

**Untersuchungen zum Einfluss der Überexpression der Proteinphosphatasen
2A und 2C auf die kardiale Funktion in transgenen Mäusen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Marko Andreas Jaron
geboren am 01.03.1987 in Cottbus

Betreuer:
Prof. Dr. med. Dr. h. c. Joachim Neumann

Gutachter:
Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen, Hamburg
Prof. Dr. med. Stefan Dhein, Leipzig

Datum der Verteidigung: 27.06.2023

Referat

Die Kontraktilität des Herzens und damit die Reaktion auf äußere Einflüsse hängt im Wesentlichen von der Verfügbarkeit von freien Kalziumionen in den Herzmuskelzellen ab. Eine zentrale Rolle in der Steuerung der Kalziumhomöostase spielt der Phosphorylierungszustand von regulierenden Proteinen. Ist der Gleichgewichtszustand zwischen phosphorylierenden Proteinkinasen und dephosphorylierenden Proteinphosphatasen gestört, können Erkrankungen des Herzens, wie die terminale Herzinsuffizienz, resultieren.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der herzspezifischen Überexpression zweier Proteinphosphatasen auf die kardiale Funktion untersucht werden. Zum besseren Verständnis wurden Mausmodelle verwendet, welche die katalytische Untereinheit der Proteinphosphatasen 2A, die PP 2C sowie beide herzspezifisch überexprimieren.

Die hämodynamische Funktion wurde mittels Echokardiografie in vivo im Alter von 4, 5 und 6 Monaten im Vergleich zum Wildtyp beurteilt. Dabei zeigten sich u.a. eine verringerte Kontraktilität, erhöhte linksventrikuläre Innendurchmesser sowie eine gestörte linksventrikuläre Relaxation der transgenen gegenüber den Wildtyp-Tieren. Auch nach β -sympathomimetischer Stimulation durch die intraperitoneale Gabe von Isoprenalin waren diese Unterschiede zu verzeichnen. Des Weiteren konnte durch Messen der Organgewichte ein erhöhtes relatives Herzgewicht aller transgenen Tiere festgestellt werden. Die histologische Untersuchung mit Immunhistochemie der Herzspitzen ergab eine niedriggradige Fibrose in den PP2C-Tieren. Hier war die Aspartat-Aminotransferase als Leberenzym in allen transgenen Tieren erhöht. Auf Proteinebene konnte die Überexpression der Proteinphosphatasen sowie eine Verminderung der Gesamtmenge an Phospholamban, einem zentralen Regulatorprotein des intrazellulären Kalziumhaushaltes, bei den PP2A- und doppelt transgenen Tieren nachgewiesen werden.

Die Erkenntnisse über die Rolle der Proteinphosphatasen 2A und 2C im Myokard stellen eine vielversprechende Grundlage für künftige Arbeiten und klinische Anwendungen dar. Die Inhibition von Proteinphosphatasen kann ein neuer Ansatz in der Therapie von Herzinsuffizienz und Kardiomyopathien sein.

Jaron, Marko Andreas: Untersuchungen zum Einfluss der Überexpression der Proteinphosphatasen 2A und 2C auf die kardiale Funktion in transgenen Mäusen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 76 Seiten, 2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung	1
2. Fragestellung.....	5
3. Material und Methoden.....	6
3.1 Versuchstiere und Tierhaltung.....	6
3.2 Tiermodell	6
3.3 Herzfunktion in vivo	7
3.3.1 Sedierung und Vorbereitung der Tiere	7
3.3.2 Echokardiografie	7
3.4 Organentnahme	11
3.5 Molekularbiologische Methoden.....	11
3.5.1 DNA-Isolation	11
3.5.2 PCR und Agarosegelelektrophorese.....	11
3.6 Biochemische Methoden	12
3.6.1 Homogenisierung der Proben.....	12
3.6.2 Bestimmung des Proteingehaltes der Homogenate	12
3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	12
3.6.4 Western Blot	13
3.6.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen	13
3.7 Histologie	14
3.8 Laborchemische Methoden	15
3.9 Statistische Auswertung.....	15
3.10 Verwendete Materialien und Geräte.....	16
3.10.1 Puffer und Lösungen	16
3.10.2 Substanzen	19
3.10.3 Primer, PCR-Protokoll und Antikörper.....	20
3.10.4 Geräte.....	23
4. Ergebnisse	24
4.1 Genotypische Charakterisierung der transgenen Mausmodelle	24
4.2 Echokardiografie	25

4.3	Biochemische Untersuchung	42
4.4	Laborchemische Untersuchung.....	45
4.5	Vergleichende Morphologie	45
4.6	Histologie	47
5.	Diskussion.....	49
5.1	Echokardiographie	49
5.2	Biochemische Untersuchung	54
5.3	Laborchemische Untersuchung.....	56
5.4	Morphologische Parameter	56
5.5	Histologie	57
6.	Zusammenfassung	58
7.	Klinischer Ausblick.....	59
8.	Literaturverzeichnis.....	60
9.	Veröffentlichungen	76
9.1	Publikation	76
9.2	Vortrag und Poster mit veröffentlichtem Abstract	76
10.	Thesen.....	77
11.	Selbstständigkeitserklärung.....	IX
12.	Erklärung über frühere Promotionsversuche	X
13.	Danksagung.....	XI

Abkürzungsverzeichnis

A	spätdiastolische Flussgeschwindigkeit durch die Mitralklappe
A'	spätdiastolische Myokardbewegungsgeschwindigkeit
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	Natriuretisches Peptid vom B-Typ (englisch: brain natriuretic peptide)
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalziumionen
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CaMKII	Calcium-/Calmodulinabhängige Proteinkinase II
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CICR	Ca ²⁺ -induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung
CSQ	Calsequestrin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT	1. doppelt transgene Maus / Mäuse 2. Dezelerationszeit
E	frühdiaastolische Flussgeschwindigkeit durch die Mitralklappe
E'	frühdiaastolische Myokardbewegungsgeschwindigkeit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
et al.	et alii
ER	endoplasmatisches Retikulum
FS	Verkürzungsfraction (fractional shortening)
FT	systolische Dickenzunahme (fractional thickening)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IVCT	isovolumetrische Kontraktionszeit
IVRT	isovolumetrische Relaxationszeit

IVS	Septum interventrikulare
i.p.	intraperitoneal
ISO	Isoprenalin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kDa	Kilodalton
LTCC	L-Typ-Kalziumkanal
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVET	linksventrikuläre Ejektionszeit
LVPW	Hinterwand des linken Ventrikels
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumionen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm/s	Millimeter pro Sekunde
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mmol	Millimol
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
NCX1	kardialer Natriumkalziumaustauscher
NYHA	New York Heart Association
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PDE	Phosphodiesterase
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
RyR	Ryanodin-Rezeptor (Kalzium-Freisetzungskanal)
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
s.u.	siehe unten
SV40	Simian-Virus 40, dsDNA-Virus als Transkriptionsterminator
Tab.	Tabelle
TBST	TBS-T-Puffer (englisch: Tris-buffered saline with Tween20)
TDI	Gewebe-Doppler (englisch: Tissue Doppler Imaging)
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
TG	transgene Maus
Tn	Troponin
TnC	Kalzium-bindendes Troponin
TnI	Troponin I (Troponin-Inhibitor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	1. Volt 2. Volumen
v.a.	vor allem
V_{max}	maximale Geschwindigkeit
VTI	Volumen-Zeit-Integral (englisch: Volume-Time-Integral)
WT	Wildtyp-Maus

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zusammenspiels von Kinasen und Phosphatasen im Herzmuskel	4
Abbildung 2: Genotyp-Konstrukt	6
Abbildung 3a: Echokardiografische Klassifikation der diastolischen Dysfunktion.....	10
Abbildung 3b: Echokardiografischer Arbeitsplatz	10
Abbildung 4: Genotypisierung mit Darstellung der aufgetrennten PCR-Produkte	24
Abbildung 5a: Ejektionsfraktion in Ruhe	26
Abbildung 5b: Ejektionsfraktion nach Isoprenalingabe	26
Abbildung 5c: Verkürzungsfraktion in Ruhe.....	26
Abbildung 5d: Verkürzungsfraktion nach Isoprenalininjektion.....	26
Abbildung 6a: Schlagvolumen in Ruhe	27
Abbildung 6b: Schlagvolumen nach Isoprenalininjektion	27
Abbildung 7a: Linksventrikulärer Innendurchmesser in Ruhe in der Systole.....	28
Abbildung 7b: Linksventrikulärer Innendurchmesser in der Systole nach Isoprenalin ..	28
Abbildung 7c: Linksventrikulärer Innendurchmesser in Ruhe in der Diastole.....	28
Abbildung 7d: Linksventrikulärer Innendurchmesser in der Diastole nach Isoprenalin ..	28
Abbildung 8a: Dicke des interventrikulären Septums in der Systole in Ruhe	29
Abbildung 8b: Dicke des interventrikulären Septums in der Systole nach Isoprenalin..	29
Abbildung 9a: Linksventrikuläre Hinterwanddicke in der Systole in Ruhe	30
Abbildung 9b: Linksventrikuläre Hinterwanddicke in der Systole nach Isoprenalin	30
Abbildung 10a: Systolische Dickenzunahme des Septums interventrikulare in Ruhe ..	31
Abbildung 10b: Systolische Dickenzunahme des Septums interventrikulare nach Isoprenalin	31
Abbildung 11a: Systolische linksventrikuläre Dickenzunahme der Hinterwand in Ruhe	32
Abbildung 11b: Systolische linksventrikuläre Dickenzunahme der Hinterwand nach Isoprenalin	32
Abbildung 12: Herzfrequenz in Ruhe	32
Abbildung 13a: Frühdiastolische Flussgeschwindigkeit (E) durch die Mitralklappe	34
Abbildung 13b: Frühdiastolische Myokardbewegungsgeschwindigkeit (E') in Ruhe	34
Abbildung 13c: Linksventrikulärer Füllungsindex' (E/E')	34
Abbildung 14: Isovolumetrische Relaxationszeit	35
Abbildung 15: Tei-Index	36
Abbildung 16: Dezelerationszeit der E-Welle in Ruhe	36
Abbildung 17: Volumen-Zeit-Integral der Aorta ascendens	37

Abbildung 18: Volumen-Zeit-Integral der Aorta descendens	38
Abbildung 19: Volumen-Zeit-Integral der Arteria pulmonalis	39
Abbildung 20: Longitudinaler Strain der mittleren Segmente der posterioren Myokardwand.....	40
Abbildung 21a: Exemplarische Darstellung eines Western Blots	43
Abbildung 21b: Expression der PP2A.....	43
Abbildung 21c: Expression der PP2C.....	43
Abbildung 22: Expression des Gesamtphospholambans.....	44
Abbildung 23: Fotodokumentation der Herzgröße	46
Abbildung 24a: Histologische Färbung (Hämatoxylin-Eosin)	48
Abbildung 24b: Histologische Färbung (Masson-Goldner-Trichrom).....	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Ablaufprotokoll	21
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper	22
Tabelle 3: Dicke des interventrikulären Septums (IVS) in der Diastole	30
Tabelle 4: Dicke der linksventrikulären Hinterwand (LVPW) in der Diastole	31
Tabelle 5: Herzfrequenz nach intraperitonealer Isoprenalininjektion	33
Tabelle 6: Verhältnis von frühdiastolischer Myokardbewegungsgeschwindigkeit (E') und spätdiastolischer aktiver Bewegungsgeschwindigkeit (A')	35
Tabelle 7: Verhältnis E/A	37
Tabelle 8: Spitzenflussgeschwindigkeiten durch Aorta ascendens	38
Tabelle 9: Spitzenflussgeschwindigkeiten durch Aorta descendens	39
Tabelle 10: Spitzenflussgeschwindigkeiten durch Arteria pulmonalis	40
Tabelle 11: Überblick über linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD), Ejektionsfraktion (EF) und Verkürzungsfraktion (FS) im Zusammenhang mit den Kriterien der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)	41
Tabelle 12: Darstellung der Messwerte von SERCA, PP5 und Tnl	44
Tabelle 13: Laborchemische Ergebnisse	45
Tabelle 14: Darstellung der gemessenen Organ- und Körpergewichte	46

1. Einleitung

Die Herzinsuffizienz stellt in der westlichen Welt eine der häufigsten Todesursachen dar und gehört zu den Erkrankungen, die mit erheblichen Einschränkungen im Alltag einhergehen. (Go et al., 2013, Metra et al., 2017). Die Genese der Herzinsuffizienz ist multifaktoriell, so liegt bei der überwiegenden Anzahl der Fälle ein Untergang von Herzmuskelgewebe infolge einer Durchblutungsstörung zugrunde. Aber auch jede andere strukturelle und funktionelle Störung, etwa Formen der Kardiomyopathie, können zu einer Herzinsuffizienz führen. Die verfügbaren Standardtherapien beruhen auf dem Einsatz von inotrop wirksamen Substanzen, Vasodilatoren und Schleifendiuretika in Verbindung mit Inhibitoren des Angiotensin-konvertierenden Enzyms und β -Adrenorezeptorblockern (Ponikowski et al., 2016). Trotz dieser Evidenzbasierten Therapien muss jedoch konstatiert werden, daß die 1-Jahres Sterblichkeitsrate der Herzinsuffizienz nur geringfügig verbessert werden konnte (Benjamin et al., 2017). Dies zeigt den nach wie vor großen Bedarf an neuen Ansätzen zur Behandlung der Herzinsuffizienz.

Bereits im Jahr 1997 wurde gezeigt, daß bei terminaler Herzinsuffizienz die Aktivität von Protein-Phosphatasen (PP) erhöht ist, welche u.a. die regulatorischen Proteine des Kalziumhaushaltes von Kardiomyozyten dephosphorylieren und damit die Konzentration von freiem Kalzium im Intrazellularraum beeinflussen, von der wiederum die Kontraktionskraft des Herzmuskels abhängt (Neumann et al., 1997). Im Folgenden soll dieser Mechanismus detaillierter beleuchtet werden (siehe auch Abb. 1).

Wenn Herzmuskelzellen durch einen Reiz, der normalerweise aus dem Sinusknoten stammt, depolarisiert werden, öffnen sich spannungsabhängige L-Typ-Kalzium-Kanäle (LTCC). Dies ermöglicht das Einströmen des für die Kontraktion der Kardiomyozyten benötigten freien intrazellulären Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum. Durch die damit erfolgende Kalziumbindung am Ryanodin-Rezeptor (RyR2) des sarkoplasmatischen Retikulums wird eine kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung (Fabiato und Fabiato, 1975; Niggli, 2013) vermittelt, die nunmehr die zur Kontraktion benötigten weiteren 70% des Ca^{2+} zur Verfügung stellt.

Im ruhenden Herzmuskel hindert der Tropomyosin-Troponin-Komplex die Aktin-Myosinfilamentinteraktion, indem Tropomyosin die Bindungsstelle des Myosinköpfchens am Aktin verdeckt. Freies intrazelluläres Ca^{2+} bindet am Troponin C des kontraktile Apparates, wodurch das Tropomyosin, welches das Anheften von Aktinfilamenten am Myosinköpfchen verhindert, eine Konformationsänderung erfährt und die Bindungsstelle des Myosinköpfchens freigibt (Pearson et al., 1988). Nun kann der Querbrückenzyklus beginnen. Die Myosinköpfchen besitzen Aktin- und ATP-Bindungsstellen. In

Abwesenheit von ATP sind sie fest mit Aktin verbunden. Durch ATP-Bindung lösen sie sich und Myosin kann seine ursprüngliche 90°-Konformation einnehmen. Das freie Myosinköpfchen hydrolysiert ATP zu ADP und Phosphat und bewegt sich einige Aktinmoleküle weiter voran. Die ADP-Abgabe bewirkt wiederum eine weitere Konformationsänderung und verschiebt die Filamente gegeneinander.

Im Sarkoplasmatischen Retikulum ist Ca^{2+} an Calsequestrin (CSQ2) gebunden. Freies CSQ2 bindet am Ryanodin-Rezeptor und inhibiert die weitere Ca^{2+} -Freisetzung. Für die Verminderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich ist die ATP-abhängige Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA), die Ca^{2+} zurück in das sarkoplasmatische Retikulum transportiert. Die abnehmende Ca^{2+} -Konzentration bewirkt eine Dissoziation des Ca^{2+} vom Troponin C, wodurch ein weiterer Querbrückenzyklus verhindert wird.

Die Aktivität der SERCA wird reguliert durch ihre Bindung an Phospholamban (PLB). PLB bindet im dephosphorylierten Zustand an die SERCA und hemmt diese. Durch Phosphorylierung von PLB wird die SERCA aktiv und beschleunigt so die Relaxation der Herzmuskelzellen. Die Phosphorylierung des PLB erfolgt durch die Proteinkinase A (PKA) und die Ca^{2+} -/Calmodulinabhängige Proteinkinase II (CaMKII). Die Dephosphorylierung wird durch Proteinphosphatasen gewährleistet (Aye et al., 2012). Damit Organismen kurzfristig und flexibel auf Veränderungen reagieren können, werden viele zelluläre Prozesse durch das Zusammenspiel von phosphorylierenden Proteinkinasen und dephosphorylierenden Proteinphosphatasen gesteuert. Dies bewirkt eine Änderung der Proteineigenschaften, der Bindungseigenschaften durch Konformationsänderung oder erhöhte bzw. erniedrigte enzymatische Aktivität (Cohen, 2002; Hunter, 1995).

Bei Eukaryoten findet Phosphorylierung zu mehr als 98% an Serin- und Threoninresten statt. Serin- bzw. Threoninphosphatasen dephosphorylieren Phosphoserin bzw. Phosphothreonin und können in sieben Gruppen unterschieden werden (Shenolikar, 1991; Chen et al., 2017). Dabei machen die Proteinphosphatase 1 (PP1) und Proteinphosphatase 2A (PP2A) circa 90% der Phosphataseaktivität im Herzen aus (Cohen, 1989; Herzig und Neumann, 2000). Proteinphosphatasen bestehen aus verschiedenen Untereinheiten wie einer katalytischen und verschiedenen regulatorischen Einheiten. Das Holoenzym der PP2A ist ein Heterotrimer aus Kernenzym und regulatorischer Untereinheit (B-Unit). Das heterodimere Kernenzym besteht aus einer strukturellen (A-Unit) und einer katalytischen (C-Unit) Untereinheit. Von jeder Untereinheit existieren zwei bis fünf Isoformen (Shi, 2009). Die PP2A wurde als wichtiger Modulator vieler zellulärer Prozesse wie der Regulation von Ionenkanälen und Transportern, der Apoptose, Transkription, Entwicklung, Zell-Zell-Kommunikation

und der Erregungs-Kontraktions-Kopplung identifiziert (Herzig und Neumann, 2000; Niggli et al., 2013). Ebenso konnte gezeigt werden, daß sie im Herzen bei der Regulierung des β -Adrenorezeptors, Natrium/Kalzium-Austauschers (NCX1), L-Typ-Kalzium-Kanals (LTCC), Ryanodin-Rezeptors (RyR2), Phospholamban (PLB), Troponin I (TnI) und der Myosin-Leichtkette 2 (MLC-2) als wichtige Moleküle der Myokarderregung und -kontraktion beteiligt ist (Macdougall et al., 1991; Marx et al., 2000; Schulze et al., 2003; Ai und Pogwizd, 2005; Hall et al., 2006; Deshmukh et al., 2007).

Die bisher weniger untersuchte PP2C gehört zu den metallionenabhängigen Proteinphosphatasen und benötigt Mn^{2+}/Mg^{2+} für ihre Aktivität. Die katalytische Untereinheit der PP2C besteht aus einem zentralen β -Sandwich umgeben von α -Helices (Das et al., 1996). Ihre Aufgabe besteht in der Regulation des Stresssignalweges, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums, der Apoptose und des Metabolismus (Lu und Wang, 2008).

Das Gleichgewicht zwischen Proteinkinasen und Proteinphosphatasen ist entscheidend für eine normale Zellfunktion in allen Geweben, so auch im Herzen. Ein Ungleichgewicht kann Fehlfunktionen und Erkrankungen verursachen (Cohen, 2001).

Teile dieser Arbeit sind bereits Bestandteil einer akzeptierten Publikation (Bollmann et al., 2021), die sich mit der Überexpression der Proteinphosphatase 2C im Herzen von transgenen Mäusen beschäftigt.

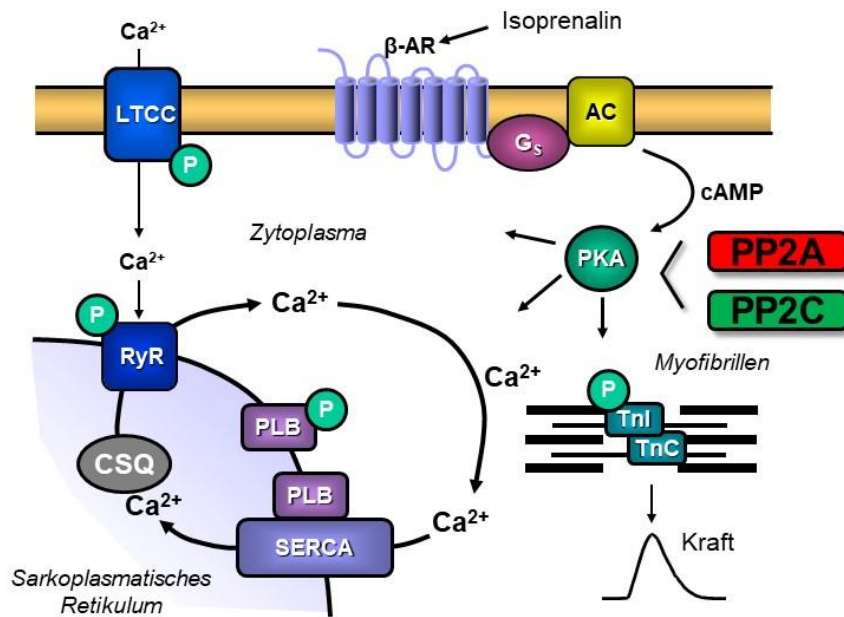


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zusammenspiels von Kinasen und Phosphatasen im Herzmuskel: Durch einen Reiz, z.B. aus dem Sinusknoten, depolarisiert die Herzmuskelzelle und es strömen Kalziumionen über den L-Typ Kalziumkanal ins Zellinnere. Diese stehen zum einen für eine Kontraktion bereit und ermöglichen zum anderen dem Ryanodin-Rezeptor weitere Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freizugeben. Die Aufgabe der SERCA besteht darin, die Kalziumionen nach erfolgter Herzmuskelkontraktion wieder ins sarkoplasmatische Retikulum zurück zu befördern. Die SERCA wird durch Phospholamban im unphosphoryliertem Zustand gehemmt. Die Phosphorylierung von Phospholamban wird durch die PKA gewährleistet. Für die Dephosphorylierung sind Phosphatasen verantwortlich, wodurch die Aktivität der SERCA gehemmt wird.

AC: Adenylylzyklase; β -AR: β -Adrenorezeptor; Gs: stimulierendes G-Protein; LTCC: L-Typ Kalziumkanal; PKA: cAMP-abhängige Proteinkinase A; PLB: Phospholamban; RyR: Ryanodin-Rezeptor; SERCA: Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums; TnI: Troponin I.

2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle von Proteinphosphatasen im Zusammenhang mit der kardialen Funktion untersucht werden. Bekannt ist, daß die Überexpression der PP1 zu eingeschränkter kardialer Kontraktilität, erhöhtem relativen Herzgewicht, vergrößertem Ventrikeldurchmesser und zur Fibrose (Carr et al., 2002) führt. Von der PP2A ist bekannt, daß sie bei Überexpression ebenfalls zu kardialer Hypertrophie, teilweise begleitet von Nekrosen und Fibrose, führt und letztlich eine Herzinsuffizienz verursachen kann (Gergs et al., 2004). In dieser Arbeit soll ergründet werden, welchen Einfluss die durch eine genetisch bedingte Überexpression verursachte erhöhte Phosphataseaktivität von PP2A und/oder PP2C auf die Ausbildung der Herzinsuffizienz ausübt. Dazu werden Mausmodelle genutzt, die entweder die PP2A, die PP2C oder beide Proteinphosphatasen herzspezifisch überexprimieren und mit dem Wildtyp verglichen. Die Mäuse der jeweiligen Gruppen sollen hämodynamisch mittels Echokardiografie im Alter von vier, fünf und sechs Monaten untersucht werden. Anschließend werden molekularbiologische, laborchemische und histologische Untersuchungen durchgeführt. Außerdem soll herausgefunden werden, welche Auswirkungen die Überexpression von Phosphatasen auf die Stressreaktion hat. Der kardiale Stress soll durch intraperitoneale Gabe des positiv inotrop und chronotrop wirkenden β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin erzeugt werden. Echokardiografisch soll vor allem geklärt werden, ob die Überexpression der Proteinphosphatasen die linksventrikuläre Funktion beeinflusst und wie diese sich im zeitlichen Verlauf verändert. Die molekularbiologische Untersuchung soll klären, inwieweit die Proteine der intrazellulären Kalziumhomöostase involviert sind und welche Signalwege durch die Überexpression der Proteinphosphatasen beeinflusst werden. Die ebenfalls durchgeführten histologischen Untersuchungen sollen der Erkennung von Fibrosen und Nekrosen als mögliche Zeichen einer kardialen Hypertrophie dienen.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein besseres Verständnis über die intrazellulären Abläufe bei Herzerkrankungen wie Kardiomyopathien, Herzmuskelhypertrophien oder der Herzinsuffizienz zu erlangen und damit auch zur Entwicklung neuer Therapieansätze beizutragen.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Versuchstiere waren Mäuse der Auszuchtlinie CD1 (auch als ICR bezeichnet). Es wurden ähnlich viele männliche und weibliche Tiere ausgewählt und ihr Alter betrug zu den echokardiographischen Untersuchungen vier, fünf und sechs Monate. Das Körpergewicht belief sich nach sechs Monaten bei den weiblichen Mäusen im Durchschnitt auf $29,7 \pm 0,54$ g und bei den männlichen Tieren durchschnittlich auf $38,4 \pm 0,67$ g. Die Tiere wurden geschlechtergetrennt gehalten und mit Labortierfutter (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum versorgt. Die Tierversuche wurden unter Beachtung der Richtlinien und Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt.

3.2 Tiermodell

Neben Wildtypmäusen wurden in den Experimenten transgene Mäuse verwendet, die entweder die katalytische Untereinheit α der murinen Proteinphosphatase 2A (Gergs et al. 2004), die katalytische Untereinheit β der Rinder (*Bos taurus*) Proteinphosphatase 2C (Bollmann et al., 2021) oder beide Proteinphosphatasen gleichzeitig herzspezifisch überexprimieren (Doppelt-Transgen = DT).

Die kodierenden Sequenzen der Proteinphosphatasen wurden mittels RT-PCR isoliert. Mithilfe von Restriktionsendonukleasen wurde die cDNA aus dem RT-PCR-Produkt herausgeschnitten und in eine Expressionskassette eingefügt (Abb. 2). Als Promotor diente die α -Isoform der schweren Kette des Myosins (α -MHC), wodurch die Zielsequenz unter der gewebsspezifischen Kontrolle des Promotors eingesetzt werden konnte. Der α -MHC-Promoter wird erst nach der Geburt durch mauseigene Schilddrüsenhormone aktiv und erreicht nach circa zwei Wochen seine vollständige Aktivität. Dadurch können pränatale Einflüsse auf die Tier- und Herzentwicklung weitgehend ausgeschlossen werden. Zur Terminierung der Transkription enthielt die Kassette eine SV40-Polyadenyl-Signalsequenz. Diese Expressionskassette konnte nun in befruchtete Eizellen von Mäusen des CD1-Stammes injiziert werden.

Als Kontrollen wurden gleichaltrige Wildtyp (WT)-Geschwistertiere verwendet.

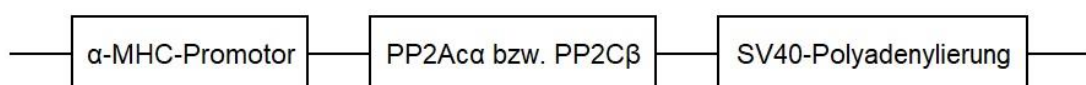


Abbildung 2: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskassetten.

3.3 Herzfunktion in vivo

3.3.1 Sedierung und Vorbereitung der Tiere

Die Sedierung der Tiere erfolgte durch eine Inhalationsnarkose mit einem Gemisch aus 1,5 Vol.-% Isofluran und Sauerstoff mit einem Fluss von 1,5 l/min zuerst zur Narkoseeinleitung in einem geschlossenen Becherglas. Nachdem die Maus das Bewusstsein verloren hatte, wurde sie in Rückenlage mit Kunstseidenpflaster (Transpore 3M) an den Extremitäten auf dem beheizbaren Untersuchungstisch fixiert (Abb. 3). Während der gesamten echokardiografischen Untersuchung wurde die Narkose durch kontinuierliche Gabe des Narkosegasgemisches mit 1,5 Vol.-% Isofluran und einem 1,5 l/min Sauerstofffluss aufrechterhalten und mit einem über den Untersuchungstisch abgeleiteten Echokardiogramm überwacht. Zur Verbesserung der Bildqualität wurde das Fell der Tiere im Bereich des Brustkorbes mittels Rasierer und Enthaarungscreme (Firma Veet) entfernt. Zur Erhaltung der Körpertemperatur der Versuchstiere wurde sowohl das Ultraschallkontaktgel erwärmt als auch der Untersuchungstisch beheizt und die Körpertemperatur durch eine rektal applizierte Temperatursonde überwacht.

3.3.2 Echokardiografie

Die transthorakale Echokardiografie erfolgte mit einem speziell für kleine Labortiere entwickelten Vevo 2100 Ultraschallgerät der Firma VisualSonics (FUJIFILM, Toronto, Canada). Da nur eine geringe Eindringtiefe der Schallwellen erforderlich war, konnte zugunsten einer besseren Ortsauflösung eine höhere Ultraschallfrequenz gewählt werden. Dazu kam ein 10 MHz-Schallkopf der Firma VisualSonics (FUJIFILM, Toronto, Canada) zum Einsatz. Zur Dokumentation dienten anschließend die berechneten Mittelwerte dieser drei Werte. Auch die Anlotung des Schallstrahls erfolgte jeweils aus den gleichen Richtungen und Winkeln. Zunächst erfolgten Aufnahmen im Brightness-Mode (B-Mode), bei dem die reflektierten Ultraschallwellen als Graustufen dargestellt werden, und im Motion-Mode (M-Mode), bei dem die Echoamplituden auf der vertikalen Achse gegen die Zeit auf der horizontalen Achse aufgetragen werden können. Im B- und M-Mode wurde jeweils die parasternal lange und kurze Achse aufgenommen, wobei in der langen Achse auf die Abbildung von Herzspitze und Aortenabgang geachtet wurde. Die parasternal kurze Achse wurde in Höhe der Papillarmuskeln in Ventrikel Ebene aufgezeichnet, wobei das Ventrikellumen möglichst kreisrund und die Papillarmuskeln bei fünf und sieben Uhr zur Abbildung kamen. Dort wurde auch eine Messung mittels Gewebedoppler (TDI) an der linksventrikulären Hinterwand (LVPW) durchgeführt. Beim M-Mode wurde darauf geachtet, daß die Anlotung senkrecht zum Septum

interventrikuläre erfolgte, um Winkelfehler zu vermeiden. Alle Messungen wurden jeweils an bzw. während dreier Herzaktionen vorgenommen und das arithmetische Mittel der Messwerte als Einzelwert verwendet. Durch Dopplertechnik wurde die Messung der Flussgeschwindigkeiten durch Aorta ascendens, Aorta descendens, Arteria pulmonalis und die Vena cava durchgeführt.

Grundlage der Dopplertechnik ist die mechanische Ausbreitung von Schallwellen. Treffen die Schallwellen auf ein unbewegtes Objekt, werden sie mit gleicher Frequenz reflektiert. Treffen sie auf ein bewegtes Objekt, wie die Erythrozyten im Blutstrom, so ändert sich die Frequenz der reflektierten Welle. Bewegt sich das Objekt auf den Schallkopf zu, werden die Wellenbewegungen des zurückgeworfenen Schallstrahls schneller und die reflektierte Frequenz ist höher als die Ausgangsfrequenz. Aus der Differenz der Frequenzen, dem sogenannten Dopplershift, berechnet sich die Geschwindigkeit des Blutflusses. Analog dazu ist die reflektierte Frequenz geringer, wenn sich ein Objekt vom Schallkopf wegbewegt.

Die Darstellung des Flusses durch die Mitralklappe konnte durch die epigastrische Einstellung, die dem Vierkammerblick entspricht (Stypmann, 2007), ermöglicht werden (Abb. 3a). Veränderungen der linksventrikulären Füllung und damit der diastolischen Funktion des linken Ventrikels können mithilfe des Blutflusses durch die Mitralklappe erkannt werden. Hierzu wird das Verhältnis des Flusses der frühdiaastolischen, passiven Ventrikelfüllung (E) und des Flusses der spätdiaastolischen, aktiven Ventrikelfüllung (A) bestimmt. Dieses Verhältnis ist ein wesentlicher Bestandteil der echokardiografischen Klassifikation der diastolischen Funktion nach Khouri et. al, 2004.

Zudem wurden Aufnahmen der parasternal kurzen und langen Achse im B- und M-Mode, des posterioren Papillarmuskels mittels Gewebedoppler und des Flusses durch die Arteria pulmonalis unter β -adrenerger Stimulation angefertigt. Als β -adrenerger Stimulus diente das nicht selektive β -Sympathomimetikum Isoprenalin, wovon 100 μ l (10 mM) intraperitoneal injiziert wurden. Die Auswertung der Aufnahmen mit der Vevo 2100 Software ermöglichte unter anderem die Bestimmung der Herzfrequenz, der Ejektionsfraktion, des Ventrikeldurchmessers, des Auswurfvolumens und der Flüsse durch die o. g. Gefäße. Mithilfe der erhobenen Parameter konnte eine Aussage über die Herzfunktion im Verlauf des Untersuchungszeitraumes getroffen werden. Aus den Messwerten des enddiastolischen und endsystolischen Innendurchmessers (LVEDD bzw. LVESD) konnte die linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS), ein für die Abschätzung der globalen Funktion des linken Ventrikels ebenso wichtiger Wert wie die Ejektionsfraktion, errechnet werden.

$$FS = \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} \times 100$$

Aus den gemessenen Wandstärken kann als sensitives und spezifisches Kriterium für Kontraktilitätsstörungen die systolische Dickenzunahme, fractional thickening (FT), des interventrikulären Septums und der linksventrikulären Hinterwand nach folgender Formel berechnet werden (Hein, 1996):

$$FT = \frac{IVS_{systolisch} - IVS_{diastolisch}}{IVS_{diastolisch}} \times 100 \quad \text{bzw.} \quad FT = \frac{LVPW_{systolisch} - LVPW_{diastolisch}}{LVPW_{diastolisch}} \times 100$$

Aus den Zeiten der isovolumetrischen Kontraktion (IVCT) und Relaxation (IVRT) und der linksventrikulären Ejektionszeit (LVET) kann der Tei-Index als Routineparameter der systolischen und diastolischen Funktion errechnet werden (Tei et al., 1997).

$$Tei - Index = \frac{IVCT + IVRT}{LVET}$$

Zur Bestimmung der Verkürzung bzw. Verdickung eines myokardialen Segmentes wurde, als sogenannter Deformationsparameter, der Strain bestimmt. Er ist eine dimensionslose Größe und wird in Prozent angegeben. Die Berechnung des Strains erfolgt mit Hilfe folgender Formel:

$$Strain = \frac{(Länge(enddiast.) - Länge(endsyst.))}{Länge(enddiast.)}$$

Dabei lässt sich die Kontraktionsbewegung in drei wesentliche Komponenten aufteilen: eine longitudinale Kontraktion, also eine Verkürzung entlang der Ventrikellängsachse, eine zirkumferenzielle Kontraktion, die eine tangentielle Verkürzung im Querschnitt entsprechend einer Verkleinerung des Ventrikeldurchmessers in der kurzen Achse darstellt, und eine radiale Kontraktion, die die Verdickung des Myokards während der Kontraktion in der kurzen Achse abbildet. Entsprechend dieser drei Komponenten kann man einen longitudinalen, zirkumferenziellen und radialen Strain beschreiben. Zur Messung der Deformationsparameter wird die sogenannte „Speckle Tracking Technologie“ verwendet. Dabei macht man sich natürliche akustische Marker im Myokard zunutze, die als „Speckles“ (Flecken) bezeichnet werden. Sie entstehen durch die Streuung der Ultraschallstrahlen an kleinen Strukturen und verleihen dem Myokard seine spezifische Textur. Während eines Herzzyklus bewegen sich innerhalb des beobachteten Bereichs diese Flecken relativ zu- bzw. auseinander. Aus diesen räumlichen Verlagerungen wird mittels der oben angeführter Formel der Strain für die jeweiligen myokardialen Segmente berechnet.

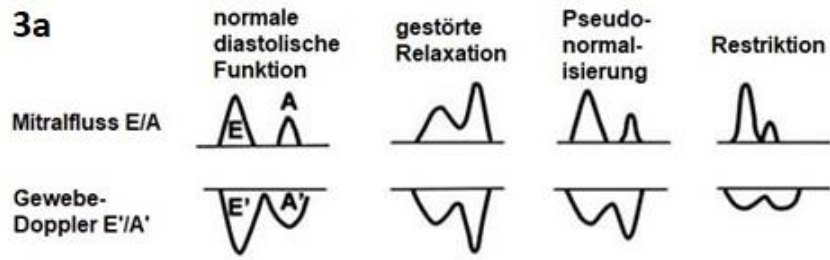


Abbildung 3a: Echokardiografische Klassifikation der diastolischen Dysfunktion nach Khouri et al.,2004. 3b: Echokardiografischer Arbeitsplatz.

3.4 Organentnahme

Die Organentnahme wurde direkt im Anschluss an die Echokardiografie im Alter von sechs Monaten durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Körpergewicht bestimmt und eine tiefe Bewusstlosigkeit durch intraperitoneal appliziertes Pentobarbital erzeugt. Ein Atemstillstand wurde dabei nicht hervorgerufen, um die Sauerstoffversorgung des Herzens so lange wie möglich aufrecht zu erhalten. Die übliche Dosis betrug dabei 50-75 mg/kg Körpergewicht. Danach wurde das Versuchstier an den Extremitäten fixiert und – nach Entfernung von Fell und Haut im Thoraxbereich – der Brustkorb von ventral eröffnet. Nach Durchtrennung der ventralen Rippenbögen wurden das Sternum und die Rippen nach kranial aufgeklappt, um einen guten Einblick in den Thoraxsitus zu erhalten. Nun konnte das Herz entfernt und Blutreste vorsichtig aus den Ventrikeln gepresst werden. Dennoch handelte es sich um Feuchtpräparate, da um ein zügiges Einfrieren zu gewährleisten die Herzen nicht komplett getrocknet werden konnten. Das makroskopische Bild wurde mittels Fotodokumentation festgehalten. Der linke und rechte Vorhof wurden abpräpariert und separat gewogen. Neben den beiden Ventrikeln wurden ebenfalls die Lungen und die Leber freipräpariert und gewogen. Nach dem Wiegen wurden die entnommenen Präparate zügig in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C tiefgefroren. Nach dem Durchtrennen der Aorta wurde außerdem ein 2 ml EDTA-Blutentnahmeröhrchen mit Vollblut gefüllt und das abzentrifugierte Serum ebenfalls bei -80 °C eingefroren.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 DNA-Isolation

Zur Genotypisierung wurde jedem Versuchstier im Alter von 4 Wochen ein circa 5 mm langes Schwanzstück entnommen. Gleichzeitig erhielten die Tiere eine Ohrmarkierung zur eindeutigen Identifizierung. Zur DNA-Isolation wurden die Schwanzspitzen mit 250 µl Extraktionspuffer versetzt und über Nacht schüttelnd bei 56 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 250 µl Neutralisierungspuffer hinzugefügt und das Gemisch gevortext, um das fertige Template zu erhalten. Die Zusammensetzungen der Pufferlösungen sind im Anhang beschrieben.

3.5.2 PCR und Agarosegelelektrophorese

Die gesuchten DNA-Abschnitte der Proteinphosphatasen 2A und 2C wurden jeweils durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Zur Durchführung der PCR wurde die extrahierte DNA mit einem speziellen Reaktionsansatz in einem 0,2 ml PCR-Gefäß inkubiert. Jede Probe enthielt 8 µl 2-fach destilliertes Wasser, 0,5 µl Forward-

Primer, 0,5 µl Reverse-Primer und 10 µl einer thermostabilen Taq-DNA-Polymerase. Zu dem Gemisch kamen nun 1 µl des aus der DNA-Isolation gewonnenen Templates hinzu. Der fertige Ansatz wurde im Thermocycler nach Protokoll (siehe 9.3, Tab. 1) amplifiziert. Die PCR-Produkte können in einer Agarosegelelektrophorese beurteilt werden, da kleine Moleküle im elektrischen Feld schneller wandern als große. Zur Beurteilung der Länge der DNA-Fragmente wurden zusätzlich ein Marker sowie eine Positiv- und Negativkontrolle aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit einem 1%igen Agarosegel in einer TAE-Pufferlösung. Bei einer Stromstärke von 80 mA liefen die Proben circa 45 min. Unter UV-Licht konnten die mit dem interkalierenden Farbstoff SafeRed gefärbten DNA-Banden sichtbar gemacht und einem Genotyp zugeordnet werden.

3.6 Biochemische Methoden

3.6.1 Homogenisierung der Proben

Die Homogenisierung dient der Freisetzung der zu untersuchenden Proteine aus den entnommenen Ventrikeln der Versuchstiere. Hierzu wurden die entnommenen Gewebe im tiefgefrorenen Zustand eine Minute im Mikro-Dismembrator S bei 2700 rpm mechanisch zu Gewebepulver zerkleinert. Anschließend wurden dem Pulver 300 µl Homogenisationspuffer (NaHCO₃-SDS-Puffer) hinzugefügt. Dieses Gemisch wiederum wurde drei Mal 15 Sekunden mit dem Ultraschall-Homogenisator UW 2070 der Firma BANDELIN electronic weiter homogenisiert. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Homogenat ebenfalls 30 Minuten lang bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand (= Homogenat) wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

3.6.2 Bestimmung des Proteingehaltes der Homogenate

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration der Homogenate wurde die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) angewandt. Die Proben und die Eichkurve wurden als Dreifach-Ansatz angefertigt. Als Proteinstandard für die Eichkurve diente Rinderserumalbumin. Die Extinktionen wurden bei 595 nm an einem Eppendorf BioPhotometer bestimmt.

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der zu untersuchenden Proteine nach Molekülmasse wurde eine SDS-Gelelektrophorese in einem Polyacrylamidgel durchgeführt, wobei Natriumdodecylsulfat (SDS) zum Überdecken der Eigenladung der Proteine diente. Um eine Beladung der Geltaschen mit dem gleichen Volumen zu erreichen, wurden die Proben entsprechend des Proteingehaltes mit Homogenisationspuffer auf eine einheitliche Konzentration von

2 µg/µl verdünnt und im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer nach Lämmli (1970) gemischt (Endkonzentration: 1 µg/µl). Anschließend wurden die Proteingemische 10 Minuten bei 95 °C erhitzt um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Unterbrechung von Wasserstoffbrücken aufzulösen. Die Polyacrylamid-Gele bestanden aus einem Sammelgel (4 %) und einem Trenngel (10 %). Auf jedem Gel wurden 28 µl eines Proteinstandards mit Proteinen der Massen 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18,4 kDa und 14,4 kDa aufgetragen. Neben 60 µl Probengemisch je Spur lief auf jedem Gel eine Referenzprobe eines WT-Versuchstieres. Die Elektrophorese lief bei 40 mA pro Gel in einer Hoefer SE 600 vertikalen Elektrophorese-Einheit circa vier Stunden bis der anionische Farbstoff Bromphenolblau der Laufmittelfront am unteren Rand der Elektrophorese-Einheit ankam. Als Stromquelle diente das BIO-RAD Power Pac HC. Die Temperatur des gesamten Systems von 4 °C wurde durch ein Julabo F12 Kühler sichergestellt.

3.6.4 Western Blot

Die bei der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine sollten nun vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden, um sie in einem weiteren Schritt immunologisch nachweisen zu können. Dies geschieht, indem ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt wird, wodurch die mit SDS-beladenen und negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode (Plus-Pol) wandern. Durch ionische und polare Wechselwirkungen bleiben die Proteine auf der Nitrocellulosemembran haften. Der Transferprozess findet in einer Transferkassette statt, die folgendermaßen aufgebaut ist (von Anode zu Kathode): Blotting-Schwamm, Filterpapier, Nitrozellulosemembran, Polyacrylamid-Gel, Filterpapier und wieder ein Blotting-Schwamm. Diese Transfer-Kassette wurde in eine BIO-RAD Trans-Blot Cell, die mit Transferpuffer gefüllt war, überführt und lief für 16 Stunden bei konstantem Strom von 250 mA bei einer Temperatur von 4 °C. Die Stromversorgung und die Kühlung wurden von den selben Geräten wie bei der Elektrophorese gewährleistet. Nach dem Transfer erfolgte die reversible Färbung aller übertragenen Proteine als Ladekontrolle mit Ponceau-Rot.

3.6.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die mit Ponceau-Rot gefärbten Membranen wurden entsprechend der zu erwartenden Molekulargewichte der nachzuweisenden Proteine zugeschnitten. Als Ladungskontrolle und als Bezugsquelle für den relativen Proteingehalt dienten Calsequestrin (CSQ) (Movsesian et al., 1994) bzw. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Auf den Zuschnitt folgte das zehnmünütige Herunterwaschen des roten Ponceau-Farbstoffes mit TBST-Puffer. Sämtliche Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einer horizontalen Schüttelplattform. Der Waschvorgang wurde drei Mal wiederholt. Die freien unspezifischen Bindungsstellen der gewaschenen Membranen wurden anschließend mit Milchpulver oder bovinem Serumalbumin (BSA) blockiert. Die Art und Konzentration des Blockierungspuffers richtete sich nach dem verwendeten Antikörper zum Proteinnachweis (siehe Tab. 2). Nach der zweistündigen Inkubationszeit des Blockierungspuffers wurde der erste Antikörper, der spezifisch an dem gesuchten Protein binden soll, bei 4 °C über Nacht auf die Membran aufgebracht. Anschließend wurde die Membran wieder drei Mal für 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Zum Nachweis des ersten Antikörpers wurde ein zweiter alkalische Phosphatase-gekoppelter Antikörper, der am F_c-Ende des ersten Antikörpers bindet, für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Blot inkubiert. Zur quantitativen Auswertung der gebundenen Antikörper wurde zunächst die Membran drei Mal 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und zweimal 2 Minuten mit AP-Puffer äquilibriert und im Folgenden 5 Minuten mit dem alkalische Phosphatase-Substrat ECF ohne Schütteln inkubiert. Die Dephosphorylierung von ECF setzt einen wasserunlöslichen Fluoreszenzfarbstoff frei, der sich an der Stelle seiner Entstehung auf der Membran niederschlägt und mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden kann. Das Emissionsmaximum liegt bei 532 nm. Das Auslesen der Blots erfolgte mit dem Fluoreszenzscanner Typhoon 9410 Variable Mode Imager der Firma GE Healthcare mit den für ECF geeigneten Filtereinstellungen. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Proteinbanden wurden mit der Software ImageQuant quantifiziert und mit den Intensitäten von CSQ bzw. GAPDH ins Verhältnis gesetzt.

3.7 Histologie

Zur Darstellung möglicher Veränderungen des Myokards wurden von jedem Genotyp histologische Präparate angefertigt. Im Rahmen der Organentnahme wurde dazu je Genotyp eine Herzspitze entfernt und in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Hämatopathologie Hamburg wurden Färbungen der Präparate angefertigt und mittels immunhistochemischer Methode untersucht (Buchwalow et al., 2011). Dazu wurden die Präparate routinemäßig in Paraffin eingebettet und in 4 µm dicke Schichten geschnitten. Diese wurden wiederum mit Ethanol und Xylen deparaffinisiert, um sie mit Hämatoxylin-Eosin und Masson-Goldner-Trichromfärbung einzufärben.

Zum Nachweis der Überexpression der Proteinphosphatasen erfolgte die immunhistochemische Untersuchung mit den primären Antikörpern Anti-PP2A alpha und beta (AbCam, #ab32141, Verdünnung 1:10) sowie Anti-PP2C / PPM1B Antikörper (Proteintech, #13193-1-AP, Verdünnung 1:50).

3.8 Laborchemische Methoden

Während der Organentnahme nach der letztmaligen echokardiografischen Untersuchung wurde von den Versuchstieren Vollblut gewonnen. Nach dem Durchtrennen der Aorta wurde ein 2 ml EDTA-Blutentnahmeröhrchen mit Blut gefüllt. Dieses wurde 20 min bei 2300 g zentrifugiert um circa 150 µl Serum zur Analyse zu erhalten. Der Überstand, das Serum, wurde abpipettiert und bei -80 °C eingefroren. Die entnommenen Serumproben der Versuchstiere wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle (Saale) auf die Konzentrationen von Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff und Aspartat-Aminotransferase (ASAT) untersucht.

3.9 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten sind als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Dabei ist „n“ die Anzahl der Einzelversuche. Die Analysen wurden mittels Students t-Test für verbundene und unverbundene Stichproben durchgeführt. Die Varianzanalyse erfolgte mit ANOVA und anschließender T-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche nach Bonferroni. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant gewertet und so auch gekennzeichnet.

3.10 Verwendete Materialien und Geräte

3.10.1 Puffer und Lösungen

Molekularbiologische Untersuchung (Genotypisierung)

Extraktionspuffer:	NaOH	25 mM
	EDTA	0,1 mM
	pH	8,0
Neutralisierungspuffer:	Tris-HCl	10 mM
	pH	8,0
DEPC-Wasser:	DEPC	0,1% (V/V)
Agarosegel:	Agarose	1%
	TAE-Puffer	
	SafeRed™	0,01%
TAE-Puffer:	Tris-Base	1,99 M
	EDTA	59,5 mM
	Eisessig	0,99 M
Ladepuffer:	TAE-Puffer	50%
	Glycerol	50%
	Bromphenolblau	

Homogenisierung

Reaktionsgemisch:	NaHCO ₃	10 mM
	SDS	20%
	pH	7,4

Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951)

Proteinstandard:	1 mg Rinderserum-Albumin / 1 ml Aqua bidest	
Stammlösung A:	Na ₂ CO ₃	2%
	in NaOH	0,1

Stammlösung B:	K ⁺ -Na ⁺ -Tartrat	1%
Stammlösung C:	CuSO ₄	0,5%
Lösung D:	Stammlösung A	99%
	Stammlösung B	0,5%
	Stammlösung C	0,5%
Lösung E:	Folin-Ciocalteus	1:2

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Probenpuffer:	Tris-Base	0,25 M
	SDS	8%
	Glycerol	40%
	Bromphenolblau	0,004%
	pH	6,8
Sammelgel (4%):	Sammelgelpuffer	24,73%
	Acrylamid 30%	13,16%
	H ₂ O	61,05%
	TEMED	0,06%
	APS	1%
Trenngel (10%):	Porziopuffer	47,39%
	Acrylamid 30%	31,6%
	Glycerol	7,9%
	H ₂ O	12,64%
	TEMED	0,08%
	APS	0,38%
Porzio-Gel-Puffer(2x):	Tris-Base	0,2 M
	Glycin	0,6 M
	EDTA	0,12 mM
	SDS	0,2%
	Glycin	10%
	Polyacrylamid	0,4%
	pH	8,8
	gelöst in 1l Aqua destillata	

Sammelgelpuffer(4x):	Tris-Base	0,5 M
	SDS	0,4%
	pH	8,0
Elektrophoresepuffer(4x):	Tris-Base	0,4 M
	Glycin	1,2 M
	SDS	0,4%
	pH	8,8
	gelöst in 1l Aqua destillata	
Transferpuffer:	Tris-Base	0,025 M
	Glycine	0,19 M
	Methanol	20%
	pH	8
	gelöst in 5l Aqua destillata	
Ponceau-Rot:	Ponceau S	0,2%
	Trichloressigsäure	2%
	gelöst in Aqua destillata	

Immunologischer Nachweis von Proteinen

TBST:	Tris-Base	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,1% (V/V)
	pH	7,4
AP-Puffer:	Triethanolamin	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
	pH	9,4
ECF-Substrat-Lösung:	ECF-Substrat	36 mg
	ECF dilution buffer	60 ml

3.10.2 Substanzen

Albumin (aus Rinderserum)	Merck, Darmstadt
Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, Philadelphia, USA
Ammoniumpersulfat 10% (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
5-Brom-4-Chlor-3-indolyolphosphat (BCIP)	MBI Fermentas, Heidelberg
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Leiter GeneRuler™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
ECF dilution buffer	GE Healthcare, Berlin
ECF Substrat	GE Healthcare, Berlin
EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol 100 %	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Merck, Darmstadt
Glycerol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Isofluran	Linde, München
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
K ⁺ -Na ⁺ -Tartrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
CuSO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	TSI GmbH, Zeven
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Methanol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Pentobarbital	Spofa, Prag, Tschechien
Polyacrylamid	C. Roth GmbH, Karlsruhe
PCR-Puffer, 15 mM MgCl ₂	Ampliqon, Odense, Dänemark
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
SafeRed™	Applied Medical Materials Inc., Canada
Taq-DNA-Polymerase	Ampliqon, Odense, Dänemark

N, N, N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Triethanolamin	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Fluka AG, Buch
Tween 20	Merck, Darmstadt

3.10.3 Primer, PCR-Protokoll und Antikörper

Primer

PP2A	Forward:	MHC-SEQ-P1
		5'-ACCCTTACCCCACATAGACC-3'
	Reverse:	PP2A-SEQ-P1R
		5'-CTTAAACACTCGTCGTAGAACC-3'
PP2C	Forward:	MHC-SEQ-P1
		5'-ACCCTTACCCCACATAGACC-3'
	Reverse:	PP2C-PCR-P1R
		5'-GCGTGACCATCATAAACTGC-3'

PCR-Programm

Tabelle 1: PCR-Ablaufprotokoll über die Schritte während der PCR mit einem Eppendorf Mastercycler gradient.

Denaturierung	94° C	5 min	1 Zyklus
Denaturierung	94° C	20 s	10 Zyklen
Annealing	60° C	30 s	
Elongation	72° C	2 min	
Denaturierung	94° C	30 s	20 Zyklen
Annealing	60° C	30 s	
Elongation	72° C	2 min	
Elongation	72° C	5 min	1 Zyklus
Lagerung	16° C		

Antikörper

Anti-CSQ:	abcam, ab3516, 55 kDa Molekülmasse
Anti-GAPDH:	abcam, ab9484, 40,2 kDa Molekülmasse
Anti-Mouse:	Sigma-Aldrich GmbH, Anti-Mouse Polyvalent Immunglobulins (G/AM), Alkaline Phosphatase, A0162-5ML
Anti-PLB-A1:	Badrilla, A010-14, als Pentamer 30 kDa und als Monomer 6 kDa Molekülmasse
Anti-pSerin16:	Badrilla, A010-12, als Pentamer 30 kDa und als Monomer 6 kDa Molekülmasse
Anti-pThreonin17:	Badrilla, A010-13, als Pentamer 30 kDa und als Monomer 6 kDa Molekülmasse
Anti-PP2A:	abcam, ab32141, Anti-PP2A alpha + beta [Y119], 36 kDa Molekülmasse
Anti-PP2C:	Santa Cruz Biotechnology, sc-166662, Anti-PP2C alpha + beta, 46 kDa Molekülmasse
Anti-PP5:	BD Biosciences, 611021, 58 kDa Molekülmasse

Anti-Rabbit: Sigma-Aldrich GmbH, Anti-Rabbit IgG, Alkaline Phosphatase, A3687-1MC

Anti-Serca: abcam, ab2861, 110 kDa Molekülmasse

Anti-Tnl: Cell Signaling, #4002, 28 kDa Molekülmasse

Anti-Phospo-Tnl: Cell Signaling, #4004, 28 kDa Molekülmasse

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper.

Antikörper	Medium 1.Antikörper	Verdünnung 1.Antikörper	Medium 2.Antikörper	Verdünnung 2.Antikörper
anti-CSQ	5% Milchpulver in TBST	1:1000	anti-rabbit IgG 5% Milchpulver in TBST	1:1000
anti-GAPDH	5% BSA in TBST	1:1000	anti-mouse IgG 5% BSA in TBST	1:1000
anti-PP2A-Cα	2% BSA in TBST	1:10000	anti-rabbit IgG 2% BSA in TBST	1:1000
anti-PP2Cβ	2% BSA in TBST	1:500	anti-rabbit IgG 2% BSA in TBST	1:1000
anti-PP5	5% Milchpulver in TBST	1:500	anti-mouse IgG 5% Milchpulver in TBST	1:1000
anti-Serca	5% BSA in TBST	1:1000	anti-mouse IgG 5% BSA in TBST	1:1000

anti-PLB-A1	2% BSA in TBST	1:5000	anti-mouse IgG 5% Milchpulver in TBST	1:1000
anti-P-Serin-16	2% BSA in TBST	1:5000	anti-rabbit IgG 5% Milchpulver in TBST	1:1000
anti-P-Threonin-17	2% BSA in TBST	1:5000	anti-rabbit IgG 5% Milchpulver in TBST	1:1000
anti-Tnl	2% BSA in TBST	1:1000	anti-rabbit IgG 2% BSA in TBST	1:1000
anti-P-Tnl	2% BSA in TBST	1:1000	anti-rabbit IgG 2% BSA in TBST	1:1000

3.10.4 Geräte

Bandelin Sonopuls	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Biophotometer	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Elektrophorese-Einheit SE 600	Hofer, San Francisco, USA
Echokardiographie: Vevo 2100	VisualSonics, Toronto, Canada
Elektrophoresekammer Typ Horizon 58	Life Technologies, Gaithersburg, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Mikrodismembrator S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
PCR Gerät: Mastercycler gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
pH-Meter	WTW GmbH, STH 600, Weilheim
Transfer-Einheit TE 62	Hofer, San Francisco, USA
Typhoon 9410 Variable Mark Imager	Amersham Biosciences, Freiburg
Vortex Shaker Eppendorf Mixer 5432	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Waage Typ AT261 DeltaRange	Mettler Instruments GmbH, Gießen
Zentrifuge Modell 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

4. Ergebnisse

4.1 Genotypische Charakterisierung der transgenen Mausmodelle

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen eingeteilt: PP2A monotransgen, PP2C monotransgen, PP2A und PP2C doppelt transgen und eine Wildtypkontrollgruppe. Die Gruppe mit transgenen PP2A-überexprimierenden Mäusen bestand aus 5 männlichen und 4 weiblichen Tieren, die der transgenen PP2C-überexprimierenden Mäuse aus 7 männlichen und 5 weiblichen Tieren und die der doppelt transgenen Tiere mit PP2A- und PP2C-Überexpression aus jeweils 5 männlichen und weiblichen Tieren. Die Wildtypgruppe bildeten 5 männliche und 3 weibliche Tiere. Zur Überprüfung wurden alle transgenen Tiere genotypisiert. Die Identifizierung der Genotypen erfolgte durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus Gewebe aus den Schwanzspitzen der Versuchstiere. Im Anschluss an die PCR wurden die PCR-Produkte in einem Agarosegel aufgetrennt und konnten einem Genotyp eindeutig zugeordnet werden (Abb. 4).

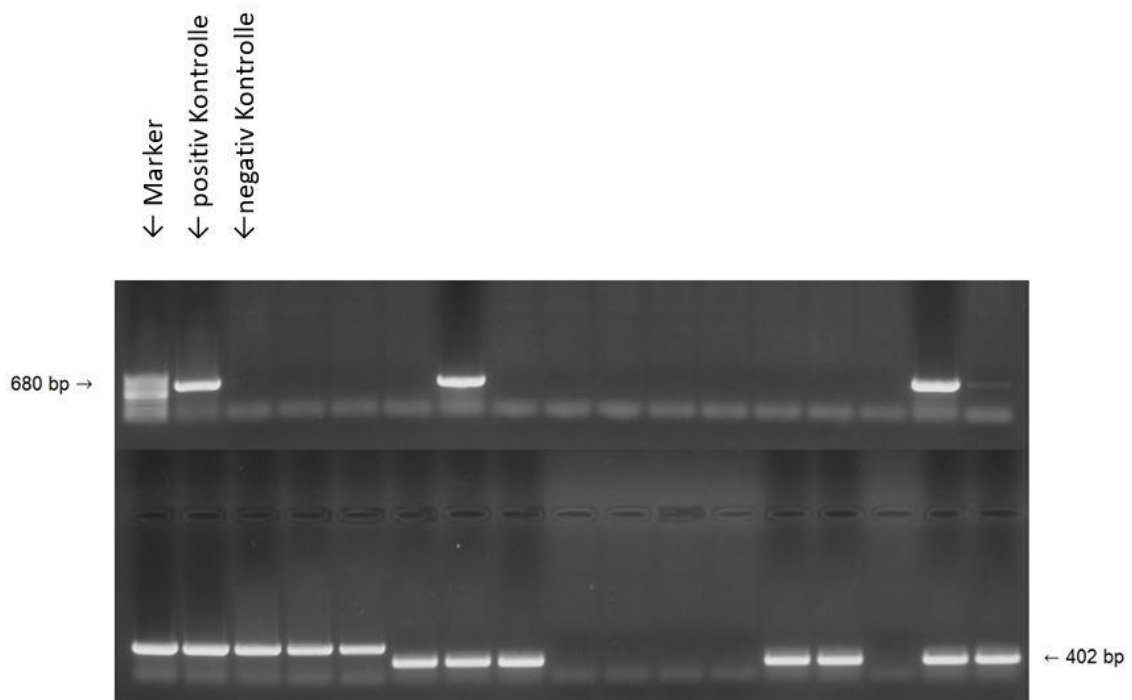


Abbildung 4: Exemplarische Dargestellung der aufgetrennten PCR-Produkte im Agarosegel. Oben: PP2A mit einer Molekülgröße von 680 bp. Unten: PP2C mit einer Molekülgröße von 402 bp und PP2A.

Die Genotypisierung bestätigte die Zuordnung der transgenen Tiere zu den jeweiligen Gruppen.

Die Versuchstiere aller vier Gruppen waren lebensfähig und fertil. Makroskopisch konnten weder körperliche Auffälligkeiten noch Auffälligkeiten im Verhalten festgestellt werden.

Aufgrund des zeitlich begrenzten Untersuchungszeitraumes und der festgelegten Organentnahme nach sechs Monaten konnte keine Aussage über eine eventuell veränderte Lebenserwartung getroffen werden.

4.2 Echokardiografie

Entsprechend der Fragestellung der Arbeit wurde zunächst untersucht, welchen Einfluss die Überexpression der Phosphatasen PP2A und PP2C einzeln und gemeinsam auf die Herzfunktion ausübt. Die Echokardiografie ist hierbei die Methode der Wahl, da sie es ermöglicht, die Veränderungen der Herzfunktion am lebenden Organismus über einen längeren Zeitraum zu beurteilen. Die Versuchstiere wurden dazu im Alter von vier, fünf und sechs Monaten echokardiografisch untersucht und Parameter wie Herzfrequenz, Schlagvolumen, linksventrikuläre Auswurfraction, Dicke der linksventrikulären Wände, Innendurchmesser des linken Ventrikels, Fluss durch die Pulmonalarterie sowie die Flüsse durch die Mitralklappe unter Ruhebedingung und nach β -adrenerger Stimulation erfasst. Parallel dazu wurden die Körpertemperatur und ein Elektrokardiogramm der Versuchstiere dokumentiert.

Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der systolischen Herzfunktion ist die linksventrikuläre Auswurfraction, auch Ejektionsfraction (EF) genannt. Sie ist der prozentuale Anteil des Blutvolumens, der vom Ventrikel während der Herzaktion ausgeworfen wird in Bezug auf das Gesamtvolumen des Ventrikels. Die Ejektionsfraction berechnet sich aus dem Quotienten aus Schlagvolumen und enddiastolischem Volumen.

Es konnten über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg im Ruhezustand für die PP2A- und doppelt transgenen Tiere signifikante Reduktionen der Ejektionsfraction im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden. Im Gegensatz dazu zeigten die PP2C-überexprimierenden Tiere keine Unterschiede zur Kontrollgruppe (Abb. 5a). Im Gegensatz dazu konnten alle drei Versuchsgruppen, also auch die PP2C-Gruppe, nach Isoprenalingabe nicht das Niveau der Ejektionsfraction der Kontrollgruppe erreichen (Abb. 5b). Auch hier blieben die gemessenen Werte für die Versuchsgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg konstant.

Die Verkürzungsfraction (FS) beschreibt die prozentuale Veränderung der linksventrikulären Innendurchmesser in der Diastole gegenüber der Systole. Eine verringerte FS kann neben der Ejektionsfraction ein Indikator für die linksventrikuläre systolische Dysfunktion sein. Diese Berechnung zeigte Veränderungen bei allen transgenen Tieren gegenüber dem Wildtyp.

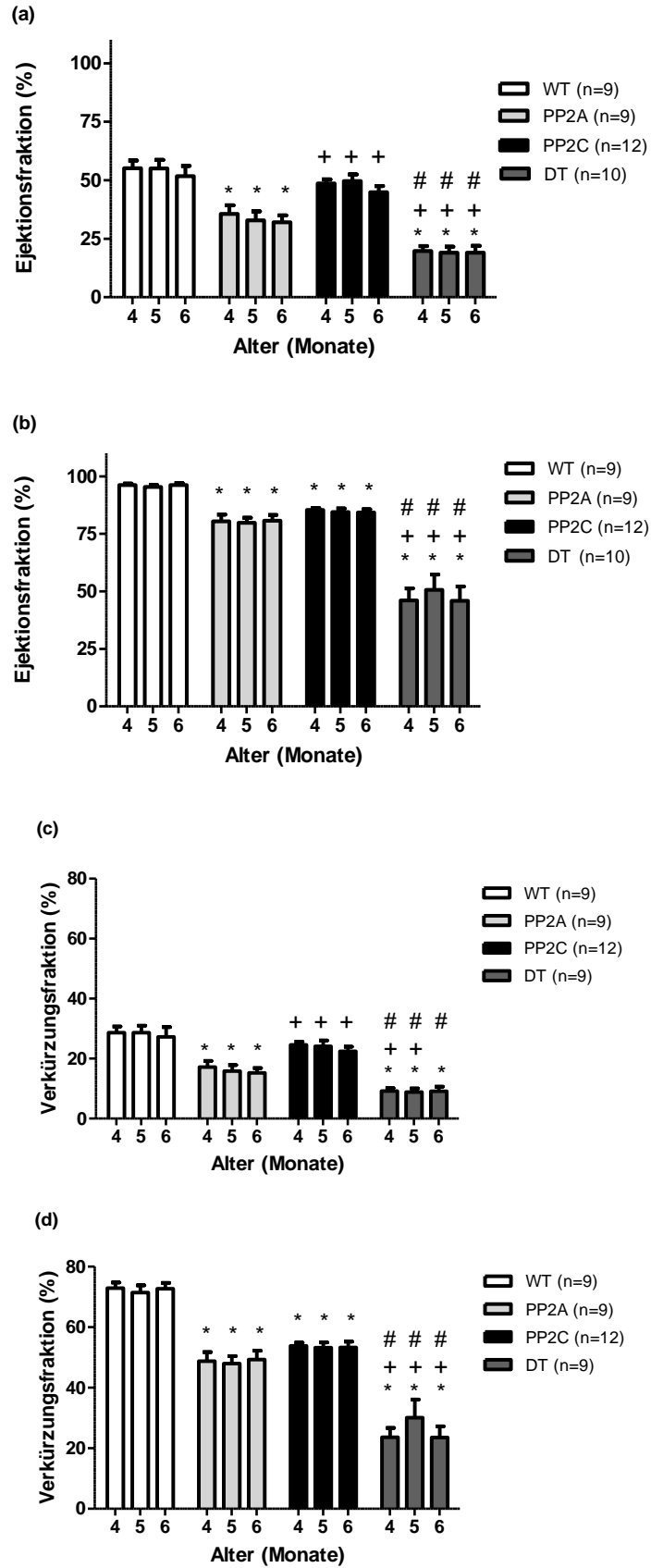


Abbildung 5a-d: a: Ejektionsfraktion in Ruhe. b: Ejektionsfraktion nach Isoprenalingabe. c: Verkürzungsfraction in Ruhe. d: Verkürzungsfraction nach Isoprenalininjektion.

* $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. WT.

Das linksventrikuläre Schlagvolumen wurde mittels M-Mode-Aufzeichnung in der parasternal langen Achse des Herzens bestimmt. Es ist das Volumen, das während einer Herzaktion ausgeworfen wird und sich aus der Differenz aus enddiastolischen und endsystolischen Volumen im linken Ventrikel berechnet. Das Schlagvolumen nimmt physiologisch mit zunehmendem Alter ab. Einen ähnlichen Trend lässt sich in Abbildung 6a erkennen, jedoch übersteigt dieser im Beobachtungszeitraum nicht das Signifikanzniveau. Aber bei den doppelt transgenen Tieren ist das Ausgangsvolumen in Ruhe, d.h im Alter von vier Monaten, im Vergleich zu den Wildtypen bereits verringert. Nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin konnte jedoch bei den doppelt transgenen Versuchstieren kein Unterschied ausgemacht werden.

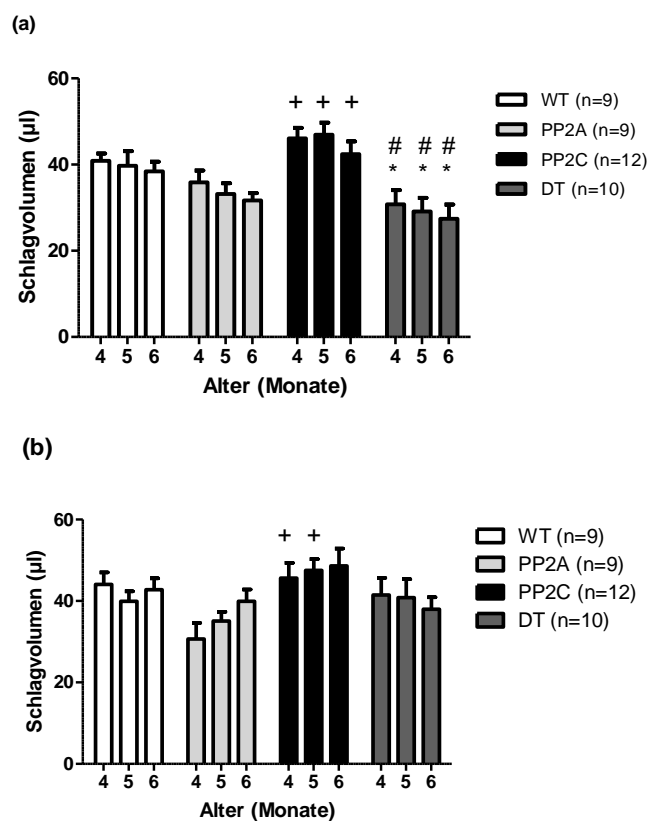


Abbildung 6a: Schlagvolumen in Ruhe.

6b: Schlagvolumen nach Isoprenalininjektion.

* $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

Zur Beurteilung einer möglichen Dilatation oder systolischen Funktionseinschränkung wurden, ebenso im M-Mode, die Innendurchmesser des linken Ventrikels während der Systole und der Diastole in Ruhebedingungen und unter Belastung gemessen (Abb. 7). Hierbei zeigten die doppelt transgenen Tiere in den Messungen unter allen Bedingungen erhöhte Innendurchmesser. Unter Basalbedingungen waren auch die Ventrikeldurchmesser der PP2A-Tiere vergrößert.

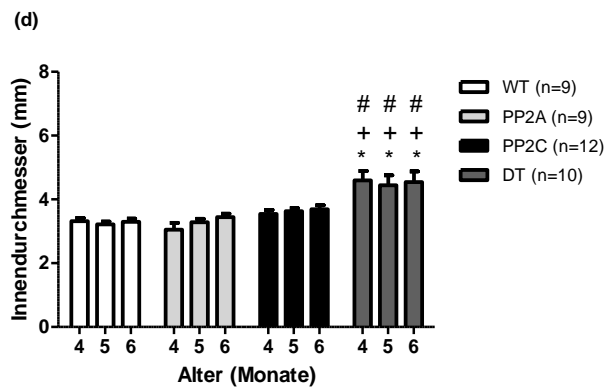
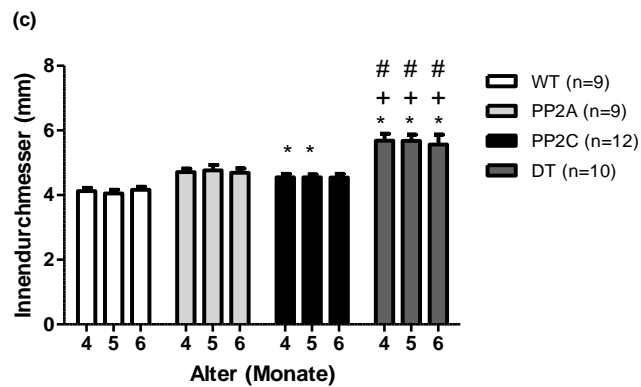
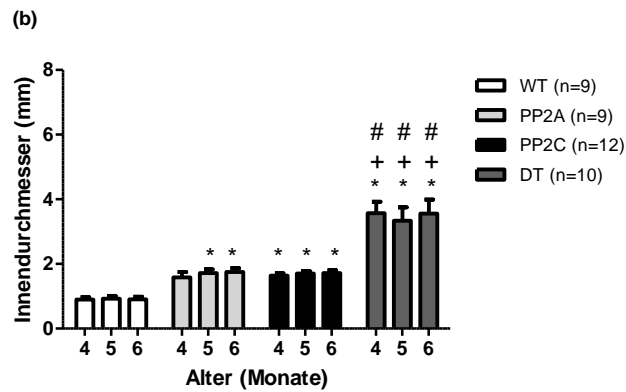
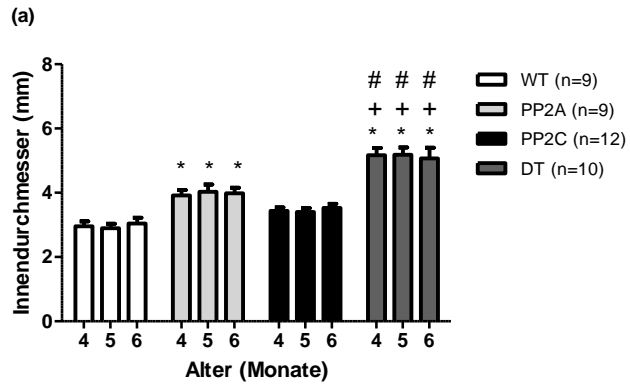


Abbildung 7a-d:

7a: Linksventrikulärer Innendurchmesser unter Ruhebedingungen in der Systole.
 7b: Linksventrikulärer Innendurchmesser in der Systole nach Isoprenalininjektion.
 7c: Linksventrikulärer Innendurchmesser unter Ruhebedingungen in der Diastole.
 7d: Linksventrikulärer Innendurchmesser in der Diastole nach Isoprenalin-Injektion.

* $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

Nach medikamentös induziertem Stress durch β -adrenerge Stimulation hatten die transgenen Versuchstiere in der Systole vergrößerte Innendurchmesser im Vergleich zum Wildtyp. Der diastolische Innendurchmesser war hingegen nur bei den doppelt transgenen Tieren vergrößert verglichen mit den drei anderen Genotypen.

Im Zusammenhang mit der Messung des Innendurchmessers wurden auch die Dicken des interventrikulären Septums und der hinteren linksventrikulären Wand bestimmt (Abb. 8). Die Messung der Diastole ergab jeweils unter Ruhe- und Belastungsbedingungen keine Unterschiede in der Wanddicke des Septums und der linksventrikulären Hinterwand (Tab. 3). Das Septum interventrikuläre ist in Ruhe während der Systole bei den doppelt transgenen Mäusen weniger dick verglichen mit den Wildtypen und den PP2C-Genotypen. Diesen Unterschied kann man auch noch nach β -adrenerger Stimulation beobachten.

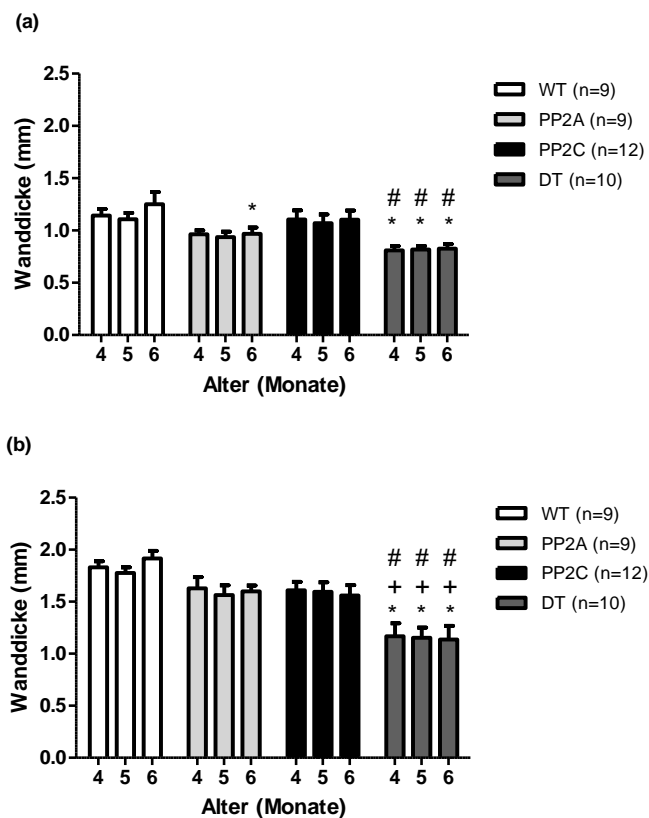


Abbildung 8a: Dicke des interventrikulären Septums in der Systole in Ruhe.
 8b: Dicke des interventrikulären Septums in der Systole nach Isoprenalin.
 * $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

Tabelle 3: Dicke des interventrikulären Septums (IVS) in der Diastole.

Genotyp	Anzahl [n]	Alter[Monate]	Ruhe[mm]	Belastung[mm]
WT	8	4	0,82 ± 0,04	1,01 ± 0,07
		5	0,78 ± 0,03	1,01 ± 0,04
		6	0,89 ± 0,05	1,02 ± 0,07
PP2A	9	4	0,77 ± 0,03	1,17 ± 0,08
		5	0,77 ± 0,04	1,08 ± 0,04
		6	0,83 ± 0,05	1,13 ± 0,06
PP2C	12	4	0,81 ± 0,06	0,93 ± 0,06
		5	0,79 ± 0,05	0,93 ± 0,05
		6	0,83 ± 0,06	0,89 ± 0,06
DT	10	4	0,68 ± 0,03	1,00 ± 0,09
		5	0,72 ± 0,03	0,85 ± 0,05
		6	0,68 ± 0,03	0,91 ± 0,09

Bei der Hinterwanddicke des linken Ventrikels konnten vor allem belastungsbedingte Veränderungen gezeigt werden, jedoch nur in der Systole (Abb. 9 und Tab. 4).

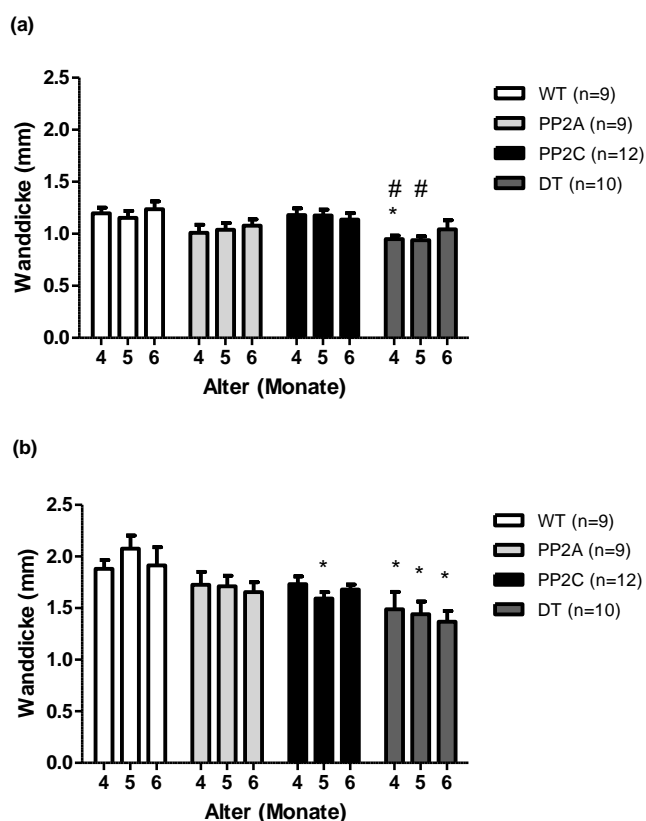


Abbildung 9a: Hinterwanddicke des linken Ventrikels in der Systole in Ruhe.

9b: Hinterwanddicke des linken Ventrikels in der Systole nach Isoprenalininjektion. * p < 0,05 vs. WT; # p < 0,05 vs. PP2C.

Tabelle 4: Dicke der linksventrikulären Hinterwand (LVPW) in der Diastole.

Genotyp	Anzahl [n]	Alter[Monate]	Ruhe[mm]	Belastung[mm]
WT	8	4	0,90 ± 0,05	1,09 ± 0,06
		5	0,90 ± 0,05	1,20 ± 0,07
		6	0,98 ± 0,07	1,13 ± 0,08
PP2A	9	4	0,86 ± 0,05	1,32 ± 0,10
		5	0,91 ± 0,06	1,22 ± 0,07
		6	0,94 ± 0,06	1,13 ± 0,02
PP2C	12	4	0,92 ± 0,06	1,16 ± 0,08
		5	0,93 ± 0,05	1,00 ± 0,08
		6	0,92 ± 0,05	1,09 ± 0,07
DT	10	4	0,85 ± 0,03	1,21 ± 0,14
		5	0,84 ± 0,04	1,13 ± 0,08
		6	0,90 ± 0,09	1,08 ± 0,06

Zur Bestimmung von Kontraktilitätsstörungen im Allgemeinen wurde die systolische Dickenzunahme bestimmt. Die Messung erfolgte im medialen Segment der linken Herzkammer. Hierbei konnten vor allem bei den PP2A- und doppelt transgenen Versuchstieren Störungen festgestellt werden, sowohl im Bereich des Septums (Abb. 10) als auch im Bereich der Hinterwand (Abb. 11).

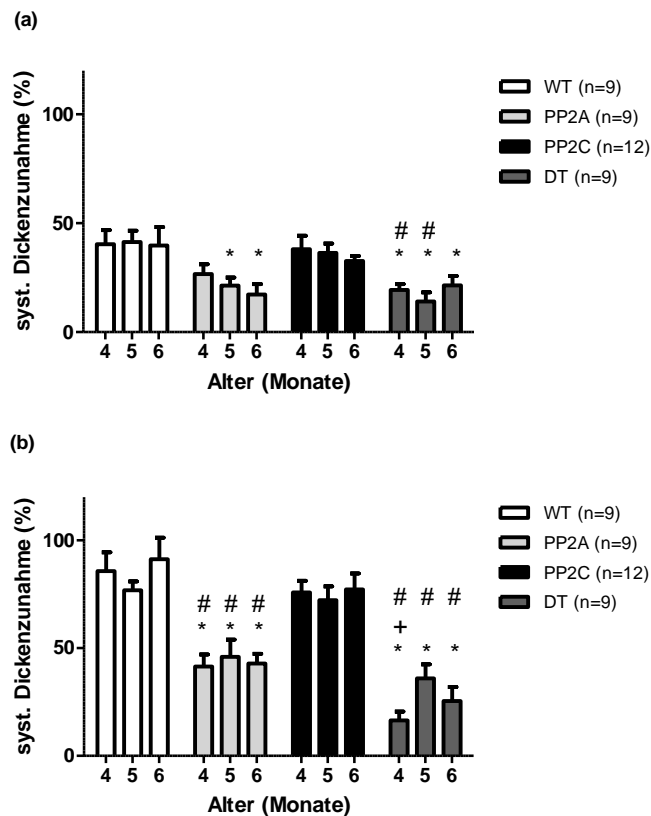


Abbildung 10a: Systolische Dickenzunahme des Septums interventrikuläre in Ruhe.
 10b: Systolische Dickenzunahme des Septums interventrikuläre nach Isoprenalingabe.
 * $p < 0,001$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

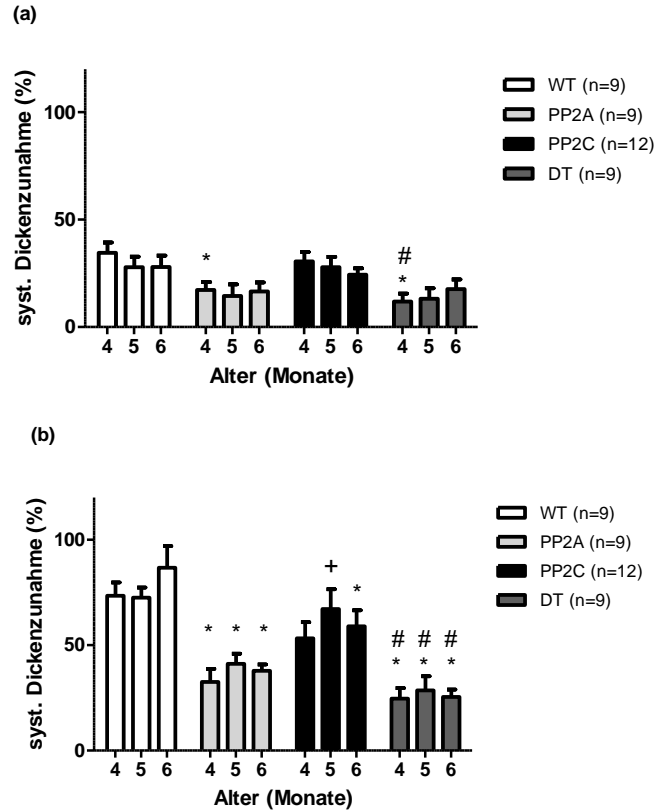


Abbildung 11a: Systolische Dickenzunahme der Hinterwand des linken Ventrikels in Ruhe. 11b: Systolische Dickenzunahme der Hinterwand des linken Ventrikels nach Isoprenalingabe. * $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

Bereits in Ruhe zeigte sich, daß die doppelt transgenen Tiere eine höhere Herzfrequenz aufwiesen (siehe Abbildung 12).

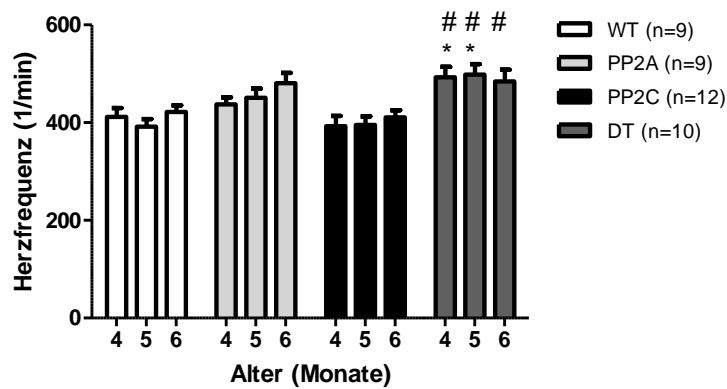


Abbildung 12: Darstellung der Herzfrequenz in Ruhe. * $p < 0,05$ vs. WT; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

Wie Tabelle 5 zeigt, waren nach intraperitonealer Isoprenalininjektion zur Stressinduktion die Unterschiede jedoch nicht mehr zu verzeichnen.

Tabelle 5: Herzfrequenz in Schlägen pro Minute nach intraperitonealer Isoprenalininjektion im Alter von 4, 5 und 6 Monaten.

Genotyp	Anzahl [n]	4 Monate	5 Monate	6 Monate
WT	8	564 ± 26	578 ± 23	570 ± 16
PP2A	9	587 ± 24	584 ± 15	598 ± 9
PP2C	12	523 ± 22	518 ± 18	503 ± 16
DT	10	562 ± 19	553 ± 33	554 ± 22

Zur Quantifizierung der diastolischen Herzfunktion werden in der Echokardiografie hauptsächlich die maximalen Flussgeschwindigkeiten durch die Mitralklappe mittels Doppler-Ultraschall und die Myokardbewegungsgeschwindigkeit auf Höhe der Papillarmuskeln mittels Gewebe-Doppler bestimmt. Dabei wird beim Mitralfluss zwischen frühdiastolischer passiver Ventrikelfüllung (E) und spätdiastolischer Ventrikelfüllung (A) und bei der Myokardbewegungsgeschwindigkeit ebenfalls zwischen frühdiastolischer passiver Bewegungsgeschwindigkeit (E') und spätdiastolischer aktiver Bewegungsgeschwindigkeit (A') durch Vorhofkontraktion unterschieden. Die Messung der zeitlichen Abläufe von Ventrikelfüllung und -ausstrom am Mitralklappenflussprofil geben ebenso Auskunft über die Herzfunktion. So können die linksventrikuläre Ejektionszeit (LVET), die der Zeit zwischen Aortenklappenöffnung bis zum Aortenklappenschluss entspricht, die isovolumetrische Kontraktionszeit (IVCT), die der Zeit vom Mitralklappenschluss bis zur Aortenklappenöffnung entspricht, und die isovolumetrische Relaxationszeit (IVRT), die der Zeit zwischen Aortenklappenschluss bis zur Mitralklappenöffnung entspricht, gemessen werden.

Das Verhältnis aus frühdiastolischer E-Welle des Mitralklappenblutfluss-Dopplers und der frühdiastolischen E'-Welle des Gewebe-Doppler-Signals entspricht dem linksventrikulären Füllungsindex (E/E'). Ommen et al. zeigten im Jahr 2000, daß der Füllungsindex mit dem enddiastolischen Druck im linken Ventrikel (LVEDP) korreliert. Kommt es im Rahmen einer diastolischen linksventrikulären Dysfunktion zu einer Erhöhung des linksatrialen Druckes, wird der frühdiastolische Fluss (E) beschleunigt, die frühdiastolische Myokardbewegungsgeschwindigkeit (E') hingegen verlangsamt. Demzufolge nimmt E/E' mit zunehmendem linksatrialen und linksventrikulären enddiastolischen Druck zu (Abb. 13c).

Eine erhöhte frühdiastolische Flussgeschwindigkeit (E) kann ebenso ein Hinweis auf eine verbesserte Relaxation des linken Ventrikels sein (Nishimura, Tajik, 1997). Eine Erniedrigung von E kann als Zeichen einer linksventrikulären Restriktion gesehen werden, da die Muskulatur im linken Herzen nicht die benötigte Elastizität aufweist, um

einen schnellen Blutfluss zu gewährleisten. Ersteres ist bei den PP2C-Tieren zu erkennen und letzteres bei den doppelt transgenen Mäusen.

Die Myokardbewegungsgeschwindigkeit während der frühdiastolischen passiven Füllung (E') ist bei der diastolischen Dysfunktion vermindert. Abbildung 13b zeigt die verminderten Bewegungsgeschwindigkeiten der PP2A- und doppelt transgenen Mäusen verglichen mit den Wildtypen.

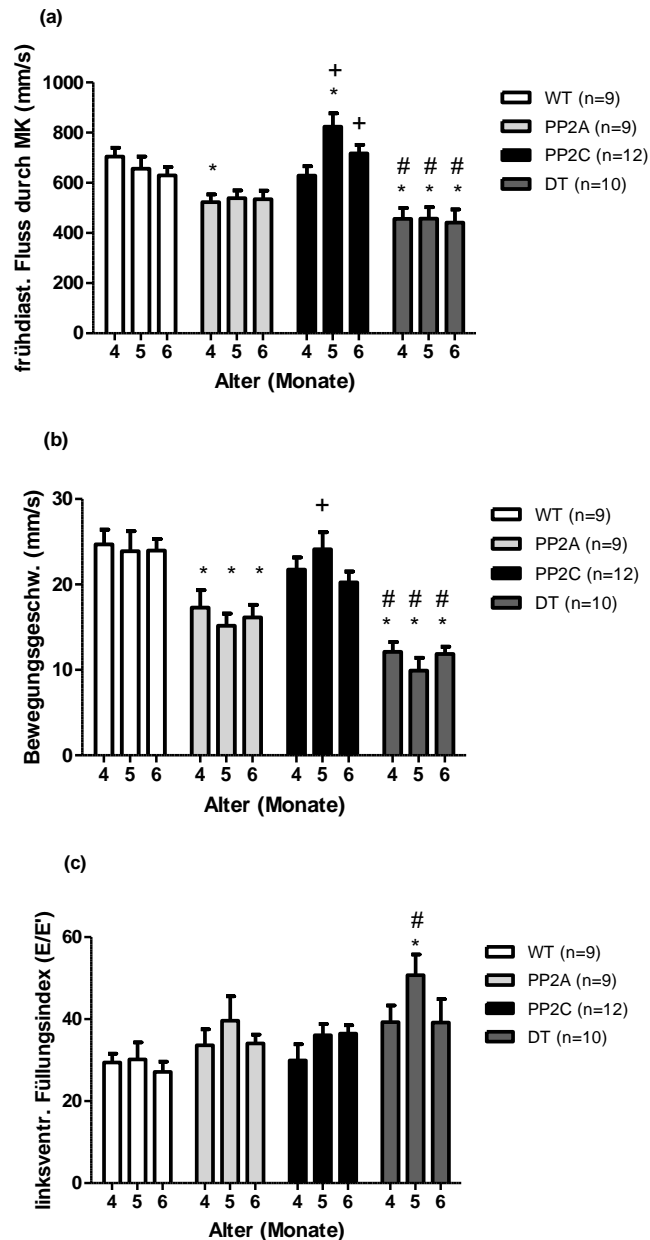


Abbildung 13a-c: 13a: Darstellung der frühdiastolischen Flussgeschwindigkeit (E) durch die Mitralklappe(MK). 13b: Darstellung der frühdiastolischen Myokardbewegungsgeschwindigkeit (E') in Ruhe. 13c: Graphische Darstellung des linksventrikulären Füllungsindex' (E/E'). * p < 0,05 vs. WT; + p < 0,05 vs. PP2A; # p < 0,05 vs. PP2C.

Nach Schaefer et al., 2003 gehört neben E' und der IVRT das Verhältnis E'/A' zu den Parametern des Gewebedopplers (TDI), die bei diastolischer Funktionseinschränkung verändert sind. Es ist vor allem bei den doppelt-transgenen Tieren ein Trend zur Abnahme des Verhältnisses zu erkennen, aber ohne statistische Signifikanz (Tab. 6).

Tabelle 6: Verhältnis von frühdiastolischer Myokardbewegungsgeschwindigkeit (E') und spätdiastolischer aktiver Bewegungsgeschwindigkeit (A') jeweils in mm/s im Alter von 4, 5 und 6 Monaten.

Genotyp	Anzahl [n]	4 Monate	5 Monate	6 Monate
WT	8	1,64 ± 0,13	1,83 ± 0,1	1,71 ± 0,2
PP2A	9	1,36 ± 0,18	1,38 ± 0,17	1,26 ± 0,13
PP2C	12	1,6 ± 0,15	1,61 ± 0,1	1,43 ± 0,11
DT	10	1,55 ± 0,29	1,23 ± 0,26	1,03 ± 0,18

Bei der isovolumetrischen Relaxationszeit (IVRT) kann man im zeitlichen Verlauf den altersabhängigen Anstieg der IVRT erkennen, deren Verlängerung bei den 6 Monate alten doppelt transgenen Mäusen am stärksten ausgeprägt ist. Eine Verlängerung der IVRT spricht für eine gestörte diastolische Relaxation und eine Verkürzung für eine Restriktion (Abb. 14). Dabei muss beachtet werden, daß die Zeitintervalle der IVCT und IVRT stark abhängig von der Herzfrequenz sind. Ähnlich der isovolumetrischen Relaxationszeit (IVRT) ist auch beim Tei-Index ein Trend zur Altersabhängigkeit in der PP2C und der doppelt transgenen Gruppe zu erkennen, der aber das Signifikanzniveau zumeist nicht überschreitet (Abb. 15).

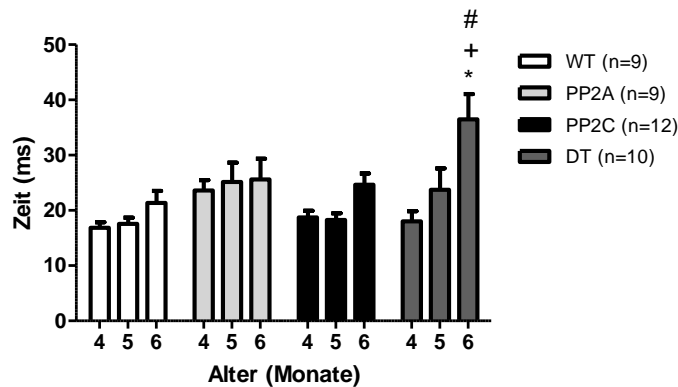


Abbildung 14: Darstellung der isovolumetrischen Relaxationszeit.

* p < 0,05 vs. WT; + p < 0,05 vs. PP2A; # p < 0,05 vs. PP2C.

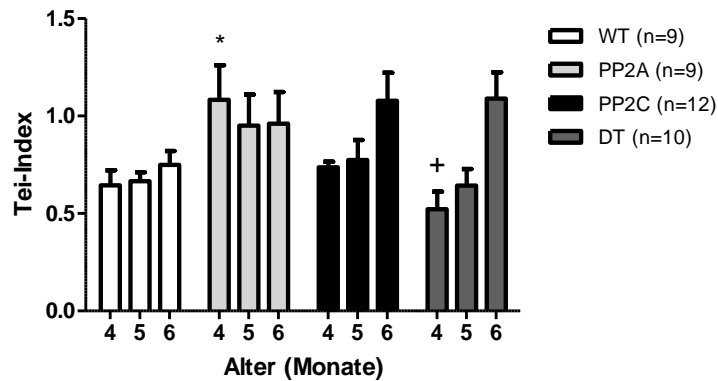


Abbildung 15: Darstellung des Tei-Indexes.
 * $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

Des Weiteren wurde die Dezelerationszeit der E-Welle bestimmt (Abb. 16). Sie ist definiert als die Zeit von der maximalen E-Zacke im Flussprofil der Mitralklappe bis zur Rückkehr des frühdiastolischen Flusses zur Null-Linie. Eine Verringerung der Dezelerationszeit kann einen Hinweis auf einen erhöhten Füllungsdruck des linken Ventrikels oder eine restriktive Störung sein. Eine Erhöhung findet sich bei Relaxationsstörungen (Pinger, 2011).

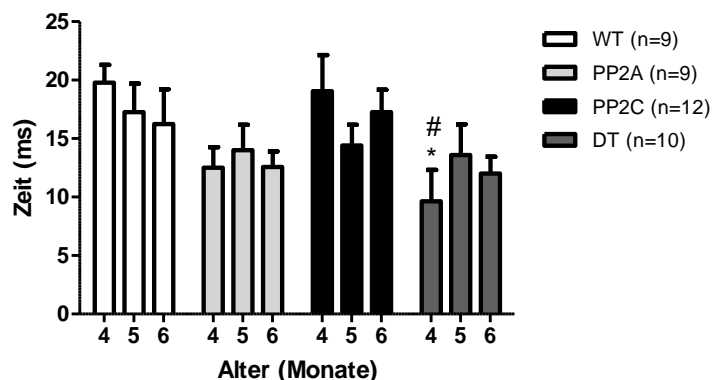


Abbildung 16: Dargestellung der Dezelerationszeit der E-Welle in Ruhe.
 * $p < 0,05$ vs. WT; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

Als sensitiver Index für Veränderungen der linksventrikulären Füllung und damit der diastolischen Funktion gilt das Verhältnis von E zu A, welches einen Bestandteil der echokardiografischen Klassifikation der diastolischen Funktion darstellt (Khoury et. al., 2004). Bei diesem Verhältnis von frühdiastolischer Ventrikelfüllung (E) und spätdiastolischer Ventrikelfüllung (A) waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen (Tab. 7).

Tabelle 7: Verhältnis E/A.

Genotyp	Anzahl [n]	Alter[Monate]	E/A
WT	8	4	1,87 ± 0,16
		5	2,25 ± 0,27
		6	1,76 ± 0,10
PP2A	9	4	1,66 ± 0,19
		5	1,59 ± 0,19
		6	2,36 ± 0,54
PP2C	12	4	1,92 ± 0,13
		5	2,33 ± 0,17
		6	2,61 ± 0,31
DT	10	4	1,82 ± 0,17
		5	2,10 ± 0,42
		6	1,81 ± 0,22

Als ergänzender Parameter für die systolische linksventrikuläre Funktion wurden die Flussgeschwindigkeiten und die Volumen-Zeit-Integrale von Aorta ascendens und descendens gemessen. Beim Volumen-Zeit-Integral (VTI) der Aorta ascendens zeigten sich Unterschiede, die aufgrund der eingeschränkten Ejektionsfraktion zu erwarten waren. So erreichten die doppelt transgenen Tiere weniger Volumenfluss pro Zeiteinheit im Vergleich zu den PP2C-Tieren (Abb. 17).

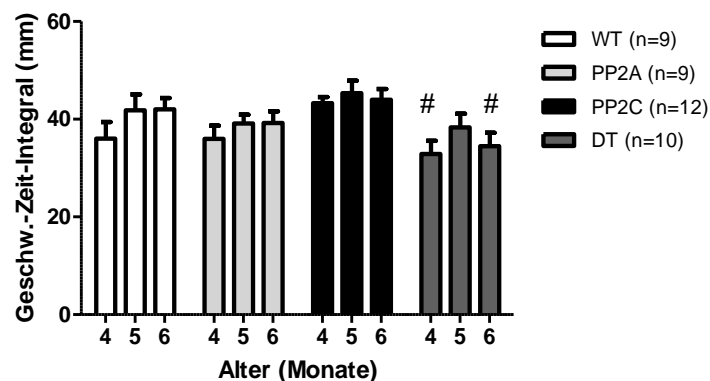


Abbildung 17: Darstellung des Volumen-Zeit-Integrals der Aorta ascendens. # p < 0,05 vs. PP2C.

Die Spitzengeschwindigkeiten durch die Aorta ascendens waren bei allen Genotypen annähernd gleich (Tab. 8).

Tabelle 8: Spitzenflussgeschwindigkeiten durch Aorta ascendens.

Genotyp	Anzahl [n]	Alter [Monate]	Geschwindigkeit [mm/s]
WT	8	4	1014,4 ± 72
		5	1109,9 ± 92
		6	1139,8 ± 99
PP2A	9	4	1112,3 ± 81
		5	1080,2 ± 61
		6	1111,4 ± 63
PP2C	12	4	1210,5 ± 44
		5	1226,1 ± 80
		6	1123,2 ± 62
DT	10	4	1004 ± 64
		5	1094,5 ± 44
		6	961,3 ± 43

Durch die Betrachtung der Spitzenflussgeschwindigkeiten und der Volumen-Zeit-Integrale der Aorta descendens wurden diese Unterschiede deutlicher. Vor allem die doppelt transgene Gruppe zu allen Untersuchungszeitpunkten und die PP2C-Versuchstiere im Alter von 4 und 5 Monaten zeigten verringerte Werte des Geschwindigkeits-Zeit-Integrals der Aorta descendens. Ebenfalls erniedrigte maximale Flussgeschwindigkeiten wiesen die doppelt transgenen Tiere im Alter von 4 und 5 Monaten sowie die PP2C-Tiere im Alter von 5 Monaten auf (Abb. 18, Tab. 9).

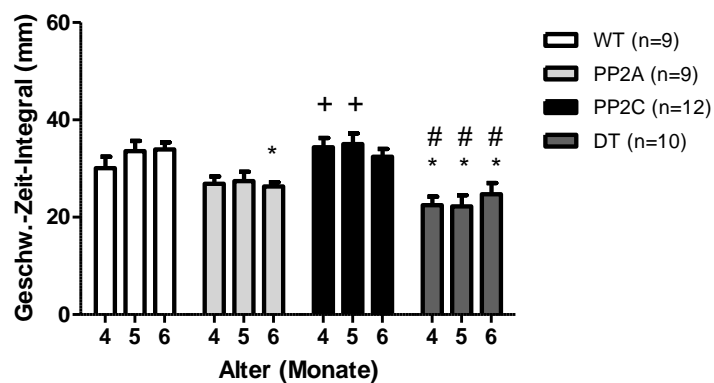


Abbildung 18: Volumen-Zeit-Integral der Aorta descendens.
 * $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

Tabelle 9: Spitzenflussgeschwindigkeiten durch Aorta descendens.
 + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

Genotyp	Anzahl [n]	Alter [Monate]	Geschwindigkeit [mm/s]
WT	8	4	876,5 ± 47
		5	893,8 ± 34
		6	871,7 ± 37
PP2A	9	4	892,7 ± 49
		5	805,5 ± 49
		6	813,5 ± 30
PP2C	12	4	967,0 ± 51
		5	1001,2 ± 55+
		6	883,1 ± 54
DT	10	4	752,2 ± 56#
		5	737,1 ± 49#
		6	753,8 ± 46

Der Blutfluss durch die Pulmonalarterie gibt Auskunft über die Auswurfleistung der rechten Herzkammer. Im Gegensatz zu den maximalen Flussgeschwindigkeiten, die bei allen Genotypen nahezu gleich sind, ist das Volumen-Zeit-Integral (VTI) des Flussprofils der Pulmonalarterie herabgesetzt. Dieses verringerte VTI spricht für eine Funktionseinschränkung des rechten Ventrikels (Abb. 19, Tab. 10).

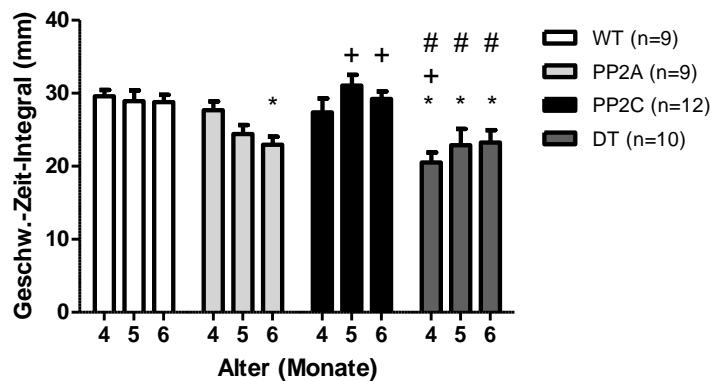


Abbildung 19: Volumen-Zeit-Integral der Arteria pulmonalis.
 * $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. PP2C

Tabelle 10: Spitzenflussgeschwindigkeiten durch Arteria pulmonalis.
+ $p < 0,05$ vs. PP2A.

Genotyp	Anzahl [n]	Alter [Monate]	Geschwindigkeit [mm/s]
WT	8	4	683,4 ± 33
		5	635,6 ± 42
		6	628,3 ± 34
PP2A	9	4	707,6 ± 47
		5	576,2 ± 37
		6	583 ± 37
PP2C	12	4	692,1 ± 27
		5	732,9 ± 36+
		6	649 ± 26
DT	10	4	625 ± 24
		5	628,9 ± 35
		6	642,9 ± 36

Zur Beurteilung und Quantifizierung möglicher Kinetikstörungen wurde aus dem B-Mode-Bild der longitudinale Strain, also die Myokarddeformation in longitudinaler Richtung über die Zeit, exemplarisch für die mittleren Segmente der posterioren Wand ermittelt. Der Strain ist eine dimensionslose Größe und wird in Prozent angegeben. Hierbei zeigten die PP2A- und die doppelt transgenen Tiere eine deutlich verringerte Wandbeweglichkeit im Vergleich zum Wildtyp und zu den PP2C-Tieren (Abb. 20).

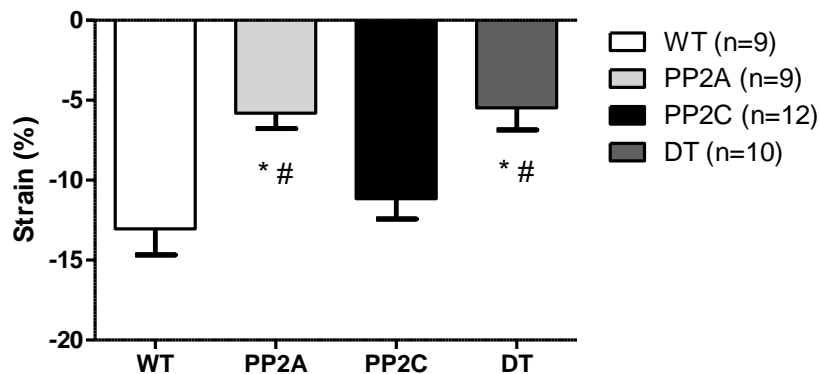


Abbildung 20: Longitudinaler Strain der mittleren Segmente der posterioren Wand im Alter von 6 Monaten. * $p < 0,05$ vs. WT; # $p < 0,05$ vs. PP2C

Zu den Kriterien der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) gehören eine herabgesetzte Pumpfunktion und eine vergrößerte linke Herzhöhle, was durch eine $EF < 45\%$ und bzw. oder einer $FS < 25\%$ und einem $LVEDD > 117\%$ bezogen auf den WT beschrieben wird (Mestroni et al., 1999).

Tabelle 11: Überblick über den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD), die Ejektionsfraktion (EF) und die Verkürzungsfraktion (FS) im Zusammenhang mit den Kriterien der dilatativen Kardiomyopathie (DCM).

* $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

Genotyp	Alter [Monate]	LVEDD [mm]	LVEDD bezogen auf WT [%]	EF [%]	FS [%]
WT	4	4,12 ± 0,09	100	55,1 ± 3,1	28,6 ± 2
	5	4,05 ± 0,11		55 ± 3,5	28,6 ± 2,2
	6	4,17 ± 0,08		51,7 ± 4,1	27,2 ± 3,1
PP2A	4	4,71 ± 0,1	114,4	35,6 ± 3,5 *	17,2 ± 2 *
	5	4,76 ± 0,16	117,6	32,9 ± 3,6 *	15,8 ± 1,9 *
	6	4,69 ± 0,13	112,5	32 ± 2,8 *	15,3 ± 1,5 *
PP2C	4	4,55 ± 0,1 *	110,4	48,6 ± 1,7 +	24,6 ± 1 +
	5	4,55 ± 0,08 *	112,4	49,7 ± 2,7 +	24,1 ± 1,8 +
	6	4,54 ± 0,11	109,1	44,9 ± 2,6 +	22,4 ± 1,5 +
DT	4	5,68 ± 0,2 *+#	138	19,8 ± 2 *+#	9,2 ± 1 *+#
	5	5,68 ± 0,18 *+#	140,2	19,1 ± 2,4 *+#	8,8 ± 1,2 *+#
	6	5,56 ± 0,29 *+#	133,6	19,1 ± 2,7 *+#	9,1 ± *+#

4.3 Biochemische Untersuchung

Um die in der Echokardiografie entdeckten Unterschiede der Herzfunktion erklären zu können, wurde mittels Western Blot die Expression der kalziumregulierenden Proteine Calsequestrin, Phospholamban und SERCA untersucht. Außerdem wurden die Expression und der Phosphorylierungszustand von Troponin I untersucht. Troponin I (TnI) bindet in Kardiomyozyten Aktin, stabilisiert den Aktin-Tropomyosin-Komplex und verhindert, daß Myosin an Aktin binden kann. Erst wenn Kalziumionen am Troponin C (TnC) binden, bewirkt die Konformationsänderung des Troponin C die Dissoziation des Troponin I vom Aktin-Tropomyosin-Komplex und ermöglicht eine Kontraktion. Diese Aufhebung der Inhibition geschieht auch bei β -adrenerger Stimulation durch Phosphorylierung von Troponin I. Die Phosphorylierung erfolgt durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) an den Aminosäuren Serin 23 und Serin 24 des Troponin I (Solaro et al., 1976). Die Stimulation durch β -adrenerge Substanzen evoziert ebenfalls eine Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) an den Aminosäuren Serin 16 und Threonin 17 (Wegener et al., 1989), weshalb auch dies untersucht wurde. Zudem wurden die Expressionslevel der Proteinphosphatasen 2A und 2C ermittelt. Als Bezugswert galt die Menge an Calsequestrin, da es in Wildtyp- und transgenen Mäusen gleich exprimiert wird (Movsesian et al., 1994).

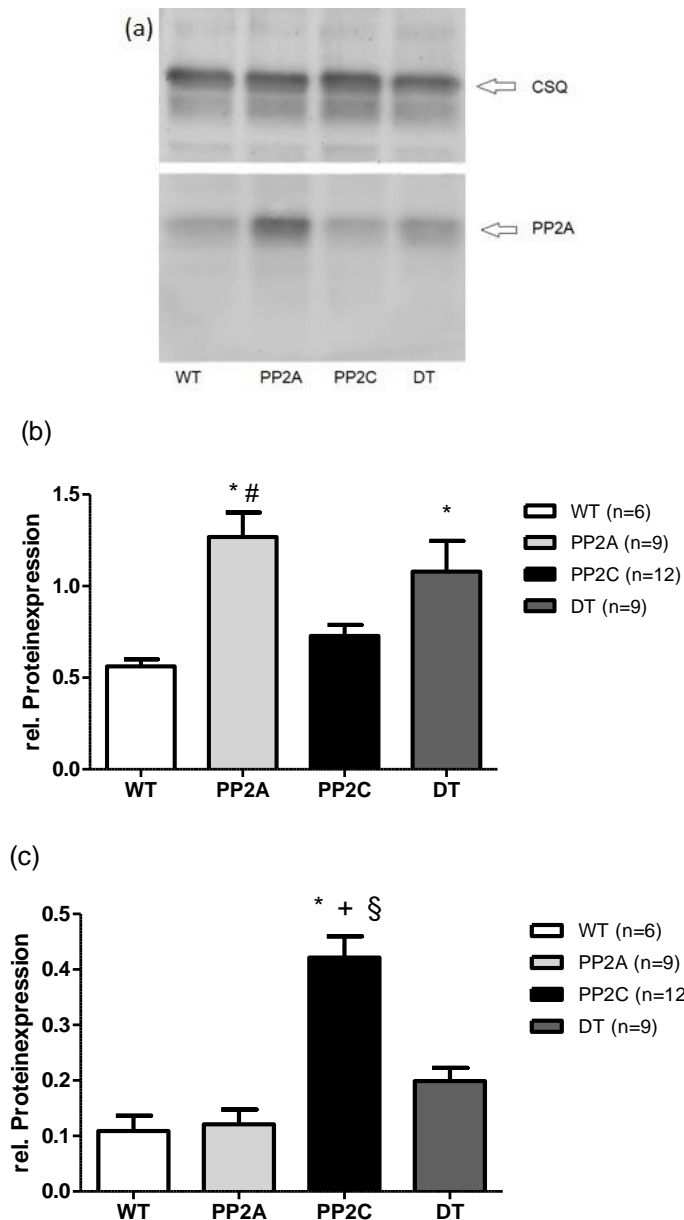


Abb. 21a-c: 21a: Exemplarische Darstellung eines Western Blots für PP2A mit CSQ (Calsequestrin) als Ladekontrolle. 21b: Expression der PP2A in Relation zu Calsequestrin. 21c: Expression der PP2C bezogen auf Calsequestrin.
 * $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. PP2C; § $p < 0,05$ vs. DT.

Weitere Sicherheit über die Zugehörigkeit der Versuchstiere zu den jeweiligen Genotypen erbrachte der Proteinnachweis mittels Western Blot. Es zeigte sich eine erhöhte Expression der Proteinphosphatase 2A bei den Tieren der PP2A- und DT-Gruppe (Abb. 21a und b), sowie eine deutlich erhöhte Expression der exogenen PP2C bei den PP2C-Tieren (Abb. 21c).

Beim Nachweis der SERCA sowie bei der Expression von Troponin I (TnI) zeigten sich, wie in Tabelle 12 zu erkennen ist, keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen.

Tabelle 12: Darstellung der Messwerte von SERCA, PP5 und Tnl in Relation zu Calsequestrin.

Genotyp	WT	PP2A	PP2C	DT
Anzahl [n]	9	9	12	10
SERCA	0,56 ± 0,05	0,46 ± 0,04	0,55 ± 0,06	0,48 ± 0,06
PP5	0,72 ± 0,06	0,65 ± 0,06	0,72 ± 0,05	0,56 ± 0,05
Tnl	0,98 ± 0,06	1,04 ± 0,07	0,94 ± 0,09	0,91 ± 0,13

Darüber hinaus wurde Phospholamban (PLB) untersucht, die zentrale Substanz zur Regulierung der SERCA. Die Gesamtmenge an PLB ist bei den PP2A- und den doppelt transgenen Tieren verringert (siehe Abb. 22).

Ebenfalls von Interesse sind die Phosphorylierungsstellen Serin-16 und Threonin-17 im Verhältnis zur Gesamtmenge an Phospholamban (Wegener, Simmerman et al., 1989). Die Phosphorylierungen an Serin-16 und Threonin-17 bezogen auf die Gesamtmenge an PLB ergaben aufgrund der interindividuellen Streuung keine signifikanten Unterschiede.

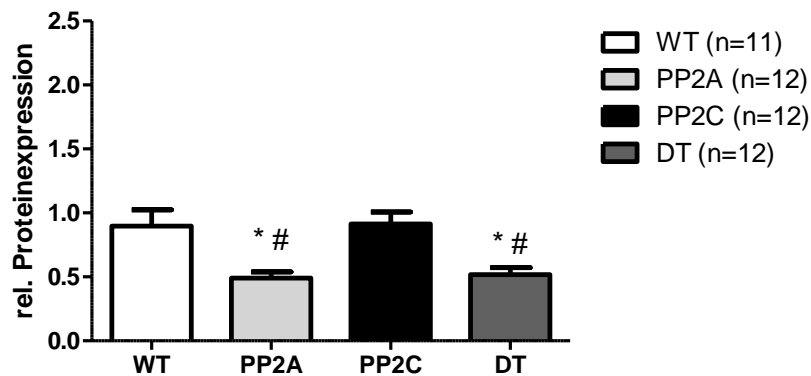


Abb. 22: Expression des Gesamtphospholambans in Relation zu Calsequestrin.
* $p < 0,05$ vs. WT; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

4.4 Laborchemische Untersuchung

Die Untersuchung der Serumproben wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle (Saale) durchgeführt. Die Konzentrationen von Natrium, Kreatinin und Harnstoff unterschieden sich in allen vier Gruppen nicht wesentlich. Auf eine Bestimmung der Kaliumkonzentration wurde verzichtet, da aufgrund der Blutentnahme aus dem offenen Thorax eine Hämolyse unvermeidbar eintritt, durch die falsch hohe Werte angezeigt würden. Alle transgenen Tiere zeigten erhöhte Aspartat-Aminotransferasekonzentrationen.

Tabelle 13: Laborchemische Ergebnisse.
ASAT = Aspartat-Aminotransferase, * $p < 0,05$ vs. WT.

Genotyp	WT	PP2A	PP2C	DT
Anzahl [n]	6	6	8	8
Natrium [mmol/l]	150,33 ± 0,96	151,83 ± 1,74	150,25 ± 1,7	150,88 ± 0,45
Kreatinin [µmol/l]	19 ± 2,12	< 15	16,75 ± 0,74	18,5 ± 1,06
Harnstoff [mmol/l]	8 ± 1,25	10,03 ± 0,51	8,4 ± 0,77	9,21 ± 0,61
ASAT [µkat/l]	2,97 ± 0,72	5,73 ± 0,73*	6,81 ± 1,25 *	4,87 ± 0,43 *

4.5 Vergleichende Morphologie

Im Anschluss an die letzte echokardiografische Untersuchung im Alter von 6 Monaten wurden die Organe der Versuchstiere entnommen und gewogen (Abb. 23).

Zur Berechnung des relativen Herz-, Leber- und Lungengewichtes wurden jeweils die Organgewichte ins Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt (mg/g).

Die Versuchstiere der PP2A-Linie und die doppelt transgenen Tiere wiesen ein erhöhtes Herzgewicht verglichen mit den WT-Wurfgeschwistern auf. Alle drei transgenen Tiergruppen haben im Vergleich zum WT ein erhöhtes relatives Herzgewicht. Dabei zeigten die DT-Tiere ein annähernd verdoppeltes relatives Herzgewicht. Ebenso konnte eine Vergrößerung der linken und der rechten Vorhöfe der doppelt transgenen Mäuse verglichen mit den drei anderen Genotypen festgestellt werden. Unverändert hingegen blieben das Körpergewicht und die Gewichte von Lunge und Leber (Tab. 14).

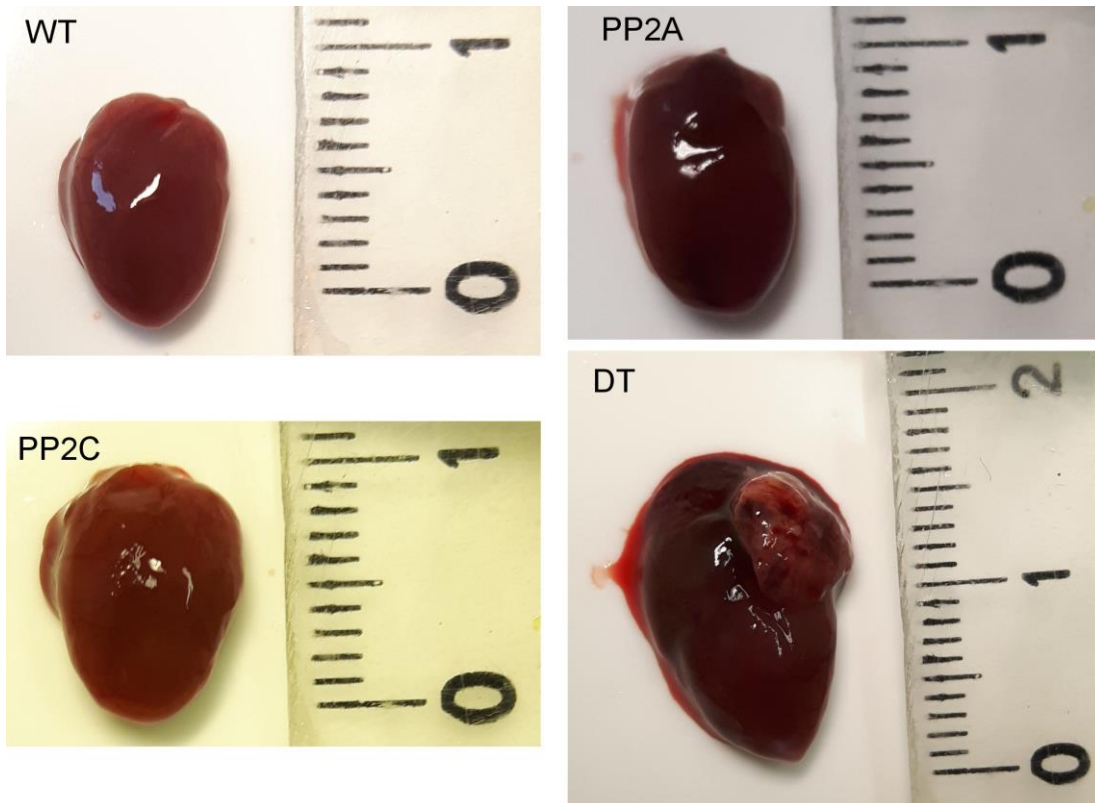


Abbildung 23: Fotodokumentation der Herzgröße.

Tabelle 14: Darstellung der gemessenen Organ- und Körpergewichte.

* $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. PP2A; # $p < 0,05$ vs. PP2C.

Genotyp	WT	PP2A	PP2C	DT
Anzahl [n]	8	9	12	10
Gewicht [g]	34,5 ± 1,62	35,5 ± 1,66	35,4 ± 1,63	32,6 ± 1,55
Herzgewicht [mg]	158,7 ± 8,63	195,3 ± 12,82 *	182,8 ± 11,59	294,9 ± 30,35 *
Relatives Herzgewicht [mg/g]	4,59 ± 0,09	5,47 ± 0,14 *	5,13 ± 0,13 *	9,12 ± 0,93 *+#
Relatives Lebergewicht [mg/g]	48,74 ± 1,63	46,67 ± 1,79	48,86 ± 1,7	50,29 ± 3,77
Relatives Lungengewicht [mg/g]	5,83 ± 0,22	5,46 ± 0,22	5,72 ± 0,22	6,66 ± 0,55
Rel. Gewicht des linken Vorhofs [mg/g]	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,01	1,11 ± 0,28 *+#
Rel. Gewicht des rechten Vorhofs [mg/g]	0,14 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,34 ± 0,03 *+#

4.6 Histologie

Die histologische Aufarbeitung der Herzspitzenpräparate, die dazu von je einem Herzen pro Genotyp entnommen wurden, erfolgte durch das Institut für Hämatopathologie Hamburg. Die Histologie umfasste eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung, bei der azidophile Strukturen wie zytoplasmatische Proteine, Mitochondrien und Kollagen rot gefärbt werden und basophile Bestandteile wie DNS, Zellkerne und Ribosomen blau dargestellt werden (Abb. 24a). Ebenso wurde eine Masson-Goldner-Trichromfärbung durchgeführt, in der kollagenes Bindegewebe als Fibrosezeichen grün erscheint (Abb. 24b). Anhand der Hämatoxylin-Eosin- und Masson-Goldner-Trichromfärbung konnten lokale Fibrosezeichen niedrigen Grades bei den PP2C-Tieren festgestellt werden. Die durchgeführte Immunhistochemie mit Antikörpern gegen die Proteinphosphatasen 2A und 2C zeigte eine homogene Färbung des Sarkoplasmas der Kardiomyozyten (Buchwalow et al, 2011). Dabei war die Färbung der gegen die PP2A gerichteten Antikörper weniger intensiv, aber brachte auch Kapillaren, kleinere Arteriolen und Disci intercalares zur Darstellung.

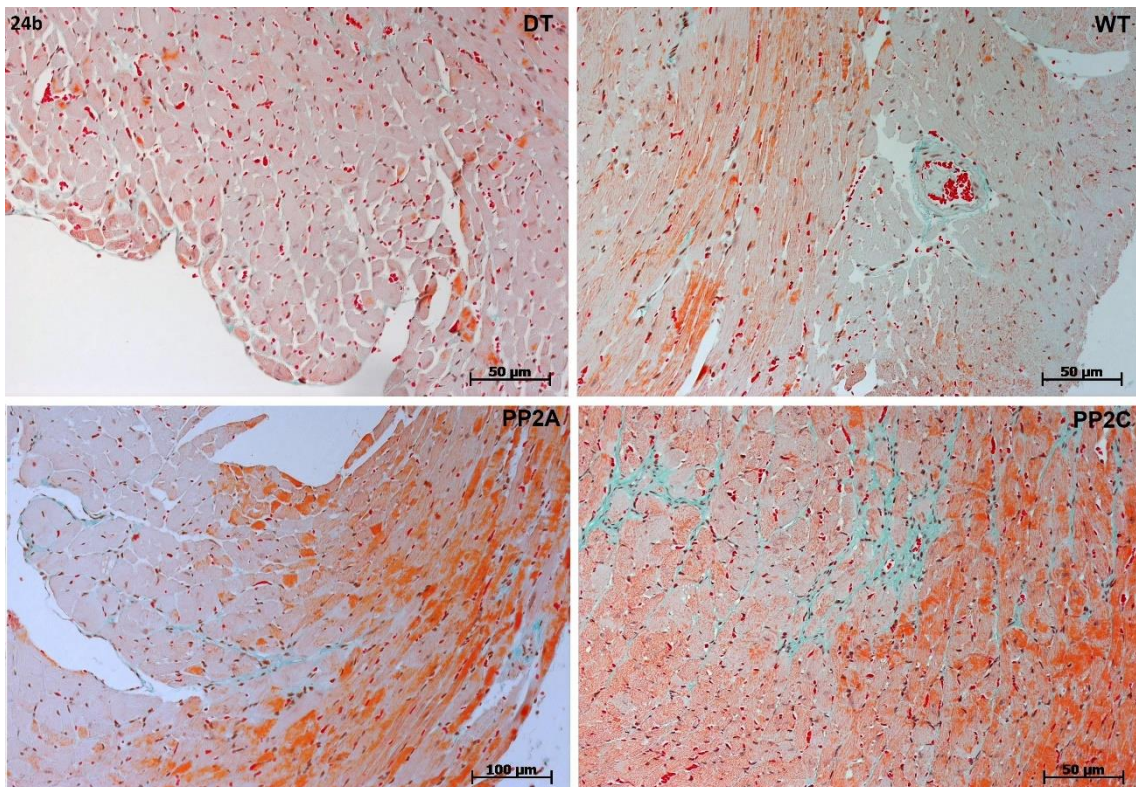
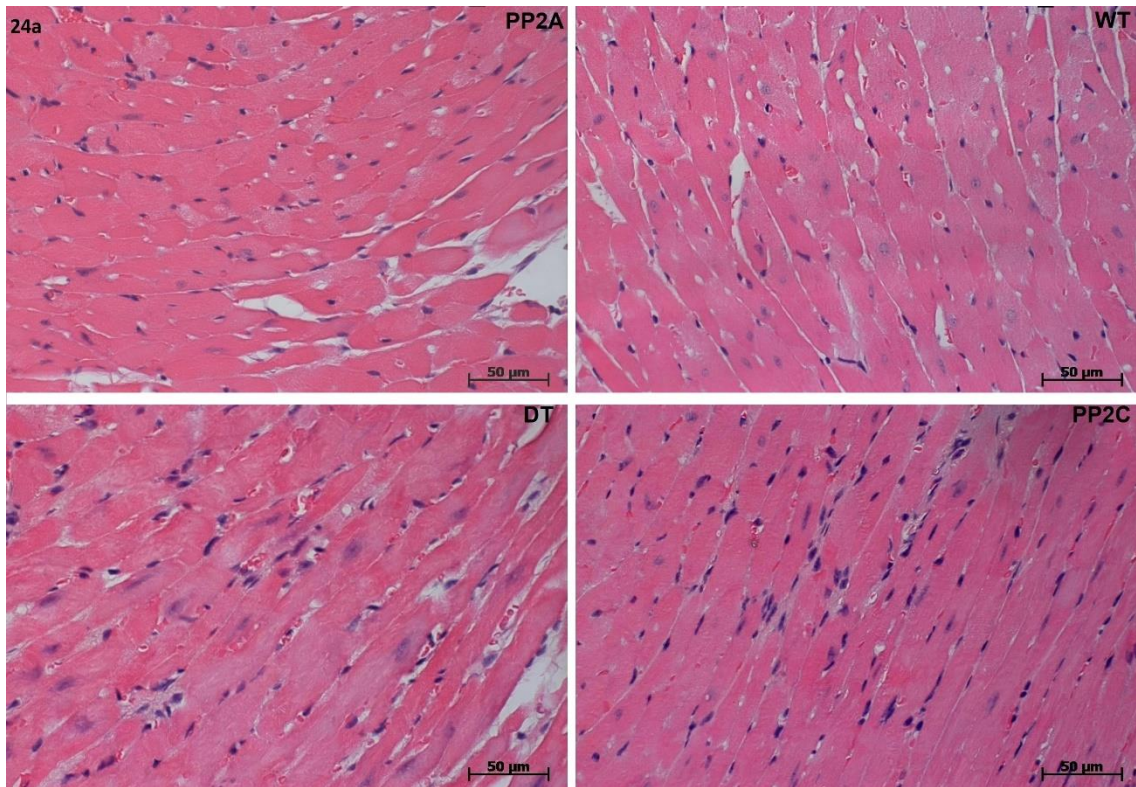


Abbildung 24a: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, azidophile Strukturen (zytoplasmatische Proteine, Mitochondrien, Kollagen) rot gefärbt, basophile Strukturen (DNS, Ribosomen, Zellkerne) blau gefärbt. 24b: Masson-Goldner-Trichromfärbung zeigt vermehrtes kollagenes Bindegewebe (grün) beim PP2C-Genotyp.

5. Diskussion

Das tiefgehende Verständnis der Pathomechanismen, die einer kardialen Erkrankung wie der Herzinsuffizienz zu Grunde liegen, trägt in entscheidender Weise dazu bei, effizientere Therapien gegen diese multifaktorielle Erkrankung zu entwickeln (Braunwald et al., 2019; Francis, 2001). Da bei den meisten Formen der Herzinsuffizienz die auch die Kontraktilität der Kardiomyocyten gestört ist, liegt es nahe die regulatorischen Komponenten des Ca^{2+} -Haushaltes zu untersuchen (Lahiri,2021). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in einer vergleichenden Studie mittels transgener Mausmodelle untersucht, welchen Einfluß die Überexpression der Proteinphosphatasen PP2A, PP2C einzeln bzw. gemeinsam auf die Kontraktilität des Herzens sowie ausgewählter biochemischer, morphologischer und histologischer Parameter ausübt.

5.1 Echokardiographie

Der transthorakale Ultraschall bei genetisch veränderten Mäusen in Inhalationsnarkose ist ein etabliertes Verfahren bei der Beurteilung der Herzfunktion (Stypmann, 2007).

Zur Beurteilung der systolischen Herzfunktion ist die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) ein wichtiger Parameter (Ram et al., 2011). Ohne adrenerge Stimulation waren die prozentualen EF-Werte bei den PP2A-TG als auch den DT-TG deutlich vermindert und das Herz im B-Mode-Bild vergrößert. Somit waren hier Kriterien für eine dilatative Kardiomyopathie erfüllt, wie man sie für den Menschen aufgestellt hat und die man hier pragmatischer Weise auch für die Maus annehmen will (z.B. Mestroni et al., 1999). Im Gegensatz dazu zeigten die PP2C-TG keine Reduktion der EF ohne adrenerge Stimulation. Andere Untersuchungen an PP2C-TG zeigten hingegen bereits in Ruhe eine verringerte EF, allerdings waren dort die Versuchstiere 8 – 11 Monate alt (Bollmann, 2021).

Nach Stimulation von β -Rezeptoren durch Injektion von Isoprenalin zeigten sich in allen transgenen Tiergruppen verminderte Ejektionsfraktionen im Vergleich zum WT. Eine entsprechende verringerte Kraftzunahme an isolierten elektrisch gereizten menschlichen linksventrikulären Herzmuskelstreifen auf Isoprenalin ist seit langem bei der terminalen Herzinsuffizienz bekannt (Bristow et al.,1982), deren Ursache eine dilatative oder ischämische Kardiomyopathie war.

Die errechnete Verkürzungsfraktion (FS) und die linksventrikulären Innendurchmesser der WT- und PP2A-Mäuse stimmen mit Vorarbeiten der Arbeitsgruppe überein (Gergs et al., 2004).

Die Verkürzungsfraktion, die eine ähnliche Aussagekraft wie die EF besitzt, ist bei den DT-Mäusen ebenso wie bei den PP2A-Tieren verringert und bei den PP2C-Tieren im

Vergleich zur WT-Gruppe normal. Nach Isoprenalin-Injektion war FS bei den PP2C-Mäusen erniedrigt. Noch deutlicher wird der Unterschied bei der DT-Gruppe. Auch hier kommt es zu einer Übereinstimmung mit klinischen Daten, da eine verringerte FS ebenfalls bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie beschrieben wurde (Rajan et al., 2007).

Die gemessenen Herzfrequenzen der Wildtyp-Mäuse in Ruhe und auch der Frequenzanstieg nach Isoprenalin sind vergleichbar mit der Literatur (z.B. Stypmann, 2007).

Bei PP2C-Tieren in Ruhe war das Schlagvolumen (SV) möglicherweise zur Kompensation der linksventrikulären Auswurfleistung erhöht. Bei den DT-Tieren war auch in Ruhe analog zur EF ein verringertes Schlagvolumen zu verzeichnen.

Einen vergrößerten linksventrikulären Innendurchmesser in der Systole wie in Abb. 7a gezeigt, konnten andere ebenfalls in jeweils einem die A- Untereinheit beziehungsweise die C-Untereinheit der PP2A-überexprimierenden Mausmodell feststellen (Brewis et al., 2000 und Gergs et al., 2004). Bei den doppelt transgenen Mäusen war dieser Unterschied noch größer und die PP2C-Tiere wiesen diesen Unterschied nur nach Belastung auf. Auch andere deuteten die Verringerung der FS bzw. EF und den erhöhten linksventrikulären Innendurchmesser als Zeichen, daß die Überexpression einer A-Untereinheit der PP2A zu einer dilatativen Kardiomyopathie führen könnte (Brewis et al., 2000). Tabelle 11 zeigt, wie die doppelt transgenen Tiere die Kriterien einer dilatativen Kardiomyopathie in Form einer herabgesetzten Pumpfunktion und einer vergrößerten linken Herzhöhle, erfüllen.

Ebenfalls hinweisend auf eine dilatative Kardiomyopathie und zum Ausschluss einer hypertrophen Kardiomyopathie (bei erhöhten relativen Herzgewichten, s.u.) als Differentialdiagnose sind die Dicken des interventrikulären Septums (IVS) und der Hinterwand des linken Ventrikels (Sahn et al., 1978). Die Wanddicken der doppelt transgenen Mäuse sind zu beinahe allen Untersuchungszeitpunkten in Ruhe und nach Belastung in der Systole verringert, was sich auch mit der Untersuchung von Brewis et al. deckt (Abb. 8a/b und 9a/b). Somit kann eine hypertrophe Kardiomyopathie ausgeschlossen werden.

Die systolische Dickenzunahme ist im Allgemeinen bei arterieller Mangelversorgung, Myokarditis, instabiler Angina pectoris und nach Myokardinfarkt regional reduziert. Bei globalen Kontraktilitätsstörungen, wie bei einer dilatativen Kardiomyopathie, ist die systolische Dickenzunahme vor allem beim interventrikulärem Septum reduziert (Piper, 2013). Hierzu wurde die systolische Dickenzunahme des mittleren Segments des linken Ventrikels am Septum interventrikuläre (IVS) und der Hinterwand (LVPW) in Ruhe und Belastung bestimmt. Die systolische Dickenzunahme des IVS der PP2A-Tiere erfuhr im

zeitlichen Verlauf bereits unter Ruhebedingungen eine kontinuierliche Einschränkung. Ähnlich starke Einschränkungen waren auch bei den DT-Tieren zu erkennen, nicht aber bei den WT- und PP2C-Mäusen. Nach parenteraler Isoprenalin-Injektion wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen PP2A und DT sowie den Gruppen WT und PP2C noch deutlicher, was für eine mangelnde Reserve der Kontraktilität bei Belastung sprechen könnte (Linck et al., 1998). Vergleichbare Ergebnisse zeigte die linksventrikuläre Hinterwand, jedoch mit dem Unterschied, daß unter Belastung hier auch die PP2C-Tiere betroffen waren.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Isoprenalinapplikation wurde die Ermittlung der Herzfrequenz mittels elektrokardiografischer Messung genutzt. Zur Durchführung der Echokardiographie an den lebenden Tieren wurde das gut steuerbare Inhalationsnarkotikum Isofluran verwendet. Neben seiner muskelrelaxierenden Wirkung ist Isofluran auch für seine geringe negativ inotrope Wirkung bekannt, die v.a. in der Senkung der Herzfrequenz begründet ist. Da jedoch alle vier Versuchsgruppen den gleichen Narkosebedingungen ausgesetzt waren, sind die Ergebnisse dennoch vergleichbar. Die ermittelten Herzfrequenzen der Wildtyp-Mäuse in Ruhe und Belastung stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer (Stypmann, 2007). Dort wurden auch Isofluran und Isoprenalin angewendet. Bei den doppelt transgenen Mäusen war die Herzfrequenz bereits in Ruhe erhöht (Abb. 12a), was als Zeichen der Kompensation der erniedrigten EF gewertet werden könnte, um ein ausreichendes Herzzeitvolumen gewährleisten zu können. Infolgedessen könnte vielleicht hier die Herzfrequenz nach Belastung nicht in dem Maße gesteigert werden wie in den anderen drei Versuchsgruppen (siehe Abb. 12b).

Wie bereits in der Methodik erläutert, kann man (Braunwald et al., 2019) die diastolische Herzfunktion gut durch die Messung der Flussgeschwindigkeit des Blutes durch die Mitralklappe und die Myokardbewegungsgeschwindigkeit in Höhe der Papillarmuskeln indirekt meßbar machen. Andere zeigten anhand von Messungen an Patienten vor und nach Hämodialyse, wie der Gewebe-Doppler (TDI) mit dem die Myokardbewegungsgeschwindigkeiten (E' und A') gemessen werden können, unabhängig von der Vorlast ist (Graham et al. 2003). Nach Abbildung 13a war die frühdiaastolische Flussgeschwindigkeit (E) durch die Mitralklappe bei den DT-Tieren aller drei Altersstufen verringert. Ursache dafür könnte eine eingeschränkte Elastizität im Sinne einer Restriktion oder eine Störung der Relaxation des Ventrikelmyokards sein (Braunwald et al., 2019). Für eine gestörte Relaxation sprechen die in der histologischen Untersuchung, wenn auch nur bei den PP2C-Tieren, gefundenen ersten Anzeichen einer Fibrosierung. Daher ist es wichtig, zwischen systolischer und diastolischer Herzinsuffizienz zu unterscheiden (Wintrich et al., 2020). Bei der systolischen

Herzinsuffizienz kommt es, wie in Abb. 5a sichtbar, durch eine Kontraktionsstörung des Myokards, die mit einer verstärkten Ventrikelfüllung einhergeht (wie z.B. im Rahmen einer koronaren Herzkrankheit oder einer dilatativen Kardiomyopathie), zu einer verminderten linksventrikulären Ejektionsfraktion (Ponikowski et al., 2016). Bei der diastolischen Herzinsuffizienz hingegen entsteht ein vermindertes Schlagvolumen bei erhaltener systolischer Pumpfunktion. In diesem Fall verhindert wohl eine unzureichende diastolische Dehnbarkeit und Relaxation des linken Ventrikels die Füllung des Ventrikels, weshalb nur ein vermindertes Schlagvolumen ausgeworfen werden kann, wie es beispielsweise bei arterieller Hypertonie oder restriktiver Kardiomyopathie der Fall ist. (Mandinov, 2000).

Die von Khouri et al., 2004 festgelegten Kriterien für eine diastolische Funktionseinschränkung beim Menschen, die u.a. die Verhältnisse E/A , E/E' und die Dezelerationszeit der E-Welle beinhalten, können nicht einfach auf das Mausherz übertragen werden. Dies zeigte bereits die Bestimmung des Verhältnisses von E/A , dessen Werte bei allen vier Genotypen oberhalb des dort festgelegten Grenzwertes von 1,5 lagen. Ähnliche Verhältnisse dokumentierten auch andere Untersuchungen von Wildtypmäusen (Du et al., 2008; Stypmann, 2007). Wie in Abbildung 3a zu erkennen ist, gibt es mehrere Stadien der Relaxationsstörung. Ein Stadium zwischen normaler diastolischer Funktion und Restriktion ist die Pseudonormalisierung, bei der das Verhältnis E/A normal ist, so wie es bei allen untersuchten Gruppen der Fall war (Arques et al., 2004). Zur Abgrenzung einer normalen von einer pseudonormalen Funktion werden weitere Parameter wie die Dezelerationszeit der E-Welle, die Myokardbewegungsgeschwindigkeit (E'), die isovolumetrische Relaxationszeit (IVRT) und das Verhältnis von E/E' genutzt, welches mithilfe der Nagueh-Formel Aufschluss über den linksventrikulären enddiastolischen Druck gibt (Nagueh et al., 1997; Ommen et al., 2000). Die gemessenen Werte für die Myokardbewegungsgeschwindigkeit (E') bei den Wildtypen deckten sich mit den Ergebnissen von Du et al., 2008. So zeigten die doppelt transgenen Tiere eine verringerte frühdiastolische Flussgeschwindigkeit (E) bei normalem E/A -Verhältnis mit zugleich verringerter Dezelerationszeit der E-Welle (DT, Abb. 16) und erniedrigter Myokardbewegungsgeschwindigkeit (E' , Abb. 13b), was für eine Relaxationsstörung im pseudonormalen Stadium spricht. Andere Untersuchungen an Mäusen mit diastolischer Funktionsstörung im pseudonormalen Stadium wiesen ebenfalls normale E/A -Verhältnisse und erhöhte E/E' -Verhältnisse bei gleichzeitig vergrößerten linksventrikulären Durchmessern nach (Schumacher et al., 2008). Im Gegensatz dazu scheinen die PP2C-Mäuse in ihrer diastolischen Funktion nicht eingeschränkt zu sein. Die Quotienten E/A und E/E' sind ebenso normal wie die Zeiten bzw. Geschwindigkeiten von DT, IVRT und E' . Auffallend ist jedoch eine erhöhte

frühdiaastolische Flussgeschwindigkeit (E) bei den Tieren im Alter von 5 Monaten. Dies könnte ein Zeichen von erhöhter Elastizität des Myokards sein, die im zeitlichen Verlauf, also mit dem Alter der Tiere, wieder abnimmt (Pugh und Wei, 2001).

Tei et al. zeigten 1997, wie ein erhöhter Myocardial Performance Index (MPI) bzw. Tei-Index im Zusammenhang steht mit dem Auftreten von idiopathischen dilatativen Kardiomyopathien und ischämischen Herzkrankheiten. Eine ischämische Ursache der Indexerhöhung erscheint vernachlässigbar, da ausschließlich junge Tiere untersucht wurden bei denen das Auftreten von degenerativen Gefäßveränderungen unwahrscheinlich ist. Ein Anstieg des aus den Zeiten der isovolumetrischen Kontraktion (IVCT) und Relaxation (IVRT) und der linksventrikulären Ejektion (LVET) errechneten Tei-Index als Index für die globale, also systolische und diastolische Funktion zeigte eine Abnahme mit dem Alter der Versuchstiere (Abb. 15). Da dieser Index aus drei gemessenen Werten errechnet wird, ist er anfällig für Messfehler, weshalb es zu den erkennbaren großen Streuungen gekommen sein könnte.

Die maximalen Flussgeschwindigkeiten (V_{max}) durch die Aorta und die Pulmonalarterie zeigten bei allen untersuchten Genotypen kaum Unterschiede (Tab. 8, 9 und 10). Es decken sich die gemessenen Werte der WT-Kontrollgruppe mit den Ergebnissen anderer (z.B. Stypmann, 2007), der Spitzenflussgeschwindigkeiten der Aorta zwischen 600 und 1200 mm/s gemessen hat.

Mithilfe des Volumen-Zeit-Integrals (VTI) der Gefäße können Schlagvolumen und damit auch das Herzzeitvolumen berechnet werden (Blanco, 2020). Anhand des Dopplersignals wird die Geschwindigkeit an jedem Punkt unter der Flusskurve mit der Zeit integriert. Das VTI war bei dem DT-Genotyp in der Aorta ascendens nur gegenüber den PP2C-Tieren verringert, aber in der Pulmonalarterie und der Aorta descendens war es gegenüber dem WT deutlich verringert. Die Verringerung des VTI der Aorta descendens passt zu den erniedrigten Werten des Schlagvolumens und der Ejektionsfraktion. Die Abnahme des VTI der Pulmonalarterie ist mit einer rechtsventrikulären Funktionseinschränkung vereinbar (Myslinski et al., 1998). Die teilweise erhöhten Herzfrequenzen stellen einen Versuch der Kompensation dar, um ein ausreichendes Herzzeitvolumen zu generieren (Joyce und Wang, 2020).

Um die Myokardkontraktion entlang der Ventrikellängsachse quantifizieren zu können, wurde die Verkürzung bzw. die Verdickung eines myokardialen Segmentes, der sogenannte Strain, gemessen (Sanna et al., 2021; Liu et al., 2020). Die bei der exemplarischen Analyse des longitudinalen Strains, der mittleren Segmente der posterioren Wand gezeigten Kinetikstörungen passen sehr gut zu einer gestörten Relaxation des Ventrikelmyokards, könnten aber auch ein Hinweis auf eine mögliche

Myokardischämie aufgrund der Vergrößerung der Herzhöhlen mit unzureichender Perfusion über die Koronargefäße sein (Prasad et al., 2008).

5.2 Biochemische Untersuchung

Bei bestimmten Formen der menschlichen Herzinsuffizienz ist ein verändertes Gleichgewicht zwischen Proteinkinase- und Proteinphosphataseaktivität zugunsten der Dephosphorylierung bemerkt worden (Neumann et al., 1997). Mittels Western Blot gelang der Nachweis der Überexpression der Proteinphosphatasen 2A und 2C bzw. beider bei den doppelt transgenen Mäusen in Relation zu Calsequestrin (CSQ), was als Kontrolle zur gleichen Gelbeladung mitgemessen wurde und von dem man meist annimmt, es sei bei Herzinsuffizienz unverändert (Faggioni und Knollmann, 2012).

Wijnker et al. zeigten 2011, daß die Zugabe der katalytischen Untereinheit der PP2A (PP2A_c) über eine vermehrte Dephosphorylierung von Troponin I zu einer Zunahme der Kalziumsensitivität von menschlichen Herzmuskelzellen führt.

Mutationen in dem Tnl-codierenden Gen waren einerseits mit den verschiedenen Formen von Kardiomyopathien assoziiert sind (Du et al., 2008). Andererseits wurde auch Troponin I (Tnl) untersucht, welches als inhibitorische Untereinheit des Troponinkomplexes die Muskelkontraktion verhindert. Es konnten aber weder bei der Gesamtmenge noch bei der Phosphorylierung des Troponin I Unterschiede zwischen den Genotypen in der vorliegenden Arbeit gefunden werden. In der Literatur wurde bereits gezeigt, daß Phospholamban (PLB), die Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) und Calsequestrin (CSQ) in Herzen von Wildtypen und PP2A-überexprimierenden Mäusen in gleicher Menge vorliegen (Gergs et al., 2004). Phospholamban, das membranständig am kardialen sarkoplasmatischen Retikulum sitzt, inhibiert die SERCA. Durch Phosphorylierung von Phospholamban wird die Inhibition der SERCA aufgehoben und führt so zur Beseitigung von zytosolischem Kalzium, das nicht mehr für die kardiale Kontraktion zur Verfügung steht und was letztlich zu einer beschleunigten Relaxation führt (Bers, 2008). Durch große Mengen von Serin/Threonin- Phosphatasen, wie sie bei den transgenen Tieren vorhanden sind, ist Phospholamban einer ständigen Dephosphorylierung unterworfen. Dies ist eine mögliche Erklärung für die gestörte Relaxation des Myokards, bei der die Normalisierung der zytosolischen Kalziumkonzentration in der Diastole gehemmt ist. Denn durch Inhibition der SERCA durch dephosphoryliertes PLB können zytosolische Kalziumionen nicht ins sarkoplasmatische Retikulum zurück gelangen. Eine weitere Ursache für eine gestörte Relaxation könnte eine Fibrose der Herzmuskelzellen sein.

Die bei der Untersuchung der Gesamtmenge an Phospholamban gezeigten Unterschiede stehen im Widerspruch mit Ergebnissen anderer Untersuchungen wie (Gergs et al., 2004). Dort blieb die Phospholambangesamtmenge bei den PP2A-überexprimierenden Mäusen in Vergleich zum Wildtyp unverändert. An dieser Stelle sei erwähnt, daß Phospholamban in zwei Formen vorliegt: zum einen als Monomer, welches an der Hemmung der SERCA beteiligt ist und zum anderen als Pentamer, dessen biologische Funktion Gegenstand aktueller Forschung ist. Eine Hypothese geht in diesem Zusammenhang davon aus, daß das Pentamer eine Reservefunktion innehat und selbst inaktiv ist (Hamstra et al., 2020). Um auszuschließen, daß nur die Menge an PLB-Pentameren oder nur PLB-Monomere bestimmt werden, wurden die Proben vor der Gelelektrophorese erhitzt, um die Struktur der Pentamere aufzulösen und ausschließlich Monomere zu erhalten.

Die Methode der Proteinbestimmung ist relativ anfällig für Fehler, so können bei jedem einzelnen Western Blot Pipettierfehler auftreten und die Trenngele zum Auftrennen der Proteine können unterschiedliche Eigenschaften aufweisen.

Ebenso verhält es sich mit der Untersuchung der beiden Phosphorylierungstellen Serin-16 und Threonin-17. Die Phosphorylierung durch Kinasen und die Dephosphorylierung durch Phosphatasen geschieht *in vivo* in Sekundenschnelle. Die hier durchgeführten Organentnahmen fanden zwar standardisiert statt, dennoch kann die Zeit zwischen Isoprenalinbelastung und Organentnahme mit endgültiger Fixierung des Phosphorylierungszustandes nie exakt gleich sein. Dies könnte ein Grund dafür sein, daß die erwartete verminderte Phosphorylierung von PLB durch Phosphatase überexprimierende Tiere nicht nachgewiesen werden konnte. Zuverlässigere Daten erhält man an isoliert perfundierten Herzen nach Langendorff, die gut schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren werden können.

In diesem Kontext stellt sich auch die Frage, inwiefern sich die Proteinphosphatasen 2A und 2C gegenseitig in den doppelt transgenen Tieren beeinflussen. Die Ergebnisse des Proteinnachweises der PP2C lassen vermuten, daß die PP2A die Expression der PP2C reduzieren kann. Da die Expressionskassette der PP2C identisch ist mit der Expressionskassette der PP2A, liegt die Ursache wahrscheinlich eher auf der Proteinebene. Um dies herauszufinden, könnte man die mRNA-Expression mittels qPCR, die die Quantifizierung der gewonnenen RNA mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen ermöglicht, untersuchen. Für PP2C-überexprimierende Tiere wurde die Proteinaktivität der PP2C ermittelt (Bollmann et al., 2021). Zum Ausschluss beziehungsweise Nachweis einer gegenseitigen Beeinflussung von PP2A und PP2C könnte man diese Untersuchung bei den doppelt transgenen Versuchstieren im Vergleich zu den einfach transgenen Mäusen durchführen. Eventuell bewirkt die PP2A

auch eine beschleunigte Degradation der PP2C, sei es auf mRNA- oder Proteinebene. Für eine genauere Untersuchung dessen müsste man auf Zellkulturmodelle zurückgreifen, in denen die Signalwege leichter manipuliert werden können.

5.3 Laborchemische Untersuchung

Die laborchemische Untersuchung des Plasmas der transgenen Mäuse ergab keine Abweichungen der Konzentrationen von Natriumionen und der Nierenretentionsparameter Harnstoff und Kreatinin vom Wildtyp. Erhöhte Nierenretentionsparameter hätte man erwarten können, wenn durch die eingeschränkte linksventrikuläre Funktion des Herzens die Durchblutung der Nieren nicht mehr gewährleistet werden kann und die Niere dadurch ihrer Funktion nicht mehr hätte nachgehen können (Kamboj und Kazory, 2019). Erhöhte Konzentrationen im Vergleich zum WT ergab die Untersuchung des Enzyms Aspartat-Aminotransferase (ASAT), das neben Gehirn, Niere, Pankreas, Herz- und Skelettmuskulatur und Erythrozyten hauptsächlich in der Leber vorkommt. Eine Erhöhung kann Folge einer Stauung der Leber aufgrund der insuffizienten rechtsventrikulären Herzfunktion sein (Seeto et al., 2000).

In Anbetracht der Vergrößerung der Ventrikel und der Vorhöfe bei den transgenen Tieren (siehe Abb. 23 und Tab. 14) hätte man das Blut auf das Peptidhormon BNP bzw. dessen Vorläuferpeptid proBNP untersuchen können. BNP wird von Herzmuskelzellen synthetisiert und bei Dehnung der Ventrikel und Vorhöfe durch bspw. Volumenbelastung sezerniert (Doust et al., 2006). Die Hauptwirkung entfaltet es an den Nieren, die zu einer vermehrten Natriurese angeregt werden und infolgedessen das zirkulierende Volumen im Kreislauf verringert wird. Aufgrund dieses Mechanismus gilt es als kardialer Marker einer Herzinsuffizienz (Doust et al., 2006).

5.4 Morphologische Parameter

Wie in Tabelle 14 erkennbar ist, sind die jeweiligen absoluten Körpergewichte und damit auch die absoluten Herzgewichte der vier Untersuchungsgruppen aufgrund der interindividuellen Abweichungen bedingt durch Geschlecht oder Ernährungszustand nicht gut vergleichbar. Daher hat es sich bewährt das relative Herzgewicht, also Herzgewicht dividiert durch das Körpergewicht, zu ermitteln. Das relative Herzgewicht war bei allen transgenen Tieren erhöht. Der Vergleichswert der WT-Mäuse deckte sich mit Messwerten von Brewis et al., 2000. Die Erhöhung des relativen Herzgewichtes bei den PP2A- und PP2C-Mäusen decken sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen (Gergs et al., 2014; Bollmann, 2016). Anhand der Fotodokumentation mit Maßstab (Abb. 23) kann man bereits makroskopisch eine deutliche Vergrößerung

des Herzen der DT-Mäuse feststellen. Dies schlug sich ebenfalls in einem annähernd doppelten relativen Herzgewicht der DT-Tiere gegenüber dem Wildtyp nieder und passt zu der gemessenen Vergrößerung des linksventrikulären Innendurchmessers.

Eine derart deutliche Herzvergrößerung könnte dazu führen, daß das Myokard nicht mehr ausreichend durch die Herzkranzgefäße versorgt werden kann und es zu myokardialen Ischämien insbesondere der inneren Myokardschichten kommen kann (Rowin und Fifer, 2021).

Des Weiteren konnte bei den doppelt transgenen Tieren verglichen mit den drei anderen Genotypen eine Vergrößerung beider Vorhöfe festgestellt werden (siehe Abb. 23 und Tab. 14). Die Vorhofdilatation könnte Folge der massiv verringerten Ejektionsfraktion mit resultierender Volumenbelastung der Ventrikel sein. Zudem besteht bei vergrößerten Vorhöfen das Risiko für die Entwicklung von Vorhofflimmern und die damit begünstigte Bildung von Thromben in den Vorhöfen (Schotten et al., 2003). Im Echokardiogramm das parallel zu jedem Herzecho in dieser Arbeit gemessen wurde (Daten nicht gezeigt), konnte ein Vorhofflimmern weder bestätigt noch ausgeschlossen werden, da bei der Ableitung über den Untersuchungstisch die Darstellung einer P-Welle nicht möglich war.

5.5 Histologie

Die immunhistochemische Untersuchung der Herzspitzen mit den Antikörpern gegen PP2A und PP2C erbrachte den Nachweis der Überexpression der Proteinphosphatasen der entsprechenden Versuchstiergruppen in den Kardiomyocyten selbst.

Die Hämatoxylin-Eosin- und Masson-Goldner-Trichrom-Färbungen sind zum Nachweis einer möglichen Fibrosierung des Myokards in Form von Bindegewebsvermehrung angefertigt worden. Anders als erwartet, wies lediglich die Probe des PP2C-Genotypes eine lokale Fibrose niedrigen Grades auf, wohingegen die restlichen Präparate keine Unterschiede zum Wildtyp zeigen. Im Gegensatz dazu wiesen Gergs et al. 2004 bei 10 Wochen alten PP2A-Mäusen Fibroseherde und Nekroseinseln nach. Mit großer Wahrscheinlichkeit kann das Ausbleiben der Fibrosen und Nekrosen in den PP2A-TG durch das geringere Alter der Mäuse erklärt werden.

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, Mäuse mit herzspezifischer Überexpression der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatasen 2A und 2C unter Ruhebedingungen und unter β -adrenerger Stimulation zu charakterisieren. Aufgrund der Möglichkeit der Beteiligung von Proteinphosphatasen an den regulierenden Mechanismen bei der Herzinsuffizienz und der damit verbundenen hohen klinischen Relevanz wurden funktionelle Untersuchungen in vivo und unter anderem Proteinnachweise in vitro durchgeführt.

In diesem Zusammenhang wurde im Laufe der Versuche erfolgreich eine Stressreaktion provoziert, welche den klinischen Bedingungen von β -adrenergem Stress entspricht.

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Herzen der einfach und doppelt transgenen Mäuse, im Gegensatz zu denen der Wildtyp-Mäuse, in ihrer Kontraktilität deutlich eingeschränkt sind. Vor allem die Herzen der doppelt transgenen Tiere zeigten erhöhte Innendurchmesser und geringere Wanddicken mit reduzierter Dickenzunahme in der Systole unter Ruhe- und Stressbedingungen. Formal wurden damit die Kriterien einer dilatativen Kardiomyopathie erfüllt. Es konnte ebenfalls eine gestörte Herzwandkinetik und diastolische Funktion der doppelt transgenen Mäuse nachgewiesen werden.

Phospholamban, ein Schlüsselenzym der genetisch determinierten dilatativen Kardiomyopathie, hemmt im dephosphorylierten Zustand den Einstrom von Kalziumionen am sarkoplasmatischen Retikulum und nimmt damit großen Einfluss auf die Kontraktilität und Relaxation des Myokards. Bei erhöhter Proteinphosphataseaktivität wie in den vorliegenden Mausmodellen ist Phospholamban einer ständigen Dephosphorylierung unterzogen. Durch die verringerte Kontraktionsfähigkeit verbleibt Blut im Ventrikel und es kommt zu einer Volumenbelastung und konsekutiv zu einer erhöhten Wandspannung der Kardiomyozyten.

Diese funktionellen Beeinträchtigungen schlugen sich auch in erhöhten relativen Herzgewichten nieder, die man bereits makroskopisch erkennen konnte. Aufgrund der Vergrößerung der Herzhöhlen wurden Herzspitzenpräparate histologisch auf Hypertrophiemarker untersucht. Als Kompensationsmechanismus der Volumenbelastung sowie der gestörten Relaxation folgt eine exzentrische Hypertrophie, die sich, wie in der Histologie der PP2C-Mäusen, in einer Fibrosierung äußert.

Da diese Veränderungen durch die Proteinphosphatasen 2A und 2C bedingt sind, wurden daraufhin molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt, um Unterschiede bei einigen beteiligten Proteinen der Kalziumhomöostase zu identifizieren.

7. Klinischer Ausblick

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen biochemischen und physiologischen Veränderungen bei transgenen Mäusen, die PP2-Subtypen überexprimieren bilden eine vielversprechende Grundlage für weiterführende Arbeiten zur Targetvalidierung mit dem Ziel klinischer Anwendungen. Die erreichten Ergebnisse legen nahe, daß die Hemmung dieser Proteinphosphatasen in Kardiomyozyten zu einem neuartigen Ansatz in der Therapie von Herzinsuffizienz und Kardiomyopathien weiterentwickelt werden könnte. Mögliche Strategien zur Erreichung dieses Ziels sind vielfältig und unterscheiden sich sehr in ihrer Komplexität. Es konnte gezeigt werden, daß Zink die Enzymaktivität von PP2C hemmt (Neumann et al., 2021; Lin und Li, 2018). Ein derartiger Ansatz berücksichtigt aber nicht, daß eine Hemmung der mitochondrialen Proteinphosphatasen eine andere, gegebenenfalls sogar nachteilige Auswirkung auf die kardiale Funktion haben kann, als die der zytosolisch lokalisierten Phosphatasen. Eine andere Strategie besteht darin, durch Screening umfangreicher Substanzsammlungen Wirkstoffstrukturen zu identifizieren und nachfolgend zu hochspezifischen Entwicklungskandidaten für klinische Prüfungen zu optimieren. Äußerst komplex und sicher mit noch größerem Entwicklungsrisiko verbunden sind denkbare Ansätze zur Gentherapie. Derartige Ansätze sind aber bislang nur auf Tiermodelle und zellbasierte Verfahren beschränkt. So wurde bereits erfolgreich eine Proteinphosphatase 1-Hemmung durch Vektor-vermittelte Gentherapie erzielt, die im Mausmodell die linksventrikuläre diastolische Funktion verbesserte und das ventrikuläre Remodellierung milderte (Miyazaki et al., 2012). Ebenso Vektor-vermittelt konnte in der Zellkultur die Proteinphosphatase 2C erfolgreich herunterreguliert werden (Lu et al. 2020). Die Untersuchung anderer Proteinphosphatasen, wie bspw. der PP5, und deren Substrate sowohl im Mausmodell als auch im Patienten könnte weitere Erkenntnisse über die Pathophysiologie der terminalen Herzinsuffizienz liefern.

8. Literaturverzeichnis

Abuzaanona A, Lanfear D (2017) Pharmacogenomics of the Natriuretic Peptide System in Heart Failure. *Current heart failure reports* 14:536–542. doi:10.1007/s11897-017-0365-5

Acil T, Wichter T, Stypmann J, Janssen F, Paul M, Grude M, Scheld HH, Breithardt G, Bruch C (2005) Prognostic value of tissue Doppler imaging in patients with chronic congestive heart failure. *International journal of cardiology* 103:175–181. doi:10.1016/j.ijcard.2004.08.048

Ai X, Pogwizd SM (2005) Connexin 43 downregulation and dephosphorylation in nonischemic heart failure is associated with enhanced colocalized protein phosphatase type 2A. *Circulation research* 96:54–63. doi:10.1161/01.RES.0000152325.07495.5a

Apple FS, Daniels LB, Januzzi J, Omland T, Ordonez-Llanos J, Jaffe A (2019) Role of BNP vs NT-proBNP Testing in the Age of New Drug Therapies; Sacubitril-Valsartan. *Clinical chemistry* 65:1076–1083. doi:10.1373/clinchem.2018.289371

Arques S, Ambrosi P, Roux E, Habib G (2004) Potentials and limitations of color M-Mode and tissue Doppler indexes in identifying pseudonormal mitral filling pattern in patients with acute symptoms of heart failure and preserved left ventricular systolic function. *The American journal of cardiology* 93:1057–1060. doi:10.1016/j.amjcard.2003.12.063

Aye T-T, Soni S, van Veen TAB, van der Heyden MAG, Cappadona S, Varro A, Weger RA de, Jonge N de, Vos MA, Heck AJR, Scholten A (2012) Reorganized PKA-AKAP associations in the failing human heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 52:511–518. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.06.003

Bartel T (Hrsg) (2007) *Echokardiographie; Lehrbuch und Atlas*. Elsevier Urban & Fischer, München

Batra J, Truby LK, Defilippis EM, Takeda K, Takayama H, Naka Y, Yuzefpolskaya M, Colombo PC, Sayer G, Farr MA, Garan AR, Uriel N, Topkara VK (2021) C-Reactive Protein Levels Predict Outcomes in Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device Patients; An INTERMACS Analysis. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*. doi:10.1097/MAT.0000000000001327

Bell JR, Raaijmakers AJA, Janssens JV, Delbridge LMD (2015) CaMKII δ and cardiomyocyte Ca(2+) signalling new perspectives on splice variant targeting. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 42:1327–1332. doi:10.1111/1440-1681.12489.

Benes J, Kotrc M, Wohlfahrt P, Conrad MJ, Franekova J, Jabor A, Lupinek P, Kautzner J, Melenovsky V, Jarolim P (2019) The Role of GDF-15 in Heart Failure Patients With Chronic Kidney Disease. *The Canadian journal of cardiology* 35:462–470. doi:10.1016/j.cjca.2018.12.027

Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE et al (2017) Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update; A Report From the American Heart Association. *Circulation* 135:e146-e603. doi:10.1161/CIR.0000000000000485

Bers DM (2004) Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *Journal of molecular and cellular cardiology* 37:417–429. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.05.026

Bers DM (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual review of physiology* 70:23–49. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455

- Bevilaqua LRM, Cammarota M, Dickson PW, Sim ATR, Dunkley PR (2003) Role of protein phosphatase 2C from bovine adrenal chromaffin cells in the dephosphorylation of phospho-serine 40 tyrosine hydroxylase. *Journal of neurochemistry* 85:1368–1373. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01792.x
- Blanco P (2020) Rationale for using the velocity-time integral and the minute distance for assessing the stroke volume and cardiac output in point-of-care settings. *The ultrasound journal* 12:21. doi:10.1186/s13089-020-00170-x
- Böhmeke T, Doliva R, Flachskampf FA (2004) *Der Echo-Guide; Die kompakte Einführung in die Echokardiographie*. Thieme, Stuttgart
- Böhmeke T, Schmidt A (2015) *Checkliste Echokardiografie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- 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-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362:222–231
- Bollmann P, Werner F, Jaron M, Bruns TA, Wache H, Runte J, Bokník P, Kirchhefer U, Müller FU, Buchwalow IB, Rothmund S, Neumann J, Gergs U (2021) Initial Characterization of Stressed Transgenic Mice With Cardiomyocyte-Specific Overexpression of Protein Phosphatase 2C. *Front. Pharmacol.* 11:171. doi:10.3389/fphar.2020.591773
- Braunwald E, Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Mann DL, Tomaselli GF (Hrsg) (2019) *Braunwald's heart disease; A textbook of cardiovascular medicine*. Elsevier, Philadelphia, PA
- Brewis N, Ohst K, Fields K, Rapacciuolo A, Chou D, Bloor C, Dillmann W, Rockman H, Walter G (2000) Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a mutant A subunit of protein phosphatase 2A. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 279:H1307-18. doi:10.1152/ajpheart.2000.279.3.H1307
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *The New England journal of medicine* 307:205–211. doi:10.1056/NEJM198207223070401
- Brittsan AG, Kranias EG (2000) Phospholamban and cardiac contractile function. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32:2131–2139. doi:10.1006/jmcc.2000.1270
- Buchwalow I, SamoiloVA V, Boecker W, Tiemann M (2011) Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry; Fallacies and facts. *Scientific reports* 1:28. doi:10.1038/srep00028
- Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing S-L, 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. *Molecular and cellular biology* 22:4124–4135
- Chen MJ, Dixon JE, Manning G (2017) Genomics and evolution of protein phosphatases. *Science signaling* 10. doi:10.1126/scisignal.aag1796
- Cheng A, Ross KE, Kaldis P, Solomon MJ (1999) Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes & development* 13:2946–2957. doi:10.1101/gad.13.22.2946

- Christ T, Boknik P, Wöhrl S, Wettwer E, Graf EM, Bosch RF, Knaut M, Schmitz W, Ravens U, Dobrev D (2004) L-type Ca²⁺ current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation* 110:2651–2657. doi:10.1161/01.CIR.0000145659.80212.6A
- Christenson RH (2008) What is the value of B-type natriuretic peptide testing for diagnosis, prognosis or monitoring of critically ill adult patients in intensive care? *Clinical chemistry and laboratory medicine* 46:1524–1532. doi:10.1515/CCLM.2008.294
- Chu G, Lester JW, Young KB, Luo W, Zhai J, Kranias EG (2000) A single site (Ser16) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to beta -agonists. *The Journal of biological chemistry* 275:38938–38943. doi:10.1074/jbc.M004079200
- Cohen P (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual review of biochemistry* 58:453–508. doi:10.1146/annurev.bi.58.070189.002321
- Cohen P (1994) The discovery of protein phosphatases; From chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 16:583–588. doi:10.1002/bies.950160812
- Cohen P (2001) The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *European journal of biochemistry* 268:5001–5010. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02473.x
- Cohen P, Cohen PT (1989) Protein phosphatases come of age. *The Journal of biological chemistry* 264:21435–21438
- Cohen PT (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases; Variety is the spice of life. *Trends in biochemical sciences* 22:245–251
- Cohen P (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nature cell biology* 4:E127-30. doi:10.1038/ncb0502-e127
- Cosson S (2004) Usefulness of B-type natriuretic peptide (BNP) as a screen for left ventricular abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetes & metabolism* 30:381–386. doi:10.1016/s1262-3636(07)70132-5
- Cowie MR (2004) B type natriuretic peptide testing; Where are we now? *Heart (British Cardiac Society)* 90:725–726. doi:10.1136/hrt.2003.014787
- Das AK, Helps NR, Cohen PT, Barford D (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *The EMBO journal* 15:6798–6809
- DeGrande ST, Little SC, Nixon DJ, Wright P, Snyder J, Dun W, Murphy N, Kilic A, Higgins R, Binkley PF, Boyden PA, Carnes CA, Anderson ME, Hund TJ, Mohler PJ (2013) Molecular mechanisms underlying cardiac protein phosphatase 2A regulation in heart. *The Journal of biological chemistry* 288:1032–1046. doi:10.1074/jbc.M112.426957
- Deshmukh PA, Blunt BC, Hofmann PA (2007) Acute modulation of PP2a and troponin I phosphorylation in ventricular myocytes; Studies with a novel PP2a peptide inhibitor. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 292:H792-9. doi:10.1152/ajpheart.00225.2006
- Dodge-Kafka KL, Bauman A, Mayer N, Henson E, Heredia L, Ahn J, McAvoy T, Nairn AC, Kapiloff MS (2010) cAMP-stimulated protein phosphatase 2A activity associated with muscle A kinase-anchoring protein (mAKAP) signaling complexes inhibits the phosphorylation and activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3. *The Journal of biological chemistry* 285:11078–11086. doi:10.1074/jbc.M109.034868

- Doust J, Lehman R, Glasziou P (2006) The role of BNP testing in heart failure. *American family physician* 74:1893–1898
- Du J, Zhang C, Liu J, Sidky C, Huang XP (2006) A point mutation (R192H) in the C-terminus of human cardiac troponin I causes diastolic dysfunction in transgenic mice. *Archives of biochemistry and biophysics* 456:143–150. doi:10.1016/j.abb.2006.08.018
- Du J, Liu J, Feng H-Z, Hossain MM, Gobara N, Zhang C, Li Y, Jean-Charles P-Y, Jin J-P, Huang X-P (2008) Impaired relaxation is the main manifestation in transgenic mice expressing a restrictive cardiomyopathy mutation, R193H, in cardiac TnI. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294:H2604-13. doi:10.1152/ajpheart.91506.2007
- Edwards KD, Tighe MP (2020) How to use N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) in assessing disease severity in bronchiolitis. *Archives of disease in childhood. Education and practice edition* 105:282–288. doi:10.1136/archdischild-2019-316896
- El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didié M, Dobrev D, Eschenhagen T (2006) Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 346:700–706. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.182
- El-Armouche A, Eschenhagen T (2009) Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart failure reviews* 14:225–241. doi:10.1007/s10741-008-9132-8
- El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh Y-H, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T, Carrier L (2007) Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 43:223–229. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.05.003
- El-Armouche A, Wittköpper K, Degenhardt F, Weinberger F, Didié M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsöld B, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T (2008) Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovascular research* 80:396–406. doi:10.1093/cvr/cvn208
- El-Armouche A, Wittköpper K, Fuller W, Howie J, Shattock MJ, Pavlovic D (2011) Phospholemman-dependent regulation of the cardiac Na/K-ATPase activity is modulated by inhibitor-1 sensitive type-1 phosphatase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25:4467–4475. doi:10.1096/fj.11-184903
- Eschenhagen T (2008) Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nature medicine* 14:485–487. doi:10.1038/nm0508-485
- Fabiato A, Fabiato F (1975) Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *The Journal of physiology* 249:469–495
- Faggioni M, Knollmann BC (2012) Calsequestrin 2 and arrhythmias. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 302:H1250-60. doi:10.1152/ajpheart.00779.2011
- Feola M, Testa M, Ferreri C, Cardone M, Sola M, Ariotti S, Rosso GL (2018) Role of Response-to-Diuretic in Predicting Prognosis in Discharged Heart Failure Patients After an Acute Decompensation. *Archives of medical research* 49:198–204. doi:10.1016/j.arcmed.2018.08.007

- Feola M, Testa M, Leto L, Cardone M, Sola M, Rosso GL (2016) Role of galectin-3 and plasma B type-natriuretic peptide in predicting prognosis in discharged chronic heart failure patients. *Medicine* 95:e4014. doi:10.1097/MD.00000000000004014
- Flachskampf FA (2017) *Kursbuch Echokardiografie; Unter Berücksichtigung nationaler und internationaler Leitlinien*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Fontes-Carvalho R, Sampaio F, Teixeira M, Gama V, Leite-Moreira AF (2015) The role of a structured exercise training program on cardiac structure and function after acute myocardial infarction; Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 16:90. doi:10.1186/s13063-015-0612-6
- Francis GS (2001) Pathophysiology of chronic heart failure. *The American Journal of Medicine* 110:37–46. doi:10.1016/S0002-9343(98)00385-4
- Frea S, Morello M, Bobbio M, Saviolo R, Mangiardi L, Trevi GP (2006) The Myocardial Performance Index detects chronic cardiac allograft dysfunction sooner than other methods. *The Journal of cardiovascular surgery* 47:461–467
- Fukunaga K, Kobayashi T, Tamura S, Miyamoto E (1993) Dephosphorylation of autophosphorylated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 2C. *The Journal of biological chemistry* 268:133–137
- George J, Wexler D, Roth A, Barak T, Sheps D, Keren G (2006) Usefulness of anti-oxidized LDL antibody determination for assessment of clinical control in patients with heart failure. *European journal of heart failure* 8:58–62. doi:10.1016/j.ejheart.2005.04.015
- Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W, Neumann J (2004) Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *The Journal of biological chemistry* 279:40827–40834. doi:10.1074/jbc.M405770200
- Gergs U, Boknik P, Schmitz W, Simm A, Silber R-E, Neumann J (2008) A positive inotropic effect of ATP in the human cardiac atrium. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294:H1716-23. doi:10.1152/ajpheart.00945.2007
- Gergs U, Trapp T, Bushnaq H, Simm A, Silber R-E, Neumann J (2019) Age-Dependent Protein Expression of Serine/Threonine Phosphatases and Their Inhibitors in the Human Cardiac Atrium. *Advances in medicine* 2019:2675972. doi:10.1155/2019/2675972
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL et al (2013) Heart disease and stroke statistics--2013 update; A report from the American Heart Association. *Circulation* 127:e6-e245. doi:10.1161/CIR.0b013e31828124ad
- Graham RJ, Gelman JS, Donelan L, Mottram PM, Peverill RE (2003) Effect of preload reduction by haemodialysis on new indices of diastolic function. *Clinical science (London, England : 1979)* 105:499–506. doi:10.1042/CS20030059
- Grote-Wessels S, Baba HA, Boknik P, El-Armouche A, Fabritz L, Gillmann H-J, Kucerova D, Matus M, Müller FU, Neumann J, Schmitz M, Stümpel F, Theilmeier G, Wohlschlaeger J, Schmitz W, Kirchhefer U (2008) Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 exacerbates progression of cardiac failure in a model with pressure overload. *Cardiovascular research* 79:464–471. doi:10.1093/cvr/cvn113
- Gruson D, Buglioni A, Burnett JC (2014) PTH; Potential role in management of heart failure. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 433:290–296. doi:10.1016/j.cca.2014.03.029

- Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, Morgan JP (1987) Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circulation research* 61:70–76. doi:10.1161/01.res.61.1.70
- Hainaut C, Gade W (2003) The emerging roles of BNP and accelerated cardiac protocols in emergency laboratory medicine. *Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology* 16:166–179
- Hall C, Stokke O (2002) Natriuretiske hjertepeptider som markører for hjertesykdom. *Tidsskrift for den Norske lægeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny række* 122:2784–2786
- Hall DD, Feekes JA, Arachchige Don AS, Shi M, Hamid J, Chen L, Strack S, Zamponi GW, Horne MC, Hell JW (2006) Binding of protein phosphatase 2A to the L-type calcium channel Cav1.2 next to Ser1928, its main PKA site, is critical for Ser1928 dephosphorylation. *Biochemistry* 45:3448–3459. doi:10.1021/bi051593z
- Hamstra SI, Whitley KC, Baranowski RW, Kurgan N, Braun JL, Messner HN, Fajardo VA (2020) The role of phospholamban and GSK3 in regulating rodent cardiac SERCA function. *American journal of physiology. Cell physiology* 319:C694-C699. doi:10.1152/ajpcell.00318.2020
- Heijman J, Dewenter M, El-Armouche A, Dobrev D (2013) Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 64:90–98. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.09.006
- Herzig S, Neumann J (2000) Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiological reviews* 80:173–210. doi:10.1152/physrev.2000.80.1.173
- Hien P (1996) *Echokardiographie-Handbuch*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Hoehn M, Zhang Y, Xu J, Gergs U, Boknik P, Werdan K, Neumann J, Ebel H (2015) Overexpression of protein phosphatase 2A in a murine model of chronic myocardial infarction leads to increased adverse remodeling but restores the regulation of β -catenin by glycogen synthase kinase 3 β . *International journal of cardiology* 183:39–46. doi:10.1016/j.ijcard.2015.01.087
- Huang J-P, Cheng M-L, Wang C-H, Huang S-S, Hsieh P-S, Chang C-C, Kuo C-Y, Chen K-H, Hung L-M (2020) Therapeutic potential of cPLA2 inhibitor to counteract dilated-cardiomyopathy in cholesterol-treated H9C2 cardiomyocyte and MUNO rat. *Pharmacological research* 160:105201. doi:10.1016/j.phrs.2020.105201
- Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases; The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225–236. doi:10.1016/0092-8674(95)90405-0
- Ichiki T, Boerrigter G, Huntley BK, Sangaralingham SJ, McKie PM, Harty GJ, Harders GE, Burnett JC (2013) Differential expression of the pro-natriuretic peptide convertases corin and furin in experimental heart failure and atrial fibrosis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 304:R102-9. doi:10.1152/ajpregu.00233.2012
- Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A; A highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *The Biochemical journal* 353:417–439
- Januzzi JL (2012) The role of natriuretic peptide testing in guiding chronic heart failure management; Review of available data and recommendations for use. *Archives of cardiovascular diseases* 105:40–50. doi:10.1016/j.acvd.2011.10.007

- Jelić V, Milasinović G, Pavlović SU, Kanjuh V, Zivković M (2007) Brain natriuretic peptide as a predictor of heart failure in patients with permanent pacemaker. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo* 135:21–25. doi:10.2298/sarh0702021j
- Joyce W, Wang T (2020) What determines systemic blood flow in vertebrates? *The Journal of experimental biology* 223. doi:10.1242/jeb.215335
- Kallistratos MS, Dritsas A, Laoutaris ID, Cokkinos DV (2008) Chronotropic and neurohumoral markers for the evaluation of functional capacity in patients with impaired left ventricular function. *Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheorese* 49:26–32
- Kamboj M, Kazory A (2019) Left Ventricular Assist Device and the Kidney; Getting to the Heart of the Matter. *Blood purification* 48:289–298. doi:10.1159/000502080
- Kanagala P, Arnold JR, Singh A, Chan DCS, Cheng ASH, Khan JN, Gulsin GS, Yang J, Zhao L, Gupta P, Squire IB, Ng LL, McCann GP (2020) Characterizing heart failure with preserved and reduced ejection fraction; An imaging and plasma biomarker approach. *PloS one* 15:e0232280. doi:10.1371/journal.pone.0232280
- Kaneko H, Koike A, Senoo K, Tanaka S, Suzuki S, Nagayama O, Sagara K, Otsuka T, Matsuno S, Funada R, Uejima T, Oikawa Y, Yajima J, Nagashima K, Kirigaya H, Sawada H, Aizawa T, Yamashita T (2012) Role of cardiopulmonary dysfunction and left atrial remodeling in development of acute decompensated heart failure in chronic heart failure with preserved left ventricular ejection fraction. *Journal of cardiology* 59:359–365. doi:10.1016/j.jcc.2012.01.004
- Kato S, Terasawa T, Kobayashi T, Ohnishi M, Sasahara Y, Kusuda K, Yanagawa Y, Hiraga A, Matsui Y, Tamura S (1995) Molecular cloning and expression of mouse mg(2+)-dependent protein phosphatase beta-4 (type 2C beta-4). *Archives of biochemistry and biophysics* 318:387–393. doi:10.1006/abbi.1995.1244
- Kelly NP, Januzzi JL (2013) The role of B-type natriuretic Peptide testing in guiding outpatient heart failure treatment. *Current treatment options in cardiovascular medicine* 15:397–409. doi:10.1007/s11936-013-0247-4
- Khouri SJ, Maly GT, Suh DD, Walsh TE (2004) A practical approach to the echocardiographic evaluation of diastolic function. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 17:290–297. doi:10.1016/j.echo.2003.08.012
- Kjaer A, Hesse B (2001) Heart failure and neuroendocrine activation; Diagnostic, prognostic and therapeutic perspectives. *Clinical physiology (Oxford, England)* 21:661–672. doi:10.1046/j.1365-2281.2001.00371.x
- Klumpp S, Selke D, Hermesmeier J (1998) Protein phosphatase type 2C active at physiological Mg²⁺; Stimulation by unsaturated fatty acids. *FEBS letters* 437:229–232
- Koracevic GP (2010) Does pheochromocytoma mimic or cause acute myocardial infarction? *Cardiology journal* 17:215–216
- Kunert M, Ulbricht LJ (2010) *Praktische Echokardiographie; Lehrbuch und DVD mit Video-Atlas ; mit 84 Tabellen ; DVD mit 142 Videosequenzen, weiteren Abbildungen und Internet-Links.* Dt. Ärzte-Verl., Köln
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lahiri SK, Aguilar-Sanchez Y, Wehrens XHT (2021) Mechanisms underlying pathological Ca²⁺ handling in diseases of the heart. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 473:331–347. doi:10.1007/s00424-020-02504-z

- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MSJ, Stewart WJ (2005) Recommendations for chamber quantification; A report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 18:1440–1463. doi:10.1016/j.echo.2005.10.005
- Leong DP, Chakrabarty A, Shipp N, Molaee P, Madsen PL, Joerg L, Sullivan T, Worthley SG, Pasquale CG de, Sanders P, Selvanayagam JB (2012) Effects of myocardial fibrosis and ventricular dyssynchrony on response to therapy in new-presentation idiopathic dilated cardiomyopathy; Insights from cardiovascular magnetic resonance and echocardiography. *European heart journal* 33:640–648. doi:10.1093/eurheartj/ehr391
- Lifschitz-Mercer B, Sheinin Y, Ben-Meir D, Bramante-Schreiber L, Leider-Trejo L, Karby S, Smorodinsky NI, Lavi S (2001) Protein phosphatase 2C α expression in normal human tissues; An immunohistochemical study. *Histochemistry and cell biology* 116:31–39. doi:10.1007/s004180100291
- Lin W, Li D (2018) Zinc and Zinc Transporters; Novel Regulators of Ventricular Myocardial Development. *Pediatric cardiology* 39:1042–1051. doi:10.1007/s00246-018-1859-y.
- Linck B, Bokník P, Baba HA, Eschenhagen T, Haverkamp U, Jäckel E, Jones LR, Kirchhefer U, Knapp J, Läer S, Müller FU, Schmitz W, Scholz H, Syska A, Vahlensieck U, Neumann J (1998) Long-term beta adrenoceptor-mediated alteration in contractility and expression of phospholamban and sarcoplasmic reticulum Ca(++)-ATPase in mammalian ventricle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 286:531–538
- Linskey K, Lewandowski K (2012) The role of B-type natriuretic peptide testing in patients with acute coronary syndromes. *Minerva cardioangiologica* 60:175–182
- Liu JE, Barac A, Thavendiranathan P, Scherrer-Crosbie M (2020) Strain Imaging in Cardio-Oncology. *JACC. CardioOncology* 2:677–689. doi:10.1016/j.jacc.2020.10.011
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003) What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circulation research* 93:896–906. doi:10.1161/01.RES.0000102042.83024.CA
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193:265–275
- Lu G, Ren S, Korge P, Choi J, Dong Y, Weiss J, Koehler C, Chen J-n, Wang Y (2007) A novel mitochondrial matrix serine/threonine protein phosphatase regulates the mitochondria permeability transition pore and is essential for cellular survival and development. *Genes & development* 21:784–796. doi:10.1101/gad.1499107
- Lu G, Wang Y (2008) Functional diversity of mammalian type 2C protein phosphatase isoforms; New tales from an old family. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 35:107–112. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04843.x
- Lu Z, Xiao P, Zhou Y, Li Z, Yu X, Sun J, Shen Y, Zhao B (2020) Identification of HN252 as a potent inhibitor of protein phosphatase PPM1B. *Journal of cellular and molecular medicine* 24:13463–13471. doi:10.1111/jcmm.15975

- Lüss H, Klein-Wiele O, Bokník P, Herzig S, Knapp J, Linck B, Müller FU, Scheld HH, Schmid C, Schmitz W, Neumann J (2000) Regional expression of protein phosphatase type 1 and 2A catalytic subunit isoforms in the human heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32:2349–2359. doi:10.1006/jmcc.2000.1265
- MacDougall LK, Jones LR, Cohen P (1991) Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *European journal of biochemistry* 196:725–734
- MacKenzie E, Smith A, Angus N, Menzies S, Brulisauer F, Leslie SJ (2010) Mixed-method exploratory study of general practitioner and nurse perceptions of a new community based nurse-led heart failure service. *Rural and remote health* 10:1510
- MacLennan DH, Kranias EG (2003) Phospholamban; A crucial regulator of cardiac contractility. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4:566–577. doi:10.1038/nrm1151
- Maeder MT, Mueller C, Schoch OD, Ammann P, Rickli H (2016) Biomarkers of cardiovascular stress in obstructive sleep apnea. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 460:152–163. doi:10.1016/j.cca.2016.06.046
- Maisel A (2001) B-type natriuretic peptide in the diagnosis and management of congestive heart failure. *Cardiology clinics* 19:557–571. doi:10.1016/s0733-8651(05)70243-5
- Maisel A (2001) B-type natriuretic peptide levels; A potential novel "white count" for congestive heart failure. *Journal of cardiac failure* 7:183–193. doi:10.1054/jcaf.2001.24609
- Maisel AS (2001) B-type natriuretic peptide (BNP) levels; Diagnostic and therapeutic potential. *Reviews in cardiovascular medicine* 2 Suppl 2:S13-8
- Maisel AS (2001) Practical approaches to treating patients with acute decompensated heart failure. *Journal of cardiac failure* 7:13–17. doi:10.1054/jcaf.2001.26646
- Mandinov L (2000) Diastolic heart failure. *Cardiovascular research* 45:813–825. doi:10.1016/S0008-6363(99)00399-5
- Marley AE, Kline A, Crabtree G, Sullivan JE, Beri RK (1998) The cloning expression and tissue distribution of human PP2C β . *FEBS letters* 431:121–124
- Marley AE, Kline A, Crabtree G, Sullivan JE, Beri RK (1998) The cloning expression and tissue distribution of human PP2C β 1. *FEBS letters* 431:121–124. doi:10.1016/s0014-5793(98)00708-x
- Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC (1986) Intramural ("small vessel") coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 8:545–557. doi:10.1016/s0735-1097(86)80181-4
- Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC (1987) Morphologic evidence for "small vessel disease" in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Zeitschrift fur Kardiologie* 76 Suppl 3:91–100
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor); Defective regulation in failing hearts. *Cell* 101:365–376
- Mastikhina O, Moon B-U, Williams K, Hatkar R, Gustafson D, Mourad O, Sun X, Koo M, Lam AYL, Sun Y, Fish JE, Young EWK, Nunes SS (2020) Human cardiac fibrosis-on-a-chip model recapitulates disease hallmarks and can serve as a platform for drug testing. *Biomaterials* 233:119741. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119741

- Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ, Schwartz K, Charron P, Rocco C, Tesson F, Richter A, Wilke A, Komajda M (1999) Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. *European heart journal* 20:93–102
- Metra M, Teerlink JR (2017) Heart failure. *Lancet* (London, England) 390:1981–1995. doi:10.1016/S0140-6736(17)31071-1
- Mitchell GF, Jeron A, Koren G (1998) Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *The American journal of physiology* 274:H747-51. doi:10.1152/ajpheart.1998.274.3.H747
- Miyazaki Y, Ikeda Y, Shiraishi K, Fujimoto SN, Aoyama H, Yoshimura K, Inui M, Hoshijima M, Kasahara H, Aoki H, Matsuzaki M (2012) Heart failure-inducible gene therapy targeting protein phosphatase 1 prevents progressive left ventricular remodeling. *PLoS one* 7:e35875. doi:10.1371/journal.pone.0035875
- Moe GW (2006) B-type natriuretic peptide in heart failure. *Current opinion in cardiology* 21:208–214. doi:10.1097/01.hco.0000221582.71619.84
- Moltzahn S, Zeydabadijad M (2000) *Dopplerechokardiographie; CW, PW, Farbdoppler ; eine Einführung*. Thieme, Stuttgart
- Mor-Avi V, Lang RM, Badano LP, Belohlavek M, Cardim NM, Derumeaux G, Galderisi M, Marwick T, Nagueh SF, Sengupta PP, Sicari R, Smiseth OA, Smulevitz B, Takeuchi M, Thomas JD, Vannan M, Voigt J-U, Zamorano JL (2011) Current and evolving echocardiographic techniques for the quantitative evaluation of cardiac mechanics; ASE/EAE consensus statement on methodology and indications endorsed by the Japanese Society of Echocardiography. *European journal of echocardiography : the journal of the Working Group on Echocardiography of the European Society of Cardiology* 12:167–205. doi:10.1093/ejehoccard/jer021
- Movsesian MA, Karimi M, Green K, Jones LR (1994) Ca(2+)-transporting ATPase, phospholamban, and calsequestrin levels in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation* 90:653–657
- Myśliński W, Mosiewicz J, Ryczak E, Barud W, Błan A, Palusiński R, Hanzlik J (1998) Right ventricular function in systemic hypertension. *Journal of human hypertension* 12:149–155. doi:10.1038/sj.jhh.1000534
- Nagueh SF, Middleton KJ, Kopelen HA, Zoghbi WA, Quiñones MA (1997) Doppler tissue imaging; A noninvasive technique for evaluation of left ventricular relaxation and estimation of filling pressures. *Journal of the American College of Cardiology* 30:1527–1533
- Nagueh SF, Mikati I, Kopelen HA, Middleton KJ, Quiñones MA, Zoghbi WA (1998) Doppler estimation of left ventricular filling pressure in sinus tachycardia. A new application of tissue doppler imaging. *Circulation* 98:1644–1650
- Namdari M, Eatemadi A, Negahdari B (2016) Natriuretic peptides and their therapeutic potential in heart failure treatment; An updated review. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 62:1–7
- Nessler J, Nessler B, Golebiowska-Wiatrak R, Palka I, Gackowski A, Kitlinski M, Melander O, Fedorowski A (2013) Serum biomarkers and clinical outcomes in heart failure patients treated de novo with carvedilol. *Cardiology journal* 20:144–151. doi:10.5603/CJ.2013.0027
- Nessler J, Nessler B, Kitliński M, Gackowski A, Piwowarska W, Stepniowski M (2008) Concentration of BNP, endothelin 1, pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha, IL-6) and exercise capacity in patients with heart failure treated with carvedilol. *Kardiologia polska* 66:144-51; discussion 152-3

- Neumann J, Boknik P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Gupta RC, Watanabe AM (1993) Evidence for physiological functions of protein phosphatases in the heart; Evaluation with okadaic acid. *The American journal of physiology* 265:H257-66. doi:10.1152/ajpheart.1993.265.1.H257
- Neumann J, Bokník P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Wiechen K, Zimmermann N (1994) Biochemical and electrophysiological mechanisms of the positive inotropic effect of calyculin A, a protein phosphatase inhibitor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 271:535–541
- Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997) Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29:265–272. doi:10.1006/jmcc.1996.0271
- Neumann J, Herzig S, Boknik P, Apel M, Kaspereit G, Schmitz W, Scholz H, Tepel M, Zimmermann N (1995) On the cardiac contractile, biochemical and electrophysiological effects of cantharidin, a phosphatase inhibitor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 274:530–539
- Neumann J (2008) New pathophysiological function of protein phosphatase 2A? *Cardiovascular research* 80:7–8. doi:10.1093/cvr/cvn204
- Neumann J, Boknik P, Kirchhefer U, Gergs U (2021) The role of PP5 and PP2C in cardiac health and disease. *Cellular signalling* 85:110035. doi:10.1016/j.cellsig.2021.110035
- Niggli E, Ullrich ND, Gutierrez D, Kyrychenko S, Poláková E, Shirokova N (2013) Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors; Ca(2+) signaling and EC-coupling. *Biochimica et biophysica acta* 1833:866–875. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.08.016
- Nishimura RA, Tajik AJ (1997) Evaluation of Diastolic Filling of Left Ventricle in Health and Disease; Doppler Echocardiography Is the Clinician's Rosetta Stone. *Journal of the American College of Cardiology* 30:8–18. doi:10.1016/s0735-1097(97)00144-7
- O'Donoghue M, Braunwald E (2010) Natriuretic peptides in heart failure; Should therapy be guided by BNP levels? *Nature reviews. Cardiology* 7:13–20. doi:10.1038/nrcardio.2009.197
- Ommen SR, Nishimura RA, Appleton CP, Miller FA, Oh JK, Redfield MM, Tajik AJ (2000) Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures; A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. *Circulation* 102:1788–1794
- Palazzuoli A, Caputo M, Calabrò A, Nuti R (2012) Clinical impact of BNP and other emerging biomarkers in heart failure evaluation and management. *Minerva cardioangiologica* 60:183–194
- Pascual-Figal DA, Peñafiel P, La Morena G de, Redondo B, Nicolás F, Casas T, Valdés M (2007) Relation of B-type natriuretic peptide levels before and after exercise and functional capacity in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *The American journal of cardiology* 99:1279–1283. doi:10.1016/j.amjcard.2006.12.050
- Pearson RB, Wettenhall RE, Means AR, Hartshorne DJ, Kemp BE (1988) Autoregulation of enzymes by pseudosubstrate prototopes; Myosin light chain kinase. *Science (New York, N.Y.)* 241:970–973
- Pinger S (2011) *Repetitorium Kardiologie; Für Klinik, Praxis und Facharztprüfung ; mit 308 Tabellen.* Dt. Ärzte-Verl., Köln

- Piper W (2013) Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems. In: Piper W (Hrsg) Innere Medizin. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 1–180
- Pollick C, Hale SL, Kloner RA (1995) Echocardiographic and cardiac Doppler assessment of mice. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 8:602–610
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P (2016) 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure; The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European journal of heart failure* 18:891–975. doi:10.1002/ejhf.592
- Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochimica et biophysica acta* 490:27–34
- Prasad A, Lerman A, Rihal CS (2008) Apical ballooning syndrome (Tako-Tsubo or stress cardiomyopathy); A mimic of acute myocardial infarction. *American heart journal* 155:408–417. doi:10.1016/j.ahj.2007.11.008
- Pugh KG, Wei JY (2001) Clinical implications of physiological changes in the aging heart. *Drugs & aging* 18:263–276. doi:10.2165/00002512-200118040-00004
- Rajan S, Ahmed RPH, Jagatheesan G, Petrashevskaya N, Boivin GP, Urboniene D, Arteaga GM, Wolska BM, Solaro RJ, Liggett SB, Wiecek DF (2007) Dilated cardiomyopathy mutant tropomyosin mice develop cardiac dysfunction with significantly decreased fractional shortening and myofilament calcium sensitivity. *Circulation research* 101:205–214. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.148379
- Ram R, Mickelsen DM, Theodoropoulos C, Blaxall BC (2011) New approaches in small animal echocardiography; Imaging the sounds of silence. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301:H1765-80. doi:10.1152/ajpheart.00559.2011
- Ritzel A, Otto F, Bell M, Sabin G, Wieneke H (2015) Impact of lifestyle modification on left ventricular function and cardiopulmonary exercise capacity in patients with heart failure with normal ejection fraction and cardiometabolic syndrome; A prospective interventional study. *Acta cardiologica* 70:43–50. doi:10.1080/ac.70.1.3064592
- Rowin EJ, Fifer MA (2021) Evaluating Histopathology to Improve Our Understanding of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 77:2171–2173. doi:10.1016/j.jacc.2021.03.292
- Sahin U, Karikó K, Türeci Ö (2014) mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs. *Nature reviews. Drug discovery* 13:759–780. doi:10.1038/nrd4278
- Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A (1978) Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography; Results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 58:1072–1083. doi:10.1161/01.CIR.58.6.1072
- Sanna GD, Canonico ME, Santoro C, Esposito R, Masia SL, Galderisi M, Parodi G, Nihoyannopoulos P (2021) Echocardiographic Longitudinal Strain Analysis in Heart Failure; Real Usefulness for Clinical Management Beyond Diagnostic Value and Prognostic Correlations? A Comprehensive Review. *Current heart failure reports* 18:290–303. doi:10.1111/echo.13299

- Sasaki M, Ohnishi M, Tashiro F, Niwa H, Suzuki A, Miyazaki J-i, Kobayashi T, Tamura S (2007) Disruption of the mouse protein Ser/Thr phosphatase 2Cbeta gene leads to early pre-implantation lethality. *Mechanisms of development* 124:489–499. doi:10.1016/j.mod.2007.04.001
- Schaefer A, Klein G, Brand B, Lippolt P, Drexler H, Meyer GP (2003) Evaluation of left ventricular diastolic function by pulsed Doppler tissue imaging in mice. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 16:1144–1149. doi:10.1067/S0894-7317(03)00679-5
- Schmidt AG, Gerst M, Zhai J, Carr AN, Pater L, Kranias EG, Hoit BD (2002) Evaluation of left ventricular diastolic function from spectral and color M-mode Doppler in genetically altered mice. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 15:1065–1073
- Schmoltdt A, Benthe HF, Haberland G (1975) Digitoxin metabolism by rat liver microsomes. *Biochemical pharmacology* 24:1639–1641
- Schotten U, Neuberger H-R, Allesie MA (2003) The role of atrial dilatation in the domestication of atrial fibrillation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 82:151–162. doi:10.1016/S0079-6107(03)00012-9
- Schulze DH, Muqhal M, Lederer WJ, Ruknudin AM (2003) Sodium/calcium exchanger (NCX1) macromolecular complex. *The Journal of biological chemistry* 278:28849–28855. doi:10.1074/jbc.M300754200
- Schumacher A, Khojeini E, Larson D (2008) ECHO parameters of diastolic dysfunction. *Perfusion* 23:291–296. doi:10.1177/0267659109102485
- Seeto RK, Fenn B, Rockey DC (2000) Ischemic hepatitis; Clinical presentation and pathogenesis. *The American Journal of Medicine* 109:109–113. doi:10.1016/s0002-9343(00)00461-7
- Semeniuk LM, Kryski AJ, Severson DL (2002) Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 283:H976-82. doi:10.1152/ajpheart.00088.2002
- Sharma A, Stevens SR, Lucas J, Fiuzat M, Adams KF, Whellan DJ, Donahue MP, Kitzman DW, Piña IL, Zannad F, Kraus WE, O'Connor CM, Felker GM (2017) Utility of Growth Differentiation Factor-15, A Marker of Oxidative Stress and Inflammation, in Chronic Heart Failure; Insights From the HF-ACTION Study. *JACC. Heart failure* 5:724–734. doi:10.1016/j.jchf.2017.07.013
- Shenolikar S, Nairn AC (1991) Protein phosphatases; Recent progress. *Advances in second messenger and phosphoprotein research* 23:1–121
- Shi Y (2009) Serine/threonine phosphatases; Mechanism through structure. *Cell* 139:468–484. doi:10.1016/j.cell.2009.10.006
- Shimizu N, Kotani K (2020) Point-of-care testing of (N-terminal pro) B-type natriuretic peptide for heart disease patients in home care and ambulatory care settings. *Practical laboratory medicine* 22:e00183. doi:10.1016/j.plabm.2020.e00183
- Shindo K, Fukuda H, Hitsumoto T, Ito S, Kim J, Washio T, Kitakaze M (2020) Plasma BNP Levels and Diuretics Use as Predictors of Cardiovascular Events in Patients with Myocardial Infarction and Impaired Glucose Tolerance. *Cardiovascular drugs and therapy* 34:79–88. doi:10.1007/s10557-019-06922-9
- Siân Pincott E, Burch M (2011) Indications for heart transplantation in congenital heart disease. *Current cardiology reviews* 7:51–58. doi:10.2174/157340311797484240

- Signorile A, Sardanelli AM, Nuzzi R, Papa S (2002) Serine (threonine) phosphatase(s) acting on cAMP-dependent phosphoproteins in mammalian mitochondria. *FEBS letters* 512:91–94
- Signorile A, Sardanelli AM, Nuzzi R, Papa S (2002) Serine (threonine) phosphatase(s) acting on cAMP-dependent phosphoproteins in mammalian mitochondria. *FEBS letters* 512:91–94. doi:10.1016/s0014-5793(02)02226-3
- Simmerman HK, Jones LR (1998) Phospholamban; Protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiological reviews* 78:921–947. doi:10.1152/physrev.1998.78.4.921
- Singhal N, Saha A (2014) Bedside biomarkers in pediatric cardio renal injuries in emergency. *International journal of critical illness and injury science* 4:238–246. doi:10.4103/2229-5151.141457
- Sohn DW, Chai IH, Lee DJ, Kim HC, Kim HS, Oh BH, Lee MM, Park YB, Choi YS, Seo JD, Lee YW (1997) Assessment of mitral annulus velocity by Doppler tissue imaging in the evaluation of left ventricular diastolic function. *Journal of the American College of Cardiology* 30:474–480
- Solaro RJ, Moir AJ, Perry SV (1976) Phosphorylation of troponin I and the inotropic effect of adrenaline in the perfused rabbit heart. *Nature* 262:615–617
- Solaro RJ, Kobayashi T (2011) Protein phosphorylation and signal transduction in cardiac thin filaments. *The Journal of biological chemistry* 286:9935–9940. doi:10.1074/jbc.R110.197731
- Struthers AD, Davies J (2005) B-type natriuretic peptide; A simple new test to identify coronary artery disease? *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 98:765–769. doi:10.1093/qjmed/hci111
- Stypmann J (2007) Doppler ultrasound in mice. *Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)* 24:97–112. doi:10.1111/j.1540-8175.2006.00358.x
- Stypmann J, Engelen MA, Troatz C, Rothenburger M, Eckardt L, Tiemann K (2009) Echocardiographic assessment of global left ventricular function in mice. *Laboratory animals* 43:127–137. doi:10.1258/la.2007.06001e
- Subramaniam A, Gulick J, Neumann J, Knotts S, Robbins J (1993) Transgenic analysis of the thyroid-responsive elements in the alpha-cardiac myosin heavy chain gene promoter. *The Journal of biological chemistry* 268:4331–4336
- Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J (1991) Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 266:24613–24620
- Sugimoto M, Manabe H, Nakau K, Furuya A, Okushima K, Fujiyasu H, Kakuya F, Goh K, Fujieda K, Kajino H (2010) The role of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in children. - Correlation with the heart failure score and comparison with B-type natriuretic peptide -. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 74:998–1005. doi:10.1253/circj.cj-09-0535
- Suzuki T, Hayashi D, Yamazaki T, Mizuno T, Kanda Y, Komuro I, Kurabayashi M, Yamaoki K, Mitani K, Hirai H, Nagai R, Yazaki Y (1998) Elevated B-type natriuretic peptide levels after anthracycline administration. *American heart journal* 136:362–363. doi:10.1053/hj.1998.v136.89908
- Tamura S, Lynch KR, Lerner J, Fox J, Yasui A, Kikuchi K, Suzuki Y, Tsuiki S (1989) Molecular cloning of rat type 2C (IA) protein phosphatase mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:1796–1800

- Taylor KS, Verbakel JY, Feakins BG, Price CP, Perera R, Bankhead C, Plüddemann A (2018) Diagnostic accuracy of point-of-care natriuretic peptide testing for chronic heart failure in ambulatory care; Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)* 361:k1450. doi:10.1136/bmj.k1450
- Tei C, Nishimura RA, Seward JB, Tajik AJ (1997) Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index; Correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 10:169–178
- Terasawa T, Kobayashi T, Murakami T, Ohnishi M, Kato S, Tanaka O, Kondo H, Yamamoto H, Takeuchi T, Tamura S (1993) Molecular cloning of a novel isotype of Mg(2+)-dependent protein phosphatase beta (type 2C beta) enriched in brain and heart. *Archives of biochemistry and biophysics* 307:342–349. doi:10.1006/abbi.1993.1598
- Terentyev D, Belevych AE, Terentyeva R, Martin MM, Malana GE, Kuhn DE, Abdellatif M, Feldman DS, Elton TS, Györke S (2009) miR-1 overexpression enhances Ca(2+) release and promotes cardiac arrhythmogenesis by targeting PP2A regulatory subunit B56alpha and causing CaMKII-dependent hyperphosphorylation of RyR2. *Circulation research* 104:514–521. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.181651
- Thomas L, Foster E, Hoffman JI, Schiller NB (1999) The Mitral Regurgitation Index; An echocardiographic guide to severity. *Journal of the American College of Cardiology* 33:2016–2022
- Tobacman LS (1996) Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annual review of physiology* 58:447–481. doi:10.1146/annurev.ph.58.030196.002311
- Trabelsi I, Msolli MA, Sekma A, Fredj N, Dridi Z, Bzeouich N, Najjar MF, Gannoun I, Mzali M, Laouiti K, Beltaief K, Grissa MH, Belguith A, Boukef R, Bouida W, Boubaker H, Nouira S (2020) Value of systolic time intervals in the diagnosis of heart failure in emergency department patients with undifferentiated dyspnea. *International journal of clinical practice* 74:e13572. doi:10.1111/ijcp.13572
- Tribouilloy C, Shen WF, Rey JL, Adam MC, Lesbre JP (1994) Mitral to aortic velocity-time integral ratio. A non-geometric pulsed-Doppler regurgitant index in isolated pure mitral regurgitation. *European heart journal* 15:1335–1339
- Vahlensieck U, Bokník P, Knapp J, Linck B, Müller FU, Neumann J, Herzig S, Schlüter H, Zidek W, Deng MC, Scheld HH, Schmitz W (1996) Negative chronotropic and inotropic effects exerted by diadenosine hexaphosphate (AP6A) via A1-adenosine receptors. *British journal of pharmacology* 119:835–844
- Wang AY-M (2012) Clinical utility of natriuretic peptides in dialysis patients. *Seminars in dialysis* 25:326–333. doi:10.1111/j.1525-139X.2012.01079.x
- Wang M, Yip GWK, Wang AYM, Zhang Y, Ho PY, Tse MK, Lam PKW, Sanderson JE (2003) Peak early diastolic mitral annulus velocity by tissue Doppler imaging adds independent and incremental prognostic value. *Journal of the American College of Cardiology* 41:820–826
- Wegener AD, Simmerman HK, Lindemann JP, Jones LR (1989) Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *The Journal of biological chemistry* 264:11468–11474
- Wenk J, Trompeter HI, Pettrich KG, Cohen PT, Campbell DG, Mieskes G (1992) Molecular cloning and primary structure of a protein phosphatase 2C isoform. *FEBS letters* 297:135–138

- Wijnker PJM, Boknik P, Gergs U, Müller FU, Neumann J, dos Remedios C, Schmitz W, Sindermann JR, Stienen GJM, van der Velden J, Kirchhefer U (2011) Protein phosphatase 2A affects myofilament contractility in non-failing but not in failing human myocardium. *Journal of muscle research and cell motility* 32:221–233. doi:10.1007/s10974-011-9261-x
- Wilkenshoff U, Kruck I, Mühr-Wilkenshoff F (2012) *Handbuch der Echokardiografie; 103 Tabellen*. Thieme, Stuttgart
- Wintrich J, Kindermann I, Böhm M (2020) Neues zur Herzinsuffizienz. *Herz* 45:158–169. doi:10.1007/s00059-018-4715-1
- Wozakowska-Kapłon B, Opolski G (2009) Effects of exercise testing on natriuretic peptide secretion in patients with atrial fibrillation. *Kardiologia polska* 67:254–261
- Wu AHB (2006) Serial testing of B-type natriuretic peptide and NTpro-BNP for monitoring therapy of heart failure; The role of biologic variation in the interpretation of results. *American heart journal* 152:828–834. doi:10.1016/j.ahj.2006.08.021
- Wu AHB, Smith A (2004) Biological variation of the natriuretic peptides and their role in monitoring patients with heart failure. *European journal of heart failure* 6:355–358. doi:10.1016/j.ejheart.2003.12.011
- Xiaojing C, Yanfang L, Yanqing G, Fangfang C (2017) Thymopentin improves cardiac function in older patients with chronic heart failure. *Anatolian journal of cardiology* 17:24–30. doi:10.14744/AnatolJCardiol.2016.6692
- Xu H, Ginsburg KS, Hall DD, Zimmermann M, Stein IS, Zhang M, Tandan S, Hill JA, Horne MC, Bers D, Hell JW (2010) Targeting of protein phosphatases PP2A and PP2B to the C-terminus of the L-type calcium channel Ca v1.2. *Biochemistry* 49:10298–10307. doi:10.1021/bi101018c
- Yang T-H, Tsai W-C (2015) Recurrence and metastasis of pheochromocytoma mimic acute ST-segment elevation myocardial infarction; A case report. *The American journal of emergency medicine* 33:311.e3-5. doi:10.1016/j.ajem.2014.08.010
- Zimmermann N, Boknik P, Gams E, Herzig JW, Neumann J, Scholz H (1998) Calcium sensitization as new principle of inotropic therapy in end-stage heart failure? *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 14:70–75
- Zimmermann N, Boknik P, Gams E, Herzig JW, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Wenzlaff H (1996) Positive inotropic effects of the calcium sensitizer CGP 48506 in guinea pig myocardium. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 277:1572–1578

9. Veröffentlichungen

9.1 Publikation

Bollmann P, Werner F, Jaron M, Bruns TA, Wache H, Runte J, Boknik P, Kirchhefer U, Müller FU, Buchwalow IB, Rothemund S, Neumann J, Gergs U (2021) Initial Characterization of Stressed Transgenic Mice with Cardiomyocyte-Specific Overexpression of Protein Phosphatase 2C. *Front. Pharmacol.* 11:171. doi:10.3389/fphar.2020.591773

9.2 Vortrag und Poster mit veröffentlichtem Abstract

Jaron M, Gergs U, Neumann J (2018) Co-overexpression of protein phosphatases 2A and 2C in transgenic mice leads to altered systolic and diastolic heart function and increased relative heart weight. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 391 (Suppl 1): S29

10. Thesen

- Transgenen Mäuse weisen ein erhöhtes relatives Herzgewicht auf, insbesondere die kombinierte Überexpression der Proteinphosphatasen 2A und 2C führt zur Vergrößerung aller vier Herzhöhlen
- Verglichen mit den Herzen der Wildtyp-Gruppe zeigen die transgenen Gruppen eine Verringerung der linksventrikulären Ejektionsfraktion
- Die Herzfrequenz und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion der transgenen Tiere kann durch die β -adrenerge sympathomimetische Wirkung des Isoprenalins nur geringfügig erhöht werden
- Die Hämatoxylin-Eosin- und die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung zeigt keine strukturellen Abnormalitäten bei den PP2A-überexprimierenden Mäusen, während bei den PP2C-Versuchstieren eine beginnende Fibrose festzustellen ist
- Die Überexpression der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase 2A führt zur dilatativen Kardiomyopathie
- Eine kombinierte Überexpression der Proteinphosphatasen 2A und 2C potenziert diesen Effekt und führt zusätzlich zu einer kardialen diastolischen Dysfunktion
- Die kombinierte Überexpression der Proteinphosphatasen 2A und 2C führt zu einer gestörten Relaxation des Ventrikelmyokards in der Diastole
- Eine selektive Inhibition von Proteinphosphatasen könnte ein therapeutischer Ansatz bei Herzinsuffizienz oder Kardiomyopathien sein

11. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Marko Jaron, daß ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken entnommene Stellen habe ich unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Marko Jaron

12. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit versichere ich, Marko Jaron, daß dies meine erste Dissertation ist. Ich habe weder im Inland noch im Ausland eine Dissertation eingereicht, erstellt oder daran gearbeitet. Die vorliegende Arbeit wird erstmalig und nur an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg eingereicht.

Marko Jaron

13. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Joachim Neumann, der mich für dieses überaus interessante Thema begeistert hat und mir die Möglichkeit gab, in seinem Institut die Dissertation verwirklichen zu dürfen. Die regelmäßigen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren stets eine große Hilfe und Bereicherung für mich.

Ebenfalls danken möchte Dr. rer. nat. Ulrich Gergs, der stets ein offenes Ohr für kleinere und größere Probleme hatte und die ersten Korrekturen dieser Arbeit geduldig vorgenommen hat.

Ein herzliches Dankeschön gilt den Mitarbeiterinnen des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie Pia Wilmy und Sonja Reber für die Begleitung der Experimente und die familiäre Atmosphäre im Institut.

Auch danke ich Jochen Runte für das mühevoll Einarbeiten in die Echokardiographie an den Versuchstieren.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Familie für ihre Motivation sowie ihre Unterstützung in allen Belangen. Ich konnte mich stets auf euch verlassen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Ehefrau, die mich unermüdlich bestärkte, diese Arbeit voranzutreiben und niederzuschreiben.