komponente	Menge	Endkonzentration
Template-cDNA	1 µl	0,1 µg
10x Standard Puffer (Ampliqon)	5 µl	1x
dNTP – Mix (1 mM)	1 µl	200 µM
mANP-for-327 (100 µM)	0,5 µl	1 µM
mANP-rev-327 (100 µM)	0,5 µl	1 µM
Taq – Polymerase (Ampliqon)	0,5 µl	2,5 U
H <sub>2</sub> O	41,5 µl	

Verwendetes PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	120 s	1 Zyklus
2	94°C	30 s	30 Zyklen
3	59,4°C	30 s	
4	72°C	60 s	
5	10°C	halten	1 Zyklus

PCR der TNF $\alpha$  – Sonde

Verwendete Primer:

Name	Sequenz	T <sub>m</sub>
TNF-322-for	5'-GGC ATG GAT CTC AAA GAC AAC-3'	51°C
TNF-322-rev	5'-CGG ACT CCG CAA AGT CTA AG-3'	52°C
Erwartetes PCR-Produkt		322 bp

Komponente	Menge	Endkonzentration
Template-cDNA	1 µl	0,1 µg
10x Standard Puffer (Ampliqon)	5 µl	1x
dNTP – Mix (1 mM)	1 µl	200 µM
TNF-322-for (100 µM)	0,5 µl	1 µM
TNF-322-rev (100 µM)	0,5 µl	1 µM
Taq – Polymerase (Ampliqon)	0,5 µl	2,5 U
H <sub>2</sub> O	41,5 µl	

Verwendetes PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	120 s	1 Zyklus
2	94°C	30 s	30 Zyklen
3	51°C	30 s	
4	72°C	60 s	
5	10°C	halten	1 Zyklus

Die gereinigten Sonden wurden in den pJET1/blunt – Klonierungsvektor kloniert (siehe 3.2.2.5.) und danach in E. coli XL1 Blue transformiert (siehe 3.2.2.2.)

### 3.2.3. Proteinchemische Arbeitstechniken

#### 3.2.3.1. Herstellung von Homogenaten

Die eingefrorenen Herzen von WT und TG Mäusen wurden in Lysepuffer (50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 µl/ml IGEPAL™ CA-630; pH 7,5) oder Homogenisationspuffer (20 mM Tris – HCl; 5 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0,1 % Mercaptoethanol; 0,5 mM PMSF; 1 mM Benzamidin; pH 7,4) im Mikro – Dismembrator S (Sartorius, Göttingen, Deutschland) für 1 Minute bei 2100 rpm homogenisiert. Das Lysat bzw. Homogenat wurde für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert.

#### 3.2.3.2. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951). Als Standard wurde dabei Rinderserumalbumin (Sigma – Aldrich, München, Deutschland) verwendet.

#### 3.2.3.3. Gemeinsame Immunpräzipitation von PLB und PP2A<sub>C</sub>

Das Lysat (siehe 3.2.3.1.) wurde in Konzentrationen von 0,5 µg/µl, 1 µg/µl, 1,5 µg/µl und 2 µg/µl für die Immunpräzipitation eingesetzt. Zunächst wurden 500 µl der entsprechenden Konzentration mit 1,5 µg PLB – Antikörper (2D12 – Anti – PLB – Antikörper) für 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 20 µl

Protein A/G PLUS – Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) und eine weitere rotierende Inkubation bei 4°C über Nacht. Im Anschluss wurde die Agarose für 2 Minuten bei 3000 rpm und 4°C in einer Eppendorf 5415C Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 3 Mal mit 500 µl Stammpuffer (50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5) und danach mit 500 µl sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach vollständigem Entfernen der Überstände wurde das Pellet in 50 µl SDS-Probenpuffer (10 mM TrisBase; 1 mM EDTA; 5 % Glycerin; 2 % SDS; pH 7,8) aufgenommen und zum Auflösen der Immunkomplexe für 5 Minuten bei 60°C inkubiert. Vor dem Einsatz in die PAGE erfolgte eine nochmalige Zentrifugation für 2 Minuten bei 13000 rpm und Raumtemperatur.

#### 3.2.3.4. SDS – PAGE

Die SDS – PAGE nach Laemmli et al. (1970) in Gegenwart von SDS. Die Homogenate (siehe 3.2.3.1.) wurden mit einer entsprechenden Menge doppelkonzentrierten Probenpuffers (10 mM Tris – Base; 1 mM EDTA; 5 % Glycerin; 2 % SDS; pH 7,8) gemischt. Zur Trennung wurden 12 %ige Trenngele (12 % Acrylamid; 0,5 % Bis – Acrylamid; 100 mM Tris – Base; 300 mM Glycin; 0,1 % SDS; 13,3 % Glycerin; 0,2 % Polyacrylamid; 0,086 % TEMED; 0,04 % Amoniumpersulfat; pH 8,8; Porzio und Pearson 1977) und 4 %ige Sammelgele (4 % Acrylamid; 0,2 % Bis – Acrylamid; 125 mM Tris – Base; 0,1 % SDS; 0,064 % TEMED; 0,1 % Amoniumpersulfat; pH 6,8; Laemmli et al. 1970) verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Hoefer SE600 – Elektrophoresekammer (Hoefer, Holliston, USA) durchgeführt. Dabei wurde eine Spannung von 60 mV für das Sammelgel und eine Spannung von 80 mV für das Trenngel verwendet. Die elektrophoretische Trennung wurde durchgeführt, bis die Lauffront vollständig aus dem Gel gelaufen war. Der Proteinstandard (Fermentas, St. Leon – Rot, Deutschland) der auf jedem Gel mitgeführt wurde, wurde vor Gebrauch 30 Minuten bei 95°C gekocht.

#### 3.2.3.5. Coomassie – Färbung

Zum Anfärben der Proteine in den Polyacrylamidgelen, wurden diese für 1 h in Coomassie – Färbelösung (25 % Isopropanol; 10 % Eisessig; 0,15 %

Coomassieblau; 65 % H<sub>2</sub>O) gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung (10 % Essigsäure; 30 % Methanol; 60 % H<sub>2</sub>O) entfärbt. Die Gele wurden anschließend mit Wasser gewaschen und in einem Vakuum – Gelrockner (Biorad, München, Deutschland) zwischen Cellophan – Folien getrocknet.

### 3.2.3.6. Western Blot

Die elektrophoretisch getrennten Proteine wurden in einer Transferkammer (Hoefler TE62, Hoefler, San Francisco, USA) auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm; Whatman, Dassel, Deutschland) übertragen. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer (42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) bei einer Spannung von 224 mA und 4°C für 20 h. Durch eine Färbung der Membranen mit Ponceau-S-Lösung (0,1 % Ponceau – S; 1 % Eisessig; Sigma – Aldrich, München, Deutschland) wurde der Transfer kontrolliert und gleichzeitig die Proteine auf der Membran fixiert. Nach dem Trocknen der Membran wurden die Banden des Größenstandards markiert. Je nach Molekulargewicht der zu identifizierenden Proteine wurde der entsprechende Größenbereich der Ponceau – gefärbten Membranen ausgeschnitten und in TBST – Puffer (10 mM Tris – Base; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20; pH 7,4) vollständig entfärbt. Zur Blockierung unspezifischer Protein – Bindungsstellen wurden die Membranstreifen für 1 h mit BSA – Lösung (2 % BSA in TBST – Puffer) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membranstreifen mit dem primären Antikörper, gelöst in BSA – Lösung, bei 4°C über Nacht. Nicht gebundener Antikörper wurde in 3 Waschschritten von jeweils 10 Minuten in TBST – Puffer entfernt. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, ebenfalls gelöst in BSA – Lösung. Die Membranen wurden erneut 3 Mal für 10 Minuten mit TBST – Puffer und anschließend 2 Mal für 2 Minuten mit Alkalische – Phosphatase – Puffer (100 mM Triethanolamin; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 9,4) gewaschen. Das Sichtbarmachen der Proteinbanden erfolgte mittels einer Farbreaktion, welche auf der, am sekundären Antikörper gekoppelten, alkalischen Phosphatase beruht. Die Membranen wurden in Färbelösung (0,003 % BCIP; 0,006 % NBT in AP – Puffer) inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Die Quantifizierung der Banden erfolgte durch Densitometrie mit ImageQuant<sup>®</sup> –Software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA). Das unspezifische Hintergrundsignal wurde im Local – Average – Modus von jedem Signal abgezogen.

### 3.2.3.8. Nachweis biologischer IL – 6 – Aktivität mittels 7TD1 – Proliferationstest

Mit Hilfe der IL – 6 – abhängigen Maus – Zelllinie 7TD1 wurde die biologische Aktivität von IL – 6 im Serum von LPS – vorbehandelten Mäusen bestimmt (Van Snick et al. 1986). Für den Nachweis wurden in Mikrottestplatten mit 96 Vertiefungen 50  $\mu$ l Verdünnungsmedium (RPMI; 2 % Antibiotikum; 2 % Glutamin; 2 % FCS) vorgelegt und 17  $\mu$ l Standard (10 ng/ml IL – 6), sowie Serum in der ersten Reihe zugesetzt. In 8 Schritten wurden die einzelnen Proben jeweils 1:4 weiter verdünnt. Anschließend wurden 7TD1 – Zellen (1500 Zellen/Vertiefung) zugegeben und für 72 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Bestimmung der IL – 6 – Aktivität wurde ein modifizierter MTT – Assay durchgeführt (Mosmann 1983). Dazu wurden 10  $\mu$ l MTT – Lösung (5 mg/ml MTT in PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) je Vertiefung zugesetzt und für weitere 6 h inkubiert. Danach wurden 100  $\mu$ l Stopp – Lösung (DMF; 10 % SDS) zu jedem Ansatz gegeben und für 1 h im Dunkeln inkubiert. Die einzelnen Vertiefungen wurden bei 570 nm ausgelesen und die IL – 6 – Aktivität wurde anhand des Standard bestimmt.

### 3.2.3.9. Nachweis der NADPH – Oxidaseaktivität mittels Lucigenin – Assay

Zur Bestimmung der Aktivität der NADPH – Oxidase wurden zunächst Homogenate von eingefrorenem Herzgewebe in Krebs – Henseleit – Puffer (siehe 3.2.6.1.), welcher Hemmstoffe für Proteasen und Phosphatasen enthielt (Sigma – Aldrich, München, Deutschland), wie unter 3.2.3.1. beschrieben, hergestellt.

Der Messansatz enthielt, zusätzlich zum Homogenat, 100  $\mu$ M NADPH und 10 mM Tiron bzw. DPI, um in den Kontrollansätzen die Aktivität der NADPH – Oxidase zu hemmen. Die NADPH – Oxidase katalysiert die Reaktion:



Durch die Reaktion von Lucigenin mit dem Superoxidanion kommt es zur Chemilumineszenz. Die Messung erfolgte in einem Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) durch Zugabe des Lucigenin bis zu einer Endkonzentration von 5 mM für 1 Minute. Die vom Gerät ausgegebenen relativen

Lichteinheiten (RLU) wurden auf die Proteinkonzentration des jeweiligen Messansatzes normalisiert.

### **3.2.4. Tierexperimentelles Arbeiten**

#### 3.2.4.1. Narkose und Organentnahme

Den Mäusen wurden ca. 15 bis 30 Minuten vor der Narkose 500 U Heparin (Biochrom, Berlin, Deutschland) intraperitoneal injiziert. Die Narkose erfolgte mit 75 mg/kg KG Pentobarbital (United Pharmaceutical Works, Tschechische Republik) ebenfalls intraperitoneal. Nachdem überprüft wurde, dass keine Reflexe mehr auftraten, wurde die Bauchdecke geöffnet und die Organe zügig entnommen. Herzen wurden in Tyrode (140 mM NaCl; 5,8 mM KCl; 0,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,9 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 11,1 mM Glucose; 10 mM HEPES; pH 7,4) gespült, um Blutreste zu entfernen und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Herzen, die für die Versuche am arbeitenden Herz verwendet wurden, wurden in Krebs – Henseleit – Puffer (118 mM NaCl; 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,5 mM Na – EDTA; 4,7 mM KCl; 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 11 mM Glucose) mit 15 U/ml Heparin präpariert und nach Abschluss der Versuche am arbeitenden Herz in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Bei einigen Mäusen erfolgte eine Blutentnahme aus dem Venengeflecht hinter dem Auge oder aus der Ohrvene. Hierfür wurden die Mäuse ebenfalls narkotisiert und heparinisiert. Anschließend erfolgte die Blutentnahme mittels einer Kapillare in ein EDTA enthaltendes Proberöhrchen (Microtainer K2E Tubes, Becton & Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

#### 3.2.4.2. Injektion von WT und TG Mäusen mit LPS

Um den Einfluss von LPS – induzierter Sepsis auf WT und TG Mäuse zu untersuchen, wurden 2 Versuchsdurchgänge mit jeweils 20 Tieren durchgeführt. Die Tiere wurden in 4 Gruppen eingeteilt.

Einteilung der Gruppen:

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Genotyp	TG	WT	TG	WT
LPS	-	-	30 µg/g KG	30 µg/g KG

Es wurde LPS von E. coli B55:05 verwendet. Dieses wurde zunächst in einer Stammlösung von 25 µg/µl in 0,9 % NaCl – Lösung gelöst.

Die Mäuse wurden gewogen und ihre Körpertemperatur wurde bestimmt. Anhand des jeweiligen Körpergewichtes wurde die benötigte Menge LPS – Stammlösung bestimmt und auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Den Mäusen wurden diese 100 µl intraperitoneal injiziert. Die Kontrolltiere erhielten 100 µl 0,9 % NaCl – Lösung. Nach 3 Tagen Inkubation wurden von den Tieren erneut Körpergewicht und Körpertemperatur bestimmt. Anschließend wurden die Tiere narkotisiert und getötet und die Herzen in der Versuchsanlage für das arbeitende Herz perfundiert. Zusätzlich wurden Leber, Niere und Milz, sowie Blut aus dem Brustraum entnommen.

#### 3.2.4.3. Bestimmung der Katecholaminspiegel

Zur Bestimmung der Katecholamin – Spiegel im Herzgewebe von WT und TG Mäusen, wurden die Herzen zunächst ohne Puffer im Mikro – Dismembrator S für 1 Minute bei 2100 rpm pulverisiert. Anschließend wurden 20 mg des Herzpulvers in 0,3 ml Perchlorsäurelösung (5,7 mM Ascorbinsäure; 8,25 mM Cystein; 3 mM Glutathion; 2,5 mM EDTA) für 30 s mit einem Ultraschallgerät homogenisiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand mit NaOH neutralisiert.

Die Bestimmung der Adrenalin- und NoradrenalinKonzentration erfolgte mit Hilfe des HPLC – Systems Katecholamin – Analysator II (Merck, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

Die Katecholamine wurden zunächst durch eine Vorsäule (ClinRep® SPE – Säule) aufkonzentriert und anschließend mit einer analytischen Säule (LiChrospher RP – 18e) getrennt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Fluoreszenzdetektion wie in Schäfers et al 1997 beschrieben bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm.



### **3.2.5. Hämodynamische Arbeitsmethoden**

#### **3.2.5.1. Versuche am arbeitleistenden Herz der mit LPS – vorbehandelten Mäuse**

Die Herzen der mit LPS vorbehandelten Mäuse wurden zügig entnommen und in die Versuchsanlage für das arbeitleistende Herz eingehängt. Das Herz wurde zunächst für einige Minuten mit Krebs – Henseleit – Puffer retrograd und anschließend für 5 Minuten anterograd perfundiert. Als Vorlast wurden 5 ml/Minute gewählt und als Nachlast 50 mmHg (Kirchhefer et al. 2001). Die Kontraktionsdaten wurden mit Hilfe des Programms Powerlab Chart 5 (ADInstruments, Bella Vista, Australien) aufgezeichnet und ausgewertet.

#### **3.2.5.2. Versuche am arbeitleistenden Herz mit 120 Minuten globaler Ischämie**

Die Herzen der Mäuse wurden zügig entnommen und wie unter 3.2.7.1. beschrieben zunächst für einige Minuten mit Krebs – Henseleit – Puffer retrograd perfundiert. Anschließend erfolgte eine anterograde Perfusion bis die Herzen konstant schlugen. Danach erfolgte eine 120 Minuten dauernde globale Ischämie mit anschließender Reperfusion. Die Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgte wie unter 3.2.7.1. beschrieben.

### **3.2.6. Histologische Färbung**

Zur Untersuchung histologischer Veränderungen des Herzgewebes wurden dünne Paraffin – Schnitte von LPS – behandelten und Kontrollherzen angefertigt. Diese Schnitte wurden mit Hilfe der Hämatoxylin – Eosin – Färbung, wie in Kirchhefer et al. 2007 beschrieben, angefärbt.

Hierbei werden die Zellkerne blau und sowohl das Zytoplasma als auch die Interzellulärsubstanz rot bis rosa eingefärbt.

### **3.3. Statistische Auswertung**

Alle aufgeführten Werte sind arithmetische Mittelwerte mehrerer unabhängiger Einzelversuche. Angegeben ist außerdem der zugehörige Standardfehler (SEM).

Mit „n“ wurde die Anzahl der Einzelversuche bezeichnet.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des t – Test nach Student für verbundene oder unverbundene Stichproben ermittelt. Dabei wurde ein p – Wert kleiner als 0,05 als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

Zur Auswertung multipler Vergleiche wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, USA) eine ANOVA gerechnet.

### **3.4. Behördliche Genehmigungen und Sicherheitsbestimmungen**

Für alle Tierversuche lagen die notwendigen behördlichen Genehmigungen vor. Die Tierversuche der mit LPS vorbehandelten Mäusen, wurden unter der Genehmigungsnummer des Landesverwaltungsamts 42502 – 02 – 692 MLU durchgeführt. Die Messung der kontraktiven Parameter der Versuche am arbeitenden Herz wurden unter der Nummer 42502 – 5.14 MLU genehmigt.

Gentechnische Arbeiten erfolgten gemäß dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz – GenTG) vom 16. Dezember 1993 unter Beachtung der in § 7 Abs. 1 GenTG formulierten Sicherheitsstufen und – maßnahmen. Die Genehmigung bzw. Anmeldung der Arbeiten erfolgte gemäß § 8, § 9, § 11 und § 12 GenTG.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Einfluß verschiedener Streßfaktoren

#### 4.1.1. Einfluß von globaler Ischämie

4.1.1.1. Messung kontraktile Parameter im Modell des arbeitenden Herzen an den Herzen von WT und TG Mäusen

Die Herzen von etwa 120 Tage alten WT und TG Mäusen wurden wie unter 3.2.7.2. beschrieben entnommen und in der Versuchsanlage für das arbeitende Herz perfundiert. Nachdem die Herzen konstant schlugen, wurden sie für 120 Minuten einer globalen Ischämie ausgesetzt und anschließend reperfundiert. Die Herzen der TG Mäuse zeigen eine Erhöhung des relativen Herzgewichtes (siehe Abbildung 4.1.), wie bereits in der Literatur (Gergs et al. 2004) beschrieben.

Die Tabelle 4.1. zeigt die Kontraktionsparameter und die Tabelle 4.2. zeigt diese als Prozentangaben, bezogen auf Werte vor Beginn der Ischämie. Um den Einfluß der Hypertrophie der TG Mäuse auf die Ergebnisse der Ischämieversuche auszuschließen, wurden die prozentualen Angaben für die Darstellungen verwendet. Die Abbildung 4.2. zeigt die Abnahme des systolischen linksventrikulären Drucks nach 120 Minuten Ischämie in den Herzen von WT Tieren, jedoch nicht in den Herzen der TG Tiere.

In Abbildung 4.3. ist zu sehen, daß die Druckerhöhungsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{max}$ ) in WT Herzen nach 120 Minuten Ischämie wesentlich langsamer ist, als in TG Herzen. Wie Abbildung 4.4. zeigt, verlangsamt sich die Geschwindigkeit der Relaxation ( $dp/dt_{min}$ ) in den Herzen von WT Mäusen ebenfalls nach 120 Minuten Ischämie, im Gegensatz zur Relaxationsgeschwindigkeit in den Herzen von TG Mäusen.

Die Abbildungen 4.5. und 4.6. zeigen, daß die Zeiten bis zur 50 %igen und 90 %igen Relaxation in den Herzen von TG Mäusen nach 120 Minuten Ischämie deutlich verkürzt sind, im Vergleich zu prä – ischämischen Werten. Im Gegensatz dazu zeigen die Herzen von WT Mäusen keine derartige Verkürzung.

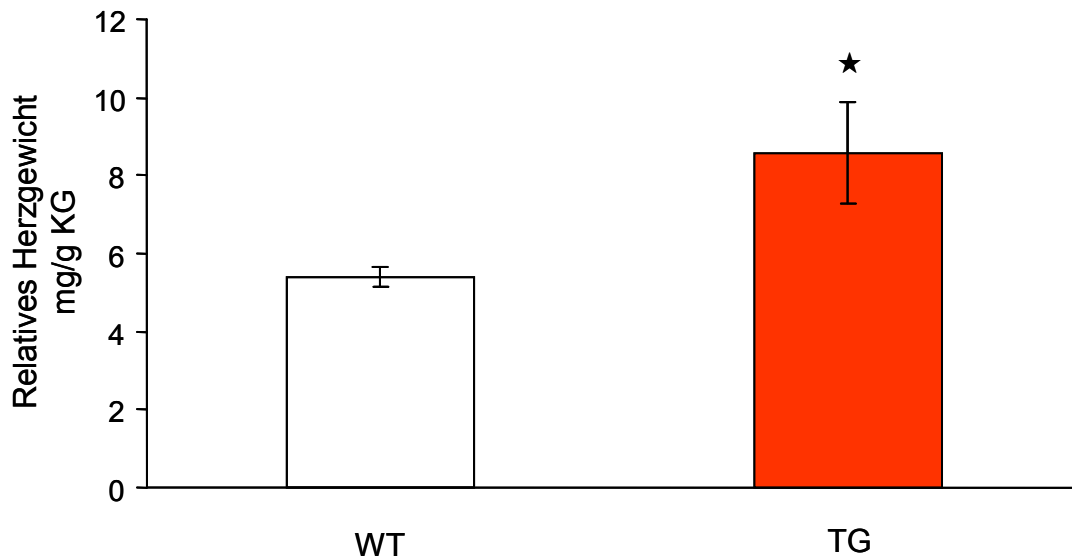


Abb. 4.1.: Relatives Herzgewicht von WT (□) und TG (■) Mäusen (n jeweils 5; ★ entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Tiere).

Tabelle 4.1.: Kontraktionsparameter der Herzen von WT und TG Mäusen vor und nach 120 Minuten Ischämie (n jeweils 6).

Messgröße	WT		TG	
	Ausgangslage	120 Minuten Ischämie	Ausgangslage	120 Minuten Ischämie
Frequenz (BPM)	296 ± 19	191 ± 43	307 ± 28	245 ± 32
Diastolischer Druck (mmHg)	26,6 ± 3,4	31,7 ± 3,4	26,9 ± 1,7	27,9 ± 1,9
Systolischer Druck (mmHg)	61,7 ± 3,1	53,8 ± 4,0 +	53,8 ± 2,9	50,7 ± 3,8
dP/dt <sub>min</sub> (mmHg/s)	-717 ± 113	-423 ± 123	-474 ± 44	-481 ± 67
dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	1691 ± 648	511 ± 109	691 ± 31	611 ± 81
Zeit bis 90 % Relaxation (ms)	63,7 ± 3,2	62,6 ± 3,9	72,4 ± 2,1	56,1 ± 3,8 +
Zeit bis 50 % Relaxation (ms)	24,9 ± 1,4	26,6 ± 3,4	28,4 ± 1,0	22,1 ± 1,5 +

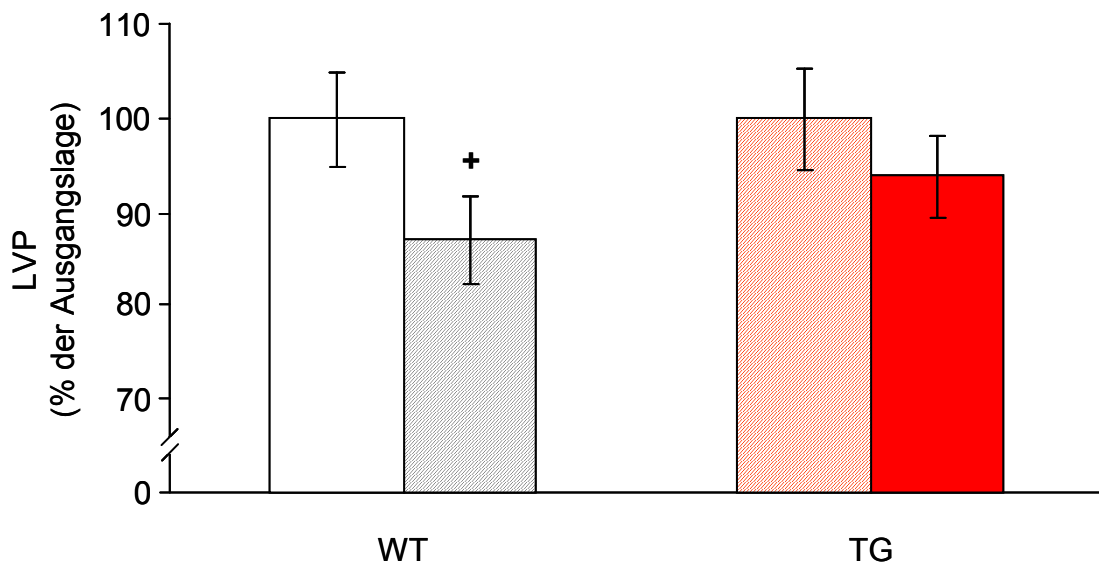
+  $p < 0,05$  vs. Ausgangslage

**Tabelle 4.2.: Prozentuale Angaben der einzelnen Kontraktionsparameter vs. Ausgangslage, in den Herzen von WT und TG Mäusen nach 120 Minuten Ischämie (n jeweils 6).**

Messgröße	WT (% der Ausgangslage)	TG (% der Ausgangslage)
Frequenz	65,7 ± 14,7	87,1 ± 16,9
Diastolischer Druck	123,3 ± 12,2	105,2 ± 6,8
Systolischer Druck	87,0 ± 4,8 +	93,9 ± 4,3
dP/dt <sub>min</sub>	60,9 ± 13,2 +	101,0 ± 11,7 ★
dP/dt <sub>max</sub>	39,8 ± 8,7 +	86,7 ± 9,4 ★
Zeit bis 90 % Relaxation	99,9 ± 8,9	77,2 ± 3,7 +
Zeit bis 50 % Relaxation	108,4 ± 15,8	78,3 ± 5,4 +

+ p<0,05 vs. Ausgangslage

★ p<0,05 vs. Werte der WT Mäuse nach 120 Minuten Ischämie



**Abb. 4.2.: Linksventrikulärer Druck (LVP) in den Herzen von WT (□, ▨) und TG (▨, ■) Mäusen vor und nach 120 Minuten Ischämie (n jeweils 6; + entspricht p<0,05 vs. Ausgangslage).**

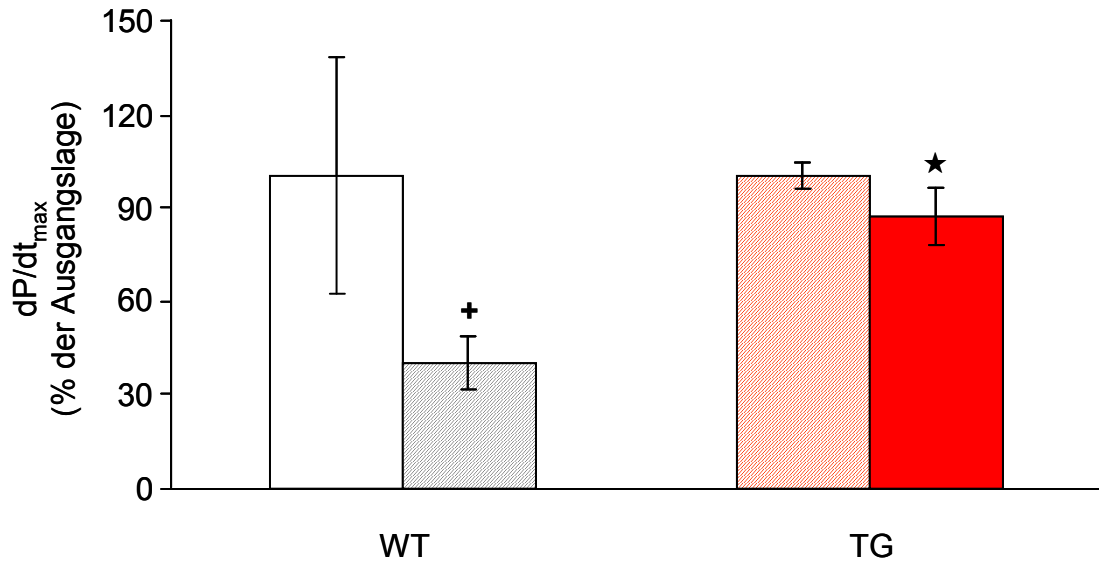


Abb. 4.3.: Aufbau des Drucks ( $dp/dt_{max}$ ) in den Herzen von WT (□, ▨) und TG (▨, ■) Mäusen vor und nach 120 Minuten Ischämie (n jeweils 6; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Ausgangslage und ★ entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Tieren).

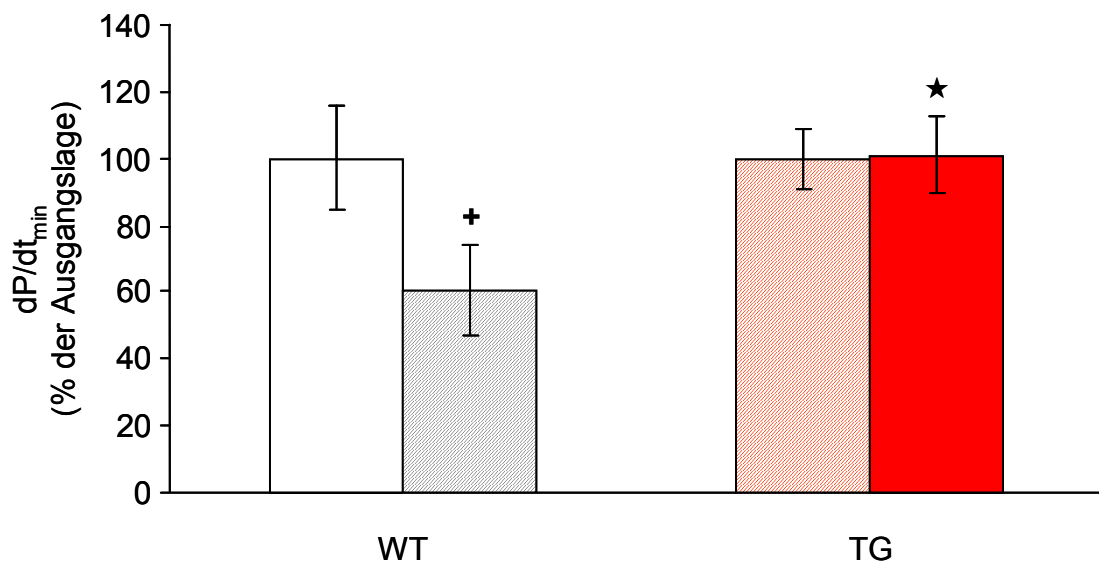


Abb. 4.4.: Abfall des Drucks ( $dp/dt_{min}$ ) in den Herzen von WT (□, ▨) und TG (▨, ■) Mäusen vor und nach 120 Minuten Ischämie (n jeweils 6; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Ausgangslage und ★ entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Tieren).

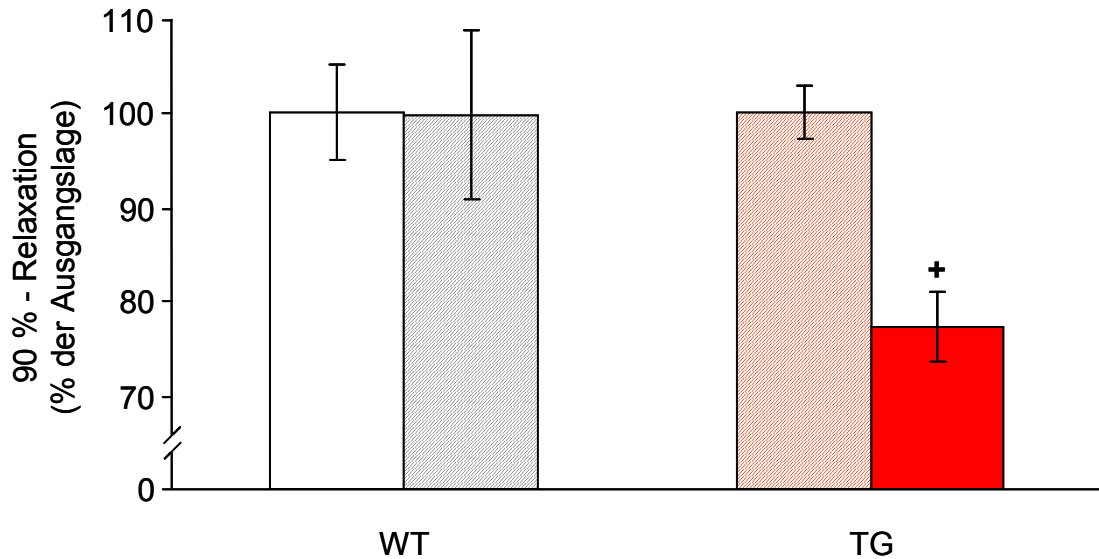


Abb. 4.5.: Zeit bis zur 90 %igen Relaxation in den Herzen von WT (□, ▨) und TG (▨, ■) Mäusen vor und nach 120 Minuten Ischämie (n jeweils 6; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Ausgangslage).

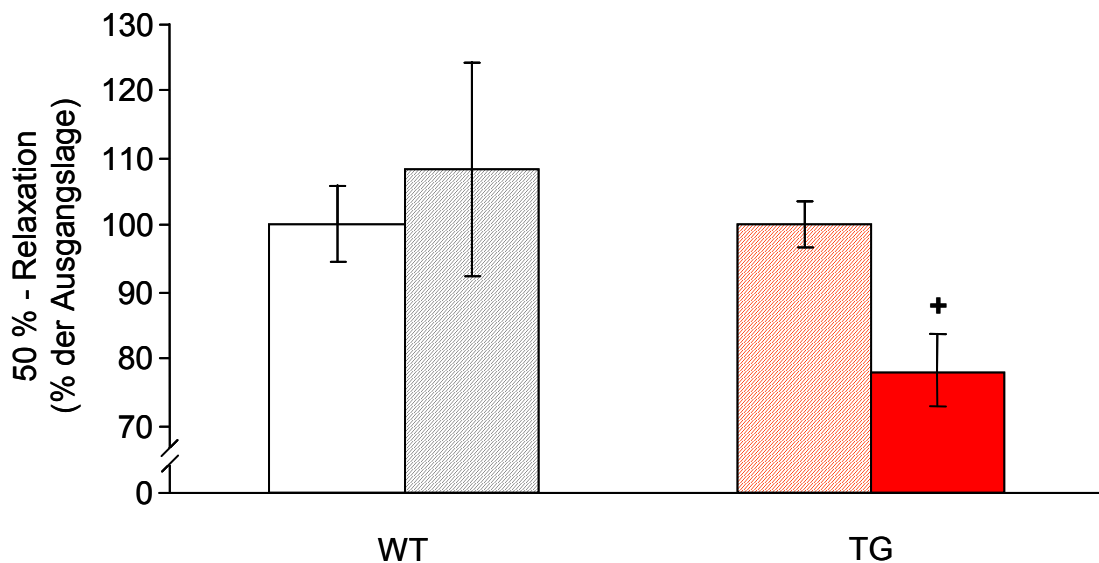


Abb. 4.6.: Zeit bis zur 50 %igen Relaxation in den Herzen von WT (□, ▨) und TG (▨, ■) Mäusen vor und nach 120 Minuten Ischämie (n jeweils 6; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Ausgangslage).

#### 4.1.1.2. Proteinexpression von eNOS und nNOS

Um den Einfluß von 120 Minuten Ischämie auf die Expressionslevel der verschiedenen NOS – Isoformen (NO – Synthase) zu bestimmen, wurden Western Blot – Experimente durchgeführt (siehe 3.2.3.6.). Dabei konnte keine iNOS – Expression nachgewiesen werden.

Die Abbildung 4.7. zeigt in den Herzen von TG Mäusen eine deutlich erhöhte Proteineexpression der nNOS nach Ischämie. Die eNOS zeigt keine vermehrte Expression. Die Abbildungen 4.8. und 4.9. stellen diese Erhöhung auch anhand der gemittelten Bandenstärken dar.

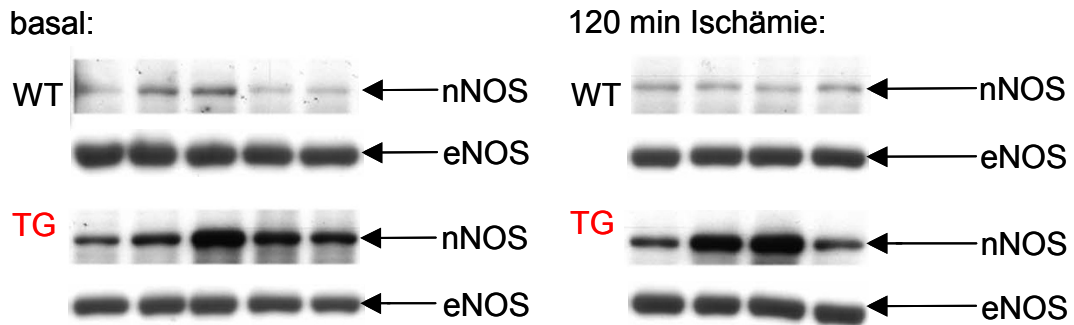


Abb. 4.7.: Western Blots für nNOS und eNOS in WT und TG Mäuseherzen.

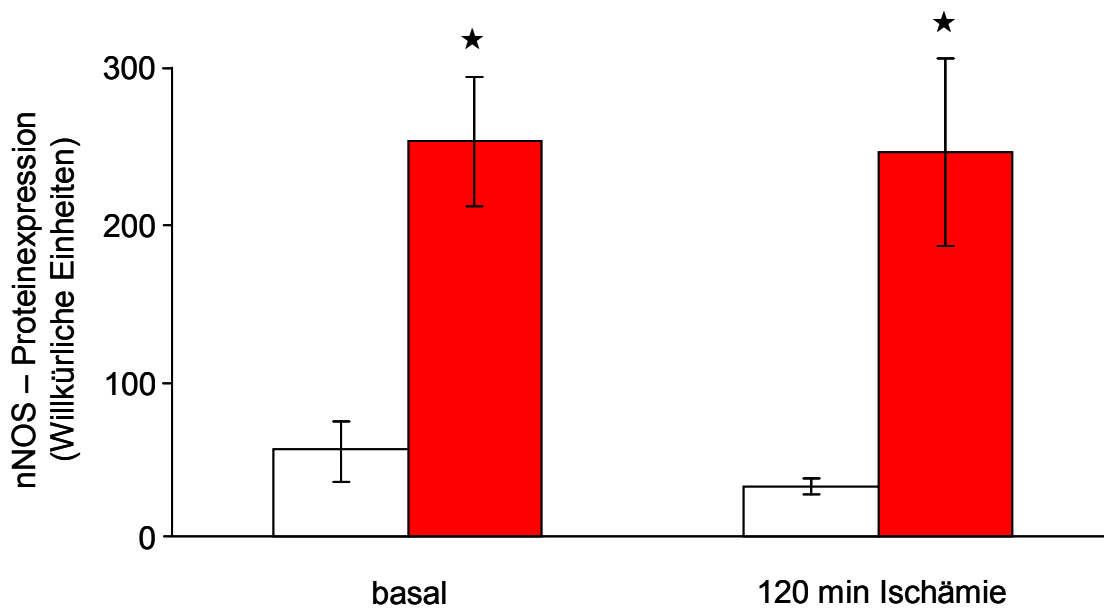
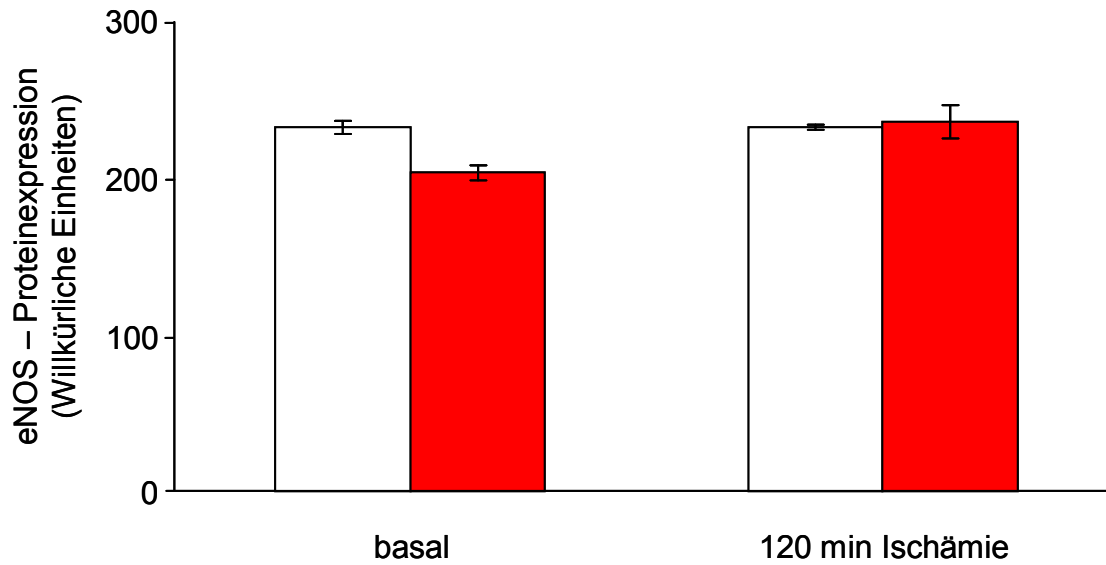


Abb. 4.8.: Quantifizierung der Expression von nNOS in WT (□) und TG (■) Mäuseherzen (n jeweils 4 – 5, ★ entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Werten).





**Abb. 4.9.:** Quantifizierung der Expression von eNOS in WT (□) und TG (■) Mäuseherzen (n jeweils 4 – 5, ★ entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Werten).

#### 4.1.1.3. NADPH – Oxidase – Aktivität

Die Bestimmung der NADPH – Oxidase – Aktivität wurde wie unter 3.2.3.9. beschrieben durchgeführt. Dazu wurden Homogenate von WT und TG Mäuseherzen nach 120 Minuten Ischämie verwendet.

Die Aktivität der NADPH – Oxidase war in den Herzen von TG Mäusen deutlich erhöht, verglichen mit den Herzen von WT Mäusen (siehe Abbildung 4.10.).

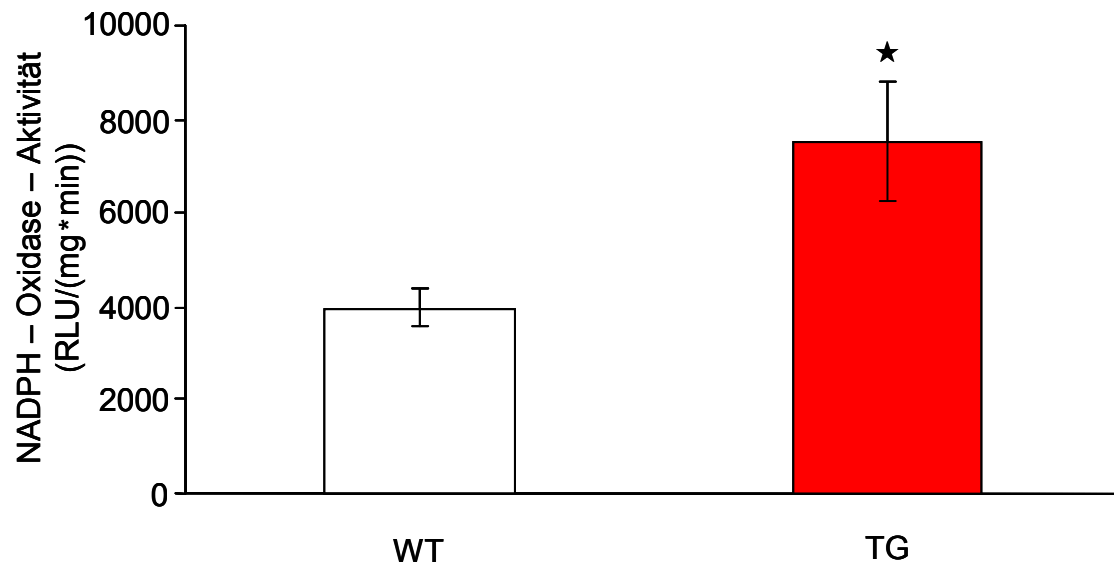


Abb. 4.10.: Aktivität der NADPH – Oxidase in den Herzen von WT (□) und TG (■) Mäusen nach 120 Minuten Ischämie gegenüber NADPH als Substrat (n jeweils 5, ★ entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Werten).

#### 4.1.1.4. Katecholaminbestimmung

Die Bestimmung der Katecholaminkonzentration im Herzgewebe von WT und TG Mäusen erfolgte wie unter 3.2.6.3. angegeben. Dabei wurden die Noradrenalin – und die Adrenalinmenge im Herzgewebe von WT und TG Mäusen bestimmt. Es wurde das Herzgewebe von jeweils sechs WT oder TG Mäusen verwendet, die 120 Minuten Ischämie ausgesetzt waren. Zum Vergleich wurde das Herzgewebe von jeweils vier WT oder TG Mäusen untersucht, die keinem ischämischen Streß ausgesetzt waren. Im Herzgewebe von WT und TG Mäusen ließ sich kein Unterschied in der Noradrenalinmenge feststellen (Abbildung 4.11.). Im Gegensatz dazu zeigte sich eine erhöhte Adrenalinmenge bei WT Herzgewebe nach Ischämie, nicht jedoch bei TG Herzgewebe (Abbildung 4.12.).

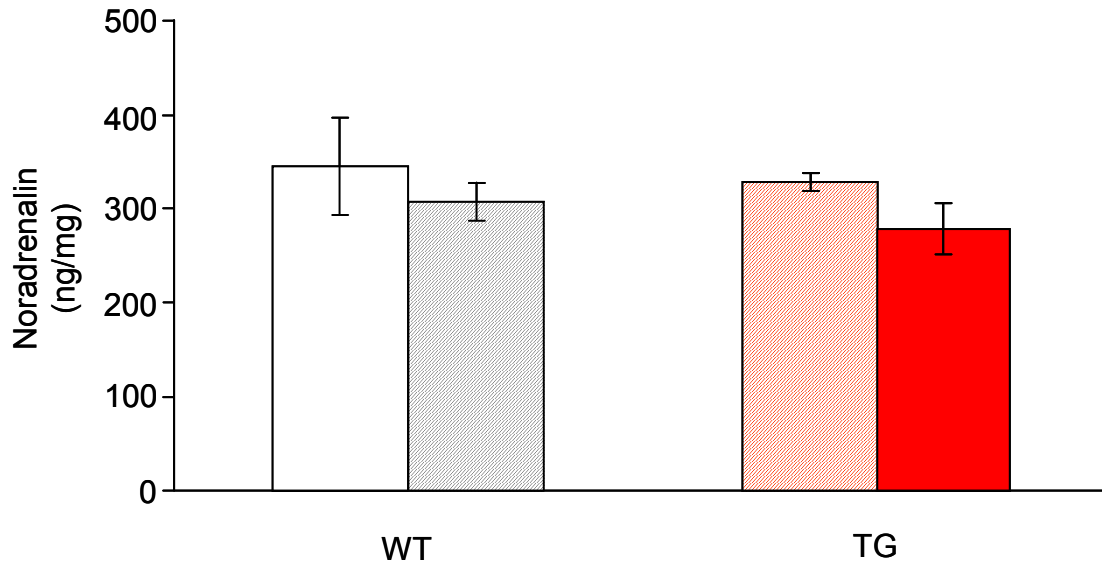


Abb. 4.11.: Noradrenalinmenge pro mg Herzgewebe von WT und TG Mäusen vor (□, ▨) und nach 120 Minuten Ischämie (▩, ■) (n jeweils 4 vor Ischämie und 6 nach 120 Minuten Ischämie).

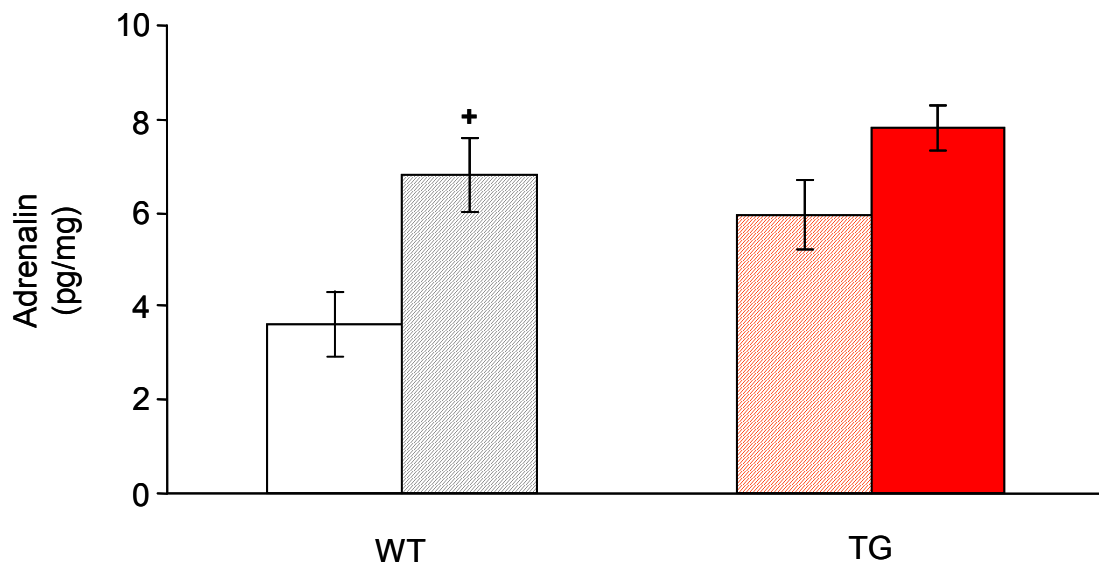


Abb. 4.12.: Adrenalinmenge pro mg Herzgewebe von WT und TG Mäusen vor (□, ▨) und nach 120 Minuten Ischämie (▩, ■) (n jeweils 4 vor Ischämie und 6 nach 120 Minuten Ischämie, + entspricht  $p < 0,05$  vs. Kontrollwerte).

## 4.1.2. Einfluß von Lipopolysacchariden

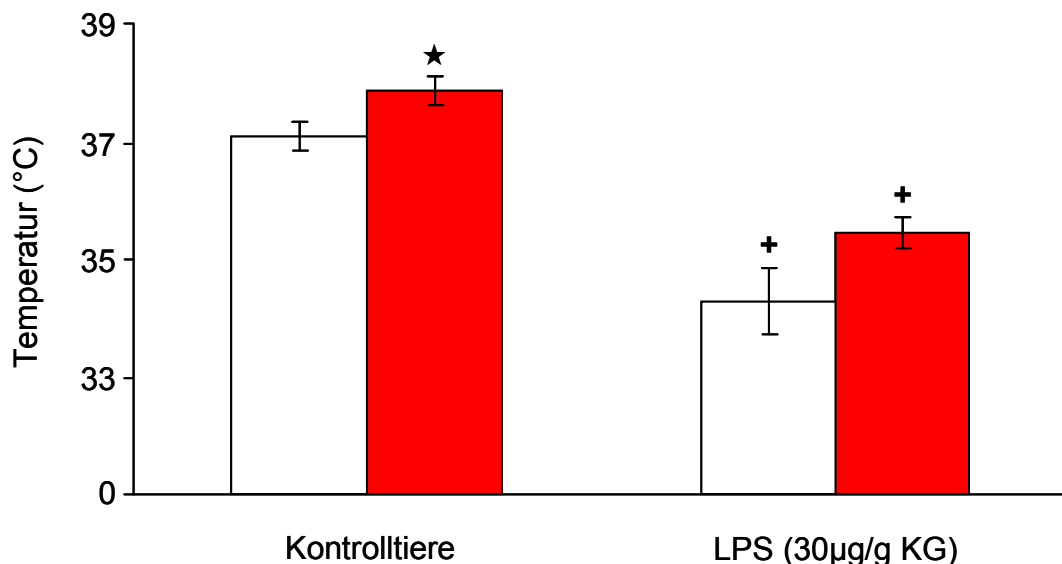
### 4.1.2.1. Temperatur und Körpergewicht LPS – behandelter Mäuse

Zur Bestimmung des Eintretens von septischem Streß, wurden die Körpertemperatur und das Körpergewicht von WT und TG Mäusen bestimmt, die wie unter 3.2.6.2. behandelten wurden.

Die TG Kontrolltiere wiesen eine höhere Temperatur als WT Kontrolltiere auf. Sowohl die Temperatur von WT, als auch TG Mäusen fiel nach dreitägiger Inkubation mit LPS ab (Abbildung 4.13.), wie es bei kleinen Nagern bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde (Derijk und Berkenbosch 1994, Mizuno et al. 2000).

Das Körpergewicht von WT und TG Mäusen verringerte sich nach der Inkubation mit LPS. Dabei fiel das Gewicht von WT Mäusen stärker als das von TG Mäusen (siehe Abbildung 4.14.).

Das relative Herzgewicht von TG Mäusen war, aufgrund der bei diesen Tieren vorhandenen Hypertrophie, bereits bei den Kontrolltieren höher als bei WT Tieren. Durch die Abnahme des Körpergewichts (siehe Abbildung 4.14.) erhöhte sich das relative Herzgewicht noch weiter (siehe Abbildung 4.15.).



**Abb. 4.13.:** Körpertemperatur von WT (□) und TG (■) Mäusen basal (Kontrolltiere) und nach Applikation von 30 µg/g KG LPS (n jeweils 10; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Werten der jeweiligen Kontrolltiere und ★ entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Tieren).

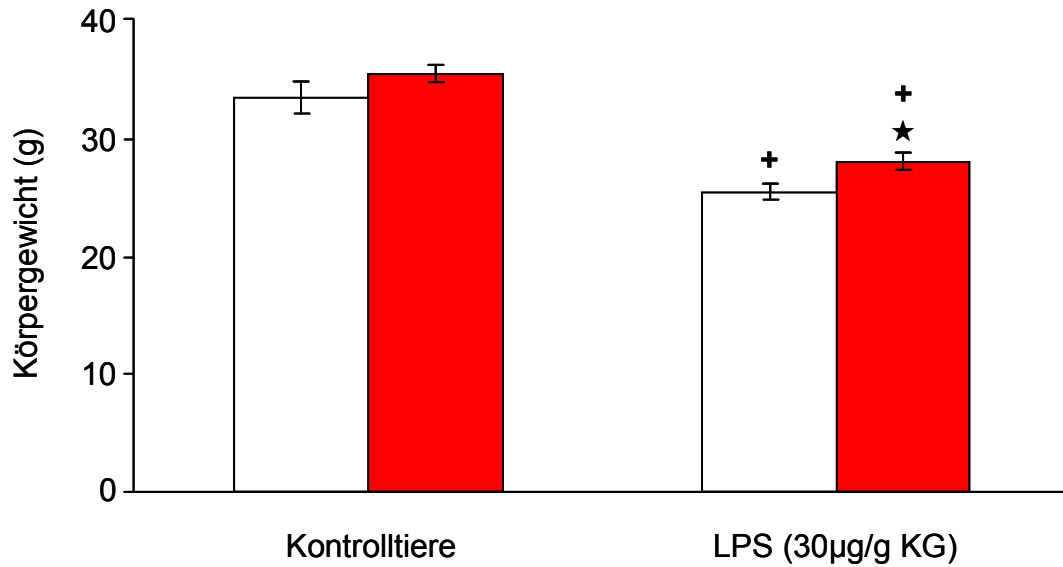


Abb. 4.14.: Körpergewicht von WT (□) und TG (■) Mäusen basal (Kontrolltiere) und nach Applikation von 30 µg/g KG LPS (n jeweils 10; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Werten der jeweiligen Kontrolltiere und ★ entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Tieren).

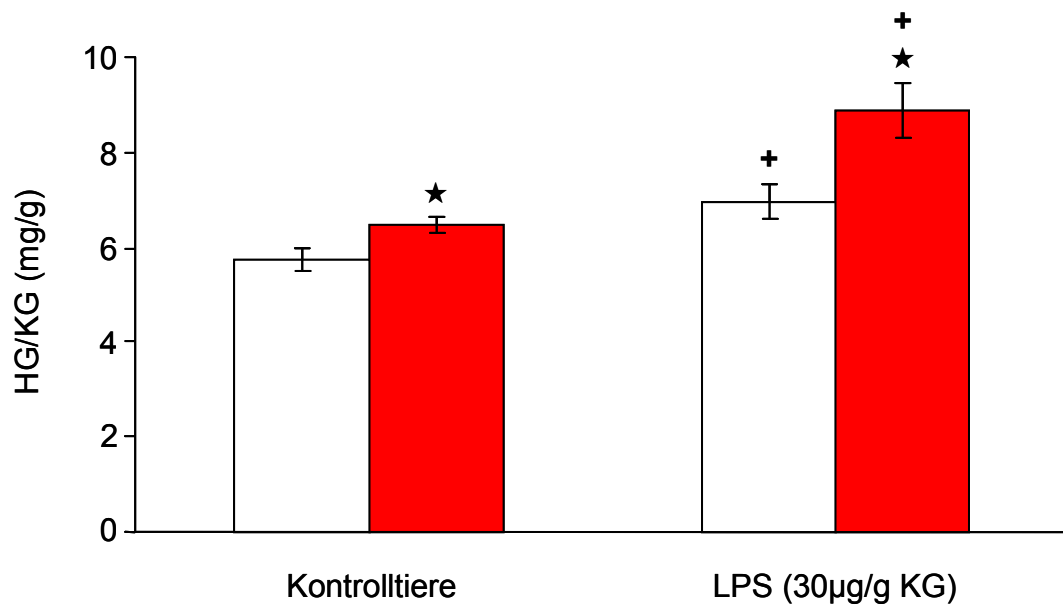


Abb. 4.15.: Relatives Herzgewicht von WT (□) und TG (■) Mäusen basal (Kontrolltiere) und nach Applikation von 30 µg/g KG LPS (n jeweils 10; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Werten der jeweiligen Kontrolltiere und ★ entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Tieren).

#### 4.1.2.2. Messung kontraktile Parameter im Modell des arbeitsleistenden Herzens an den Herzen von LPS – vorbehandelten WT und TG Mäusen

Etwa 200 Tage alte WT und TG Mäuse wurden, wie unter 3.2.6.2. beschrieben, mit LPS oder 0,9 % NaCl – Lösung vorbehandelt und drei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Herzen, wie unter 3.2.7.1 beschrieben, entnommen und in der Versuchsanlage für das arbeitsleistende Herz perfundiert. Tabelle 4.3. zeigt die Kontraktionsparameter der Herzen und Tabelle 4.4. zeigt diese als Prozentwerte bezogen auf die Werte der Kontrolltiere.

Der systolische links – ventrikuläre Druck fiel unter LPS – Behandlung in den Herzen von WT Mäusen stark ab. Im Gegensatz dazu war das bei den Herzen der TG Mäuse nicht der Fall (siehe Abbildung 4.16.).

Unter LPS – Behandlung zeigte sich ein deutlicher Unterschied in den Frequenzen von WT und TG Mäuseherzen. Die Frequenz war in TG Herzen höher als in WT Herzen (siehe Abbildung 4.17.). Der Abfall und der Aufbau des Druckes ( $dp/dt_{\min}$ ,  $dp/dt_{\max}$ ) vollzog sich in WT Herzen nach LPS – Behandlung langsamer, wohingegen er in TG Herzen gleich blieb (siehe Abbildung 4.18. und 4.19.).

**Tabelle 4.3.: Kontraktionsparameter der Herzen von WT und TG Mäusen basal (Kontrolltiere) und nach Applikation von 30 µg/g KG LPS (n jeweils 10).**

Messgröße	WT		TG	
	Kontrolltiere	LPS	Kontrolltiere	LPS
Frequenz (BPM)	344 ± 29	270 ± 30	295 ± 37	344 ± 16 ★
Diastolischer Druck (mmHg)	12,3 ± 3,5	12,2 ± 1,6	11,8 ± 1,8	14,8 ± 3,7
Systolischer Druck (mmHg)	72,5 ± 2,3	43,2 ± 3,9 +	68,4 ± 4,2	61,0 ± 2,1 ★
dP/dt <sub>min</sub> (mmHg/s)	-1386 ± 163	-576 ± 128 +	-1105 ± 175	-1024 ± 182
dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	2453 ± 256	1076 ± 269 +	2111 ± 279	1806 ± 280
Zeit bis 90 % Relaxation (ms)	60,5 ± 4,5	81,9 ± 11,0	72,2 ± 8,1	64,4 ± 4,2
Zeit bis 50 % Relaxation (ms)	22,4 ± 1,9	32,4 ± 4,3	27,4 ± 3,7	24,8 ± 1,6

+ p<0,05 vs. Werte der Kontrolltiere

★ p<0,05 vs. Werte der WT Mäuse nach LPS – Behandlung

**Tabelle 4.4.: Kontraktionsparameter der Herzen von WT und TG Mäusen nach Applikation von 30 µg/g KG LPS in % der Basalwerte (n jeweils 10).**

Messgröße	WT (% Kontrolltiere)	TG (% Kontrolltiere)
Frequenz	78,6 ± 8,7	116,9 ± 5,5 ★
Diastolischer Druck	98,8 ± 13,3	125,1 ± 31,4
Systolischer Druck	59,6 ± 5,4 +	89,2 ± 3,1 ★
dP/dt <sub>min</sub>	41,5 ± 9,3 +	92,6 ± 16,5 ★
dP/dt <sub>max</sub>	43,9 ± 11,0 +	85,6 ± 13,3 ★
Zeit bis 90 % Relaxation	135,3 ± 18,1	89,2 ± 5,9 ★
Zeit bis 50 % Relaxation	144,8 ± 19,2 +	90,4 ± 5,7 ★

+ p<0,05 vs. Werte der Kontrolltiere

★ p<0,05 vs. Werte der WT Mäuse nach LPS – Behandlung

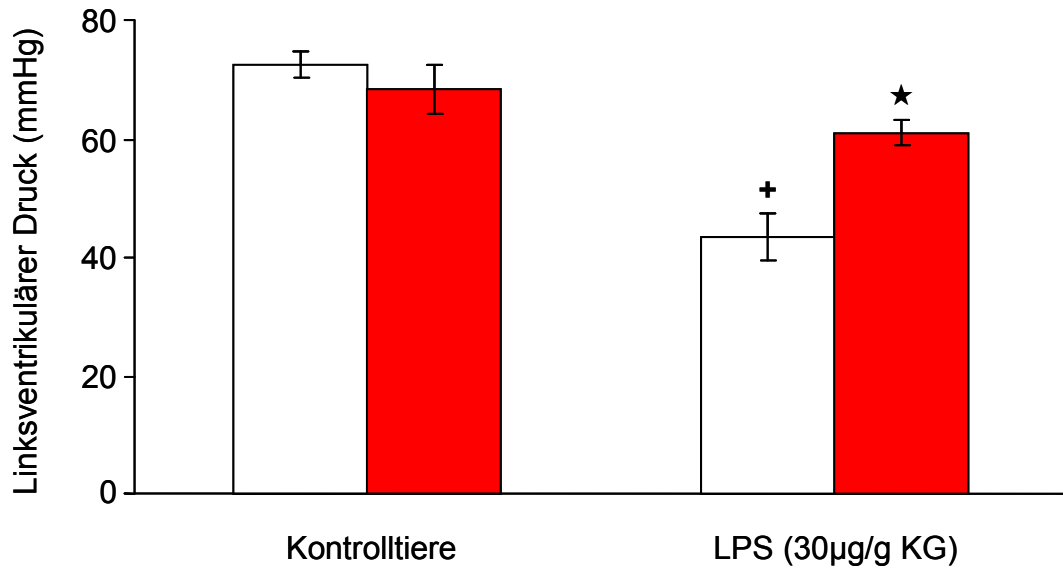


Abb. 4.16.: Linksventrikulärer Druck in den Herzen von WT (□) und TG (■) Mäusen mit und ohne LPS – Injektion (n jeweils 10; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Werten der jeweiligen Kontrolltiere und \* entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Tieren).

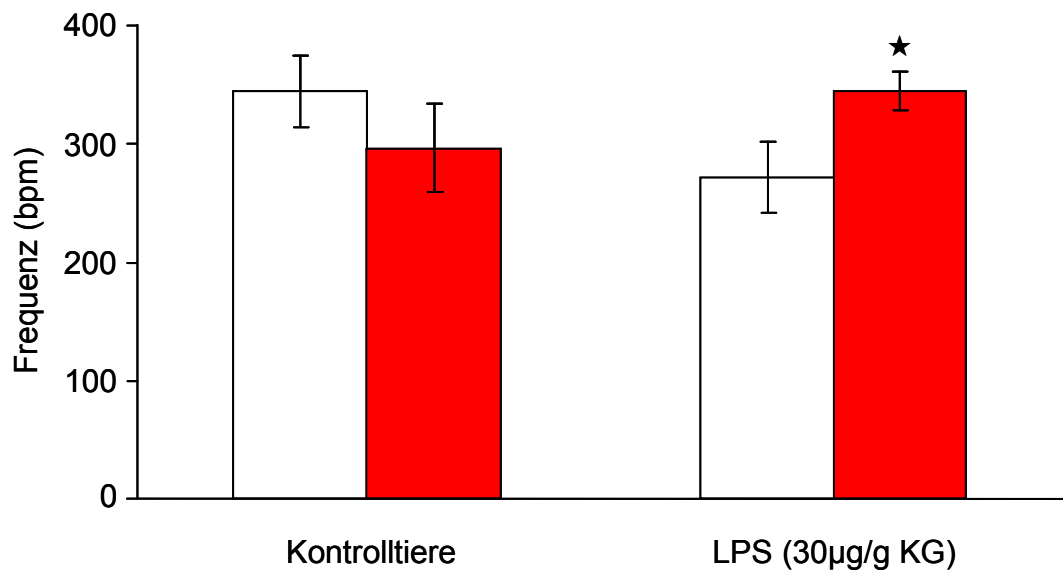


Abb. 4.17.: Frequenz der Herzen von WT (□) und TG (■) Mäusen mit und ohne LPS – Injektion (n jeweils 10; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Werten der jeweiligen Kontrolltiere und \* entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Tieren).



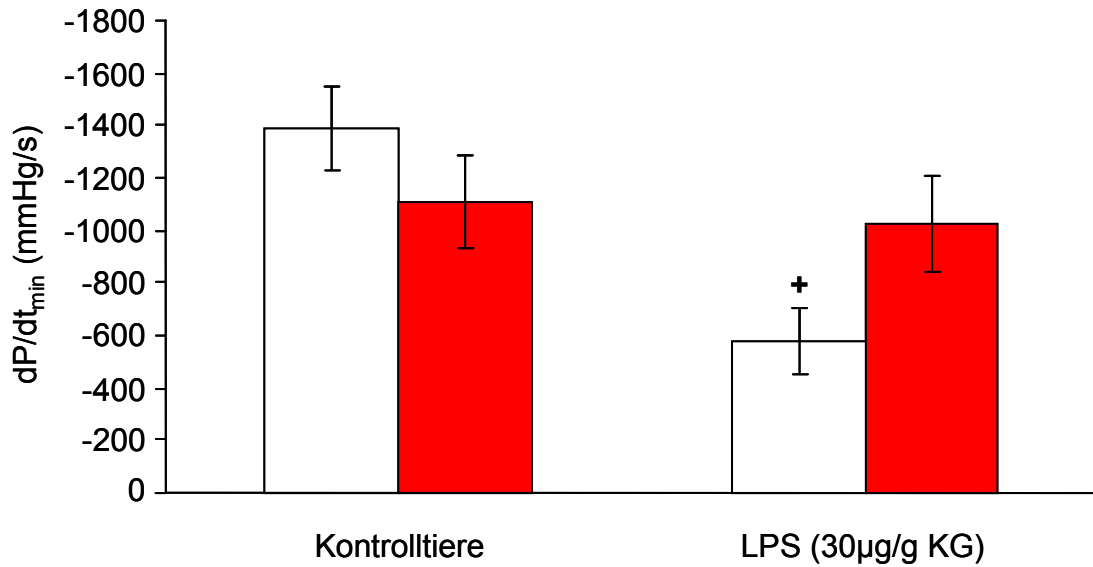


Abb. 4.18.: Abfall des Drucks in den Herzen von WT (□) und TG (■) Mäusen mit und ohne LPS – Injektion (n jeweils 10; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Werten der jeweiligen Kontrolltiere und \* entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Tieren).

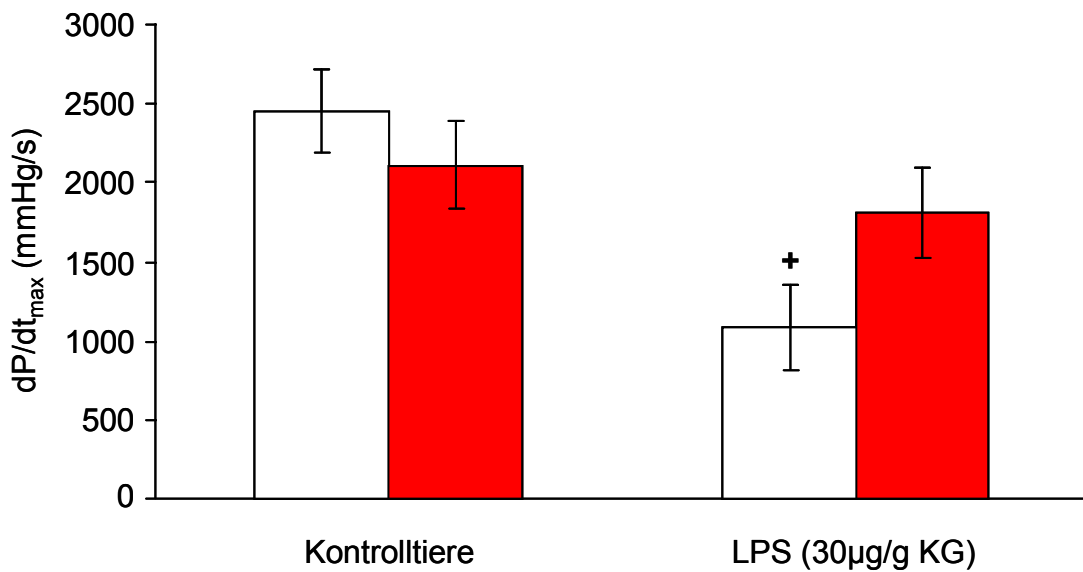


Abb. 4.19.: Aufbau des Drucks in den Herzen von WT (□) und TG (■) Mäusen mit und ohne LPS – Injektion (n jeweils 10; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Werten der jeweiligen Kontrolltiere und \* entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Tieren).

#### 4.1.2.3. Bestimmung der Interleukin – 6 – Konzentration

Zum Nachweis von IL – 6 als Indikator einer initiierten Sepsis wurde dessen Konzentration im Serum von WT Mäusen bestimmt, wie unter 3.2.3.8. beschrieben. Zunächst wurden, zur Findung einer geeigneten IL – 6/LPS - Abhängigkeit,

aufsteigende Konzentrationen von LPS appliziert und aus dem zugehörigen Serum die entsprechende IL – 6 – Konzentration bestimmt.

Mit ansteigender LPS – Menge pro g Körpergewicht (KG) stieg auch die IL – 6 – Konzentration im Serum von WT Mäusen (siehe Abbildung 4.20.).

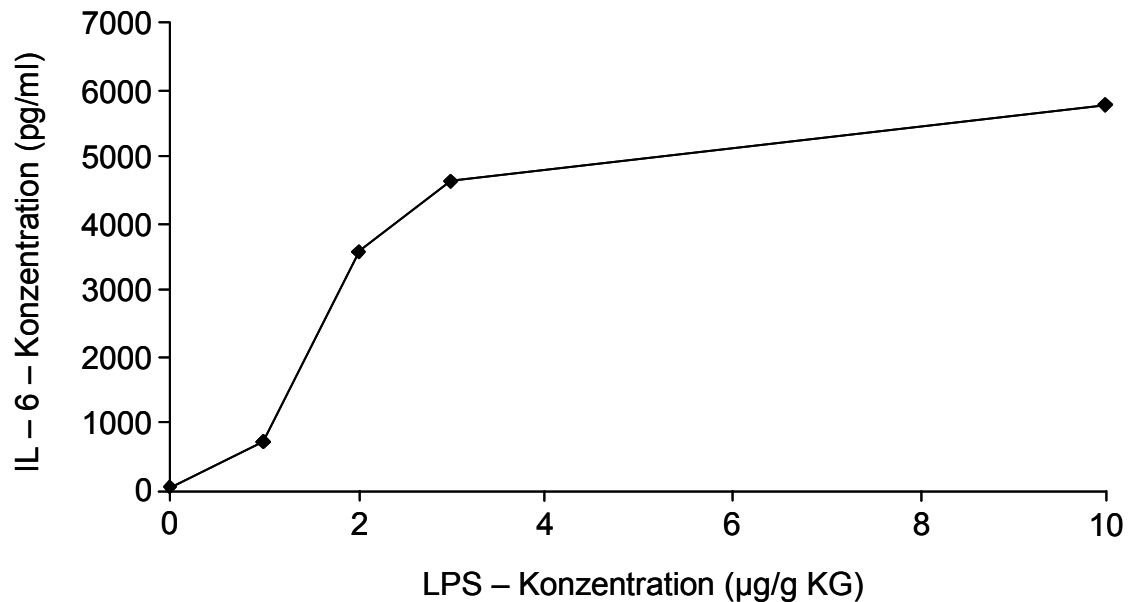
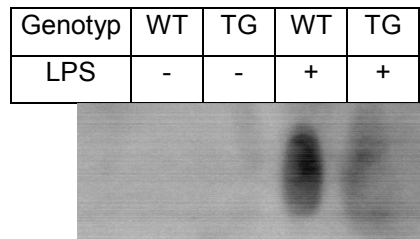


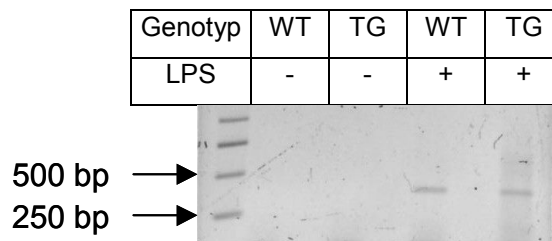
Abb. 4.20.: Ansteigende IL – 6 – Konzentration im Serum von WT Mäusen nach Applikation von LPS.

#### 4.1.2.4. Nachweis von $TNF\alpha$ und ANP

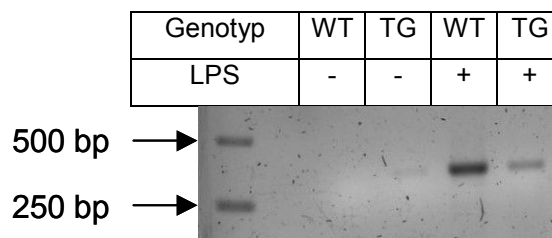
Zur Überprüfung der Expression typischer Stressproteine wurden  $TNF\alpha$  und ANP nachgewiesen. Der Nachweis für  $TNF\alpha$  erfolgte mittels Northern Blot (siehe 3.2.1.3.) und PCR (siehe 3.2.2.8.). ANP wurde nur mittels PCR nachgewiesen (siehe 3.2.2.8.). Abbildung 4.21. zeigt, daß es lediglich in den LPS – behandelten Mäusen zu einer Induktion der  $TNF\alpha$  – mRNA kam. Die Induktion von  $TNF\alpha$  – mRNA und ANP – mRNA konnte sowohl in WT als auch TG LPS – behandelten Mäusen in der aus ihrer RNA umgeschriebenen cDNA nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 4.22. und 4.23.).



**Abb. 4.21.:** Northern Blot: Induktion von  $TNF\alpha$  – mRNA in den Herzen von WT und TG Mäusen, die mit LPS behandelt wurden.



**Abb. 4.22.:** RT – PCR: Induktion von  $TNF\alpha$  – mRNA in den Herzen von WT und TG Mäusen, die mit LPS behandelt wurden.



**Abb. 4.23.:** RT – PCR: Induktion von ANP – mRNA in den Herzen von WT und TG Mäusen, die mit LPS behandelt wurden. Geringe Expression von ANP in unbehandelten TG Mäusen.

#### 4.1.2.5. Real – Time – PCR der Streßproteine $TNF\alpha$ und IL – 6

Um eine mögliche Veränderung der Expression von  $TNF\alpha$  und IL – 6 zu quantifizieren, wurde eine Real – Time – PCR durchgeführt (siehe 3.2.1.8.). Es konnte keine Veränderung der IL – 6 – Expression gefunden werden (siehe Abbildung 4.25.). Für die  $TNF\alpha$  – Expression ergibt sich ebenfalls keine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 4.24.). Allerdings ist bei WT Tieren eine tendenziell höhere  $TNF\alpha$  – Expression zu beobachten.

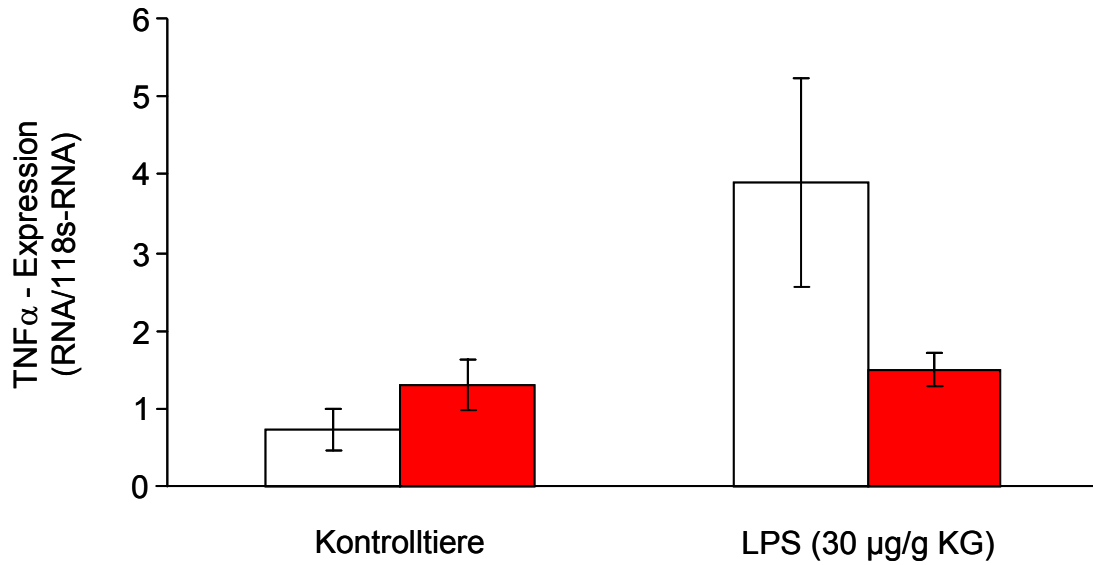


Abb. 4.24.: Real – Time – RT – PCR: TNF $\alpha$  – Expression im Herzgewebe von WT (□) und TG (■) Mäusen vor und nach der Applikation von 30  $\mu$ g/g KG LPS (n jeweils 4 – 5).

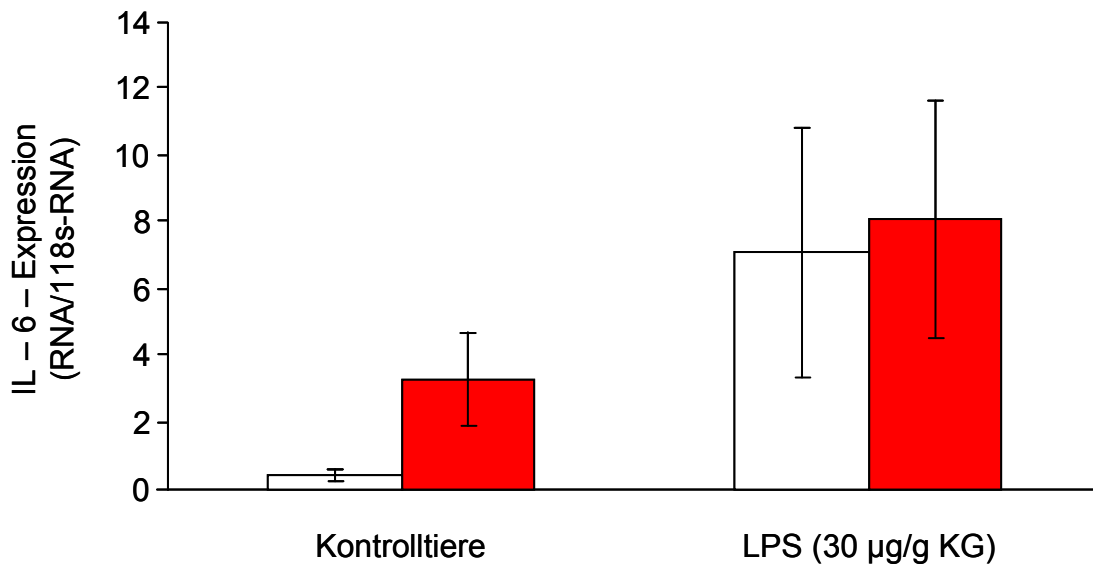
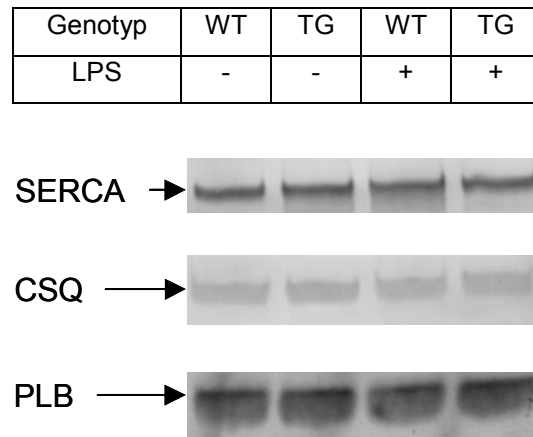


Abb. 4.25.: Real – Time – RT – PCR: IL – 6 – Expression im Herzgewebe von WT (□) und TG (■) Mäusen vor und nach der Applikation von 30  $\mu$ g/g KG LPS (n jeweils 4 – 5).

#### 4.1.2.6. Expression von SR – Proteinen

Um mögliche Veränderungen im Expressionslevel typischer SR – Proteine zu überprüfen, wurden Western Blots für SERCA, CSQ und PLB durchgeführt (siehe 3.2.3.6.).

Die Expression von SERCA, CSQ und PLB war in WT und TG Herzen gleich und wurde auch durch die Behandlung mit LPS nicht verändert (siehe Abbildung 4.26.).

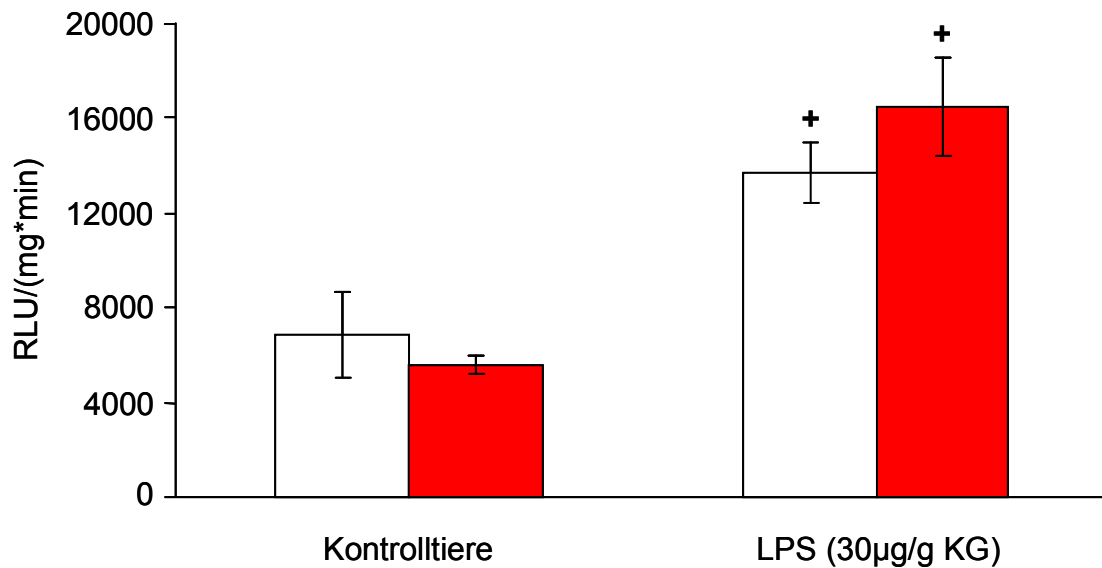


**Abb. 4.26.: Western Blots wichtiger SR – Proteine.**

#### 4.1.2.7. NADPH – Oxidase – Aktivität

Die Bestimmung der NADPH – Oxidase – Aktivität wurde wie unter 3.2.3.9. beschrieben durchgeführt. Dazu wurden Homogenate von WT und TG Mäuseherzen verwendet. Die Mäuse wurden, wie unter 3.2.6.2. beschrieben, behandelt.

Sowohl in den Herzen von WT Mäusen als auch in den Herzen von TG Mäusen zeigt sich eine Steigerung der NADPH – Oxidase – Aktivität durch die Behandlung mit LPS (siehe Abbildung 4.27.).



**Abb. 4.27.:** Aktivität der NADPH – Oxidase gegenüber NADPH als Substrat im Herzgewebe von WT (□) und TG (■) Mäusen (n jeweils 5; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Werten der jeweiligen Kontrolltiere).

#### 4.1.2.8. Katecholaminbestimmung

Die Bestimmung der Katecholaminkonzentration im Herzgewebe von WT und TG Mäusen erfolgte wie unter 3.2.6.3. angegeben. Dabei wurden die Noradrenalin – und die Adrenalinmenge im Herzgewebe von WT und TG Mäusen bestimmt. Es wurde das Herzgewebe von jeweils vier WT und TG Mäusen verwendet, die entweder 30 µg/g KG LPS erhalten hatten oder als Kontrolle 0,9 %ige NaCl – Lösung.

Im Herzgewebe von WT und TG Mäusen läßt sich kein Unterschied in der Noradrenalinmenge nach LPS - Behandlung feststellen (Abbildung 4.28.). Es zeigte sich eine erhöhte Adrenalinmenge bei LPS – behandeltem WT Herzgewebe. Die Adrenalinmenge war im Herzgewebe von TG Mäusen bereits unbehandelt höher als in WT Herzgewebe, stieg aber unter LPS –Behandlung nicht weiter an (siehe Abbildung 4.29.).

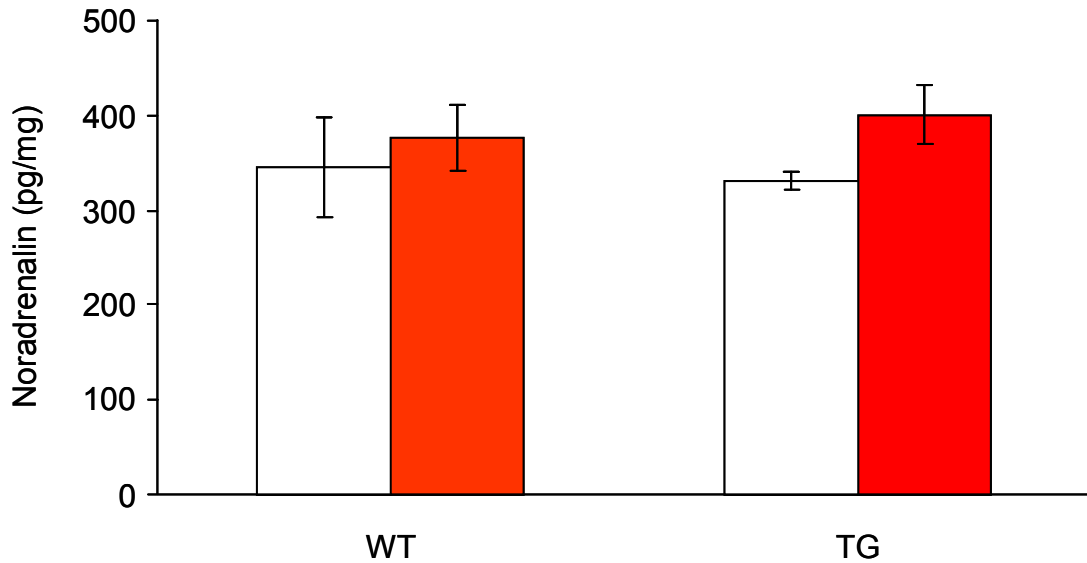


Abb. 4.28.: Noradrenalinmenge pro mg Herzgewebe in WT und TG Mäusen als Kontrollen (□) und nach Applikation von 30 µg/g KG LPS (■) (n jeweils 4).

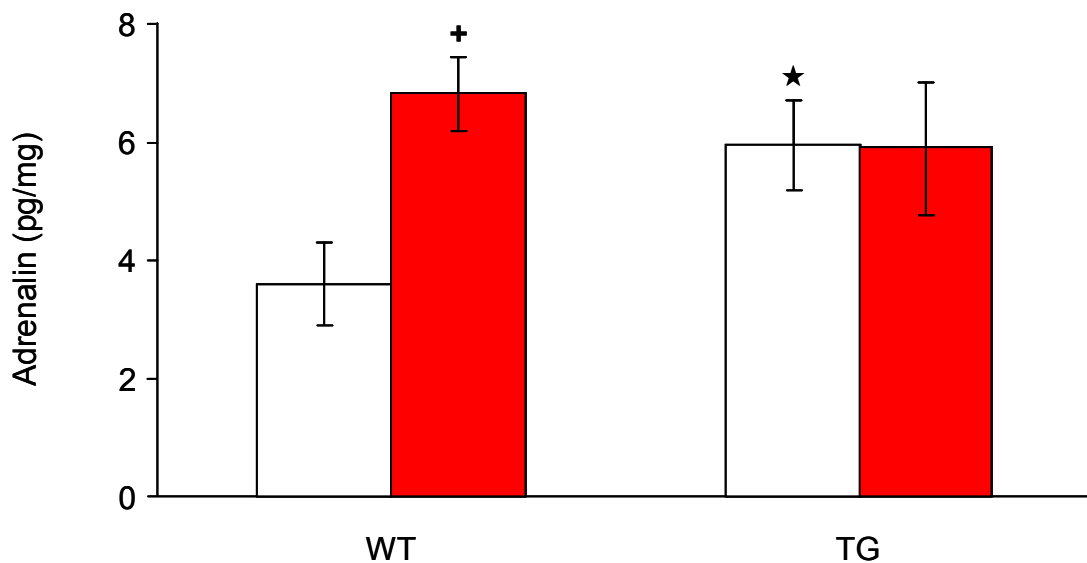


Abb. 4.29.: Adrenalinmenge pro mg Herzgewebe in WT und TG Mäusen als Kontrollen (□) und nach Applikation von 30 µg/g KG LPS (■) (n jeweils 4; + entspricht  $p < 0,05$  vs. Werten der jeweiligen Kontrolltiere und \* entspricht  $p < 0,05$  vs. WT Tieren).

#### 4.1.2.9. Histologische Färbung

Um mögliche morphologische Unterschiede zwischen WT und TG Herzgewebe vor und nach LPS – Behandlung aufzuzeigen, wurde eine Hämatoxylin – Eosin – Färbung (siehe 3.2.8.) durchgeführt. Wie in Abbildung 4.30. zu sehen ist, zeigten sich

keine histologischen Unterschiede zwischen WT und TG, sowie zwischen LPS – behandelten und unbehandelten Tieren.

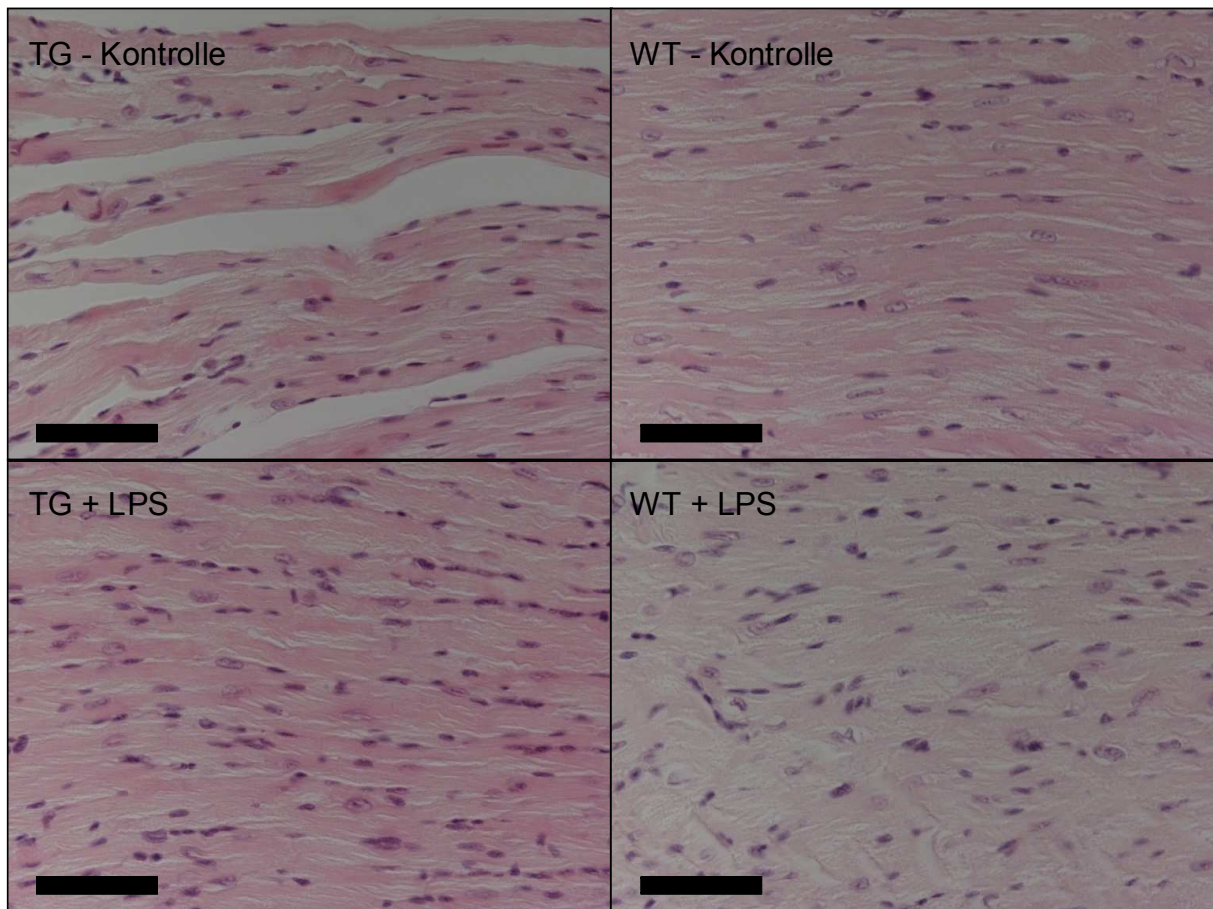
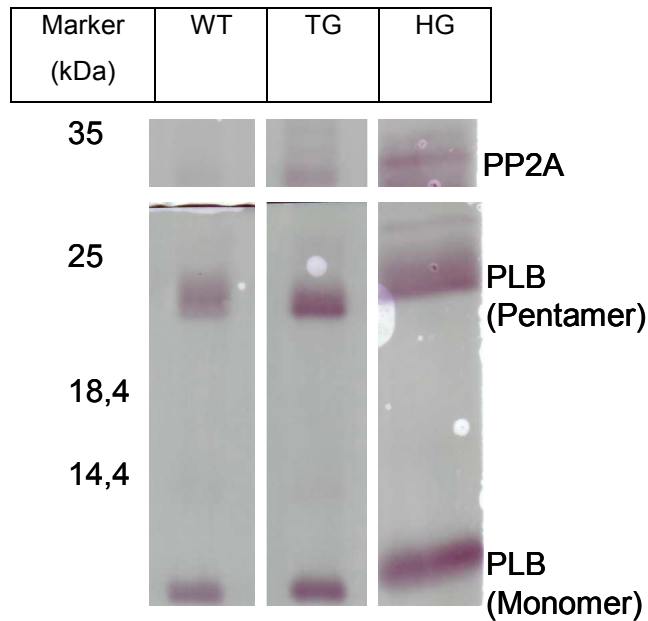


Abb. 4.30.: Haematoxilin – Eosin – Färbung von LPS – behandelten und unbehandelten WT und TG Mäuseherzen (■ – 100  $\mu$ m).

#### 4.3. Gemeinsame Präzipitation der katalytischen C – Untereinheit der PP2A mit PLB

Zur Charakterisierung der Bindung der katalytischen C – Untereinheit an PLB, das ein wichtiges Zielprotein darstellt, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt (siehe 3.2.3.3.). Bei der Immunpräzipitation von PLB wurde die katalytische C – Untereinheit der PP2A ebenfalls präzipitiert (siehe Abbildung 4.31.).





**Abb. 4.31.:** Koimmunpräzipitation von PLB und PP2A. Nach Immunpräzipitation von PLB wurden Western Blot – Experimente für PP2A (oben) und PLB (unten) durchgeführt. Als Kontrolle wurde das Homogenat (HG) eines TG Herzens verwendet.

#### 4.4. Expression des TRPV 1 im Ventrikel von WT und TG Mäusen

Wie unter 3.2.1.8. beschrieben, wurde die Expression der TRPV 1 – mRNA bestimmt. Die Expression von TRPV 1 ist in den Ventrikeln von TG Mäusen, im Vergleich zu den Ventrikeln von WT Mäusen, erhöht (siehe Abbildung 4.32.).

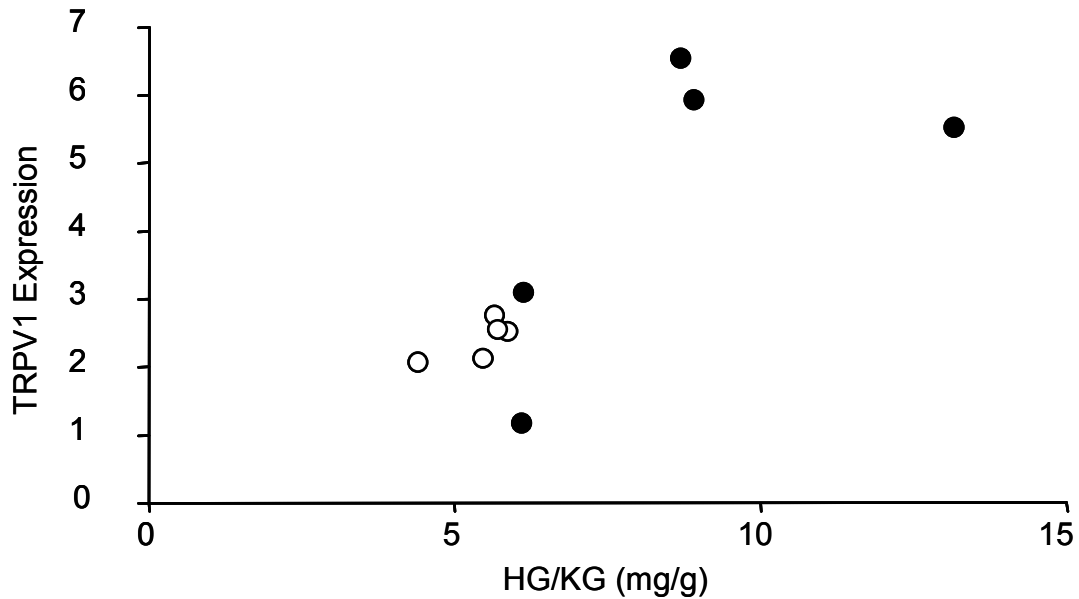


Abb. 4.32.: TRPV 1 Expression in WT (○) und TG (●) Mäuseherzen im Vergleich zum Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht. Die TRPV 1 Expression wurde gegen GAPDH normiert.

#### 4.5. Affymetrix Gene – Chip Daten

Um Hinweise auf eine mögliche Veränderung der Genexpression zu finden, welche die verbesserte Streßantwort der TG Mäuse erklären könnte, wurde eine Mikroarray – Analyse (siehe 3.2.1.7.) durchgeführt. Dabei konnten für die RNA von WT Tieren drei und für die RNA von TG Tieren zwei Gene – Chips ausgewertet werden. Aus den erhaltenen Daten wurden jeweils die Mittelwerte gebildet.

Zur Festlegung einer veränderten Genexpression in TG Mäusen, wurde das Verhältnis von TG Expressionsstärke zu WT Expressionsstärke (TG/WT) gebildet. Eine Abweichung von 50 % wurde dabei als relevante Veränderung betrachtet (siehe Abbildung 4.33.). Um den Einfluß auf unterschiedliche Stoffwechselwege deutlich zu machen, wurden die Gene in den Tabellen 4.5. bis 4.14. verschiedene Gruppen eingeteilt.

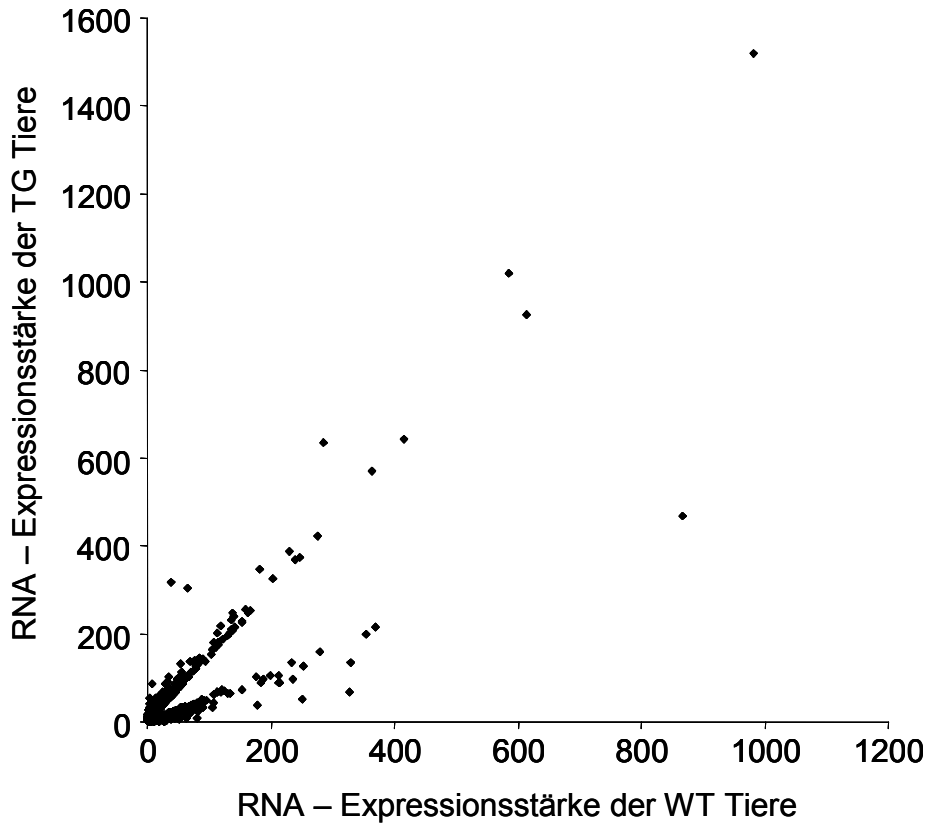


Abb. 4.33.: Affymetrix Gene – Chip Daten für Gene, deren Expression in TG Tieren um mindestens 50 % von WT Tieren abweicht.

Tabelle 4.5.: Veränderte RNA – Expression von Genen der Phosphorylierung.

Beschreibung	TG/WT
Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 7 (PPP1R7)	3,63
Mitogen activated protein kinase 9 (JNK2)	1,72
Phosphatidic acid phosphatase type 2c	1,51
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform	1,50
Protein phosphatase 5, catalytic subunit (PP5)	0,51
Protein phosphatase 5, catalytic subunit	0,30
Protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform (Ppm1g)	0,28

**Tabelle 4.6.: Veränderte RNA – Expression von Genen der Streßantwort.**

Beschreibung	TG/WT
Endonuclease G (EndoG)	1,86
Lipopolysaccharide binding protein (LBP)	1,81
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1, endothelial (TNFAIP1)	1,57
Heat shock protein, 25 kDa (Hsp25)	1,57

**Tabelle 4.7.: Veränderte RNA – Expression von Genen Membran – assoziierter Proteine.**

Beschreibung	TG/WT
FK506 binding protein 4 (59 kDa; FKBP52)	7,13
Very low density lipoprotein receptor (VLDL – Rezeptor)	2,70
Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)	2,17
Thrombomodulin (TM)	1,86
Adrenomedullin receptor (Admr)	1,73
FK506 binding protein 1a (12 kDa; FKBP12)	0,54
Regulator of G-protein signalling 10 (Rgs10)	0,53
Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit (Cacna1c)	0,37

**Tabelle 4.8.: Veränderte RNA – Expression von Genen des Stoffwechsels.**

Beschreibung	TG/WT
Enolase 3, beta muscle (Eno3)	2,79
Acetyl-Coenzyme A acyltransferase (peroxisomal 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase) (Acaa)	2,31
Cytochrome P450, 7b1 (Cyp7b1)	1,69
Phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent) (Pla2g4a)	1,53
Cytochrome P450, 51 (Cyp51)	1,50
Thioredoxin and glutathione reductase (TGR)	0,53
Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein (ALOX5AP)	0,25
Malonyl-CoA decarboxylase (Mlycd)	0,20

**Tabelle 4.9.: Veränderte RNA – Expression von Genen des Proteinabbaus.**

Beschreibung	TG/WT
Cathepsin B	2,94
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2 (PSMD2)	2,00
Cathepsin Z	1,60
Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L5 (Uchl5)	1,49
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8 (PSMD8)	0,56

**Tabelle 4.10.: Veränderte RNA – Expression von Genen mitochondrialer Proteine.**

Beschreibung	TG/WT
Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	2,02
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit (Atp5b)	1,52
Superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2)	0,31

**Tabelle 4.11.: Veränderte RNA – Expression von Genen der Translation.**

Beschreibung	TG/WT
Nucleoporin 62 (Nup62)	6,28

**Tabelle 4.12.: Veränderte RNA – Expression von Genen des Cytoskeletts.**

Beschreibung	TG/WT
Microtubule-associated protein, RPEB family, member 1 (Mapre1, EB1)	2,97
Microtubule-associated protein 4 (MAP4)	0,54

**Tabelle 4.13.: Veränderte RNA – Expression von Genen der Transkription.**

Beschreibung	TG/WT
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K)	1,71
RNA polymerase II 3 (RPB3)	0,58
Activating transcription factor 4 (ATF4)	0,48
Histone deacetylase 2 (Hdac2)	0,41

**Tabelle 4.14.: Veränderte RNA – Expression von nicht zugeordneten Genen.**

Beschreibung	TG/WT
Lysosomal membrane glycoprotein 2 (LAMP2)	1,77
Calmodulin 1	0,37

## 5. Diskussion

### 5.1. Einfluß verschiedener Streßfaktoren

#### 5.1.1. Einfluß von globaler Ischämie

Die Ergebnisse der Messungen am arbeitleistenden Herz zeigten nach 120 Minuten ischämischem Streß, wie zu erwarten, eine deutliche Verschlechterung des systolischen linksventrikulären Drucks in den Herzen von WT Mäusen. Die Herzen der TG Mäuse zeigten keine solche Verschlechterung. Die Anstiegs- und Abfallgeschwindigkeit des Ventrikeldrucks war in den Herzen von WT Mäusen ebenfalls nach der Ischämie verringert, jedoch nicht in den Herzen von TG Mäusen. Im Gegensatz dazu zeigten die Herzen von TG Mäusen nach der Ischämie eine Verkürzung der Zeiten bis zur 50 %igen und 90 %igen Relaxation. Bei den Herzen von WT Mäusen kam es zu keiner solchen Verkürzung der Relaxationszeiten nach 120 Minuten Ischämie (siehe 4.1.1.1.).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß eine erhöhte Phosphataseaktivität einerseits zu einer verringerten Kontraktilität führt (Gergs et al. 2004), andererseits aber die Erholung nach Ischämie verbessert. Dies ergänzt Ergebnisse aus Experimenten zum chronischen Myokardinfarkt, welche bei TG Mäusen einerseits eine erhöhte Infarkt – Ausdehnung feststellten, andererseits aber keine Infarkt – bedingte Kardiomyozyten – Hypertrophie (Höhn et al. 2009).

Interessanterweise zeigte sich im Herzgewebe der TG Mäuse eine deutlich erhöhte nNOS – Expression im Vergleich zu WT Mäusen. Die Expression der eNOS war unverändert (siehe 4.1.1.2.). Beide NO – Synthasen können regulatorischen Einfluß auf den Ablauf der Kontraktion ausüben (Bredt 2003; Ziolo et al. 2008).

Bisher identifiziert sind drei NO – Synthasen, die abhängig vom Ort ihrer ursprünglichen Identifikation als neuronale NOS (nNOS), endotheliale NOS (eNOS) und induzierbare NOS (iNOS) bezeichnet werden. Inzwischen ist nachgewiesen worden, das alle drei Isoformen in allen Geweben vorkommen (Tsutsui et al. 2009).

Auf Grund seiner hohen Reaktivität und seiner guten Diffusionseigenschaften wird NO sowohl im Bezug auf seine Erzeugung, als auch seine Lokalisation stark reguliert.

Der Einfluß der verschiedenen NO – Synthasen auf die Kontraktilität des Herzens wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Rolle der verschiedenen Isoformen ist dabei noch nicht zur Gänze geklärt.

So kommt es nach einer Hypoxie zu einer zeitabhängigen Erhöhung der nNOS – mRNA (Danson 2005). In Ratten wurde nach einem Herzinfarkt ebenfalls eine Erhöhung der nNOS – Expression festgestellt (Übersicht in Sears et al. 2004). Verschiedene Befunde weisen auf eine mögliche protektive Funktion der nNOS – Hochregulierung hin. So kommt es durch eine Inhibierung der nNOS zu einer Verschlechterung der linksventrikulären Dysfunktion bei Ratten (Damy et al. 2003).

In nNOS – knock out – Mäusen wurde außerdem eine stärkere Verringerung des linksventrikulären Drucks nach 40 Minuten Ischämie beobachtet als in WT Mäusen. In den Herzen der nNOS – knock out – Mäuse kommt es außerdem zur Entwicklung eines größeren Infarkts und einer höheren  $TNF\alpha$  – Expression (Übersicht in Sears et al. 2004). In Myokardinfarktversuchen durch Ligation der linken Koronararterie bei nNOS – knock out – Mäusen kommt es zu vermehrten ventrikulären Arrhythmien und einer erhöhten Mortalität. Die nNOS – knock out – Mäuse zeigen außerdem erhöhte  $Ca^{2+}$  – Transienten und einen stärkeren  $Ca^{2+}$  – Einstrom durch den L – Typ Calciumkanal (LTCC). Darüber hinaus war die Nitrosylierung des LTCC, des Ryanodin Rezeptors (RyR2) und der Sarko/Endoplasmatischen retikulären  $Ca^{2+}$  – abhängigen ATPase (SERCA) verringert (Burger et al. 2009).

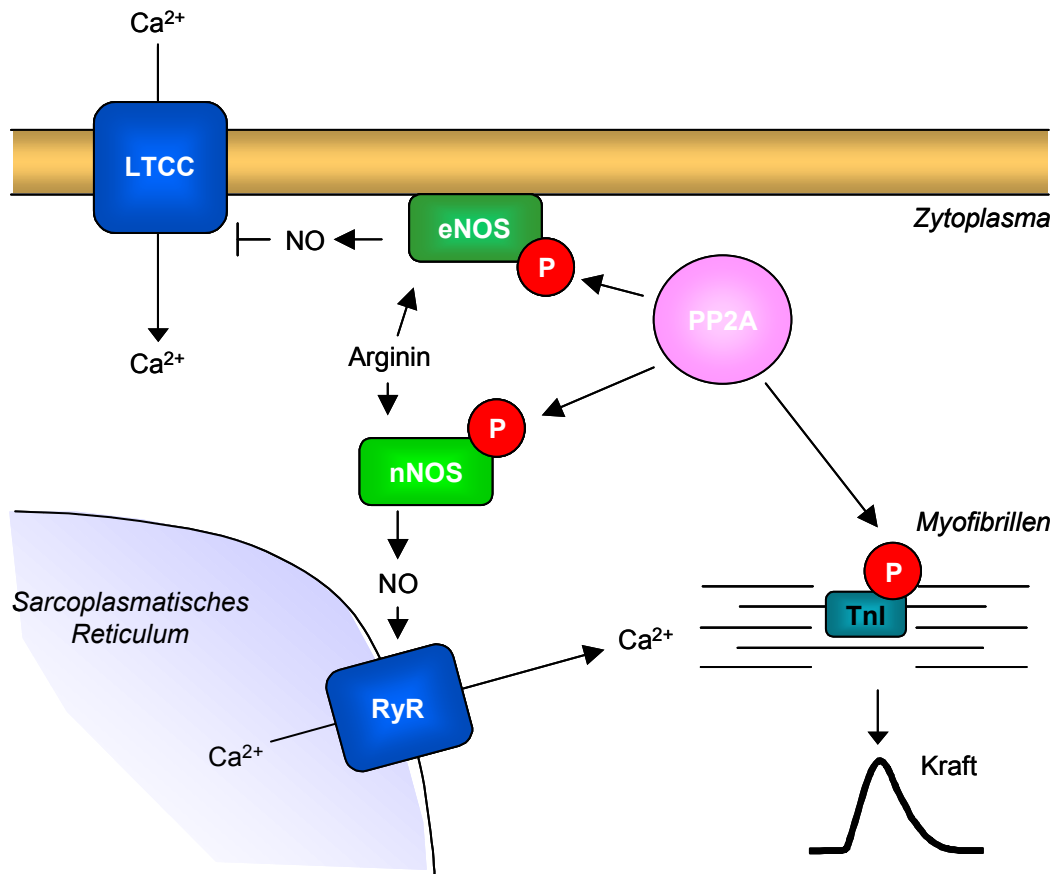
In Kardiomyocyten ist die eNOS räumlich zusammen mit dem L – Typ Calcium Kanal assoziiert (Schwencke et al. 1999) und hemmt durch NO – Produktion dessen Aktivität (Ji et al. 1999). Im Gegensatz dazu erhöht die nNOS – Aktivität die Kontraktilität der Kardiomyocyten. Die nNOS assoziiert mit dem Ryanodinrezeptor (RyR) und stimuliert dort die Calciumfreisetzung (Xu et al. 1999a; Xu et al. 1998). Auf diese Weise entsteht der entgegengesetzte Einfluß dieser beiden NOS – Isoformen im Herzen (siehe Abbildung 5.1.).

Sowohl nNOS als auch eNOS können in ihrer Funktion durch die intrazelluläre Calciumkonzentration reguliert werden. Calciumionen binden an Calmodulin, das wiederum an diese NOS – Isoformen bindet und sie aktiviert (Übersicht in Bredt 2003; Bredt und Snyder 1990).

Die Aktivität der nNOS wird durch Phosphorylierung durch CaM Kinasen ( $Ca^{2+}$  Calmodulin – abhängige Proteinkinasen) reduziert. Diese Phosphorylierung kann durch PP2A aufgehoben werden (Komeima et al. 2000), wodurch deren Aktivität

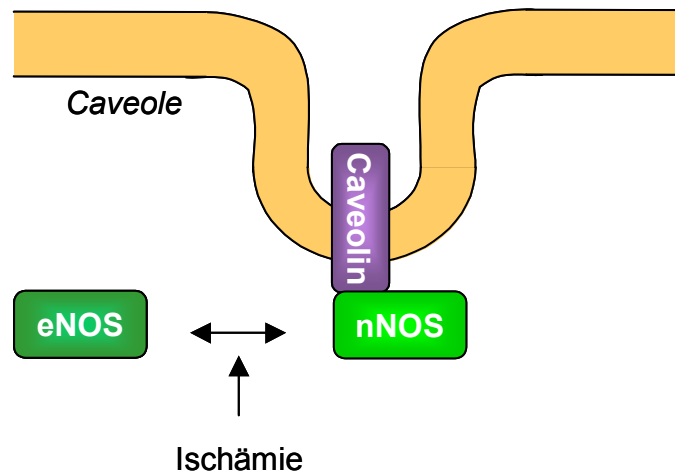


wieder ansteigt. Auch die Aktivität der eNOS wird über Phosphorylierung reguliert. Aber im Gegensatz zur nNOS wird phosphorylierte eNOS aktiviert und durch Dephosphorylierung durch die PP2A inhibiert (Nathan und Xie 1994; Mitchell et al. 2001; Greif et al. 2002, Fleming und Busse 2003, Dudzinski und Michel 2007).



**Abb. 5.1.:** Rolle von eNOS und nNOS in der Regulation der Kardiomyozytenkontraktion (modifiziert aus Bredt 2003).

Die Lokalisierung der nNOS kann während einer Ischämie in die Caveolen verschoben sein. Die nNOS kann ebenfalls von Caveolin gebunden werden und in die Caveolen transloziert werden (Venema et al. 1997, Sears et al. 2004, Daniel et al. 2006). Dort kann die nNOS eine ähnliche Funktion wie die eNOS übernehmen (siehe Abbildung 5.2.).



**Abb. 5.2.: Lokalisierung der nNOS an Caveolin während einer Ischämie.**

Für den Effekt von NO auf die  $\text{Ca}^{2+}$  – Spark – Frequenz existieren allerdings unterschiedliche Befunde (Übersicht in Sears et al. 2004). Die  $\text{Ca}^{2+}$  – Spark – Frequenz reflektiert die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2. Eine Nitrosylierung des RyR2 führt zu einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$  – Spark – Frequenz (Danson 2005). Die Nitrosylierung erfolgt hauptsächlich durch das freie Radikal Peroxynitrit, welches eines der Produkte entkoppelter NO – Synthasen ist. Durch die Lokalisierung der nNOS in räumlicher Nähe des RyR, könnte das von der nNOS generierte Peroxynitrit mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer verstärkten Nitrosylierung des RyR führen.

Weitere Befunde weisen auf eine Beteiligung von NO an verschiedenen Mechanismen hin, welche für das ischämische Herz vorteilhaft sein könnten. So führen beispielsweise kurze Episoden unterbrochener Hypoxie im Vorfeld einer Ischämie zu reduziertem oxidativen Streß, einer NO – induzierter Vasodilatation und damit zu erhöhter Kapillarperfusion (Bertuglia et al. 2008).

Auch während der ischämischen Präkonditionierung kommt es zum Anstieg der subzellulären NO – Mengen beziehungsweise der NOS – Aktivität (Han et al. 2009). Dies führt zu einer verringerten Infarktgröße und geringeren Arrhythmien während der Reperfusion und zu einer verbesserten post – ischämischen Myokardfunktion. Der protektive Effekt von NO während der Reperfusion könnte über die Inhibierung der  $\text{Ca}^{2+}$  – induzierten Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (MPTP) vermittelt sein (Borutaite et al. 2009; Wang et al. 2005). So zeigt sich nach Ischämie und anschließender Reperfusion eine erhöhte Tyrosin – Nitrierung von Proteinen, unter denen zu einem Großteil mitochondriale Proteine sind (Liu et al. 2009).

Auch die Überladung der Zelle mit  $\text{Ca}^{2+}$ , welche zur MPTP – Öffnung führt, kann über einen NOS/PKG – vermittelten (PKG - Proteinkinase G) Signalweg beeinflusst werden (Ladilov et al. 2002).

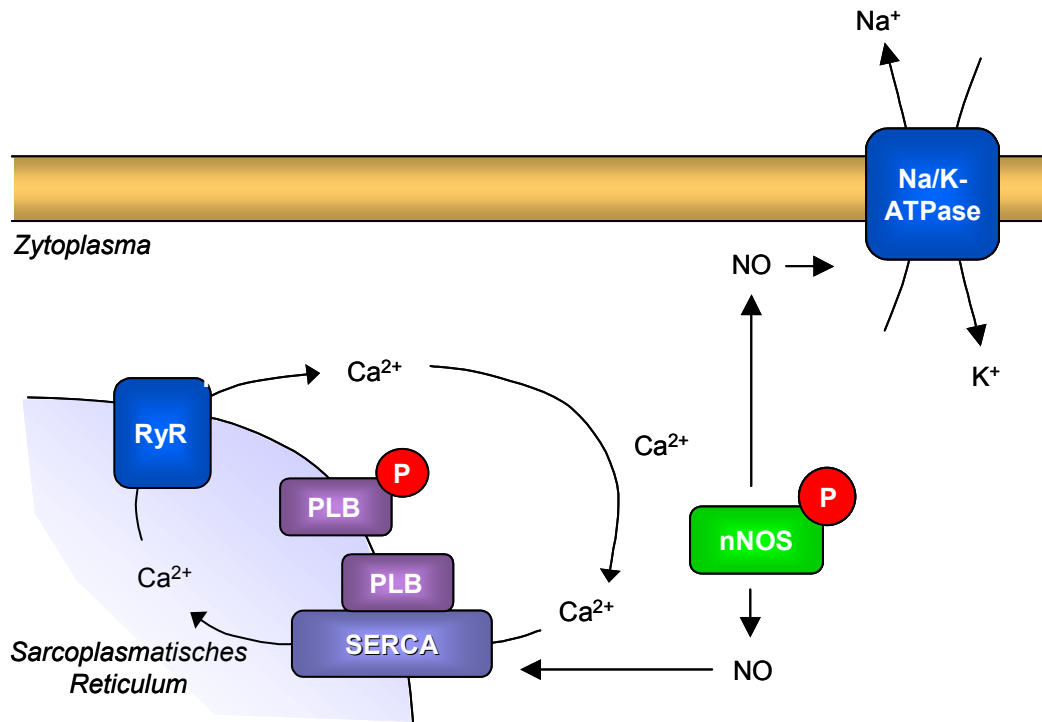


Abb. 5.3.: Einfluß der nNOS auf die Aktivität der SERCA und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> – ATPase.

Falls die erhöhte nNOS – Expression mit einer erhöhten NO – Produktion einhergeht, könnte sich daraus auch ein erhöhter oxidativer Streß (Venditti et al. 2004) oder eine Beeinflussung redox – sensibler Signalwege durch Peroxynitrit ergeben. Auf diese Weise können beispielsweise ERK 1/2, JNK 1/2 und p38 MAPK aktiviert werden (Liaudet et al. 2009).

Es konnte auch von Zhou et al. 2002 und Xu et al. 2003 gezeigt werden, daß nNOS – erzeugtes NO die Aktivität der Na<sup>+</sup> – K<sup>+</sup> – ATPase erhöht (siehe Abb. 5.3.), wodurch indirekt die Aktivität des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> – Austauschers beeinflusst wird. Dadurch könnte während einer Ischämie dem Anstieg der Ca<sup>2+</sup> – Konzentration entgegengewirkt werden.

Einen weiteren Hinweis auf einen erhöhten oxidativen Streß in den Herzen von TG Tieren gibt die erhöhte NADPH – Oxidase – Aktivität. Um den Grad der oxidativen Belastung nach der Ischämie zu bestimmen, wurde die Aktivität der NADPH – Oxidase (NOX) bestimmt. Im Herzen kommen hauptsächlich NOX2 und NOX4 vor

(Dworakowski et al. 2008; Borchi et al. 2009). Die Ergebnisse zeigen, daß die Aktivität der NADPH – Oxidase in den Herzen von TG Mäusen deutlich erhöht ist gegenüber den Herzen von WT Mäusen. Dies würde auf einen erhöhten oxidativen Streß hinweisen.

Allerdings kann das NADPH – Oxidase – generierte Superoxid mit NO zu Peroxinitrit reagieren und zur bereits erwähnten Nitrierung von Proteinen führen. Darüber hinaus können ROS (hauptsächlich H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) direkte Effekte über die Modulation von redox – sensitiven Signalwegen entfalten (Li und Shah 2004). Die Ergebnisse verschiedener Studien zeigen, daß die ROS – Produktion innerhalb von Zellen in verschiedenen kompartimentalisierten Bereichen stattfindet, wodurch eine Spezifität des Signals erreicht werden kann (Dworakowski et al. 2008). Auf diese Weise werden Kinasen wie ERK und JNK aktiviert.

Die Aktivität der NADPH – Oxidase kann auch durch Noradrenalin und TNF $\alpha$  erhöht werden (Borchi et al. 2009; Murdoch et al. 2006). Diese Aktivierung basiert vermutlich auf der Phosphorylierung der p47phox – Untereinheit der NADPH – Oxidase (Li und Shah 2003).

Während einer Ischämie kann es bei Menschen und Kaninchen zu einer verstärkten Freisetzung von Katecholaminen im Ischämiebereich kommen (Kuroko et al. 2007; Schömig et al. 1991) und damit ebenfalls zu einer verstärkten  $\beta$  – adrenergen Stimulation. Diese führen im Herzen zu einer erhöhten Kontraktilität und damit zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch. Dies kann die Schädigung des Myokards noch weiter verstärken. Auch in den Herzen der Mäuse kommt es zu einer Zunahme der Adrenalinmenge (siehe Abbildung 4.12.).

Die Herzen der TG Mäuse zeigen eine abgeschwächte Reaktion auf  $\beta$  – adrenerge Stimulation durch Isoprenalin (Gergs et al. 2004). Es ist noch nicht geklärt, ob diese verringerte Reaktion tatsächlich auf einer geringeren  $\beta$  – adrenergen Stimulierbarkeit basiert, oder ob möglicherweise eine verminderte basale ATP – Konzentration vorliegt. Sollte ersteres der Fall sein, könnte diese verringerte  $\beta$  – adrenerge Stimulierbarkeit bei TG Mäusen einem durch Katecholaminausschüttung bedingten erhöhten Sauerstoffverbrauch entgegen wirken.

Die Herzen der TG Mäuse weisen außerdem eine erhöhte Expression des TRPV 1 im Ventrikel auf. TRPV 1 ist ein nicht – selektiver Kationenkanal, welcher hauptsächlich in sensorischen Nerven und Nozizeptoren exprimiert wird (Gunthorpe et al. 2002; Golech et al. 2004). Neuere Ergebnisse zeigen auch eine Expression in

Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen. TRPV 1 kann durch verschiedene physikalische und chemische Stimuli aktiviert werden, darunter auch Protonen. Dies führt zu einer verbesserten Erholung der Herzfunktion nach Ischämie und Reperfusion (Zhong und Wang 2008). Die Aktivierung des TRPV 1 bewirkt einen verbesserten systolischen linksventrikulären Druck, eine erhöhte Anstiegsgeschwindigkeit des Drucks und einen Abfall des enddiastolischen Drucks. Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse mit einem knock out des TRPV 1 – Gens eine Verschlechterung der Erholung (Zhong und Wang 2007). Diese Ergebnisse entsprechen den Kontraktionsdaten der Experimente am arbeitleistenden Herz. Die erhöhte Expression des TRPV 1 im Ventrikel von TG Tieren könnte zur verbesserten Erholung nach Ischämie und Reperfusion beitragen.

### **5.1.2. Einfluß von Lipopolysacchariden**

Die Temperaturdaten zeigen, daß die Behandlung mit LPS, sowohl in WT als auch in TG Tieren, zu einer Hypothermie führte. Diese diente als physiologischer Marker für die Induktion einer Sepsis, da es bei kleinen Nagern unter LPS – Einfluß zu einer Hypothermie kommt (Derijk und Berkenbosch 1994; Mizuno et al. 2000; Ray et al. 2006). Trotz dieses Unterschieds zum Menschen handelt es sich hierbei um ein etabliertes Modell zur Untersuchung von Sepsis (Poli-de-Figueiredo et al 2008).

Bei den Kontrolltieren zeigten die TG Mäuse eine leicht erhöhte Temperatur. Das steht möglicherweise mit der basal höheren Adrenalinmenge bei TG Mäusen in Zusammenhang. Zu erwarten wäre eine niedrigere Temperatur auf Grund der vasokonstriktorisches Eigenschaften des Adrenalins. Allerdings führt Adrenalin auch zur verstärkten Gluconeogenese und zur Erhöhung des Energieumsatzes. Dieser könnte zu der erhöhten basalen Temperatur TG Mäuse führen.

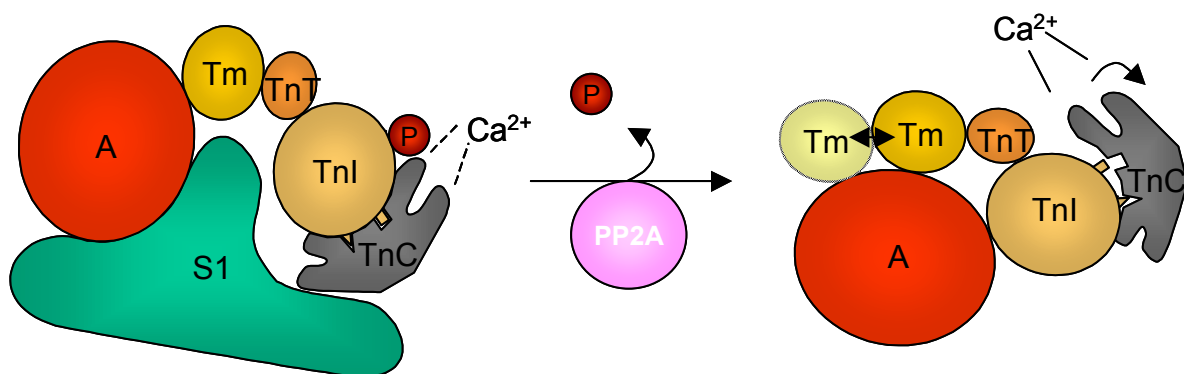
Auch der Abfall des Körpergewichtes zeigt das Vorhandensein von physiologischem Streß an. Die WT Mäuse verloren dabei stärker an Gewicht als die TG Mäuse. Dies kann als erster Hinweis auf eine verbesserte Toleranz gegenüber LPS – induzierter Sepsis gedeutet werden.

Die Ergebnisse am isoliert perfundierten arbeitleistenden Herzen zeigten nach LPS – Behandlung eine deutliche Verschlechterung des systolischen links – ventrikulären Drucks bei WT Herzen. Die Herzen der TG Mäuse zeigten keine derartige Verschlechterung. Die Herzfrequenz war nach LPS – Behandlung bei den Herzen

von TG Mäusen höher als bei WT Mäusen. Die Anstiegs – und Abfallgeschwindigkeit des Ventrikeldrucks waren in den Herzen von WT Mäusen ebenfalls nach LPS - Behandlung verringert, jedoch nicht in den Herzen von TG Mäusen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die erhöhte PP2A – Aktivität in den Herzen von TG Mäusen, trotz der basal verschlechterten Kontraktilität, einen Schutz gegen septischen Streß bewirken könnte.

PP2A kann an verschiedenen Stellen in die LPS – Signaltransduktion eingreifen, da dieser Signalweg viele physiologische Substrate der Serin/Threonin – Phosphatasen enthält. So führt beispielsweise eine erhöhte PP2A – Aktivität zu einer Verringerung der JNK – Aktivität und einer Dephosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  (Shanley et al. 2002).



**Abb. 5.5.: Änderung der Ca<sup>2+</sup> – Sensitivität bei Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von TnI (abgewandelt aus Voet und Voet 1994).**

Unter LPS – Einfluß kommt es außerdem zur verstärkten Phosphorylierung von TnI an der PKA – sensitiven Phosphorylierungsstelle. Dies führt zu einer Verringerung der Ca<sup>2+</sup> – Sensitivität der Myofilamente. Wird diese Phosphorylierung verhindert, kommt es zu einer Verbesserung der unter LPS – Einfluß auftretenden kontraktilen Dysfunktion (Layland et al. 2005, siehe Abbildung 5.5.). Da die TnI – Phosphorylierung bei TG Mäusen verringert ist, liegt es nahe, hier eine der Ursachen für die geringere Anfälligkeit des Herzens gegenüber einer Sepsis zu sehen.

Während einer Sepsis kommt es durch Vasodilatation zum Abfall des Blutdrucks, zu einer mangelnden Strömungsverteilung des Blutes und, verbunden mit der Adhäsion von Leukozyten und Plättchen an das Endothel, einer verringerten Sauerstoffversorgung des Gewebes (Thiemermann 1997).

Hinweise auf Mechanismen, welche das Gewebe bei Sauerstoffunterversorgung schützen, fanden sich bereits bei den Untersuchungen zur Ischämie (siehe 5.1.1.).

Gleichzeitig führt Sepsis zur Reduzierung der Myokardkontraktion und einer Verminderung der Herzfunktion (Weigand et al. 2003).

Da LPS – induzierte Sepsis mit einem Anstieg verschiedener Mediatoren einhergeht, wurde das Herzgewebe der Tiere auf das Vorhandensein von  $\text{TNF}\alpha$  und ANP überprüft. Die  $\text{TNF}\alpha$  – Expression wird während einer Sepsis in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten induziert (Kapadia et al. 1995).

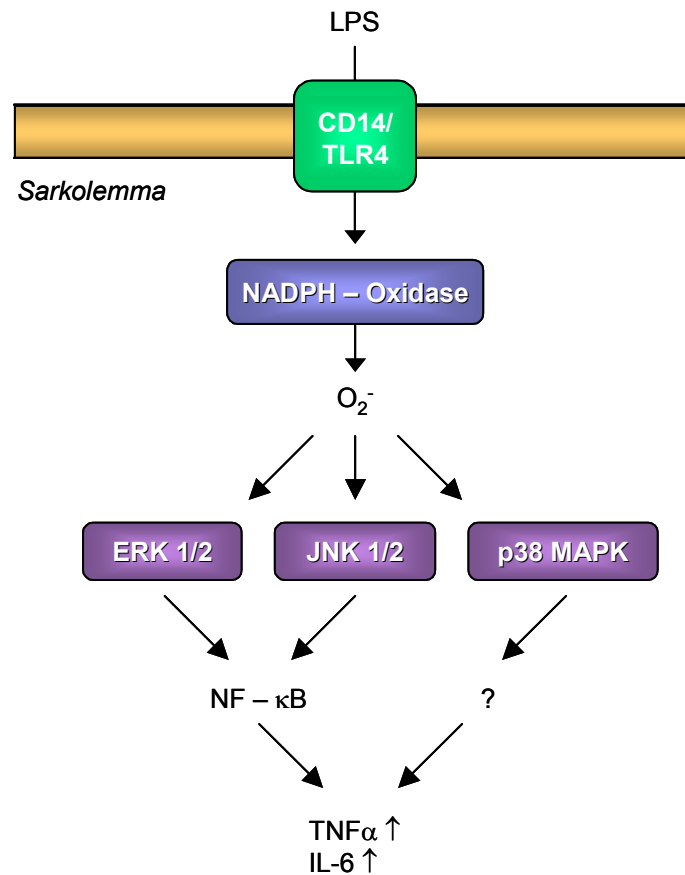
Die Reduktion der Myozytenverkürzung während einer Sepsis wird zum Großteil über  $\text{TNF}\alpha$  bewirkt (Tavener und Kubes 2005), welches unter anderem von den Kardiomyozyten selbst produziert wird (Wright et al. 2002).

Die Stärke der  $\text{TNF}\alpha$  – Expression sollte in diesem Fall Anhaltspunkte für die verbesserte LPS – Toleranz der TG Mäuse liefern. Mittels Northern Blot und RT – PCR konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß nur in LPS – behandelten Mäusen ein Anstieg der  $\text{TNF}\alpha$  – mRNA – Expression stattfand.

Die  $\text{TNF}\alpha$  – Expression wurde quantitativ untersucht, es zeigte sich eine niedrigere  $\text{TNF}\alpha$  – Expression in den Herzen von TG Mäusen.

Diese Ergebnisse zeigen nicht nur, daß eine Sepsis in den LPS – behandelten Mäusen induziert wurde, sondern auch, daß die niedrigere  $\text{TNF}\alpha$  – Konzentration in TG Mäusen ursächlich an der verbesserten LPS – Toleranz beteiligt sein könnte.

Die Aktivität der NADPH – Oxidase war nach LPS – Behandlung sowohl bei WT als auch bei TG Tieren erhöht. NADPH – Oxidase spielt für die LPS – induzierte  $\text{TNF}\alpha$  – Expression und die kardiale Dysfunktion eine zentrale Rolle (Peng et al. 2005a). LPS bewirkt eine Steigerung der Superoxidproduktion der NADPH – Oxidase, ohne deren Expression zu erhöhen (Javesghani et al. 2002).



**Abb. 5.6.: Rolle der NADPH – Oxidase bei der Induktion von TNF $\alpha$  und IL – 6 (modifiziert aus Peng et al. 2005a).**

Durch die erhöhte Superoxidproduktion der NADPH – Oxidase kommt es zur Aktivierung von Proteinkinasen wie ERK 1/2, JNK 1/2 und p38 MAPK (ERK – Extrazelluläre signalregulierte Kinase, MAPK – Mitogen – aktivierte Proteinkinase). ERK 1/2 und JNK 1/2 können ihrerseits NF –  $\kappa$ B aktivieren und damit die Expression von TNF $\alpha$  und IL – 6 induzieren. Über welchen Signalweg dies bei der p38 MAPK geschieht, ist noch nicht vollständig geklärt (Peng et al. 2005a; Peng et al. 2005b, siehe Abbildung 5.6.).



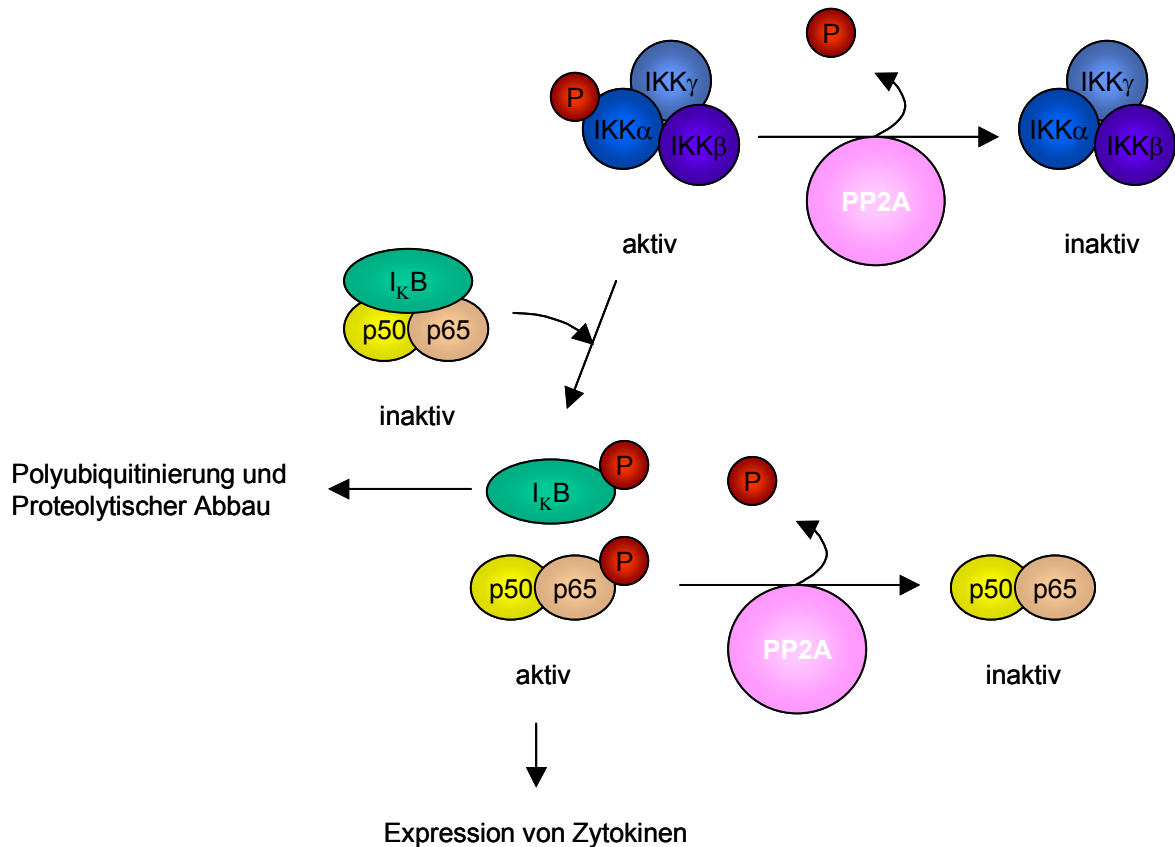


Abb. 5.7: NF – κB – Signaltransduktionsweg (nach Millward et al. 1999; Buss et al. 2004).

Betrachtet man den NF – κB – Signalweg, dann existieren zwei wichtige Regulationsstellen, an denen PP2A beteiligt ist (siehe Abb. 5.7.).

Zum Ersten wird die IKK durch Phosphorylierung aktiviert und durch PP2A inaktiviert (Millward et al. 1999). Aktive IKK phosphoryliert ihrerseits den I<sub>κ</sub>B und gibt ihn damit zur Polyubiquitinierung und zum proteolytischen Abbau frei. Die erhöhte PP2A – Aktivität führt vermutlich zu verringerter IKK – Aktivierung.

Zum Zweiten ist auch die Aktivität von NF – κB selbst abhängig von seinem Phosphorylierungszustand. Die Phosphorylierung kann durch Calyculin A, einen Inhibitor von PP1 und PP2A, induziert werden (Buss et al. 2004). Auch hier könnte die Überexpression der PP2A zu einer Verringerung der NF – κB – Aktivität führen. TNF<sub>α</sub> aktiviert außerdem die vaskuläre IL – 6 – Produktion (Loppnow et al. 1998). IL – 6 wurde zunächst in Vorversuchen als allgemeiner Nachweismarker für die Induktion der Sepsis verwendet. Die Ergebnisse der quantitativen PCR zeigten allerdings keine Unterschiede in der IL – 6 – Expression zwischen WT und TG Mäusen.



die Natriumrückresorption in der Niere. Beide Effekte senken den Blutdruck und damit die Vorlast des Herzens. Gleichzeitig wirkt ANP hemmend auf die Freisetzung von Renin und Aldosteron und schwächt damit den gegenregulatorischen Mechanismus des Renin – Angiotensin – Aldosteron – Systems.

Die RNA für ANP wurde ebenfalls durch PCR nachgewiesen und wurde sowohl in den LPS – behandelten WT, wie auch TG Mäusen induziert. Die schwächere Induktion bei behandelten TG Mäusen weist ebenfalls darauf hin, daß der IL – 6 – Signalweg bei TG Mäusen abgeschwächt sein könnte.

Interessanterweise zeigt sich auch eine schwache ANP – Bande bei TG Kontrolltieren. Durch die zusätzliche mechanische Belastung, welche von der Hypertrophie verursacht wird, könnte ANP bereits unter Kontrollbedingungen induziert sein (Chien et al. 1991).

Der Abfall des Blutdrucks während einer Sepsis wird durch exzessive NO – Ausschüttung über iNOS bewirkt, welche während der Sepsis durch  $TNF\alpha$  induziert wird (Thiemermann 1997).

Gleichzeitig kann NO aber in niedrigerer Konzentration auch positive Effekte vermitteln. Es verhindert die Aggregation von Plättchen und Leukozyten und verbessert auf diese Weise den mikrozirkulären Blutfluß.

Der konkrete Einfluß von NO auf den Verlauf der Sepsis wird allerdings ähnlich kontrovers diskutiert ebenso wie sein Einfluß auf die Ischämie (Siehe 5.1.1.).

Ein protektiver Effekt der basal erhöhten nNOS – Expression in TG Herzen sollte in diesem Fall in Betracht gezogen werden.

Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die im Herzgewebe vorhandene Katecholaminmenge dar. Katecholamine erhöhen die Herzfrequenz, den mittleren arteriellen Druck und das Herz – Zeit – Volumen. Auf diese Weise verbessern sie die Makrozirkulation. Gleichzeitig erhöhen sie allerdings auch den Sauerstoffverbrauch des Herzens, wodurch das Herz zusätzlichem Streß ausgesetzt ist.

Sepsis führt außerdem zu einer Verringerung der  $\beta$  – Adrenozeptordichte und zu deren Desensitivierung (Carpati et al. 1999).

Um auszuschließen, daß die bessere Kontraktion der TG Mäuse während der Sepsis auf Veränderungen der endogenen Katecholamine zurückzuführen ist, wurde deren Konzentration im Gewebe bestimmt.

Es ergaben sich allerdings keine Unterschiede bei der Noradrenalinmenge nach Induktion der Sepsis. Die Adrenalinmenge ist basal höher bei TG Tieren, steigt aber

im Gegensatz zu WT Tieren unter septischen Bedingungen nicht weiter an. Die erhöhte Adrenalinmenge ist vermutlich auf eine verstärkte Ausschüttung auf Grund der Hypertrophie der TG Mäuse zurückzuführen.

Eine Überprüfung der Expression typischer SR – Proteine sollte Informationen darüber liefern, ob die verbesserte Reaktion auf septischen Streß möglicherweise auf einer veränderten Proteinmenge beruht. Die Ergebnisse zeigen hingegen, daß es zu keiner Veränderung kommt.

Eine potentiell protektive Wirkung könnte auch der TRPV 1 – Rezeptor haben. Abgesehen vom positiven Einfluß unter ischämischen Bedingungen gibt es auch Hinweise auf einen direkten Einfluß des Rezeptors während einer Sepsis. In Mäusen, bei denen das Gen des TRPV 1 – Rezeptors ausgeschaltet war, kam es zu einer stärkeren Verringerung der Körpertemperatur, des Blutdrucks und zu einer erhöhten Ausschüttung von  $TNF\alpha$  (Clark et al. 2007).

Auf eine Beteiligung des Rezeptors weist auch die Arbeit von Orliac et al. 2007 hin, in der es unter septischen Bedingungen zur verstärkten Expression von TRPV 1 im Zungengewebe von Ratten kam.

Die histologische Färbung zeigte keine Unterschiede zwischen den Herzgeweben von WT und TG Tieren und ebenfalls keine zwischen unbehandelten und LPS – behandelten Tieren. Veränderungen in der Funktion des Herzens können deshalb nicht aus Veränderungen der Morphologie begründet werden.

## **5.2. Gemeinsame Immunpräzipitation der katalytischen C – Untereinheit der PP2A mit PLB**

Der Phosphorylierungszustand von PLB ist in den Herzen der TG Mäuse verringert (Gergs et al. 2004). Bisher ging man davon aus, das PLB hauptsächlich durch PP1 dephosphoryliert wird (Kranias und Di Salvo 1986; MacDougall et al. 1991; Steenaart et al. 1992). Die katalytische Untereinheit der PP1 bindet über eine größere GM – Untereinheit (auch PPP1R3) an die SR-Membran (MacDougall et al. 1991), wo sie PLB dephosphorylieren kann.

Durch die Präzipitation von PLB gemeinsam mit der C – Untereinheit der PP2A, kann vermutet werden, daß beide Proteine miteinander interagieren. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die ebenfalls PLB gemeinsam mit PP2A immunpräzipitiert haben (Kohr et al. 2009). Es besteht die Möglichkeit, daß

diese Interaktion über eine weitere Untereinheit der PP2A realisiert wird. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass die herzspezifischen Isoformen der A – und B – Untereinheiten in ihrer Expression nicht verändert sind (Gergs et al. 2004). Die verringerte PLB – Phosphorylierung könnte deshalb durch eine direkte Rekrutierung der C – Untereinheit erklärt werden.

### **5.3. Affymetrix Gene – Chip Daten**

Die Auswertung der RNA – Expression mit Hilfe einer Mikroarray – Analyse erfolgte unter dem Gesichtspunkt der veränderten Streßantwort bei TG Mäusen. Leider war eine Untersuchung der veränderten Expressionen auf Proteinebene im zeitlichen Rahmen der Dissertation nicht mehr möglich. Aus diesem Grund wird in fortführenden Arbeiten derzeit untersucht, ob es zu einer tatsächlichen Funktionsänderung kommt.

#### **Endonuclease G (EndoG)**

Endonuclease G ist ein Apoptose – regulierendes Protein. Sie ist im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert. Sie wird zusammen mit Co – Aktivatoren wie AIF freigesetzt und greift im Nukleus die DNA an. Für die Freisetzung von Endonuclease G wird Caspase 3 benötigt, welche durch die Freisetzung von Cytochrom C aktiviert wird (Burhans und Weinberger 2007; Widlak und Garrard 2005). Auf Grund der erhöhten Endonuclease G könnte es unter Apoptose zu einem verstärkten DNA – Abbau bei TG Mäusen kommen.

#### **Lipopolysaccharide binding protein (LBP)**

LBP ist ein ca. 60 kDa großes Serumglycoprotein. Neben dem gelösten und dem membrangebundenen CD14 gehört LBP zu den wichtigsten Elementen zur Wahrnehmung von LPS. Dieses ist zwar auch in Abwesenheit von LBP in der Lage, Zellen zu aktivieren, allerdings verstärkt LBP die LPS – Wahrnehmung wesentlich. Durch den Einfluß inflammatorischer Stimuli nimmt die Konzentration von LBP im Serum zu. Die LBP – LPS – Komplexe interagieren mit CD14 und aktivieren so Endothel – und Epithelzellen (Tobias und Ulevicht 1994). LBP ist aber auch in der Lage, LPS zu Lipoproteinen oder zu HDL – Partikeln zu transferieren, wodurch es funktionell inaktiviert wird (Fenton und Golenbock 1998). LBP bindet auch, im

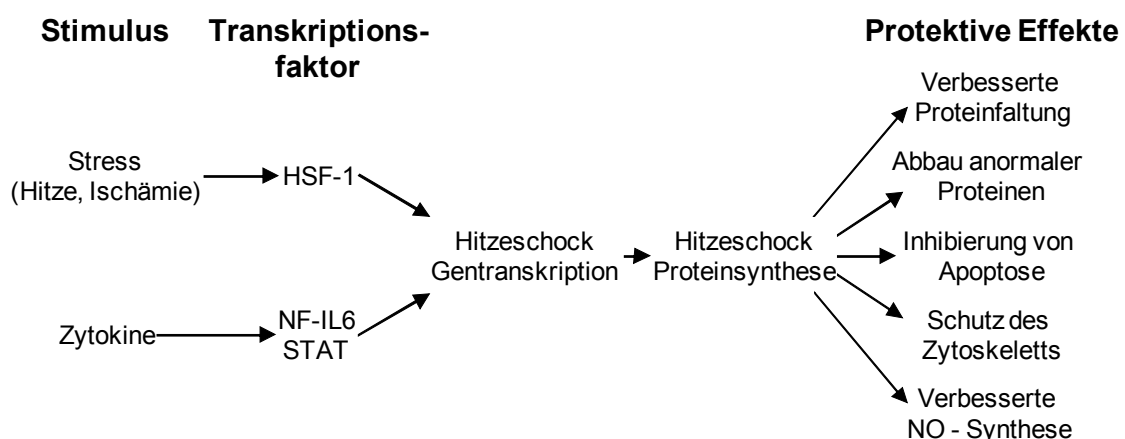
Gegensatz zu CD14, an LPS – Aggregate. Die erhöhte LBP – Menge führt bei TG Mäusen möglicherweise zu einer verstärkten Inaktivierung von LPS.

### Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1, endothelial (TNFAIP1)

TNFAIP1 ist ein von  $\text{TNF}\alpha$  und IL – 6 induziertes Protein, daß eine Rolle bei DNA – Synthese, DNA – Reparatur und bei Apoptose spielt. Es wird von Caseinkinase 2 phosphoryliert und anschließend in den Nukleus transportiert. Möglicherweise ist die Phosphorylierung von TNFAIP1 notwendig für seine Funktion (Yang et al. 2010). Es wird ebenfalls vermutet, daß TNFAIP1 an der Immunität gegen den Hepatitis B Virus (HBV) beteiligt ist, da es bei Patienten mit HBV chronisch herunterreguliert ist (Lin et al. 2005). Eine genaue Aussage über mögliche Effekte in den Herzen der TG Mäuse ist nicht möglich.

### Heat shock protein, 25 kDa (Hsp25)

HSP25 ist ein Protein, das zur HSP27 – Familie gehört. Die Expression von HSP25 wird durch IL – 6 moduliert. Ein Vergleich der HSP25 – Expression mit den Proteinleveln von IL – 6 in Herz – und Skelettmuskel zeigte, daß IL – 6 die HSP25 – Expression in Skelettmuskeln erhöht, aber nicht in Herzmuskeln. HSP25 schützt gegen oxidativen Streß und reduziert die NF –  $\kappa$ B – Aktivierung (Huey und Meador 2008).



**Abb.5.9.:** Aktivierung der HSPs durch spezifische Stimuli wie Ischämie und Zytokine und ihr protektiver Effekt (aus Latchman 2001).

Da in den TG Herzen bereits eine erhöhte Menge an HSP25 vorhanden zu sein scheint, könnte dies ähnlich protektiv wirken wie in Skelettmuskeln nach IL – 6 – Einfluß.

### Very low density lipoprotein receptor (VLDL – Rezeptor)

Der VLDL – Rezeptor wird im Herzen, in Skelettmuskeln und im Fettgewebe exprimiert. Er bindet triglyzeridreiche Lipoproteine und seine Überexpression verringert die Konzentration der Serum – Triglyzeride. Seine Funktion erstreckt sich auch auf den Lipoprotein – und den kardialen Fettsäure – Metabolismus (Takahashi et al. 2004). Möglicherweise führt seine erhöhte Expression zusammen mit LBP zu einem verstärkten LPS – Abbau bei TG Mäusen.

### Thrombomodulin (TM)

Thrombomodulin ist ein Membranprotein auf der Oberfläche von Endothelzellen. Es fungiert als Thrombin – Rezeptor und aktiviert Protein C (siehe Abbildung 5.10.).

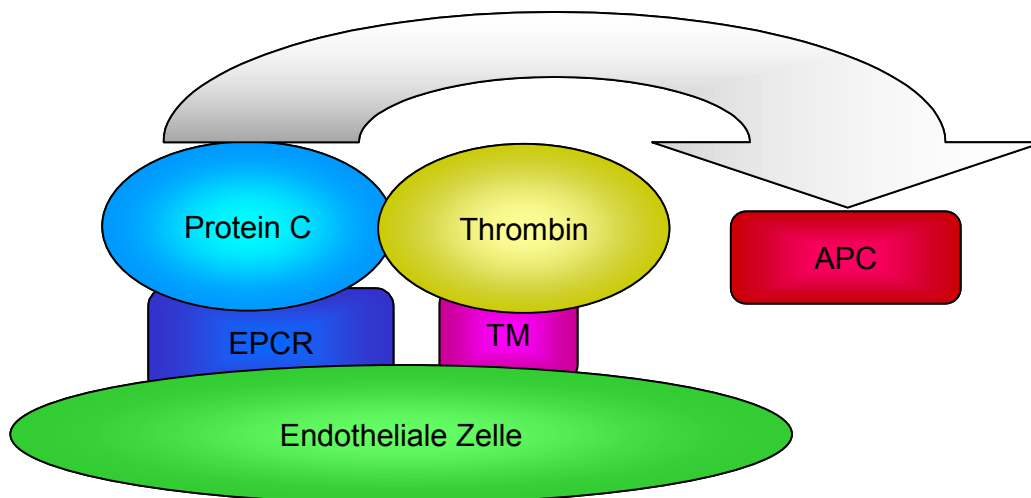


Abb.5.10.: Aktivierung von Protein C durch Thrombin (aus Kottke – Marchant und Comp 2002).

Eine verringerte Thrombomodulin – Aktivität führt zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Thrombose und Sepsis (Kottke – Marchant und Comp 2002). Die erhöhte Thrombomodulin – Expression könnte zu einer verstärkten Aktivierung von Protein C durch Thrombin führen. Aktiviertes Protein C (APC) führt bei Pavianen zu einem Schutz gegen E. coli induzierte Sepsis. APC inhibiert die TNF $\alpha$  – Produktion in Monozyten, Zytokin – Signale und die NF –  $\kappa$ B – Expression (Van de Wouwer und

Conway 2004). Über APC kann Thrombomodulin eine anti – inflammatorische Wirkung vermitteln. Diese antiinflammatorische Wirkung könnte zum Schutz der TG Mäuse vor LPS –Einfluß beitragen.

### **Adrenomedullin receptor (Admr)**

Adrenomedullin ist ein starker Vasodilatator, dessen Plasmakonzentration während eines septischen Schocks und eines Myokardinfarkts ansteigt. Allerdings reicht dieser Anstieg nur beim septischen Schock aus, um die Rezeptoren zu aktivieren (Smith et al. 2002). Der vasodilatatorische Effekt des Adrenomedullins wird wahrscheinlich über zwei Mechanismen vermittelt. Einen direkten Effekt durch die Erhöhung des intrazellulären cAMP über die Stimulation der Rezeptoren. Dem gegenüber steht ein indirekter Effekt über die Erhöhung der endothelialen NO – Freisetzung. Auf diese Weisen erhöht Adrenomedullin das Herz – Zeit – Volumen und den Blutfluß im Herzen (Wang et al. 2001).

Im Verlauf einer Sepsis kommt es zu einer Verringerung des Effekts von Adrenomedullin. Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, erfolgt aber möglicherweise über eine verminderte Expression des Rezeptors (Wang et al. 2001). Auf Grund einer erhöhten Expression in TG Mäusen, könnte dieser Effekt verzögert sein.

### **FK506 binding protein 1a (FKBP12), FK506 binding protein 4 (FKBP52)**

Die veränderte Expression der FKBP – Proteine 12 und 52 ist aus verschiedenen Gründen von Interesse. FKBP52 kann in Rattenneuronen mit der  $\beta 1$  – Untereinheit des LTCC assoziieren und damit dessen Funktion inhibieren (Ruan et al. 2008). Möglicherweise kommt es in Kardiomyozyten zu einem ähnlichen Effekt.

FKBP12 und das zu 85 % homologe FKBP12.6 assoziieren mit dem RyR und stabilisieren dessen geschlossenen Zustand. Außerdem wird es für die korrekte Interaktion der Untereinheiten benötigt (Chelu et al. 2004).

FKBP12 dient auch als Ligand für den Transforming Growth Faktor (TGF –  $\beta$ ), welcher kardioprotektive Eigenschaften aufweist (Åström – Olsson et al. 2009). Eine verringerte FKBP12 – Expression bei TG Mäusen könnte auf eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR hinweisen, was vermehrte spontane  $\text{Ca}^{2+}$  – Freisetzungen zur Folge haben könnte. Gleichzeitig könnte eine erhöhte FKBP52 –



Expression zu einer verringerten LTCC – Funktion führen. Diese Störungen der  $\text{Ca}^{2+}$  – Ströme könnten eventuell zur Entstehung von Arrhythmien beitragen.

### **Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5), Regulator of G-protein signalling 10 (RGS10)**

Die veränderte Expression von RGS5 und RGS10 ist schwer zu interpretieren. RGS – Proteine sind negative Regulatoren der G – Protein – gekoppelten Signaltransduktion. Sie beschleunigen die GTPase – Aktivität der  $\alpha$  – Untereinheit der G – Proteine (Wieland und Mittmann 2003).

RGS55 – knock out – Mäuse weisen einen geringeren Blutdruck als WT Mäuse auf, was möglicherweise auf einer erhöhten Sensitivität gegenüber NO basiert (Gu et al. 2009; Manzur und Ganss 2009). Eine erhöhte Expression von RGS5 könnte dem entsprechend einen gegenteiligen Effekt haben.

Die Verringerung von RGS10 ist im Kontext der verbesserten Antwort auf septischen Streß ungewöhnlich. Bei entsprechenden knock down – Mäusen kommt es zu einer fehlregulierten entzündungsbezogenen Genexpression in dopaminergen Neuronen, welche zu einer Überproduktion von TNF führt (Lee et al. 2008). Man würde erwarten, daß der geringere RGS10 – Gehalt in den Herzen der TG Mäuse ebenfalls eine erhöhte TNF – Produktion nach sich zieht. Dies bestätigt sich allerdings nicht.

### **Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit (Cacna1c)**

Cacna1c ist die hauptsächliche Porenbildungsuntereinheit des LTCC (Beitelshees et al. 2009). Der LTCC gehört zu den spannungsabhängigen Ionenkanälen und wird durch die Depolarisation der Zellmembran aktiviert. Dadurch kommt es zum  $\text{Ca}^{2+}$  – Einstrom und zur Aktivierung des RyR2 und der  $\text{Ca}^{2+}$  – Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum.

Die Gabe von LPS bewirkt die Verringerung des  $\text{Ca}^{2+}$  – Einstroms durch den LTCC und der Expression der Cacna1c – mRNA (Zhong et al. 1997; Abi-Gerges et al. 1999; Okazaki et al. 2009). Die verringerte Expression von Cacna1c weist auf eine niedrigere Funktion des LTCC bei TG Mäusen hin. Das wird bestätigt durch verminderte  $\text{Ca}^{2+}$  – Ströme und eine langsamere Inaktivierung bei TG Mäusen (Gergs et al. 2004)

### **Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 7 (PPP1R7)**

Die erhöhte mRNA – Expression von PPP1R7 könnte ein gegenregulatorischer Mechanismus als Antwort auf die erhöhte Phosphataseaktivität der TG Mäuse sein.

### **Mitogen activated protein kinase 9 (JNK2)**

Für JNKs wurden sowohl pro – als auch anti – apoptotische Funktionen gefunden. Unter dem Einfluß von Ischämie oder inflammatorischen Zytokinen wie  $TNF\alpha$  werden beide JNKs aktiviert. Diese Aktivierung löst die Freisetzung apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien aus. Andererseits erhöht die Aktivierung von JNKs das Überleben von Kardiomyozyten nach oxidativem Streß (Wada und Penninger 2004). Mäuse mit einem JNK2 – knock out zeigen einen Schutz gegenüber Ischämie und Reperfusionsschaden. Allerdings hat auch eine chronische JNK – Aktivierung kardioprotektive Eigenschaften (Bogoyevitch 2006; Kaiser et al. 2005). Möglicherweise sind eben diese protektiven Effekte an der verbesserten Streßantwort in den Herzen der TG Mäuse beteiligt.

### **Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform**

Die PR65 – Untereinheit bindet an die C – Untereinheit der PP2A. Ihre Wirkung ist substratabhängig. Die verstärkte Expression der C – Untereinheit führt möglicherweise zur Erhöhung der Expression der A – Untereinheit, welche die freie C – Untereinheit binden kann. Auf Proteinebene bestätigt sich die Überexpression der A – Untereinheit allerdings nicht (Gergs et al. 2004).

### **Protein phosphatase 5 (PP5)**

PP5 ist eine ubiquitär exprimierte Phosphatase des Phosphoproteinphosphatase – Typs (PPP). Sie wird eher als ein modulierender, denn als ein essentieller Faktor in Phosphorylierungssignalwegen betrachtet. Sie enthält eine autoinhibitorische Domäne und wird in vivo wahrscheinlich durch poly – ungesättigte Fettsäuren aktiviert. Sie interagiert mit dem ANP – Rezeptor und dem Glucocorticoidrezeptor (Herzig und Neumann 2000). Außerdem kann sie mit dem HSP90 – HSF1 – Komplex (HSF1 – Hitzeschockfaktor 1) assoziieren und reguliert diesen negativ (Conde et al. 2005). Phosphorylierung ist ein positiver Regulationsmechanismus des ANP – Rezeptors (Potthast und Potter 2005). Die Auswirkung von Phosphorylierung auf den

Glucocorticoidrezeptor kann, abhängig von der Phosphorylierungsstelle, aktivierend oder inhibierend sein (Chrousos und Kino 2009). HSF1 wirkt während einer Ischämie und anschließender Reperfusion protektiv (Zou et al. 2003). Eine verringerte PP5 – Expression könnte eine abgeschwächte negative Regulierung der genannten Proteine und damit eine verbesserte Streßantwort zur Folge haben.

### **Protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform (Ppm1g)**

PP2C ist eine monomere Proteinphosphatase des  $Mg^{2+}$  – Typs (PPM), die sowohl im Zytosol, als auch im Nukleus lokalisiert sein kann (Herzig und Neumann 2000). Bisher sind 22 Isoformen bekannt. Die Gamma – Isoform wird hauptsächlich in Hoden, Skelettmuskeln und im Herz exprimiert (Travis und Welsh 1997). Sie interagiert mit dem Apoptoserepressor ARC (Apoptoserepressor mit einer Caspase Aktivierungs – und Rekrutierungsdomäne), welcher Herzzellen bei oxidativem Streß schützt. Die PP2C – vermittelte Dephosphorylierung von ARC inhibiert seine anti – apoptotische Aktivität (Zhang und Herman 2006; Neuss et al. 2001). Eine verringerte PP2C – Konzentration könnte zu einer erhöhten ARC –Phosphorylierung und damit zu einer verbesserten anti – apoptotischen Aktivität bei TG Mäusen führen.

### **Cathepsin B**

Cathepsin B ist eine in Lysosomen und Endosomen lokalisierte Cystein – Protease, welche an apoptotischen Mechanismen beteiligt ist. Unter dem Einfluß von ROS kann es zu einem lysosomalen „leakage“ kommen, bei dem Cathepsine ins Zytoplasma freigesetzt werden. Dort führt Cathepsin B zur Aktivierung von Caspase und damit zur Apoptose (Lutgens et al. 2007). Auf Grund der erhöhten Expression in TG Mäuseherzen würde man bei diesen Tieren auch eine erhöhte ROS – oder  $TNF\alpha$  – induzierte Apoptose erwarten. Allerdings würde dies den Ergebnissen der Untersuchungen am arbeitleistenden Herz widersprechen.

### **Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2 (PSMD2), Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8 (PSMD8)**

Das 26S – Proteasom, baut nicht – funktionale, potentiell toxische Proteine ab. Für PSMD2 ist bekannt, das es mit dem TNF – Rezeptor interagiert (Dunbar et al. 1997). Die Bedeutung dieser Interaktion ist allerdings noch unbekannt. Für PSMD8 konnte

noch nichts derartiges dokumentiert werden. Die erhöhte Expression von PSMD2 und die verringerte Expression von PSMD8 könnte auf eine veränderte proteosomale Antwort auf  $\text{TNF}\alpha$  in den Herzen von TG Mäusen hinweisen.

### **Cathepsin Z**

Cathepsin Z ist eine lysosomale Cystein – Protease, die ebenso wie Cathepsin B der Papain – Familie angehört (Santamari et al. 1998). Cathepsin B und Cathepsin Z sind die einzigen Carboxypeptidasen in der Cystein – Cathepsine, obwohl Cathepsin B auch Endopeptidase – Aktivität zeigt (Klemenic et al. 2000). Die genaue Beteiligung von Cathepsin Z an apoptotischen Mechanismen ist allerdings noch nicht geklärt. Aus diesem Grund ist eine Aussage darüber, wie Cathepsin Z, eventuell in Verbindung mit Cathepsin B, die Streßantwort der TG Mäuse verändert, nicht möglich.

### **Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L5 (Uch15)**

Uch15 ist eine mit dem 26S – Proteasom assoziierte Isopeptidase. Es entfernt Ubiquitin vom distalen Ende der Lys48 – verbundenen Polyubiquitinkette und kann auf diese Weise ubiquitinylierte Proteine vor dem Abbau retten (Wicks et al. 2005). Möglicherweise führt dies bei TG Mäusen zu einer erhöhten Konzentration an Proteinen, welche durch Ubiquitinylierung zum Abbau markiert werden.

### **Enolase 3, beta muscle (Eno3)**

Enolase 3 katalysiert die Reaktion von 2 – Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat während der Glycolyse. Die anderen Enzyme der Glycolyse sind allerdings unverändert. Vermutlich hat aber die erhöhte Expression keine Auswirkungen auf die Glycolyse, da die von der Enolase katalysierte Reaktion nicht geschwindigkeitsbestimmend ist.

### **Acetyl-Coenzyme A acyltransferase (peroxisomal 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase) (Acaa)**

Hohe Raten an Fettsäure – Oxidation im Herzen und die anschließende Inhibierung der Glucose – Oxidation trägt zur Schwere einer Ischämie bei. Hemmung der Acaa verringert die Fettsäureoxidation und stimuliert die Glucose – Oxidation, was zu einer Verbesserung der Herzfunktion nach Ischämie führt (Lopaschuk et al. 2003). Die

chronisch erhöhte Acaa – Expression in den Herzen der TG Mäuse könnte im Umkehrschluß die Herzfunktion eher negativ beeinflussen.

### **Cytochrome P450, 7b1 (Cyp7b1)**

Die Aktivierung von Makrophagen über den TLR führt zur Synthese und Freisetzung von 25 – Hydroxycholesterol. Dieses wird ausgeschieden und unterdrückt die Produktion von IgA. Cyp7b1 wird in der Lunge der Maus und den Gelenken des Menschen durch pro –inflammatorische Stimuli induziert. Diese Induktion reflektiert möglicherweise die Notwendigkeit 2 – Hydroxycholesterol zu inaktivieren (Dulos et al. 2005b; Stiles et al. 2009). Die erhöhte Cyp7b1 – Expression könnte bei TG Mäusen protektiv wirken.

### **Phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent) (Pla2g4a)**

Phospholipasen A2 spalten Fettsäuren in der sn – 2 Position von Glycerophospholipiden. Pla2g4a besitzt eine  $Ca^{2+}$  – bindende Domäne, zwei katalytische Domänen und eine Reihe von Phosphorylierungsstellen. Der Einfluß der Phosphorylierung ist noch nicht gänzlich geklärt, kann aber eine Veränderung der Aktivität und der Bindungseigenschaften von Pla2g4a bewirken. Erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$  – Konzentrationen führen ebenfalls zur Aktivierung von Pla2g4a und zur Translokation an Membranen (Sun et al. 2007; Burke und Dennis 2009a; Burke und Dennis 2009b).

Pla2g4a ist die einzige Phospholipase A2, welche Arachidonsäure (AA) in der sn – 2 Position von Phospholipiden bevorzugt. AA hat Auswirkungen auf die mitochondriale Permeabilität und ihre Freisetzung durch Pla2g4a kann zu  $Ca^{2+}$  – abhängiger Apoptose führen. AA selbst kann auch direkt NADPH – Oxidasen aktivieren, wodurch die ROS – Generierung induziert wird (Sun et al. 2007; Burke und Dennis 2009; Kim et al. 2008).

Pla2g4a kann auch durch oxidative Verbindungen, einschließlich  $H_2O_2$  aktiviert werden, was auch durch NADPH – Oxidase – erzeugte ROS mit einschließt (Sun et al. 2007). An dem zugrunde liegenden Signalweg sind PKC, ERK 1/2 und p38 MAPK (PKC – Proteinkinase C) beteiligt. Diese erhöhen die Phosphorylierung von Pla2g4a und die ROS – Produktion. In Pla2g4a – knock out – Mäusen sind die Auswirkungen von entzündlichen Erkrankungen signifikant reduziert. Inhibitoren, welche bei

in vivo – Tiermodellen für Entzündung angewendet wurden, zeigten eine Verringerung der entzündlichen Wirkungen (Burke und Dennis 2009).

Eine erhöhte Pla2g4 – Expression wäre ein Indiz für eine verstärkte ROS – Produktion bei TG Mäusen. Allerdings könnte es trotz der stärkeren Expression zu einer Verringerung oder einem Gleichbleiben der Pla2g4 – Aktivität auf Grund veränderter Regulierungsmechanismen kommen. Bisher ist noch unbekannt, ob Pla2g4 ein Zielprotein der PP2A ist.

### **Cytochrome P450, 51 (Cyp51)**

Cyp51 ist ein Cytochrom P450, welches die Entfernung der 14 $\alpha$  – Methylgruppe von Lanosterol katalysiert. Es wird angenommen, das Cyp51 das älteste Mitglied der P450 – Superfamilie ist.

Es ist bekannt, daß NO die Aktivität von Cyp51 beeinträchtigt (Ouellet et al. 2009).

Es liegt nahe, anzunehmen, daß die erhöhte nNOS – Expression bei TG Tieren ebenfalls einen Einfluß auf die Cyp51 – Aktivität ausübt. In einer hippocampalen Maus – Zelllinie verändert Cyp51 durch oxidativen Streß induzierten Zelltod seinen Phosphorylierungszustand (Kang et al. 2007). Die Bedeutung des Phosphorylierungszustandes für die Aktivität von Cyp51 ist allerdings noch nicht geklärt. Cyp51 wurde in Rattenherzen durch Ischämie und Reperfusion herunterreguliert und durch ischämische Präkonditionierung wieder hochreguliert (Canatan 2008). Die bereits erhöhte Cyp51 – Expression in den Herzen der TG Mäuse hat möglicherweise einen ähnlich protektiven Effekt wie ischämische Präkonditionierung.

### **Thioredoxin and glutathione reductase (TGR)**

Thioredoxin – Gluthathion – Reduktase (TGR) ist eine Thioredoxin – Reduktase mit einer N – terminalen Gluthathion – Reduktase – Domäne. Beide Domänen können unabhängig voneinander Reaktionen katalysieren. Damit kann TGR die beiden wichtigsten Redoxsysteme in tierischen Zellen beeinflussen. Sie ist außerdem in der Lage, die Isomerisation von Protein – und Interprotein – Disulfidbrücken zu katalysieren (Su et al. 2005; Sun et al. 2005).

Über die Beeinflussung des Gluthathion – und des Thioredoxin – Redoxsystems ist TGR in der Lage regulierend in die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Proteinphosphatasen einzugreifen (Sun et al. 2001). Möglicherweise ist die

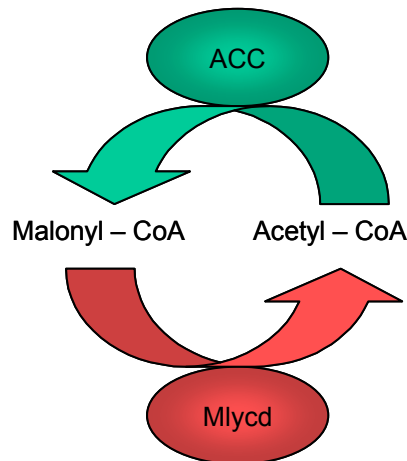
verringerte Expression bei TG Mäusen ein gegenregulatorischer Mechanismus zur erhöhten PP2A – Aktivität.

### **Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein (ALOX5AP)**

ALOX5AP ist ein wichtiger Co – Faktor der 5 – Lipoxygenase (5 – LO), welche den ersten Schritt in der Leukotriensynthese, die Oxidation von Arachidonsäure, durchführt. Leukotriene wie LTB<sub>4</sub> oder die verschiedenen Cysteinylleukotriene wirken proinflammatorisch. Die Inhibierung von ALOX5AP wirkt sich positiv während akuter und chronischer kardiovaskulärer Erkrankung aus. Es existieren auch Hinweise für eine Verbindung von ALOX5AP mit einem erhöhten Risiko für Myokard – Infarkt (Evans et al. 2008). Ein protektiver Effekt der verringerten ALOX5AP – Expression ist daher anzunehmen.

### **Malonyl-CoA decarboxylase (Mlycd)**

Während und nach einer Ischämie verändert sich der Energiemetabolismus im Herzen. Es kommt zum Anstieg der Fettsäureoxidation und zu einer Entkopplung von Glycolyse und Glucoseoxidation. Die Glucoseoxidation sinkt, während gleichzeitig die Glycolyse steigt. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der Protonenkonzentration und damit zu einer Acidose. Die Fettsäureoxidation wird durch Malonyl – CoA kontrolliert, welches die Aufnahme der Fettsäuren in die Mitochondrien inhibiert. Andererseits wird die Glucoseoxidation durch das aus den Fettsäuren entstandene Acetyl – CoA auf der Stufe der Pyruvat Dehydrogenase inhibiert (Hopkins et al. 2003). Das Gleichgewicht zwischen Acetyl – CoA und Malonyl – CoA wird von den Enzymen Acetyl – CoA – Carboxylase (ACC) und Mlycd kontrolliert (siehe Abbildung 5.11.).



**Abb.5.11.: ACC und Mlycd kontrollieren das Verhältnis zwischen Acetyl – CoA und Malonyl – CoA.**

Mlycd dekarboxyliert Malonyl – CoA zu Acetyl – CoA. Eine Verringerung der Mlycd – Aktivität führt zum Anstieg der Malonyl – CoA – Konzentration. Diese wiederum hat eine verbesserte Kopplung von Glycolyse und Glucose – Oxidation und damit einen Schutz des Myokards zur Folge (Folmes und Lopaschuk 2007; Ussher und Lopaschuk 2008). Dies könnte auch bei TG Mäusen der Fall sein.

### **Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial (ALDH2)**

Unter dem Einfluß von ROS kommt es zur Bildung von zytotoxischen Aldehyden wie Acetaldehyd und 4 – Hydroxy – 2 – nonenal. ALDH2 metabolisiert 4 – Hydroxy – 2 – nonenal zu 4 – Hydroxynon – 2 – ensäure und Acetaldehyd zu Acetat.

Es konnte gezeigt werden, daß eine erhöhte ALDH2 – Aktivität zu einer verringerten Infarktgröße nach Ischämie führt (Budás et al. 2009). Die erhöhte Expression von ALDH2 in den Herzen der TG Mäuse könnte demnach zu einer geringeren Belastung mit zytotoxischen Aldehyden führen

### **ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit (ATP5b)**

Die Expression von ATP5b verringert sich in Leberzellen nach Ischämie und Reperfusion deutlich. Nach Präkonditionierung erhöhte sie sich allerdings. Möglicherweise führt diese erhöhte Expression der ATP5b zu ATP – sparenden Effekten (Xu et al. 2009). Die bereits erhöhte Expression der ATP5b bei TG Mäusen könnte in deren Herzen eine ähnlich protektive Wirkung zeigen.



### **Superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2)**

SOD2 lokalisiert in der mitochondrialen Matrix, wo sie Superoxid in Wasserstoffperoxid umwandelt.

Mäuse mit einem knock out der SOD2 sterben im Alter von einer Woche. Sie leiden, unter anderem, an dilatierender Kardiomyopathie und oxidativer DNA – Schädigung (Melov 2002). SOD2 kann von  $TNF\alpha$  induziert werden (Xu et al. 1999b) und spielt eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegen die  $TNF\alpha$  – induzierte Zytotoxizität (Wong et al. 1989). Eine Verringerung der SOD2 spricht dafür, daß bei TG Mäusen ein erhöhtes oxidatives Streßniveau zu erwarten ist.

### **Nucleoporin 62 (Nup62)**

Nucleoporine sind die Hauptkomponenten zur Bildung der Kernporen. Nup62 gehört zu den FG – *repeat* - enthaltenden Nucleoporinen und lokalisiert in der Nähe des zentralen Stopfens der Kernporen (Stochaj et al. 2006).

Durch Maleinsäurediethylester verursachter oxidativer Streß führte zur Verschiebung des Redox – Gleichgewichts in der Zelle, was die Phosphorylierung von Nup62 bewirkt. Dadurch kam es zu einer erhöhten Bindung von Nup62 mit dem nuklearen Exporter Crm1 und einer reduzierten Wechselwirkung von Nup62 mit anderen FxFG-haltigen Nucleoporinen. Dies korreliert mit einem verringerten Proteintransport aus dem Nukleus (Crampton et al. 2009). Eine größere Menge an Nup62 in den Herzen von TG Mäusen könnte dem entgegenwirken, da möglicherweise eine größere Verschiebung des Redox – Gleichgewichts zum Auslösen dieser Veränderung notwendig ist.

### **Microtubule-associated protein, RPEB family, member 1 (Mapre1, EB1)**

EB1 ist ein Protein, welches mit dem Plusende der Mikrotubuli assoziiert ist. Es wird durch oxidativen Streß von diesen verdrängt. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der Interaktion der Mikrotubuli mit angrenzenden Gap – Junctions. Diese sind wichtig für eine gut organisierte Verbreitung des Aktionspotentials im Herzen (Smyth et al. 2010). Die erhöhte Expression von EB1 könnte den Verdrängungseffekt während einer Ischämie abschwächen.

### **Microtubule-associated protein 4 (MAP4)**

MAP4 ist ein wichtiger Regulator der Mikrotubuli. Es erhöht den Übergang von Depolymerisation zu Polymerisation und stabilisiert Mikrotubuli durch die Ausbildung von Querverbindungen. Eine Überexpression von MAP4 inhibiert den Mikrotubuli – abhängigen Transport von Organellen (Holmfeldt et al. 2009). Während einer Hypertrophie sind die Mikrotubuli mit MAP4 stark besetzt (Takahashi et al. 2003). Die verringerte Expression in TG Mäusen könnte diesen beiden Effekten entgegenwirken.

### **Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K)**

Die hnRNPs sind RNA – bindende Proteine, die mit heterogenen nuklearen RNAs komplexieren. Ostrowski und Mitarbeiter (Ostrowski et al. 1994) haben gezeigt, daß das hnRNP K – Protein, nach Phosphorylierung, in vitro an das  $\kappa$ B – Motiv bindet. Die Relevanz dieser Bindung ist allerdings noch nicht geklärt.

Darüber hinaus wird hnRNP K durch PP1 dephosphoryliert. Gleichzeitig wird die Untereinheit (PITK, engl. phosphatase interactor targeting K protein), welche PP1 mit hnRNP K assoziiert, am PP1 – Bindemotiv phosphoryliert. Diese Phosphorylierung beeinflusst die Bindung negativ (Kwiek et al. 2006). Es ist anzunehmen, daß die stärkere Expression von hnRNP K zu einer Veränderung der NF –  $\kappa$ B vermittelten Streßantwort bei TG Mäusen führt. Möglicherweise ist auch der Phosphorylierungszustand verändert.

### **RNA polymerase II 3 (RPB3)**

RNA – Polymerase II besteht aus den beiden größten Untereinheiten RPB1 und RPB2, welche das katalytische Zentrum enthalten. Darüber hinaus existieren noch zehn bis zwölf weitere Untereinheiten, deren Funktionen noch nicht zur Gänze geklärt sind (Young 1991). RPB3 bildet mit RPB11 ein Heterodimer, welches an der Promotorerkennung beteiligt ist. Beide Untereinheiten sind in Skelettmuskeln und im Herzen stark exprimiert (Fanciulli et al. 1998). RPB3 ist direkt am Kontakt mit regulatorischen Proteinen wie dem aktivierenden Transkriptionsfaktor ATF4 beteiligt (De Angelis et al. 2003), dessen Expression ebenfalls verringert ist. Leider konnte aus den Daten des Gene – Chips nicht ermittelt werden, ob die Expression von RPB11 bei TG Mäusen ebenfalls verringert ist, da dieses nicht auf dem Chip enthalten war.

### **Activating transcription factor 4**

ATF4 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Streßsignale wie Hypoxie/Anoxie, ER – Streß und oxidativem Streß induziert wird (Ameri und Harris 2008). Zu den Interaktionspartnern von ATF4 gehört auch die RNA – Polymerase II -Untereinheit 3 (RPB3), welche die Aktivität von ATF4 erhöht (De Angelis et al. 2003) und ebenfalls in ihrer Expression verringert ist. ATF4 aktiviert die Transkription von CHOP, einem apoptotischen Transkriptionsfaktor. CHOP selbst wird durch JNK – oder p38 MAPk – Phosphorylierung aktiviert (Xu et al. 2005). ATF4 kann phosphoryliert werden, wodurch er für den proteosomalen Abbau markiert wird (Ameri und Harris 2008). Die erhöhte Phosphatase – Aktivität der TG Mäuse wirkt möglicherweise diesem Abbau entgegen.

### **Histone deacetylase 2 (HDAC2)**

Histonacetylierung stellt einen wichtigen Mechanismus in der Kontrolle der Gen – Transkription dar. Dabei acetylieren Histon – Acetyltransferasen (HATs) Histone, wodurch die Chromatinstruktur entspannt und für die Transkription leichter zugänglich wird. Dem entgegen wirken Histon – Deacetylasen (HDACs), deren Aktivität in der Kondensation des Chromatins resultiert. HDACs assoziieren mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wodurch diese an bestimmte Zielgene rekrutiert werden. HDAC2 gehört zu den Klasse I – HDACs (Grozinger und Schreiber 2002; Krämer 2009).

HDAC2 wird durch Caseinkinase II phosphoryliert. Dies kann, abhängig vom auslösenden Stimulus, entweder zur Erhöhung der Aktivität oder zum proteosomalen Abbau führen. Mäuse ohne HDAC2 sind widerstandsfähig gegenüber streßbedingter Hypertrophie. Entsprechend führt eine Überexpression von HDAC2 zu einer verstärkten Hypertrophie (Krämer 2009). Eine mögliche Erklärung der geringeren HDAC2 – Expression in den Herzen der TG Mäuse könnte ein gegenregulatorischer Mechanismus zu einem verringerten proteosomalen Abbau des Proteins sein.

### **Lysosomal membrane glycoprotein 2 (LAMP2)**

Mutationen von LAMP2 (Danon – Krankheit) führen unter Anderem zu einer Kardiomyopathie, welche klinisch der schweren hypertrophen Kardiomyopathie ähnelt, sich aber von dieser elektrophysiologisch unterscheidet (Arad et al. 2005; Maron et al. 2009).

LAMP2 – knock out – Mäuse weisen eine verringerte Ejektionsfraktion, eine geringere Kraftentwicklung und ein geringeres Herz – Zeit – Volumen auf. Ursächlich daran beteiligt scheint die Bildung von autophagen Vakuolen und der verringerte autophage Abbau von langlebigen Proteinen zu sein (Eskelinen et al. 2002; Strypmann et al. 2006). Möglicherweise ist die erhöhte LAMP2 – Expression bei TG Mäusen eine Folge der Hypertrophie.

### **Calmodulin 1**

Calmodulin greift regulierend in die Aktivität von Kanälen (RyR2, LTCC), Kinasen (CaMK II), Phosphatasen (Calcineurin) und NO – Syntasen (eNOS, nNOS) ein (Bers 2004; Fukunaga et al. 2006; Ikeda et al. 2008). Calmodulin kann *in vivo* phosphoryliert werden, vermutlich durch Casein Kinase II. Dadurch verändert es sich in Bezug auf die Aktivierung verschiedener Zielproteine. *In vitro* kann Calmodulin von PP1 und PP2A dephosphoryliert werden (Quadroni et al. 1994; Quadroni et al. 1998; Corti et al. 1999). Eine geringere Calmodulin 1 – Expression hätte beispielsweise eine geringere Aktivität der NO – Synthasen zur Folge und könnte ein gegenregulatorischer Prozeß zur erhöhten nNOS – Expression sein.

## 6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, Mäuse mit herzspezifischer Überexpression der katalytischen Untereinheit der PP2A unter verschiedenen Stressbedingungen zu charakterisieren. Auf Grund ihrer hohen klinischen Relevanz und der Möglichkeit der Beteiligung von Proteinphosphatasen an den regulierenden Mechanismen wurden Ischämie und Sepsis als Stressfaktoren gewählt.

Es wurden erfolgreich Untersuchungsmodelle etabliert, welche den klinischen Bedingungen von Ischämie und Sepsis entsprechen.

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Herzen der PP2A – transgenen (TG) Mäuse, im Gegensatz zu denen der Wildtyp (WT) – Mäuse, nach ischämischem Stress in ihrer Kontraktilität nicht verschlechtert sind. Sie zeigen nach Ischämie eine Verkürzung der Relaxationszeiten, die dann der der WT Mäuse entsprach. Auch unter septischen Stressbedingungen verschlechtern sich die Kontraktilitätsparameter der TG Mäuseherzen im Vergleich mit WT nicht.

Daraufhin wurden molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt, um Unterschiede in den beteiligten Signalwegen zu identifizieren. Es konnte eine erhöhte Proteinexpression für nNOS und TRPV 1 nachgewiesen werden. Für beide Proteine ist eine schützende Wirkung unter beiden Stressbedingungen anzunehmen. Diese Schutzwirkung könnte am Ausbleiben der Stress – bedingten kardialen Dysfunktion beteiligt sein.

Es konnten außerdem Veränderungen in der TNF $\alpha$  – Menge nachgewiesen werden. Gleichzeitig war die IL – 6 – Konzentration unverändert.

Da diese Ergebnisse auf ein Eingreifen der PP2A an verschiedenen Stellen der zugrundeliegenden Signalwege schließen ließen, wurde nach möglichen Zielproteinen gesucht. Die Veränderungen in der mRNA – Expression verschiedener Proteine zeigte mögliche Kandidaten, welche auf die ischämische und septische Stressantwort Einfluss nehmen könnten.

Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden, ob die veränderte mRNA – Expression auch zu einer Veränderung der Proteinmenge führt.

## Ausblick

Die gefundenen physiologischen Veränderungen in der Stressantwort der TG Mäuse stellen eine vielversprechende Grundlage für zukünftige wissenschaftliche Arbeiten und klinische Anwendungen dar. Die molekularbiologische Untersuchung der gefundenen Effekte könnte wichtige Hinweise für neue Behandlungsverfahren für ischämische und septische Krankheitsbilder am Herzen liefern.

Die Überprüfung, ob die veränderte Genexpression auch auf Proteinebene zu Veränderungen führt, wird momentan in der Arbeitsgruppe durchgeführt. Aus den Ergebnissen dieser Arbeiten könnten sich Angriffspunkte für die Aufklärung pathologischer Signalwege ergeben.

Des Weiteren kann der Einfluss von nNOS mit Hilfe eines NOS – Inhibitors wie L – NAME untersucht werden. Auch die Inhibierung des TRPV 1 mit Rutheniumrot oder Iodoresiniferatoxin sollte durchgeführt werden. Die Wiederholung der Kontraktionsversuche unter den jeweiligen inhibierenden Bedingungen könnte den kurzfristigen Einfluss dieser Proteine klären. Um langfristige Effekte zu klären, welche zumindest für die nNOS angenommen werden können, sollte eine Vorbehandlung der Mäuse mit L – NAME erfolgen.

## 7. Literaturverzeichnis

Abi-Gerges N, Tavernier B, Mebazaa A, Faivre V, Paqueron X, Payen D, Fischmeister R, Méry PF (1999) Sequential changes in autonomic regulation of cardiac myocytes after in vivo endotoxin injection in rat. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1196-1204

Ameri K, Harris AL (2008) Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol* 40:14-21

Arad M, Maron BJ, Gorham JM, Johnson WH Jr, Saul JP, Perez-Atayde AR, Spirito P, Wright GB, Kanter RJ, Seidman CE, Seidman JG (2005) Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 352:362-372

Åström-Olsson K, Karlsson L, Mattsson Hultén L, Davidsson P, Mantovani V, Månsson C, Olofsson SO, Wiklund O, Grip L (2009) Myocardial release of FKBP12 and increased production of FKBP12.6 in ischemia and reperfusion experimental models. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1299-1304

Babior BM (2002) The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J* 4:1023-1024

Bartel S, Stein B, Eschenhagen T, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Krause EG, Karczewski P, Scholz H (1996) Protein phosphorylation in isolated trabeculae from nonfailing and failing human hearts. *Mol Cell Biochem* 157:171-179

Bayley PM, Findlay WA, Martin SR (1996) Target recognition by calmodulin: dissecting the kinetics and affinity of interaction using short peptide sequences. *Protein Sci* 5:1215-1228

Beitelshees AL, Navare H, Wang D, Gong Y, Wessel J, Moss JI, Langae TY, Cooper-DeHoff RM, Sadee W, Pepine CJ, Schork NJ, Johnson JA (2009) CACNA1C gene polymorphisms, cardiovascular disease outcomes, and treatment response. *Circ Cardiovasc Genet* 2:362-370

Ben-Shaul V, Lomnitski L, Nyska A, Zurovsky Y, Bergman M, Grossman S (2001) The effect of natural antioxidants, NAO and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. *Toxicol Lett* 123:1-10

Bers DM (2001) *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2. Edition Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic

Bers DM (2004) Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol* 37:417-429

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

Bertuglia S (2008) Intermittent hypoxia modulates nitric oxide-dependent vasodilation and capillary perfusion during ischemia-reperfusion-induced damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H1914-H1922

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979 Nov 24;7(6):1513-23

Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA (1997) Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 96:1495-1500

Bogoyevitch MA (2006) The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting. *Bioessays* 28:923-934

Bokník P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Müller T, Schmitz W, Schröder F, Neumann J (2000) Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:222-231



Borchi E, Parri M, Papucci L, Becatti M, Nassi N, Nassi P, Nediani C (2009) Role of NADPH oxidase in H9c2 cardiac muscle cells exposed to simulated ischaemia-reperfusion. *J Cell Mol Med* 13:2724-2735

Borutaite V, Morkuniene R, Arandarcikaite O, Jekabsone A, Barauskaite J, Brown GC (2009) Nitric oxide protects the heart from ischemia-induced apoptosis and mitochondrial damage via protein kinase G mediated blockage of permeability transition and cytochrome c release. *J Biomed Sci* 16:70

Bredt DS (2003) Nitric oxide signaling specificity--the heart of the problem. *J Cell Sci* 116:9-15

Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:682-685

Budas GR, Disatnik MH, Mochly-Rosen D (2009) Aldehyde dehydrogenase 2 in cardiac protection: a new therapeutic target? *Trends Cardiovasc Med* 19:158-164

Burger DE, Lu X, Lei M, Xiang FL, Hammoud L, Jiang M, Wang H, Jones DL, Sims SM, Feng Q (2009) Neuronal nitric oxide synthase protects against myocardial infarction-induced ventricular arrhythmia and mortality in mice. *Circulation* 120:1345-1354

Burhans WC, Weinberger M (2007) Yeast endonuclease G: complex matters of death, and of life. *Mol Cell* 25:323-325

Burke JE, Dennis EA (2009a) Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 50:S237-S242

Burke JE, Dennis EA (2009b) Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther* 23:49-59

Buss H, Dörrie A, Schmitz ML, Frank R, Livingstone M, Resch K, Kracht M (2004) Phosphorylation of serine 468 by GSK-3beta negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity. *J Biol Chem* 279:49571-49574

Canatan H (2008) The effect of cardiac ischemic preconditioning on rat left ventricular gene expression profile. *Cell Biochem Funct* 26:179-184

Carpati CM, Astiz ME, Rackow EC (1999) Mechanisms and management of myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Med* 27:231-232

Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing SL, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoli-Roach AA, Kranias EG (2002) Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 22:4124-4135

Chatfield K, Eastman A (2004) Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A differentially prevent intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 323:1313-1320

Chelu MG, Danila CI, Gilman CP, Hamilton SL (2004) Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins. *Trends Cardiovasc Med* 14:227-234

Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S (1991) Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 5:3037-3046

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159

Chrousos GP, Kino T (2009) Glucocorticoid signaling in the cell. Expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1179:153-166.

Clark N, Keeble J, Fernandes ES, Starr A, Liang L, Sugden D, de Winter P, Brain SD (2007) The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor protects against the onset of sepsis after endotoxin. *FASEB J* 21:3747-3755

Cohen P (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58:453-508

Cohen PT (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* 22:245-251

Cohen P, Cohen PT (1989) Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem* 264:21435-21438

Conde R, Xavier J, McLoughlin C, Chinkers M, Ovsenek N (2005) Protein phosphatase 5 is a negative modulator of heat shock factor 1. *J Biol Chem* 280:28989-28996

Corti C, Leclerc L'Hostis E, Quadroni M, Schmid H, Durussel I, Cox J, Dainese Hatt P, James P, Carafoli E (1999) Tyrosine phosphorylation modulates the interaction of calmodulin with its target proteins. *Eur J Biochem* 262:790-802

Crampton N, Kodiha M, Shrivastava S, Umar R, Stochaj U (2009) Oxidative stress inhibits nuclear protein export by multiple mechanisms that target FG nucleoporins and Crm1. *Mol Biol Cell* 20:5106-5116

Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN (2004) The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 95:957-970

Damy T, Ratajczak P, Robidel E, Bendall JK, Oliviero P, Boczkowski J, Ebrahimian T, Marotte F, Samuel JL, Heymes C (2003) Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats. *FASEB J* 17:1934-1936

Daniel EE, El-Yazbi A, Cho WJ (2006) Caveolae and calcium handling, a review and a hypothesis. *J Cell Mol Med* 10:529-544.

Danson EJ, Choate JK, Paterson DJ (2005) Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function. *Pharmacol Ther* 106:57-74

Dauphinee SM, Karsan A (2006) Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86:9-22

De Angelis R, Iezzi S, Bruno T, Corbi N, Di Padova M, Floridi A, Fanciulli M, Passananti C (2003) Functional interaction of the subunit 3 of RNA polymerase II (RPB3) with transcription factor-4 (ATF4). *FEBS Lett* 547:15-19

de la Torre P, Díaz-Sanjuán T, García-Ruiz I, Esteban E, Canga F, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA (2005) Interleukin-6 increases rat metalloproteinase-13 gene expression through Janus kinase-2-mediated inhibition of serine/threonine phosphatase-2A. *Cell Signal* 17:427-435

DePaoli-Roach AA, Park IK, Cerovsky V, Csontos C, Durbin SD, Kuntz MJ, Sitikov A, Tang PM, Verin A, Zolnierowicz S (1994) Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Adv Enzyme Regul* 34:199-224

Derijk RH, Berkenbosch F (1994) Hypothermia to endotoxin involves the cytokine tumor necrosis factor and the neuropeptide vasopressin in rats. *Am J Physiol* 266:R9-R14

Di Lisa F, Menabò R, Canton M, Petronilli V (1998) The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1366:69-78

Duchen MR (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 529:57-68

Dudzinski DM, Michel T (2007) Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res* 75:247-260

Dulos J, van der Vleuten MA, Kavelaars A, Heijnen CJ, Boots AM (2005) CYP7B expression and activity in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis: regulation by proinflammatory cytokines. *Arthritis Rheum* 52:770-778

Dunbar JD, Song HY, Guo D, Wu LW, Donner DB (1997) Two-hybrid cloning of a gene encoding TNF receptor-associated protein 2, a protein that interacts with the intracellular domain of the type 1 TNF receptor: identity with subunit 2 of the 26S protease. *J Immunol* 158:4252-4259

Dworakowski R, Alom-Ruiz SP, Shah AM (2008) NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacol Rep* 60:21-28

Höhn M, Arlt S, Zhang Y, Xu J, Gergs U, Buerke M, Müller-Werdan U, Werdan K, Neumann J, Ebelt H (2009) Auswirkungen der transgenen Überexpression von Phosphatase 2A auf das Remodeling im chronischen Herzinfarktmodell der Maus. *Clin Res Cardiol* 98, Suppl 1, Abstract

Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, Schwarzmann G, Blanz J, Von Figura K, Saftig P (2002) Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell* 13:3355-3368

Evans JF, Ferguson AD, Mosley RT, Hutchinson JH (2008) What's all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci* 29:72-78

Fan WJ, van Vuuren D, Genade S, Lochner A (2010) Kinases and phosphatases in ischaemic preconditioning: a re-evaluation. *Basic Res Cardiol* 105:495-511

Fanciulli M, Bruno T, Di Padova M, De Angelis R, Lovari S, Floridi A, Passananti C (1998) The interacting RNA polymerase II subunits, hRPB11 and hRPB3, are coordinately expressed in adult human tissues and down-regulated by doxorubicin. *FEBS Lett* 427:236-240

Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13

Fenton MJ, Golenbock DT (1998) LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 64:25-32

Folmes CD, Lopaschuk GD (2007) Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity. *Cardiovasc Res* 73:278-287

Fukunaga K, Han F, Shioda N, Moriguchi S, Kasahara J, Shirasaki Y (2006) DY-9760e, a novel calmodulin inhibitor, exhibits cardioprotective effects in the ischemic heart. *Cardiovasc Drug Rev* 24:88-100

Gallagher PJ, Herring BP, Stull JT (1997) Myosin light chain kinases. *J Muscle Res Cell Motil* 18:1-16

Ganote CE, Kaltenbach JP (1979) Oxygen-induced enzyme release: early events and a proposed mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 11:389-406

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. *J Biol Chem* 279:40827-40834

Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, Shohami E, Spatz M (2004) Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 132:87-92

Greif DM, Kou R, Michel T (2002) Site-specific dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by protein phosphatase 2A: evidence for crosstalk between phosphorylation sites. *Biochemistry* 41:15845-15853

Grimsrud PA, Swaney DL, Wenger CD, Beauchene NA, Coon JJ (2010) Phosphoproteomics for the masses. *ACS Chem Biol* 5:105-119

Grozinger CM, Schreiber SL (2002) Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol* 9:3-16

Gu S, Cifelli C, Wang S, Heximer SP (2009) RGS proteins: identifying new GAPs in the understanding of blood pressure regulation and cardiovascular function. *Clin Sci (Lond)* 116:391-399

Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB (2002) The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 23:183-191

Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM, Lesch M, Sabbah HN (1996) Evidence for presence and hormonal regulation of protein phosphatase inhibitor-1 in ventricular cardiomyocyte. *Am J Physiol* 270:H1159- H1164

Han HG, Wang ZW, Zhang NB, Zhu HY (2008) Role of nitric oxide during early phase myocardial ischemic preconditioning in rats. *Chin Med J (Engl)* 121:1210-1214

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.

Herzig S, Neumann J (2000) Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80:173-210

Holmfeldt P, Sellin ME, Gullberg M (2009) Predominant regulators of tubulin monomer-polymer partitioning and their implication for cell polarization. *Cell Mol Life Sci* 66:3263-3276

Hopkins TA, Dyck JR, Lopaschuk GD (2002) AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. *Biochem Soc Trans* 31:207-212

Hubbard MJ, Cohen P (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* 18:172-177

Huey KA, Meador BM (2008) Contribution of IL-6 to the Hsp72, Hsp25, and alphaB-crystallin [corrected] responses to inflammation and exercise training in mouse skeletal and cardiac muscle. *J Appl Physiol* 105:1830-1836

Ikeda Y, Hoshijima M, Chien KR (2008) Toward biologically targeted therapy of calcium cycling defects in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 23:6-16

Javesghani D, Magder SA, Barreiro E, Quinn MT, Hussain SN (2002) Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. *Am J Respir Crit Care Med* 165:412-418

Ji GJ, Fleischmann BK, Bloch W, Feelisch M, Andressen C, Addicks K, Hescheler J (1999) Regulation of the L – type Ca<sup>2+</sup> channel during cardiomyogenesis: switch from NO to adenylyl cyclase-mediated inhibition. *FASEB J* 13:313-324

Johnson JD, Snyder C, Walsh M, Flynn M (1996) Effects of myosin light chain kinase and peptides on Ca<sup>2+</sup> exchange with the N- and C-terminal Ca<sup>2+</sup> binding sites of calmodulin. *J Biol Chem* 271:761-767

Kaiser RA, Liang Q, Bueno O, Huang Y, Lackey T, Klevitsky R, Hewett TE, Molkenin JD (2005) Genetic inhibition or activation of JNK1/2 protects the myocardium from ischemia-reperfusion-induced cell death in vivo. *J Biol Chem* 280:32602-32608

Kang TH, Bae KH, Yu MJ, Kim WK, Hwang HR, Jung H, Lee PY, Kang S, Yoon TS, Park SG, Ryu SE, Lee SC (2007) Phosphoproteomic analysis of neuronal cell death by glutamate-induced oxidative stress. *Proteomics* 7:2624-2635



Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL (1995) Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* 96:1042-1052

Kim C, Kim JY, Kim JH (2008) Cytosolic phospholipase A(2), lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *BMB Rep* 41:555-559

Kirchhefer U, Klimas J, Baba HA, Buchwalow IB, Fabritz L, Hüls M, Matus M, Müller FU, Schmitz W, Neumann J (2007) Triadin is a critical determinant of cellular Ca cycling and contractility in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H3165-H3174.

Klemencic I, Carmona AK, Cezari MH, Juliano MA, Juliano L, Guncar G, Turk D, Krizaj I, Turk V, Turk B (2000) Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *Eur J Biochem* 267:5404-5412

Kohr MJ, Davis JP, Ziolo MT (2009) Peroxynitrite increases protein phosphatase activity and promotes the interaction of phospholamban with protein phosphatase 2a in the myocardium. *Nitric Oxide* 20:217-221

Komeima K, Hayashi Y, Naito Y, Watanabe Y (2000) Inhibition of neuronal nitric – oxide synthase by calcium/calmodulin – dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108 – 15 neuronal cells. *J Biol Chem* 275:28139-28143

Kottke-Marchant K, Comp P (2002) Laboratory issues in diagnosing abnormalities of protein C, thrombomodulin, and endothelial cell protein C receptor. *Arch Pathol Lab Med* 126:1337-1348

Krämer OH (2009) HDAC2: a critical factor in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 30:647-655

Kranias EG, Di Salvo J (1986) A phospholamban protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261:10029-10032

Kuroko Y, Yamazaki T, Tokunaga N, Akiyama T, Kitagawa H, Ishino K, Sano S, Mori H (2007) Cardiac epinephrine synthesis and ischemia-induced myocardial epinephrine release. *Cardiovasc Res* 74:438-444

Kwiek NC, Thacker DF, Datto MB, Megosh HB, Haystead TA (2006) PITK, a PP1 targeting subunit that modulates the phosphorylation of the transcriptional regulator hnRNP K. *Cell Signal* 18:1769-1778

Ladilov Y, Maxeiner H, Wolf C, Schäfer C, Meuter K, Piper HM (2002) Role of protein phosphatases in hypoxic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1092-H1098

Ladilov YV, Siegmund B, Balsler C, Piper HM (1997) Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res* 80:69-75

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

Latchman DS (2001) Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res* 51:637-646

Layland J, Cave AC, Warren C, Grieve DJ, Sparks E, Kentish JC, Solaro RJ, Shah AM (2005) Protection against endotoxemia-induced contractile dysfunction in mice with cardiac-specific expression of slow skeletal troponin I. *FASEB J* 19:1137-1139

Lee JK, McCoy MK, Harms AS, Ruhn KA, Gold SJ, Tansey MG (2008) Regulator of G-protein signaling 10 promotes dopaminergic neuron survival via regulation of the microglial inflammatory response. *J Neurosci* 28:8517-8528

Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL (2001) Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33:1065-1089

Li JM, Shah AM (2003) Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem* 278:12094-12100

Li JM, Shah AM (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R1014- R1030

Liaudet L, Vassalli G, Pacher P (2009) Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Front Biosci* 14:4809-4814

Lin MC, Lee NP, Zheng N, Yang PH, Wong OG, Kung HF, Hui CK, Luk JM, Lau GK (2005) Tumor necrosis factor-alpha-induced protein 1 and immunity to hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 11:7564-7568

Liu B, Tewari AK, Zhang L, Green-Church KB, Zweier JL, Chen YR, He G (2009) Proteomic analysis of protein tyrosine nitration after ischemia reperfusion injury: mitochondria as the major target. *Biochim Biophys Acta* 1794:476-485

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25:402-408

Lopaschuk GD, Barr R, Thomas PD, Dyck JR (2003) Beneficial effects of trimetazidine in ex vivo working ischemic hearts are due to a stimulation of glucose oxidation secondary to inhibition of long-chain 3-ketoacyl coenzyme a thiolase. *Circ Res* 93:e33- e37

Loppnow H, Bil R, Hirt S, Schönbeck U, Herzberg M, Werdan K, Rietschel ET, Brandt E, Flad HD (1998) Platelet-derived interleukin-1 induces cytokine production, but not proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Blood* 91:134-141

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275

Lutgens SP, Cleutjens KB, Daemen MJ, Heeneman S (2007) Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB J* 21:3029-3041

MacDougall LK, Jones LR, Cohen P (1991) Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 196:725-734

Manzur M, Ganss R (2009) Regulator of G protein signaling 5: a new player in vascular remodeling. *Trends Cardiovasc Med* 19:26-30

Maron BJ, Roberts WC, Arad M, Haas TS, Spirito P, Wright GB, Almquist AK, Baffa JM, Saul JP, Ho CY, Seidman J, Seidman CE (2009) Clinical outcome and phenotypic expression in LAMP2 cardiomyopathy. *JAMA* 301:1253-1259

Matsuda N, Hattori Y (2006) Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci* 101:189-198

Melov S (2002) Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1395-1400

Michell BJ, Chen Zp, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE (2001) Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276:17625-17628

Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA (1999) Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci* 24:186-191

Mishra S, Gupta RC, Tiwari N, Sharov VG, Sabbah HN (2002) Molecular mechanisms of reduced sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake in human failing left ventricular myocardium. *J Heart Lung Transplant* 21:366-373

Mizuno T, Kannan Y, Tokunaga M, Moriyama M, Kiso Y, Kusakabe K, Yamate J, Kiyomiya K, Sugano T (2000) Role of hypothermia induced by tumor necrosis factor on apoptosis and function of inflammatory neutrophils in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R157-R165.

Morano IL (1992) Molecular biology of smooth muscle. *J Hypertens* 10:411-416

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63

Mumby MC, Walter G (1993) Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* 73:673-699

Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM (2006) NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res* 71:208-215

Nathan C, Xie QW (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269:13725-13728

Netticadan T, Temsah R, Osada M, Dhalla NS (1999) Status of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 277:C384- C391

Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997) Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29:265-272

Neuss M, Monticone R, Lundberg MS, Chesley AT, Fleck E, Crow MT (2001) The apoptotic regulatory protein ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) prevents oxidant stress-mediated cell death by preserving mitochondrial function. *J Biol Chem* 276:33915-33922

Okazaki R, Iwasaki YK, Miyauchi Y, Hirayama Y, Kobayashi Y, Katoh T, Mizuno K, Sekiguchi A, Yamashita T (2009) Lipopolysaccharide induces atrial arrhythmogenesis via down-regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channel genes in rats. *Int Heart J* 50:353-363

Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P (2008) Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock Suppl* 1:53-59

Orliac ML, Peroni RN, Abramoff T, Neuman I, Podesta EJ, Adler-Graschinsky E (2007) Increases in vanilloid TRPV1 receptor protein and CGRP content during endotoxemia in rats. *Eur J Pharmacol* 566:145-152

Ostrowski J, Van Seuning I, Seger R, Rauch CT, Sleath PR, McMullen BA, Bomsztyk K (1994) Purification, cloning, and expression of a murine phosphoprotein that binds the kappa B motif in vitro identifies it as the homolog of the human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein. Description of a novel DNA-dependent phosphorylation process. *J Biol Chem* 269:17626-17634

Ouellet H, Lang J, Couture M, Ortiz de Montellano PR (2009) Reaction of mycobacterium tuberculosis cytochrome P450 enzymes with nitric oxide. *Biochemistry* 48:863-872

País SM, Téllez-Iñón MT, Capiati DA (2009) Serine/threonine protein phosphatases type 2A and their roles in stress signaling. *Plant Signal Behav* 4:1013-1015.

Pearson RB, Wettenhall RE, Means AR, Hartshorne DJ, Kemp BE (1988) Autoregulation of enzymes by pseudosubstrate prototopes: myosin light chain kinase. *Science* 241:970-973

Peng T, Lu X, Feng Q (2005a) Pivotal role of gp91phox-containing NADH oxidase in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression and myocardial depression. *Circulation* 111:1637-1644

Peng T, Lu X, Feng Q (2005b) NADH oxidase signaling induces cyclooxygenase-2 expression during lipopolysaccharide stimulation in cardiomyocytes. *FASEB J* 19:293-295

Perez RL, Ritzenthaler JD, Roman J (1999) Transcriptional regulation of the interleukin-1beta promoter via fibrinogen engagement of the CD18 integrin receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:1059-1066

Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 490:27-34

Potthast R, Potter LR (2005) Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. *Peptides* 26:1001-1008

Quadroni M, James P, Carafoli E (1994) Isolation of phosphorylated calmodulin from rat liver and identification of the in vivo phosphorylation sites. *J Biol Chem* 269:16116-16122

Quadroni M, L'Hostis EL, Corti C, Myagkikh I, Durussel I, Cox J, James P, Carafoli E (1998) Phosphorylation of calmodulin alters its potency as an activator of target enzymes. *Biochemistry* 37:6523-6532

Ray N, Kuwahara M, Takada Y, Maruyama K, Kawaguchi T, Tsubone H, Ishikawa H, Matsuo K (2006) c-Fos suppresses systemic inflammatory response to endotoxin. *Int Immunol* 18:671-677

Rhoads AR, Friedberg F (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J* 11:331-340

Ruan B, Pong K, Jow F, Bowlby M, Crozier RA, Liu D, Liang S, Chen Y, Mercado ML, Feng X, Bennett F, von Schack D, McDonald L, Zaleska MM, Wood A, Reinhart PH, Magolda RL, Skotnicki J, Pangalos MN, Koehn FE, Carter GT, Abou-Gharbia M, Graziani EI (2008) Binding of rapamycin analogs to calcium channels and FKBP52 contributes to their neuroprotective activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 105:33-38

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2. Auflage

Santamaría I, Velasco G, Pendás AM, Fueyo A, López-Otín C (1998) Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem* 273:16816-16823

Schäfers RF, Poller U, Pönicke K, Geissler M, Daul AE, Michel MC, Brodde OE (1997) Influence of adrenoceptor and muscarinic receptor blockade on the cardiovascular effects of exogenous noradrenaline and of endogenous noradrenaline released by infused tyramine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355:239-249

Schömig A, Haass M, Richardt G (1991) Catecholamine release and arrhythmias in acute myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 12 Suppl F:38-47

Schwencke C, Yamamoto M, Okumura S, Toya Y, Kim SJ, Ishikawa Y (1999) Compartmentation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling in caveolae. *Mol Endocrinol* 13:1061-1070

Schwinger RH, Münch G, Bölck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E (1999) Reduced Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 31:479-491

Sears CE, Ashley EA, Casadei B (2004) Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359:1021-1044



Sevenich L, Schurigt U, Sachse K, Gajda M, Werner F, Müller S, Vasiljeva O, Schwinde A, Klemm N, Deussing J, Peters C, Reinheckel T (1998) Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2497-2502

Shanley TP (2002) Phosphatases: counterregulatory role in inflammatory cell signaling. *Crit Care Med* 30:S80-S88

Shanley TP, Vasi N, Denenberg A, Wong HR (2001) The serine/threonine phosphatase, PP2A: endogenous regulator of inflammatory cell signaling. *J Immunol* 166:966-972

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

Shi Y (2009) Assembly and structure of protein phosphatase 2A. *Sci China C Life Sci* 52:135-146.

Smith DM, Coppock HA, Withers DJ, Owji AA, Hay DL, Choksi TP, Chakravarty P, Legon S, Poyner DR (2002) Adrenomedullin: receptor and signal transduction. *Biochem Soc Trans* 30:432-437

Smyth JW, Hong TT, Gao D, Vogan JM, Jensen BC, Fong TS, Simpson PC, Stainier DY, Chi NC, Shaw RM (2010) Limited forward trafficking of connexin 43 reduces cell-cell coupling in stressed human and mouse myocardium. *J Clin Invest* 120:266-279.

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

Stiles AR, McDonald JG, Bauman DR, Russell DW (2009) CYP7B1: one cytochrome P450, two human genetic diseases, and multiple physiological functions. *J Biol Chem* 284:28485-28489

Stochaj U, Bański P, Kodiha M, Matusiewicz N (2006) The N-terminal domain of the mammalian nucleoporin p62 interacts with other nucleoporins of the FXFG family during interphase. *Exp Cell Res* 312:2490-2499

Stypmann J, Janssen PM, Prestle J, Engelen MA, Kögler H, Lüllmann-Rauch R, Eckardt L, von Figura K, Landgrebe J, Mleczko A, Saftig P (2006) LAMP-2 deficient mice show depressed cardiac contractile function without significant changes in calcium handling. *Basic Res Cardiol* 101:281-291

Su D, Novoselov SV, Sun QA, Moustafa ME, Zhou Y, Oko R, Hatfield DL, Gladyshev VN (2005) Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *J Biol Chem* 280:26491-26498

Sun GY, Horrocks LA, Farooqui AA (2007) The roles of NADPH oxidase and phospholipases A2 in oxidative and inflammatory responses in neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 103:1-16

Sun QA, Kirnarsky L, Sherman S, Gladyshev VN (2001) Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3673-3678

Sun QA, Su D, Novoselov SV, Carlson BA, Hatfield DL, Gladyshev VN (2005) Reaction mechanism and regulation of mammalian thioredoxin/glutathione reductase. *Biochemistry* 44:14528-14537

Takahashi M, Shiraishi H, Ishibashi Y, Blade KL, McDermott PJ, Menick DR, Kuppaswamy D, Cooper G 4<sup>th</sup> (2003) Phenotypic consequences of beta1-tubulin expression and MAP4 decoration of microtubules in adult cardiocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2072- H2083

Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Hattori H, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I, Yamamoto TT (2004) The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J Atheroscler Thromb* 11:200-208

Tavener SA, Kubes P (2005) Is there a role for cardiomyocyte toll-like receptor 4 in endotoxemia? *Trends Cardiovasc Med* 15:153-157

Thiemermann C (1997) Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol* 29:159-166

Thilo F, Scholze A, Liu DY, Zidek W, Tepel M (2008) Association of transient receptor potential canonical type 3 (TRPC3) channel transcripts with proinflammatory cytokines. *Arch Biochem Biophys* 471:57-62

Tobias PS, Ulevitch RJ. (1994) Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in the lipopolysaccharide-dependent activation of cells. *Chest* 105:48S-50S

Travis SM, Welsh MJ (1997) PP2C gamma: a human protein phosphatase with a unique acidic domain. *FEBS Lett* 412:415-419

Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Ueta Y, Sasaguri Y, Yanagihara N (2009) Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice. *Circ J* 73:986-993.

Ussher JR, Lopaschuk GD (2008) The malonyl CoA axis as a potential target for treating ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 79:259-268

Van de Wouwer M, Conway EM (2004) Novel functions of thrombomodulin in inflammation. *Crit Care Med* 32:S254-S261

Van Snick J, Cayphas S, Vink A, Uyttenhove C, Coulie PG, Rubira MR, Simpson RJ (1986) Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9679-9683

Venditti P, De Rosa R, Cigliano L, Agnisola C, Di Meo S (2004) Role of nitric oxide in the functional response to ischemia-reperfusion of heart mitochondria from hyperthyroid rats. *Cell Mol Life Sci* 61:2244-2252

Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC (1997) Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J Biol Chem* 272:28187-28190

Voet D, Voet JG (1994) *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage

Wada T, Penninger JM (2004) Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004 Apr 12;23(16):2838-49

Wang P (2001) Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis. *Peptides* 22:1835-1840

Wang G, Liem DA, Vondriska TM, Honda HM, Korge P, Pantaleon DM, Qiao X, Wang Y, Weiss JN, Ping P (2005) Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction via modulation of mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1290- H1295

Weigand MA, Bardenheuer HJ, Böttiger BW (2003) Klinisches Management bei Patienten mit Sepsis. *Anaesthesist* 52:3-22

Weinbrenner C, Baines CP, Liu GS, Armstrong SC, Ganote CE, Walsh AH, Honkanen RE, Cohen MV, Downey JM (1998) Fostriecin, an inhibitor of protein phosphatase 2A, limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Circulation* 98:899-905

Wicks SJ, Haros K, Maillard M, Song L, Cohen RE, Dijke PT, Chantry A (2005) The deubiquitinating enzyme UCH37 interacts with Smads and regulates TGF-beta signalling. *Oncogene* 24:8080-8084

Widlak P, Garrard WT (2005) Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* 94:1078-1087

Wieland T, Mittmann C (2003) Regulators of G-protein signalling: multifunctional proteins with impact on signalling in the cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 97:95-115

Withaut R, Busch C, Fraunberger P, Walli A, Seidel D, Pilz G, Stuttmann R, Speichermann N, Verner L, Werdan K (2003) Plasma atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide are increased in septic shock: impact of interleukin-6 and sepsis-associated left ventricular dysfunction. *Intensive Care Med* 29:1696-1702

Wong GH, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV (1989) Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58:923-931

Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrance IK, Hall G, Cross AS, Rogers TB (2002) Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF-kappaB activation and tumor necrosis factor-alpha expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H872-H879

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115:2656-2664

Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS (1998) Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279:234-237

Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC (1999a) Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:657-662

Xu Y, Kinningham KK, Devalaraja MN, Yeh CC, Majima H, Kasarskis EJ, St Clair DK (1999b) An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *DNA Cell Biol* 18:709-722

Xu KY, Kuppusamy SP, Wang JQ, Li H, Cui H, Dawson TM, Huang PL, Burnett AL, Kuppusamy P, Becker LC (2003) Nitric oxide protects cardiac sarcolemmal membrane enzyme function and ion active transport against ischemia-induced inactivation. *J Biol Chem* 278:41798-41803.

Xu Y, Xing Y, Chen Y, Chao Y, Lin Z, Fan E, Yu JW, Strack S, Jeffrey PD, Shi Y (2006) Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell* 127:1239-1251

Xu C, Zhang X, Yu C, Lu G, Chen S, Xu L, Ding W, Shi Q, Li Y (2009) Proteomic analysis of hepatic ischemia/reperfusion injury and ischemic preconditioning in mice revealed the protective role of ATP5beta. *Proteomics* Jan;9:409-419

Yang L, Liu N, Hu X, Zhang W, Wang T, Li H, Zhang B, Xiang S, Zhou J, Zhang J (2010) CK2 phosphorylates TNFAIP1 to affect its subcellular localization and interaction with PCNA. *Mol Biol Rep* 37:2967-2973

Young RA (1991) RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* 1991;60:689-715

Zakhary DR, Moravec CS, Stewart RW, Bond M (1999) Protein kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 99:505-510

Zakhary DR, Moravec CS, Stewart RW, Bond M (1999) Protein kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 99:505-510

Zhang YQ, Herman B (2006) ARC protects rat cardiomyocytes against oxidative stress through inhibition of caspase-2 mediated mitochondrial pathway. *J Cell Biochem* 99:575-588

Zhong J, Hwang TC, Adams HR, Rubin LJ (1997) Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from endotoxemic guinea pigs. *Am J Physiol* 273:H2312- H2324

Zhong B, Wang DH (2007) TRPV1 gene knockout impairs preconditioning protection against myocardial injury in isolated perfused hearts in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H1791- H1798

Zhong B, Wang DH (2008) N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid, protects the heart against ischemia-reperfusion injury via activation of TRPV1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H728- H735

Zhou L, Burnett AL, Huang PL, Becker LC, Kuppusamy P, Kass DA, Kevin Donahue J, Proud D, Sham JS, Dawson TM, Xu KY (2002) Lack of nitric oxide synthase depresses ion transporting enzyme function in cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 294:1030-1035

Zhou J, Pham HT, Walter G (2003) The formation and activity of PP2A holoenzymes do not depend on the isoform of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 278:8617-8622

Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H (2008) Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol* 45:625-632.

Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2006) Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta* 1757:509-517

Zot AS, Potter JD (1987) Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 16:535-559

Zou Y, Zhu W, Sakamoto M, Qin Y, Akazawa H, Toko H, Mizukami M, Takeda N, Minamino T, Takano H, Nagai T, Nakai A, Komuro I (2003) Heat shock transcription factor 1 protects cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 108:3024-3030

## 8. Danksagung

Hiermit möchte ich all denen meinen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke

Herrn Prof. Dr. med. J. Neumann für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, sowie für die gute Betreuung, die Ratschläge und anregenden Diskussionen,

Herrn Prof. Dr. med. M. Tepel des Institute for Molecular Medicine/Cardiovascular and Renal Research, Odense, Dänemark für die Bestimmung der TRPV1 – Expression,

Herrn Dr. rer. nat. U. Gergs für die engagierte Betreuung der experimentellen Arbeit,

dem IZKF Leipzig, der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig für die Durchführung der Mikroarray – Analyse,

Frau Dr. rer. nat. U. Demus für die Durchführung der NOS – Western Blots,

der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für ihre freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie das familiäre Arbeitsklima,

meinen Eltern und Freunden für ihre Unterstützung, den Rückhalt und vor allem die Geduld.



## 9. Veröffentlichungen

### Abstracts:

Schulz N, Gergs U, Loppnow H, Neumann J (2008) Increased expression of PP2A protects against lipopolysaccharide-induced stress. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377 (Suppl 1): 56.

Schulz N, Gergs U, Neumann J (2007) Heart specific overexpression of PP2A leads to impaired contractility but protects against Ischemia. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 375 (Suppl 1): 62

Gergs U, Schulz N, Rückschloss U, Werner F, Neumann M, Schmitz W, Neumann J (2006) Overexpression of the human serotonin 5-HT<sub>4</sub>a receptor in the mouse heart, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372 (Suppl 1): 89

Neumann J, Ebelt H, Klöckner U, Böckler A, Günther S, Baumann M, Schulz N, Werner F, Gergs U (2008) The human serotonin 5-HT<sub>4</sub>a receptor. *Circulation* 117(19): 8-9

Thilo F, Schulz N, Gergs U, Neumann J, Tepel M (2008) Increased transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) expression in mice with myocardial hypertrophy: Association with regulatory microRNA (miR21). *J Hypertens* 26 (Suppl 1): S261

Kucerova D, Großmann C, Schreier B, Schulz N, Gergs U, Boknik P, Gekle M, Müller FU, Neumann J, Schmitz W (2009) Protective role of the protein phosphatase 2A against septic stress in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 379 (Suppl 1): 55

Gergs U, Schulz N, Grossmann C, Gekle M, Neumann J (2010) PP2A attenuates cardiac response to LPS-induced sepsis. *FASEB J* 24: 793.7

Gergs U, Schulz N, Bollmann P, Volke D, Hoffmann R, Ceglarek U, Thiery J, Neumann J (2011) Overexpression of PP2A changes proteomic patterns in the mouse heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 383 (Suppl. 1): 60

Artikel:

Thilo F, Liu Y, Schulz N, Gergs U, Neumann J, Loddenkemper C, Gollasch M, Tepel M (2010) Increased transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channel expression in hypertrophic heart. *Biochem Biophys Res Commun* 401:98-103

Eingereicht:

Baumann S, Gergs G, Schulz N, Thiery J, Neumann J (2011) Magnetic bead-based proteome profiling using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Spectrometry in cardiac tissue from transgenic mice. (eingereicht)

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit eigenständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt habe. Diese Arbeit wurde von mir an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Halle (Saale), den \_\_\_\_\_

---

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name: Nico Schulz  
Staatsangehörigkeit: Deutschland  
Geboren: 20. November 1978 in Halle/Saale  
Familienstand: ledig



09/2010 – jetzt freiberuflicher Mitarbeiter im Bereich Qualitätssicherung beim pharmazeutischen Unternehmen *crewpharm* GmbH  
11/2009 – jetzt freiberufliche Mitarbeit bei einem pharmakologischen Gründungsprojekt zur Verringerung von Tierversuchen  
03/2009 – 06/2010 Nebenberufliche Tätigkeit als Datenerfasser für die AFA AG  
06/2008 – 07/2008 Teilnahme am Kurs „Advanced Business English“ der inlingua-Sprachschulen  
01/2008 Schreiben der Promotionsarbeit und aktive Bewerbung  
10/2005 Tutor Kleingruppenseminar allgemeine und systemische Pharmakologie

### **Wissenschaftliche Tätigkeit:**

01/2005 – 12/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Experimenteller Teil der Promotionsarbeit: „Charakterisierung der Herzfunktion von Proteinphosphatase 2A überexprimierenden Mäusen“  
03/2006 – 06/2006 Weiterbildungsveranstaltung „Tierschutz/Versuchstierkunde“  
06/2005 – 10/2005 Hospitation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Universität Münster

### **Studium:**

10/2004 – 12/2004 Begonnenes Studium der Volkswirtschaftslehre ohne Abschluss  
10/1998 – 09/2004 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Diplomarbeit: „Optimierung der *linker* – Sequenz des RNase A – Tandemenzym zur Erzeugung einer potentiell zytotoxischen RNase A – Variante“ Abschluss: Diplom

**Grundwehrdienst:**

09/1998 Arbeitssuchend  
11/1997 – 08/1998 Grundwehrdienst, Weißenfels  
08/1997 – 10/1997 Arbeitssuchend

**Schulische Ausbildung:**

08/1993 – 07/1997 Gymnasium, Landsberg  
Abschluss: Abitur  
08/1990 – 07/1993 Sekundarschule, Gröbers  
08/1985 – 07/1990 Polytechnische Oberschule „W. I. Lenin“, Gröbers

**Praktische Kenntnisse:**

Zellkulturtechnik:  
- Isolation adulter Kardiomyocyten der Maus  
- Adenovirus Infektion neonataler Kardiomyocyten der Ratte

Elektrophysiologie:  
- Messung intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Transienten an adulten und neonatalen Kardiomyocyten

Molekularbiologie:  
- Agarose-Gel-Elektrophorese  
- PCR  
- Isolation von DNA, RNA und Plasmiden  
- Northern Blot  
- Klonierungstechniken mit verschiedenen Vektoren  
- ortsspezifische Mutagenese  
- Immunpräzipitation

Proteinbiochemie:  
- SDS-PAGE  
- Western Blot  
- Expression rekombinanter Proteine  
- Renaturierung von nicht-löslich exprimierten Proteinen  
- Affinitätschromatographie  
- Enzymaktivitätsassays (RNase A; NADPH-Oxidase)

Tierversuchstechniken  
- Applikation von Substanzen in Maus  
- Organentnahme aus Maus

**Lehrtätigkeit**

2005 – 2007 Tutor eines poL-Seminars (problem-orientiertes Lernen)

**Besondere Kenntnisse**

Fremdsprachen Englisch (fließend in Schrift und gut in Wort)  
IT-Kenntnisse Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Power Point, Corel Draw, Sigma Plot (Grundkenntnisse), Powerlab Chart 5, ImageQuant

Halle, den 07.12.2011