

**Einfluss von kardialen Belastungen
auf die Genexpression in Herzen von
PP2A α -, PP2C β - und PP5-transgenen Mäusen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

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

von Friedrich Paul Georg Köpp

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

Gutachter*innen:
Prof. Antje Gohla, Würzburg
Prof. Renke Maas, Erlangen

Datum der Verteidigung: 06.08.2024

Referat

Im Herzen spielen Proteinphosphatasen (PP) eine wichtige Rolle in der posttranslationalen Aktivitätskontrolle zahlreicher Proteine. In vorausgehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen von Kardiomyopathien zu einer Veränderung der Expression von verschiedenen Proteinphosphatasen kommt und dass eine Modifikation der Proteinphosphataseaktivität zu kardialen Einschränkungen führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene kardiale Belastungen an transgenen Mäusen mit herzspezifischer Überexpression verschiedener Proteinphosphatasen untersucht, um die Rolle dieser PP, beziehungsweise deren Interaktionen besser zu verstehen. Es wurde eine Sepsis bei Mäusen mit herzspezifischer Überexpression von PP2C β induziert und mittels Real-Time-PCR nach veränderten Reaktionen des NF- κ B-Signalwegs gesucht. Es konnten keine signifikanten Veränderungen gefunden werden. Die tendenziellen Veränderungen sind im Kontext der dezenten echokardiografischen Befunde plausibel. Es wurde eine stressinduzierte Kardiomyopathie bei Mäusen mit herzspezifischer Überexpression von PP2C β induziert und mittels Real-Time-PCR nach kardialen Veränderungen gesucht. Es zeigte sich eine dezente Fibrose und ein signifikanter Verlust kardialer Myosinfilamente. Es wurde ein Mausmodell mit kombinierter herzspezifischer Überexpression von PP2Ac α und PP5 untersucht. Es konnte in der Real-Time-PCR eine ausgeprägte Erhöhung von Parametern der Fibrose und Herzinsuffizienz und eine Reduktion kardialer Myosinfilamente gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer zuvor beschriebenen kardialen Hypertrophie und eingeschränkter Pumpfunktion. Es konnte eine wechselseitige Herabregulation von PP2A und PP5 gezeigt werden, die sowohl die mRNA-Expression als auch die Proteinexpression betrifft. Bei kombinierter Überexpression von PP2A und PP5 konnte weiterhin eine Verminderung der mRNA-Expression von α -MHC beobachtet werden. In diesem Modell stehen sowohl die Genkonstrukte für die Überexpression von PP5 und PP2A als auch das für α -MHC kodierende Gen unter der Kontrolle des α -MHC-Promotors. Eine Inhibition des α -MHC-Promotors ist eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung. Die Signalwege der Proteinphosphatasen 2A und 5 scheinen zu interagieren und führen zu einer ausgeprägten Kardiomyopathie. Diese Versuchsgruppe ist ein gutes genetisches Modell für die Untersuchung von Herzerkrankungen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteinphosphatasen allgemein	1
1.1.1	Proteinphosphatase 2A	2
1.1.2	Proteinphosphatase 2C	3
1.1.3	Proteinphosphatase 5	3
1.2	Herzerkrankungen allgemein	3
1.2.1	Kardiale Reaktion bei akuter und chronischer Belastung	4
1.2.2	Rolle des Herzens in der Sepsis	4
1.2.3	Die Rolle von Proteinphosphatasen bei kardialen Erkrankungen	5
2	Zielstellung	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Tierhaltung	10
3.2	Tiermodelle	10
3.2.1	Tiermodell "Herzspezifische Überexpression von PP2A"	10
3.2.2	Tiermodell "Herzspezifische Überexpression von PP5"	11
3.2.3	Tiermodell "Herzspezifische Überexpression von PP2C β "	11
3.2.4	Tiermodell "Herzspezifische Überexpression von PP2A und PP5"	12
3.3	Genotypisierung, physiologische Versuche und Herstellung von Ventrikelpulver	12
3.3.1	Genotypisierung	12
3.3.2	Physiologische Versuche und Entnahme der Herzen	12
3.3.3	Herstellung ventrikulärer Homogenate	13
3.4	Analyse von Nukleinsäuren	14
3.4.1	Puffer für Nukleinsäureanalysen	14
3.4.2	RNA-Extraktion	15
3.4.3	Photometrische Analyse der RNA-Proben	15
3.4.4	RNA-Gelelektrophorese	16
3.4.5	dsDNase-Verdau und cDNA-Synthese	16
3.4.6	Nicht-quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)	17
3.4.7	DNA-Gelelektrophorese	17
3.4.8	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (Real-Time PCR)	18
3.4.9	Auswertung mittels vergleichender C(T)-Methode	18
3.5	Quantitativer immunologischer Proteinnachweis	19
3.5.1	Puffer für den Proteinnachweis	19
3.5.2	Herstellung der Homogenate	20
3.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	20
3.6	Elektrophorese	21
3.6.1	Transfer auf die Nitrozellulosemembran	21
3.6.2	Präparation der Nitrozellulosemembran für Fluoreszenzdiagnostik	21
3.6.3	Fluoreszenznachweis	22

3.6.4	Bildauswertung	22
3.6.5	Statistische Auswertung	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Versuchsgruppe PP2C β -Lipopolysaccharid	23
4.1.1	mRNA-Expression von Herzinsuffizienzmarkern	23
4.1.2	mRNA-Expression von Zytokinen	24
4.1.3	mRNA-Expression des LPS-Bindungskomplexes	25
4.1.4	mRNA-Expression von NF κ B und I κ B α	26
4.2	Versuchsgruppe PP2C β -Isoprenalin	27
4.2.1	mRNA-Expression von Markern der Herzinsuffizienz	27
4.2.2	mRNA-Expression von Markern des fibrotischen Umbaus	28
4.2.3	mRNA-Expression kardialer Myosinfilamente	28
4.2.4	mRNA-Expression von Ionenkanälen	29
4.3	Versuchsgruppe Doppeltransgene Mäuse für PP2A α und PP5 im Vergleich zu Wildtyp- und monotransgenen Mäusen	30
4.3.1	mRNA-Expression von Markern der Herzinsuffizienz	31
4.3.2	mRNA-Expression von Markern des fibrotischen Umbaus	32
4.3.3	mRNA-Expression kardialer Myosinfilamente	33
4.3.4	mRNA-Expression von Ionenkanälen	33
4.3.5	mRNA-Expression von PP2A α und PP5 in Doppeltransgenen Tie- ren verglichen mit Monotransgenen Tieren	34
4.3.6	Proteinexpression für PP2A α und PP5	35
5	Diskussion	36
5.1	Alter und Geschlecht der Versuchstiere	36
5.2	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen	36
5.3	Limitationen durch geringe Fallzahl	37
5.4	Versuchsgruppe PP2C β -Lipopolysaccharidinjektion	37
5.4.1	Fazit	39
5.5	Versuchsgruppe PP2C β -Isoprenalin	40
5.5.1	Fazit	41
5.6	Versuchsgruppe PP2A α PP5	42
5.6.1	Fazit	43
6	Zusammenfassung	45
7	Literaturverzeichnis	47
8	Thesen	56
9	Anhang	
9.1	Antikörper für Western Blots	
9.2	Primer für Polymerase Kettenreaktion	

9.3	Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Programme
9.3.1	Geräte
9.3.2	Verbrauchsmaterialien
9.3.3	Chemikalien und Enzyme
9.4	Software

Erklärungen

Danksagung

Abbildungsverzeichnis

1	Mögliche kardiale Wirkungen von PP2A und PP5	7
2	Expressionskassette für PP2A	11
3	Expressionskassette für PP5	11
4	Expressionskassette für PP2C	12
5	PP2C-LPS: mRNA-Expression von Nppa	23
6	PP2C-LPS: mRNA-Expression von TNF α , IL1 β und IL6	24
7	PP2C-LPS: mRNA-Expression von CD14 und LBP	25
8	PP2C-LPS: mRNA-Expression von MD2 und TLR4	25
9	PP2C-LPS: mRNA-Expression von NF κ B und I κ B α	26
10	PP2C-Isoprenalin: mRNA-Expression von Nppa und Nppb	27
11	PP2C-Isoprenalin: mRNA-Expression von Col1 α 1, Col3 α 1 und Fn1	28
12	PP2C-Isoprenalin: mRNA-Expression von α -MHC und β -MHC	28
13	PP2C-Isoprenalin: mRNA-Expression von Cacna und Kcnh2	29
14	PP2AxPP5: mRNA-Expression von Nppa und Nppb	31
15	PP2AxPP5: mRNA-Expression von Col1 α 1, Col3 α 1 und Fn1	32
16	PP2AxPP5: mRNA-Expression von α -MHC und β -MHC	33
17	PP2AxPP5: mRNA-Expression von Cacna und Kcnh2	33
18	PP2AxPP5: Expression von PP2A und PP5	34
19	PP2AxPP5: Proteinmenge von PP2A	35
20	PP2AxPP5: Proteinmenge von PP5	35

Tabellenverzeichnis

2	Genorte für Analyse der mRNA-Expression	14
3	1. Antikörper des Western Blots	
4	2. Antikörper des Western Blots	
5	Primer der PCR	

Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
α -MHC	alpha-Isoform der Schweren Myosinkette
ATP	Adenosintriphosphat
β -MHC	beta-Isoform der Schweren Myosinkette
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Cacna1c	alpha-Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals
CD14	Glykoprotein CD14
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
Col1 α 1	Alpha-1-Typ-I-Kollagen
Col3 α 1	Alpha-1-Typ-III-Kollagen
CSQ	Calsequestrin
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DT	Doppelt transgen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fn1	Fibronectin 1
g	Gramm
IE	Internationale Einheit
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
I κ B α	Inhibitorisches κ B-Protein alpha, Inhibitor von NF- κ B
i.p.	intraperitoneal
ISO	Isoprenalin
Kcnh2	alpha-Untereinheit des hERG-Kaliumkanals, spannungsaktivierter auswärtsgerichteter Kaliumkanal des Herzens
LBP	Lipopolysaccharidbindendes Protein
M	Molar (Mol/Liter)
MD-2	Myeloider Differenzierungsfaktor 2, Lymphozytäres Antigen 96
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
μ L	Mikroliter
mL	Milliliter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
μ M	Mikromolar (Mikromol/Liter)

mmol	Millimol
MP	Milchpulver
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
n	Stichprobenumfang
NF- κ B	Nukleärer Faktor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ aktivierter B-Zellen
nm	Nanometer
Nppa, ANP	Natriuretisches Peptid Typ A
Nppb, BNP	Natriuretisches Peptid Typ B
p	Signifikanzwert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
PPM	Familie der Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -abhängigen Proteinphosphatasen
PPP	Familie der Phosphoproteinphosphatasen
PP2A	Protein-Phosphatase Typ 2A
PP2A α	α -Isoform der katalytischen Untereinheit der Protein-Phosphatase 2A
PP2C	Protein-Phosphatase Typ 2C
PP2C β	β -Isoform der Protein-Phosphatase 2C
PP5	Protein-Phosphatase Typ 5
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
PSP	Familie der Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen
PTP	Familie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen
rcf	relative Zentrifugalkraft (relative centrifugal force)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
TAE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris(hydroxymethyl)aminomethan buffered saline with Tween
TE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-EDTA-Puffer
TG	transgen
TLR-4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor
UV-Licht	ultraviolettes Licht
vs	gegenübergestellt (versus)
(V/V)	Volumenkonzentration
WT	Wildtyp
(W/V)	Massenkonzentration

1 Einleitung

1.1 Proteinphosphatasen allgemein

Lebende Organismen sind wechselnden Bedingungen ausgesetzt, deshalb ist die Anpassung an Umweltbedingungen essenziell, um das Überleben zu sichern. Dafür sind unterschiedliche Regulationsmechanismen mit verschiedener Wirkdauer notwendig. Eine Möglichkeit der Anpassung ist eine Veränderung der Proteinexpression. Eine phänotypische Veränderung ist in diesem Fall jedoch erst nach erfolgter Proteinsynthese möglich. Gegenübergestellt kann eine kurzfristige Anpassung über posttranslationale Modifikation von Proteinen erfolgen, hierbei kann eine Veränderung mit kurzer Latenz erfolgen.

Ein wichtiger Mechanismus für eine schnelle und reversible Anpassung ist dabei die Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von Proteinen. Insgesamt unterliegen etwa 1/3 der zellulären Proteine Phosphorylierungsprozessen (Virshup und Shenolikar, 2009), was das Ausmaß und das Potenzial dieser Regulation deutlich macht. Proteinkinasen phosphorylieren hierbei hauptsächlich Serin, Threonin und Tyrosin, in geringerem Ausmaß aber auch weitere Aminosäuren (Bilbrough et al., 2022). Als Gegenspieler dazu katalysieren Proteinphosphatasen die Dephosphorylierung der Zielproteine. Es kodieren bedeutend weniger Gene für Proteinphosphatasen als für Proteinkinasen. Im Laufe der Zeit wurden viele regulatorische Untereinheiten gefunden, die eine hohe Substratspezifität und komplexe Regulationsmechanismen ermöglichen, obwohl die katalytischen Untereinheiten der Proteinphosphatasen wenig Substratspezifität zeigen (Virshup und Shenolikar, 2009).

Proteinphosphatasen werden dabei in Familien eingeteilt (Barford et al., 1998): Die Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen (PSPs), die Serin- und Threoninreste dephosphorylieren und weiter in die Familien der PPP und PPM unterteilt werden.

Die Phosphatasen der PPP-Familie haben große Übereinstimmungen im Aufbau der katalytischen Einheit (Barford et al., 1998). Es existieren variable regulatorische Untereinheiten, die eine differenzierte Aktivitätsregulation ermöglichen. Eine essenzielle Rolle für die Aktivitätsregulation durch Untereinheiten scheint dabei die C-terminale Region der katalytischen Untereinheit zu spielen. Diese gibt regulatorische Signale an das katalytische Zentrum weiter (Barford et al., 1998). Es existieren mit Okadasäure, Mikrozystin und Caliculyn A mehrere Stoffe, die Phosphatasen der PPP-Familie hemmen. Wichtig ist dabei, dass PP2A durch deutlich geringere Konzentrationen von Okadasäure gehemmt wird als PP1 (Brautigan, 2013). Da die PSP-Phosphatasen mit den Subtypen PP1 sowie PP2A, PP2B und PP2C in-vivo den Großteil der basalen Phosphataseaktivität katalysieren (Barford et al., 1998), wurde die unterschiedliche Inhibition genutzt, um eine Zuordnung zu ermöglichen. Allerdings werden dabei die Aktivitäten der weiteren PSPs vernachlässigt. Dadurch ist die Zuordnung spezifischer Effekte nur eingeschränkt möglich (Brautigan, 2013). Die Notwendigkeit der externen Zufuhr von mehr oder weniger spezifischen Inhibitoren führt zu einer Vielfalt von Limitationen. Eine Berücksichtigung einer organspezifischen Wirkung oder komplexe in-vivo-Versuche sind mit externer kontinuierlicher Zufuhr von Substanzen schwierig durchführbar. Weiterhin ist eine Abbildung einer physiologischen Kompartimentalisierung nicht möglich.

Die Besonderheit der PP2C-Phosphatasen ist, dass das katalytische Zentrum zweiwertige Metallionen enthält und die Enzyme als Monomer funktionell aktiv sind (Kamada et al., 2020). PP2C wird nicht durch Okadasäure oder Mikrozystin gehemmt (Shi, 2009).

Im Folgenden werden Proteinphosphatasen thematisiert, welche in den Versuchstieren verändert exprimiert wurden.

1.1.1 Proteinphosphatase 2A

Das Holoenzym der PP2A besteht wohl aus drei Untereinheiten, für die jeweils verschiedene Isoformen existieren: die Gerüsteinheit/strukturgebende Untereinheit A, die regulatorische Untereinheit B und die katalytische Untereinheit C. Für die A- und C-Untereinheit existieren je zwei Strukturvarianten, die mit α und β bezeichnet werden (Sangodkar et al., 2016). Für die B-Untereinheit gibt es vier Klassen, die mit B, B', B'' und B''' bezeichnet werden und jeweils multiple Isoformen und Splicevarianten haben (Sangodkar et al., 2016). Sowohl der Aufbau aus Untereinheiten als auch die Vielfalt an Untereinheiten ermöglicht wohl eine variable Aktivität und Substratspezifität von PP2A. Insgesamt ist PP2A für etwa ein Prozent der zellulären Proteinmenge verantwortlich (Sangodkar et al., 2016), was wichtige Funktionen vermuten lässt. Die C-Untereinheit ist in Monomerform instabil und benötigt üblicherweise die Bindung an eine A-Untereinheit, um einen proteasomalen Abbau zu verhindern (Strack et al., 2004). Mit PP2A assoziierte Signalwege sind bei vielen Erkrankungen verändert, sodass eine Rolle in der Pathogenese wahrscheinlich ist. Wichtige Signalwegen unter der Regulation von PP2A sind etwa der p53- (H.-H. Li et al., 2007) oder der MAP-Kinase-Signalweg (Alvarado-Kristensson und Andersson, 2005; Z. Lu et al., 2021). So ist etwa bei Alzheimer-Demenz die Aktivität von PP2A in betroffenen Hirnarealen verringert. PP2A ist im menschlichen Gehirn für etwa 71% der Tau-Dephosphorylierung verantwortlich (Liu et al., 2005). Da hyperphosphoryliertes τ -Protein eine zentrale Rolle in der Entstehung des Morbus Alzheimer spielt (Tiwari et al., 2019), erscheint eine pathogenetische Funktion von PP2A plausibel. Für die Entstehung von Krebserkrankungen scheint PP2A eine Rolle als Tumorsuppressor zu spielen, so konnte bei verschiedenen Tumorentitäten ein Funktionsverlust von Untereinheiten der PP2A nachgewiesen werden (S. S. Wang et al., 1998). Der Nachweis einer pathogenetischen Rolle in der Tumorentstehung erfolgte im Tiermodell. Bereits bei heterozygoter Veränderung von PP2A zeigte bei Exposition zu Kanzerogenen eine erhöhte Inzidenz von Lungenkrebs (Ruediger et al., 2011).

Im Fall von Diabetes Mellitus Typ II ist die physiologische Herab-Regulation von PP2A in Skelettmuskelzellen vermindert, weshalb die Glukoseaufnahme über den GLUT4-Transporter verringert werden kann (Højlund et al., 2002). Die Beeinflussung vieler Erkrankungen durch PP2A weist auf großes therapeutisches Potential hin. Die Vielfalt an Untereinheiten und krankheitsspezifisch teils gegenläufige Veränderung von PP2A lässt aber auch eine Vielzahl komplexer Wechselwirkungen vermuten.

1.1.2 Proteinphosphatase 2C

PP2C ist der zuerst entdeckte Vertreter der Mg^{2+} -abhängigen PPM-Phosphatasen. Eine wichtige Eigenschaft ist die Resistenz gegen gängige Inhibitoren der anderen PPP-Phosphatasen, wie Okadasäure und Mikrozystin (Shi, 2009). Verschiedene Isoformen von PP2C modulieren den MAP-Kinase-Signalweg und haben damit Einfluss auf den Zellzyklus sowie die Zelldifferenzierung und Apoptose (G. Lu et al., 2007). Weiterhin konnte eine Beeinflussung des $Nf\kappa B$ -Signalwegs gezeigt werden (G. Lu et al., 2007), womit eine Rolle in der Entstehung inflammatorischer Prozesse plausibel ist. Die hochgradige Konservierung über Artgrenzen hinweg (G. Lu et al., 2007) macht wichtige Schlüsselfunktionen von PP2C wahrscheinlich.

1.1.3 Proteinphosphatase 5

PP5 gehört zu der PPP-Familie und kann durch die klassischen Inhibitoren, wie Okadasäure oder Mikrozystin gehemmt werden (Swingle et al., 2004). Eine Besonderheit von PP5 ist, dass es nur ein kodierendes Gen bei Eukaryoten gibt (Shi, 2009). Dieser hohe Grad genetischer Konservierung lässt vermuten, dass PP5 wichtige Funktionen übernimmt und im Falle von Mutationen ein hoher Selektionsdruck wirkt. Zudem besteht PP5 aus nur einem Polypeptid, in dem katalytische und regulatorische Domänen vorliegen (Shi, 2009). Bei freier PP5 liegt eine Autoinhibition vor, die durch Interaktionen mit unter anderem HSP90 oder Arachidonsäure aufgehoben werden kann (Yang et al., 2005). Die ligandengesteuerte Aktivierung von PP5 ermöglicht eine Regulierung der Phosphataseaktivität. PP5 wird in vielen Geweben von Säugetieren exprimiert und beeinflusst in Zellproliferation, -differenzierung und -migration (Hinds und Sánchez, 2008). Zudem konnte eine Erhöhung der Hormonaffinität des Glucocorticoidrezeptors durch PP5 gezeigt werden (Davies et al., 2005). PP5 kann somit eine Rolle in der Modulation von Stresssignalen spielen.

1.2 Herzerkrankungen allgemein

Das Vorliegen einer Herzinsuffizienz ist eine häufige Todesursache und geht in vielen Fällen mit einer hohen Krankheitslast und verminderter Lebensqualität einher (Tomasoni et al., 2020).

Weltweit leiden schätzungsweise 64 Millionen Menschen an einer Herzinsuffizienz (Groenewegen et al., 2020). Die Prävalenz diagnostizierter Herzinsuffizienz liegt in Industrieländern zwischen 1 und 2% (Groenewegen et al., 2020). Eine Auswertung von Krankenversicherungsdaten in Deutschland von 2009 bis 2013 zeigte eine Prävalenz von 3,96% für Herzinsuffizienz und eine Mortalitätsrate von 16,3% der Erkrankten im Auswertungszeitraum (Störk et al., 2017).

Im Rahmen des demographischen Wandels und einer alternden Gesellschaft wird die Prävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen voraussichtlich in den nächsten Jahrzehnten zunehmen. Die Behandlung ist oft aufwändig und mit erheblichen Einschränkungen für den Patienten und Kosten für das Gesundheitssystem verbunden. So führte 2017 allein die Herzinsuffizienz zu 464724 vollstationären Behandlungen und ist damit die häufigste

behandlungsbegründende Diagnose im stationären Bereich ((Destatis), 2018). Im Jahr 2015 wurden in Deutschland 5,28 Milliarden Euro für die Behandlung der Herzinsuffizienz ausgegeben ((Destatis), 2018). Trotz in den letzten Jahren verbesserter Therapien kann häufig nur das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamt werden. Die Transplantation als einzige Möglichkeit der Wiederherstellung der physiologischen Funktion ist nur wenigen Patienten vorbehalten und kann zu schweren Komplikationen führen.

Die Relevanz von Herzerkrankungen ist sowohl aus Patientensicht, als auch unter epidemiologischen und wirtschaftlichen Gesichtspunkten sehr hoch. Neue therapeutische Ansätze haben demzufolge ein hohes Potential. Die Aufklärung der Pathogenese auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene ist ein weites Forschungsfeld und Grundvoraussetzung für die Entwicklung zukünftiger Therapieansätze.

1.2.1 Kardiale Reaktion bei akuter und chronischer Belastung

Bei erhöhter Belastung des Herzens sind schnelle Anpassungsmechanismen essenziell, da eine unzureichende Pumpfunktion bereits nach kurzer Zeit schwerwiegende Folgen hat. Zu unterscheiden sind akute von chronischen Belastungssituationen. Zu akuten Belastungssituationen gehört beispielsweise eine ausgeprägte adrenerge Belastung im Rahmen einer kritischen Erkrankung, etwa bei Sepsis oder Trauma, oder eine kritische Reduktion der kardialen Blutversorgung etwa im Rahmen eines Myokardinfarkts. Chronische Belastungen sind dagegen andauernd, wie beispielsweise eine unbehandelte arterielle Hypertonie oder ein chronisches Klappenvitium.

Die mehrfache Verabreichung des unselektiven β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin im Tierversuch kann als Modell der stressinduzierten Kardiomyopathie genutzt werden (Chang et al., 2018), bei der eine erhöhte β -adrenerge Stimulation eine wichtige pathogenetische Rolle spielt (Yoshikawa, 2015). Dabei konnte beispielsweise an Mäusen gezeigt werden, dass es zu einer vermehrten Lipidakkumulation in Kardiomyozyten und leichtgradiger Fibrose kommt (Shao et al., 2013), es ist jedoch auch Nekrose von Herzwewebe möglich (Keaney, 1970). Bei einer chronischen Belastung erfolgt zudem regelhaft eine Down-Regulation von β -Adrenozeptoren und eine Zunahme extrazellulären Bindegewebes als Zeichen kardialer Fibrose (Kudej et al., 1997).

1.2.2 Rolle des Herzens in der Sepsis

Eine Sepsis ist definiert als akut lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine dysregulierte Immunantwort auf eine Infektion entsteht (Singer et al., 2016). Kommt es im Rahmen der Sepsis zu einem septischen Schock, so ist die Mortalität auch bei adäquater Therapie hoch (Perner et al., 2017). Dabei können im Rahmen der dysregulierten Immunantwort eine Vielzahl an Organen betroffen sein. Das kardiovaskuläre System ist durch seine unmittelbare lebensnotwendige Organfunktion von hohem Interesse. Parameter dafür sind die Pumpfunktion des Herzens und ein ausreichender Vasotonus, damit eine adäquate Versorgung des Körpers sichergestellt werden kann (Martin et al., 2017). Wichtig ist weiterhin, dass bisher kein etablierter Standard für die Diagnostik der septischen Kardiomyopathie besteht und die Echokardiografie als diagnostisches Mittel der Wahl nur einge-

schränkten prognostischen Wert hat (Martin et al., 2017).

Es konnte gezeigt werden, dass proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α (Natanson et al., 1989) und IL-1 β (Kumar et al., 1996) die kardiale Kontraktilität vermindern können. Für die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine ist die Aktivierung des vorgeschalteten NF- κ B-Signalwegs von zentraler Bedeutung (Lv und Wang, 2016). Dabei erfolgt die Pathogenerkennung über toll-like-Rezeptoren und eine intrazelluläre Signalkaskade, an deren Ende die Ausschüttung einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine steht.

Um neue Therapieansätze entwickeln zu können, ist ein besseres Verständnis der Rolle des Herzens in der Sepsis unabdingbar.

1.2.3 Die Rolle von Proteinphosphatasen bei kardialen Erkrankungen

In Herzen von Patienten mit fortgeschrittener idiopathischer Dilatativer Kardiomyopathie wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollherzen erhöhte Aktivitäten von PP1 und PP2A gefunden. Dabei war das Verhältnis der Aktivitäten zueinander nicht verändert (Neumann et al., 1997). Im Tiermodell wurde gezeigt, dass dauerhafte β -adrenerge Stimulation zu einer Erhöhung der Aktivität von PP1 und PP2A führt und typische Zeichen der Herzinsuffizienz verursacht (Bokník et al., 2000). Umgekehrt konnte auch gezeigt werden, dass die Überexpression von PP2A zu Veränderungen führen kann, wie sie für eine Herzinsuffizienz typisch sind. So wurde bei transgenen Mäusen mit herzspezifischer Überexpression der PP2A eine kardiale Hypertrophie, Fibrose und verringerte Reagibilität auf β -adrenerge Stimulation gefunden (Gergs et al., 2004). Aus diesen Veränderungen im Rahmen eines interventionellen Versuchsaufbaus kann gefolgert werden, dass die Erhöhung der Aktivität von PP2A eine kausale Rolle in der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Fibrose spielt.

Im Gegensatz dazu wurde auch bei herzspezifischer Deletion von PP2A kardiale Hypertrophie und Fibrose nachgewiesen (L. Li et al., 2016), sodass komplexe Zusammenhänge zwischen Herzfunktion und Proteinphosphataseaktivität angenommen werden müssen. Unter basalen Bedingungen sind PP1 und PP2A für über 90% der Gesamtaktivität von Proteinphosphatasen in Säugetierherzen verantwortlich (Lüss et al., 2000) und erfahren dementsprechend viel Aufmerksamkeit.

Auch weitere Proteinphosphatasen zeigen einen Einfluss auf das kardiovaskuläre System.

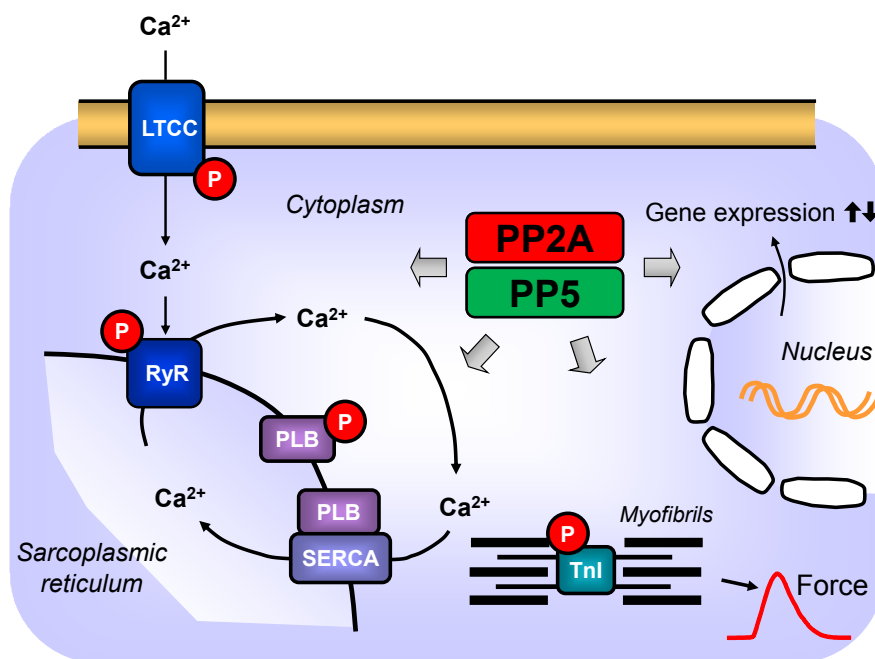
Beispielsweise wirkt PP5 auf Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose ein. Insbesondere beeinflusst PP5 über Interaktion mit dem HSP90-Glucocorticoidrezeptor-Komplex die Wirkung von Glucocorticoiden und kann dadurch Einfluss auf eine Reihe zellulärer Funktionen nehmen (Shi, 2009). Zudem kann PP5 DNA-Reparaturmechanismen nach stattgehabter Mutagenexposition beeinflussen und an den ANP-Rezeptor binden (Neumann et al., 2021). In Neumann et al., 2021 wird ausführlich die Funktion von PP5 insbesondere bei kardialen Erkrankungen erörtert. Es wird diskutiert, ob ein Knockdown im Mausmodell zu einer kardialen Hypotrophie führt, während eine Überexpression eine kardiale Hypertrophie bewirkt. Hierzu wird auf (J. Wang et al., 2018) verwiesen, hier konnte bei PP5-Knock-Out eine Größenminderung der Kardiomyozyten gezeigt werden. Passend

dazu konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit herzspezifischer Überexpression von PP5 eine kardiale Hypertrophie entwickelten und zusätzlich eine herabgesetzte Reaktion auf β -adrenerge Stimulation zeigten (Gergs et al., 2012). Weiterhin wird in Neumann et al., 2021 eine Überaktivierung von PP5 bei Herzinsuffizienz diskutiert. Als Ursache wird eine Aktivierung von Phospholipase A2 (PLA2) durch β_2 -Adrenozeptorsignaling und konsekutiv erhöhte Arachidonsäurespiegel diskutiert, die wiederum aktivierend auf PP5 wirken kann.

In Kontrast zu der Beeinträchtigung der kardialen Funktion unter basalen Bedingungen ist es möglich, dass die Überexpression von PP5 zu einer Hemmung des NF- κ B-Signalwegs führt und dadurch im Tiermodell eine höhere Resistenz gegenüber sepsistypischen Reizen angenommen werden kann (Gergs et al., 2019). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl in humanen Herzen als auch im Tiermodell fortgeschrittene Herzerkrankungen eine erhöhte Expression von PP5 und eine Hypophosphorylierung von Titinfilamenten zeigen. Experimentell konnte eine Dephosphorylierung von Titin durch PP5 und eine erhöhte passive Spannung muriner Kardiomyozyten bei Überexpression von PP5 gezeigt werden (Krysiak et al., 2018). Dies ist passend zu den klinischen Befunden einer Herzinsuffizienz vom Typ HFpEF mit einer diastolischen Funktionsstörung (Krysiak et al., 2018).

Eine kombinierte Überexpression von PP2A und PP5 führt im Tierversuch zu einer erhöhten Mortalität im Vergleich zu monotransgenen oder WT-Vergleichsgruppen. Weiterhin zeigte sich ein deutlich erhöhtes relatives Herzgewicht und fibrotischer Umbau des Myokards (Dörner et al., 2021).

PP2C erfüllt nach dem aktuellen Stand der Forschung wichtige Funktionen in der Zelldifferenzierung, Wachstum und Apoptoseinduktion (Shi, 2009). Die höchste Konzentration von PP2C bestehen in Herz und Gehirngewebe (G. Lu et al., 2007). Für PP2C ist bekannt, dass eine herzspezifische Deletion in-vitro die Apoptose von Kardiomyozyten induziert und in-vivo zu Fehlentwicklung des Herzens bei Zebrafischen führt (G. Lu et al., 2007). Bei einer herzspezifischen Überexpression von PP2C konnte eine kardiale Dilatation und vermehrte Fibrose gezeigt werden (Bollmann et al., 2021). Zudem zeigt sich einer Erhöhung der Herzfrequenz in isolierten perfundierten Herzen, jedoch nicht in-vivo (Bollmann et al., 2021). Aufgrund dieser Diskrepanz der Ergebnisse zwischen isolierten perfundierten Herzen und in-vivo-Bedingungen erscheint eine Beeinflussung des Sinusknotens durch PP2C möglich. Auch zeigte sich im Versuch mit repetitiver Isoprenalinbelastung eine bessere linksventrikuläre Ejektionsfraktion bei Mäusen mit herzspezifischer Überexpression von PP2C im Vergleich zu WT (Bollmann et al., 2021). Weiterhin zeigte sich eine mögliche Kardioprotektion bei herzspezifischer PP2C-Überexpression bei Mäusen im in-vivo-Modell einer Sepsis und im Rahmen von Hypoxiebedingungen (Bollmann et al., 2021). In der Übersichtsarbeit Neumann et al., 2021 werden multiple Einflüsse von PP2C am Herzen diskutiert. Dazu gehören eine Beeinflussung der Apoptose und des Energiestoffwechsels. Zudem wird diskutiert, dass über PP2C ein Zusammenhang zwischen körperlicher Fitness und geringeren Auswirkungen kardialer Ischämie besteht, nachdem jeweils reduzierte PP2C-Expression und verkleinerte Infarktareale nach Ligatur von Koronarien bei körperlicher Beübung gefunden werden konnten. Auch eine Rolle bei der Mediation alkoholisch bedingter Schäden



Scheme: Possible roles of PP2A and PP5 in the regulation of cardiac contractility and gene expression. LTCC, L-type Ca^{2+} channel; RyR, ryanodine receptor; PLB, phospholamban; SERCA, SR- Ca^{2+} ATPase; TnI, troponin I.

Abbildung 1: Mögliche kardiale Wirkungen von PP2A und PP5

am Herzen wird dort diskutiert, sodass eine Inhibition von PP2C bei alkoholischer Kardiomyopathie zumindest theoretisch vorteilhaft erscheint.

Insgesamt scheint somit auch die PP2C von Bedeutung für die regelrechte Herzentwicklung und -funktion zu sein. Dass PP2C einen Einfluss auf die Entwicklung und den Verlauf von Herzerkrankungen hat, ist eine naheliegende Hypothese, die jedoch nicht ausreichend untersucht ist. Ein besseres Verständnis der kardialen Regulationsmechanismen von PP2C könnte Bedeutung für die Aufklärung der Pathogenese kardialer Erkrankungen und Fehlbildung haben.

Auch Calcineurin (PP2B/PP3) scheint die Entwicklung von Herzhypertrophie zu beeinflussen. So wurde bei teilnephrektomierten Ratten unter Behandlung mit Calcineurininhibitoren verringerte kardiale Umbauprozesse beobachtet als bei den nicht damit behandelten Ratten (Di Marco et al., 2011). Interessant ist die Rolle von Calcineurininhibitoren besonders, weil mit Ciclosporin A und Tacrolimus bereits Medikamente existieren, die in der Humanmedizin eingesetzt werden. Damit konnte bereits gezeigt werden, dass die Erforschung von Proteinphosphatasen neben besserem Krankheitsverständnis auch therapeutisches Potenzial bietet. Insgesamt ist festzuhalten, dass die Wirkungen von Proteinphosphatasen komplex sind und stark miteinander interagieren, sodass für das Verständnis der Effekte die Untersuchung genetisch modifizierter Versuchstiere unabdingbar ist.

2 Zielstellung

Mittels kardialer Überexpression in transgenen Mäusen wurde der Einfluss einzelner Proteinphosphatasen auf die Herzfunktion untersucht. Es wurden hierfür transgene Mausstämme aus einem CD1-Hintergrund untersucht, welche eine herzspezifische Überexpression von PP2A α , PP5 und PP2C β aufwiesen. Aus den vorhandenen Daten konnte abgeleitet werden, dass viele unterschiedliche Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen Einfluss auf die kardiale Funktion nehmen und in-vivo komplexe Zusammenhänge und Interaktionen bestehen. Deshalb ist die Aufklärung von Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinphosphatasen von großer Bedeutung. In Vorbereitung auf diese Arbeit wurden transgene Mausmodelle einer kardialen Belastung ausgesetzt. Nach Erfassung der kardialen Belastung wurden die Herzen entnommen und im Rahmen dieser Arbeit die Expression funktionell wichtiger Gene auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Folgende Vergleichsgruppen wurden analysiert: Bei einer Versuchsgruppe der herzspezifischen Überexpression von PP2C β wurde durch Gabe von Lipopolysacchariden eine Sepsis induziert, um den Einfluss von PP2C β auf inflammatorische Prozesse zu untersuchen. Bei einer weiteren Versuchsgruppe der herzspezifischen Überexpression von PP2C β wurde durch die wiederholte Gabe von Isoprenalin eine rezidivierend-akute β -adrenerge Stimulation herbeigeführt und damit eine stressinduzierte Kardiomyopathie simuliert. In der Versuchsgruppe der herzspezifischen Überexpression von PP2A α und PP5 besteht bereits eine genetisch determinierte kardiale Belastung, sodass in diesem Versuchsaufbau keine weitere Intervention durchgeführt wurde. In jeder Gruppe wurden als Kontrollgruppe jeweils die nicht-transgenen Geschwistertiere vergleichbaren Alters untersucht, die den gleichen Bedingungen ausgesetzt wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene untersucht und diese im Kontext der Ergebnisse zuvor durchgeführter in-vivo-Untersuchungen der Herzfunktion der Versuchstiere diskutiert. Mit dieser Arbeit sollte es ermöglicht werden, zuvor unklare Ergebnisse der in-vivo-Untersuchungen besser erklären und neue Fragestellungen für künftige Versuche aufzuwerfen.

3 Material und Methoden

Alle Pipettenspitzen, EppendorfgeläÙe und weitere Materialien, die in Kontakt mit RNA- und DNA-Proben kamen, wurden vor Gebrauch autoklaviert. Auch Puffer wurden so weit nicht anders beschrieben autoklaviert. Alle Chemikalien wurden den Herstellerangaben entsprechend gelagert. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Chemikalien, Geräte und Software ist im Anhang aufgeföhrt.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten weder Tierversuche noch Organentnahmen. Es wurde auf Gewebeproben vorhergehender Versuche zurückgegriffen, ein separates Ethikvotum war deshalb nicht erforderlich.

Alle im Vorfeld dieser Arbeit durchgeföhrt Tierversuche und Gewinnung der Organproben wurden nach zuvor genehmigten Tierversuchsantrag durchgeföhrt und wurden durch Bollmann et al., 2021 und Dörner et al., 2021 publiziert. Die Genehmigungsnummern der Tierversuche sind bei den jeweiligen Tiermodellen aufgeföhrt.

3.1 Tierhaltung

Die Haltung der Mäuse erfolgte gemäß geltenden tierschutzrechtlichen Bestimmungen in der Core Facility Tierhaltung” der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu handelsüblichem Labortierfutter der Marke Altromin 1824 P und Wasser. Die Haltung erfolgte als Barrierehaltung, geschlechtergetrennt in Gruppen. Um die Identität der Labortiere jederzeit sicherzustellen, erfolgte eine individuelle Markierung mittels Ohrclips. Für die Genotypisierung wurde bis spätestens zum 30. Lebenstag die Schwanzspitze entfernt.

3.2 Tiermodelle

Das nachfolgend beschriebene Vorgehen führte zu herzspezifischer Überexpression der entsprechenden Proteinphosphatasen. Es handelte sich jeweils um Mäuse des CD-1-Stammes.

3.2.1 Tiermodell “Herzspezifische Überexpression von PP2A”

Die Etablierung der Versuchstierlinie wird in Gergs et al., 2004 beschrieben. Es wurde für PP2A α kodierende cDNA der Maus mit einer Länge von 1382 bp Länge genutzt. Diese wurde in eine Expressionskassette mit einem α MHC-Promotor und einer Simian-Virus 40 (SV40)-Polyadenylsequenz als Transkriptionsterminator eingebracht. Die vorliegende Sequenz wurde isoliert und mittels Mikroinjektion in befruchtete Eizellen eines CD1-Mausstammes eingebracht. Die transgenen Mäuse wurden identifiziert und eine Zuchtlinie etabliert. Im Northern-Blot zeigte sich für Herzen transgener Tiere eine 2,1-fache Expression von PP2A α im Vergleich zu Herzen von WT-Mäusen (Gergs et al. 2004). Weiterhin zeigte sich die durch Okadasäure inhibierte Proteinphosphataseaktivität als Näherung für die veränderte PP2A-Aktivität 1,7-fach erhöht (Gergs et al. 2004). Die Genehmigungsnummer der Tierversuche ist 42502-02-1518 MLU.

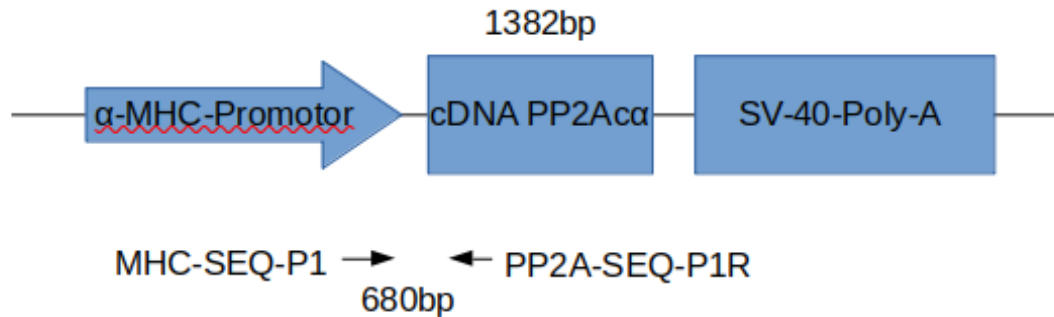


Abbildung 2: schematische Darstellung der Expressionskassette für PP2A

3.2.2 Tiermodell “Herzspezifische Überexpression von PP5“

Die Etablierung der Versuchstierlinie wird in Gergs et al., 2012 beschrieben. Es wurde für PP5 kodierende cDNA der Ratte mit einer Länge von 1493 bp genutzt. Analog zum Vorgehen bei PP2A α wurde diese Gensequenz in eine Expressionskassette mit einem α MHC-Promotor und einem SV40-Transkriptionsterminator ligiert. Diese Sequenz wurde anschließend isoliert und mittels Mikroinjektion in befruchtete Eizellen des CD1-Mausstammes eingebracht. Die transgenen Mäuse wurden mittels PCR identifiziert und eine Zuchtlinie etabliert.

Im Western-Blot wurde anschließend gezeigt, dass die Proteinmenge von PP5 im Vergleich mit WT-Mäusen in Herzen von TG-Mäusen 4,5-fach erhöht war (Gergs et al., 2012). Die Genehmigungsnummer der Tierversuche ist 42502-02-1518 MLU.

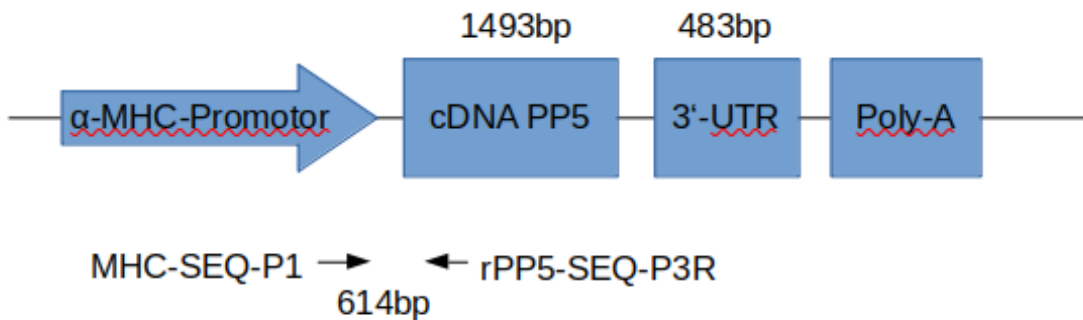


Abbildung 3: schematische Darstellung der Expressionskassette für PP5

3.2.3 Tiermodell “Herzspezifische Überexpression von PP2C β “

Die Etablierung der Versuchstierlinie wird in Bollmann et al., 2021 beschrieben. Es wurde für PP2C β codierende cDNA mit einer Länge von 402 bp genutzt. Analog zum Vorgehen bei PP2A α wurde diese Gensequenz in eine Expressionskassette mit einem α MHC-Promotor und einem SV40-Transkriptionsterminator ligiert. Diese Sequenz wurde anschlie-

ßend isoliert und mittels Mikroinjektion in befruchtete Eizellen des CD1-Mausstammes eingebracht. Die transgenen Mäuse wurden mittels PCR identifiziert und eine Zuchtlinie etabliert. Im Western-Blot zeigt sich eine etwa 10-fache Erhöhung der Proteinmenge von PP2C in den Herzen transgener Mäuse im Vergleich zu WT (Bollmann et al., 2021). Die Genehmigungsnummer der Tierversuche ist 42502-02-691 MLU.

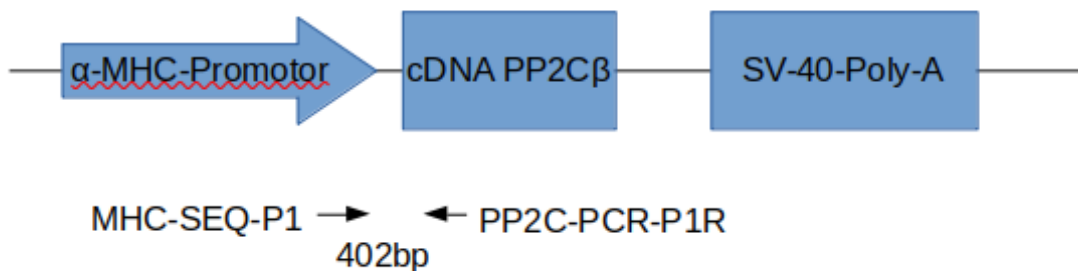


Abbildung 4: schematische Darstellung der Expressionskassette für PP2C

3.2.4 Tiermodell “Herzspezifische Überexpression von PP2A und PP5“

Für die Untersuchung von Mäusen, die sowohl für PP2A als auch für PP5 transgen sind, wurden die entsprechenden Zuchtlinien gekreuzt. Der Genotyp wurde mittels PCR identifiziert.

3.3 Genotypisierung, physiologische Versuche und Herstellung von Ventrikelpulver

Die untersuchten Herzen stammen von Mäusen, die im Alter zwischen 98 und 227 Tagen getötet wurden. Die Altersverteilung wird in der Auswertung gezeigt.

3.3.1 Genotypisierung

Für die Durchführung der Genotypisierung wurde den Mäusen im Alter von vier Wochen ein kleines Stück (2-3 mm) der Schwanzspitze entfernt. Dieses wurde in einem sterilen Tube mit 250 µl Extraktionspuffer überschichtet und über Nacht bei 56 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Als Nächstes wurden 250 µl Neutralisationspuffer zugegeben und die Lösung gemischt. Anschließend wurde die Probe bei -20 °C gelagert. Der vorliegende Genotyp wurde durch PCR mit entsprechenden Primerpaaren für PP2C, PP2A und PP5 und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

3.3.2 Physiologische Versuche und Entnahme der Herzen

Versuchsgruppe “PP2AxPP5“

Der Versuchsaufbau ist in Dörner et al., 2021 beschrieben. Unter den angegebenen Bedingungen erfolgte die Durchführung der Echokardiografie. Anschließend erfolgte die

Tötung der Versuchstiere und die Organentnahme.

Versuchsgruppe “PP2C β +Lipopolysaccharid“

Der detaillierte Versuchsaufbau wurde in Bollmann et al., 2021 beschrieben. Unter den angegebenen Bedingungen erfolgte die Erfassung der basalen Herzfunktion mittels Echokardiografie. Anschließend erfolgte die intraperitoneale Injektion von Lipopolysaccharid 30 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht gelöst in 0,9 % NaCl-Lösung oder die Injektion des gleichen Volumens von 0,9 % NaCl-Lösung als Kontrolle. Unter erneuter Isoflurannarkose erfolgten die echokardiografischen Folgeuntersuchungen nach 1, 3 und 7 Stunden. Anschließend erfolgte die Tötung der Versuchstiere und die Organentnahme.

Versuchsgruppe “PP2C β +Isoprenalin“

Die detaillierte Beschreibung der Methodik wurde in Bollmann et al., 2021 beschrieben. An Tag 1 wurde die basale Herzfunktion mittels Echokardiografie erfasst. Anschließend erfolgte die intraperitoneale Injektion von Isoprenalin 0,1 mg/g Körpergewicht gelöst in 0,9% NaCl-Lösung oder die Injektion des gleichen Volumens von 0,9% NaCl-Lösung als Kontrolle. Es erfolgte die erneute Echokardiografie etwa 1 Minute nach Injektion. An den Tagen 2, 3 und 4 erfolgte eine Echokardiografie und jeweils die erneute intraperitoneale Gabe von Isoprenalin 0,1 mg/g Körpergewicht und die erneute Echokardiografie etwa 1 Minute nach Injektion. Im Anschluss an die letzte Echokardiografie erfolgte die Tötung der Versuchstiere und die Organentnahme.

Organentnahme in allen Versuchsgruppen

Nach Abschluss der Echokardiografie erfolgte die Tötung der Versuchstiere und die Organentnahme. Dafür wurde die bestehende Narkose durch intraperitoneale Injektion einer letalen Dosis von Pentobarbital (50 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht) erweitert. Danach erfolgte die intraperitoneale Injektion von 1000 IE Heparin, um die Entstehung von Thromben zu verhindern. Die erfolgreiche Narkosewirkung wurde durch Fehlen von Reflexen an Zehen und Schnurrhaaren überprüft. Anschließend wurden Thorax und Abdomen von ventral scharf eröffnet und das gesamte Herz durch scharfe Präparation entfernt. Das Herz wurde in isotoner Natriumchloridlösung ausgeblutet und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in 1,5 mL-Eppendorfgefäßen bei -80 °C.

3.3.3 Herstellung ventrikulärer Homogenate

Das tiefgefrorene Herz wurde in flüssigem Stickstoff überführt und auch die Teflon-Kapseln und Stahlkugeln des Mikro-Dismembrators wurden in flüssigem Stickstoff gekühlt. Anschließend wurde eine Kapsel mit einer Stahlkugel und einer Probe des Ventrikelgewebes befüllt und verschlossen. Mittels Mikro-Dismembrator wurde die Probe für 60 Sekunden bei 2700 rpm pulverisiert. Das Gewebepulver wurde anschließend ohne anzutauen zurück in das Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde die Kühlung in flüssigem Stickstoff fortgesetzt. Die Proben wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder erneut bei -80 °C gelagert. Während des gesamten Prozesses wurde ein Auftauen des Gewebes vermieden.

3.4 Analyse von Nukleinsäuren

Im Rahmen der Untersuchungen wurde die mRNA-Expression folgender Gene betrachtet:

Tabelle 2: Genorte für Analyse der mRNA-Expression

Name	Funktion
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Verwendung als interner Standard
Nppa	Natriuretisches peptid Typ A
Nppb	Natriuretisches Peptid Typ B
CD14	Co-Rezeptor für die Bindung von LPS
LBP	Lipopolysaccharidbindendes Protein, verstärkt die LPS-Bindungsaktivität von CD14
MD2	Myeloider Differenzierungsfaktor 2; Lymphozytäres Antigen 96, Interaktion mit TLR-4 bei der Bindung von LPS
TLR4	Toll-like Rezeptor Typ 4, Rezeptor für die Bindung und Signaltransduktion von LPS
IL-1 β	proinflammatorisches Zytokin
IL6	proinflammatorisches Zytokin
NF- κ B	Transkriptionsfaktor, zentraler Bestandteil des NF- κ B-Signalwegs
I κ B α	Inhibitor alpha von NF- κ B
TNF(- α)	Tumornekrosefaktor
α MHC	alpha-Isoform der Schweren Myosinkette
β MHC	beta-Isoform der Schweren Myosinkette
Col1 α 1	Alpha-1-Typ-1-Kollagen
Col3 α 1	Alpha1-Typ-3-Kollagen
Fn1	Fibronektin 1
Cacna1c	alpha1c-Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals
Kcnh2	Untereinheit des hERG-Kaliumkanals
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PP5	Proteinphosphatase 5
PP2C	Proteinphosphatase 2C

3.4.1 Puffer für Nukleinsäureanalysen

Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die fertige Lösung.

DNA-Extraktion

Extraktionspuffer: 25mM NaOH; 0,1 mM EDTA; pH 8

Neutralisationspuffer: 4,6 g/l Tris-HCl in Aqua dest

RNA-Extraktion

TAE-Puffer 2 M Tris-Base; 50 mM EDTA; in Aqua dest gelöst und mit Essigsäure auf pH 8,2 eingestellt

TE-Puffer 10 mM TrisBase in Aqua dest; 0,25 mM EDTA, mit Salzsäure auf pH 8,0 eingestellt

FA-Puffer (10-fach) MOPS 200 mM; NaAcetat 50 mM; EDTA 10 mM; pH 7,0 mit NaOH eingestellt

RNA-Ladepuffer (5-fach) gesättigte Bromphenolblaulösung 16 µl; 0,5 M EDTA pH 8,0 100 µl; 37 % Formaldehyd 800 µl; 100 % Glycerin 2 ml; Formamid (deionisiert) 3,1 ml; 10-fach FA-Puffer 4 ml

3.4.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mit dem TRIzol-Reagenz entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurde jeweils 1 mL TRIzol-Reagens in 2 mL-Eppendorfgefäße gefüllt und ausgewogen. Dazu wurden maximal 50 mg Ventrikelpulver gegeben und mittels Polytron dreimal für je 30 Sekunden bei 13000 rpm homogenisiert. Anschließend erfolgte für 5 Minuten die Inkubation bei Raumtemperatur (RT) und darauffolgend die Zugabe von 0,2 mL Chloroform. Die Proben wurden für etwa 15 Sekunden gemischt und dann erneut für 5 Minuten bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 10000 rpm bei 4 °C für 15 Minuten mit der Eppendorf Centrifuge 5424 R. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde anschließend abgenommen und in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und vorsichtig vermischt. Die organische Phase sowie die Interphase wurden verworfen. Die Probe wurde für 15 Minuten bei RT inkubiert und anschließend für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde die flüssige Phase vorsichtig abgegossen und das weiße RNA-Sediment mit 0,9 mL 75% Ethanol überschichtet, um Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß für 5 Minuten bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugiert und erneut die flüssige Phase abgegossen. Anschließend wurde die Probe im Thermomixer bei 37 °C getrocknet, 30 µL DEPC-Wasser zugegeben und für 10 Minuten bei 60 °C und 600 rpm bei ständigem Schütteln inkubiert. Wenn sich das Sediment danach noch nicht vollständig gelöst hatte, wurde die Inkubation bis zur Auflösung verlängert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gelagert. Es erfolgte die Qualitätskontrolle mittels Fotometrie und Gelelektrophorese sowie die Zugabe von 1 µL RNase-Inhibitor. Unmittelbar im Anschluss erfolgte jeweils die cDNA-Synthese. Die RNA-Probe wurde anschließend bei -80 °C gelagert. Alle Schritte erfolgten auf der Sterilbank, um Verunreinigungen zu minimieren.

3.4.3 Photometrische Analyse der RNA-Proben

Für die Fotometrie wurde je 1 µL RNA-Probe in 49 µL TE-Puffer in einer Küvette aufgenommen und die Extinktionen bei 260 und 280 nm Wellenlänge gemessen. Aus der

Extinktion bei 260nm lassen sich bei bekannter Schichtdicke (l) und Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{RNA} = 40$) gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Konzentration (c) der RNA ermitteln. Als Maß der Reinheit wurde der Quotient aus den Extinktionen bei Strahlung der Wellenlänge 260 und 280 nm verwendet. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Die ermittelte Konzentration wurde genutzt, um für die folgenden Schritte möglichst gleiche Mengen an RNA einzusetzen und damit gleiche Bedingungen zu gewährleisten.

Berechnung der Konzentration

$$c_{RNA} = A_{260nm} * Verdünnungsfaktor * \epsilon$$

3.4.4 RNA-Gelelektrophorese

Eine genauere Qualitätskontrolle der RNA erfolgte außerdem durch eine Gelelektrophorese in einem denaturierenden 1 %-igem Agarosegel. Der Gelträger wurde gesäubert und getrocknet. Für das Gel wurden 0,3 g Agarose abgewogen und mit 27 mL DEPC-Wasser in einem Erlenmeyerkolben gemischt und aufgeköcht. Anschließend wurden 3 mL 10-fach konzentrierter FA-Puffer, 1,5 mL 37% Formaldehydlösung und 3 μ L INtRON RedSafe zugegeben. Das Gel wurde im Anschluss gegossen und polymerisierte erschütterungsfrei. Als Elektrophoresepuffer wurde einfach konzentrierter FA-Puffer genutzt. Zur Beladung wurden 2 μ g RNA-Probe mit DEPC-Wasser auf 8 μ L ergänzt und mit 2 μ L 5-fach konzentriertem RNA-Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden in die Taschen pipettiert. Als Längenreferenz wurde eine 1kb DNA-Leiter (Fermentas Gene Ruler) genutzt. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 40 Minuten bei 100 V. Das Gel wurde anschließend auf einem Transilluminator UV-Licht mit 254 nm Wellenlänge ausgesetzt und fotografisch dokumentiert.

Bei qualitativ hochwertiger RNA traten zwei scharf abgrenzbare Banden bei etwa 1,8 kb und bei 4,7 kb auf, die der 18S- und 28S-RNA entsprechen. War das nicht der Fall, wurde die RNA-Extraktion wiederholt.

3.4.5 dsDNase-Verdau und cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese hat das Ziel, die Gesamtheit der RNA in stabilere cDNA zu überführen, um anschließend an der DNA PCR-Untersuchungen durchführen zu können, die Rückschlüsse auf die ursprüngliche RNA-Menge zulassen. Im ersten Schritt der cDNA-Synthese wurde durch spezifischen Verdau doppelsträngiger DNA (dsDNA) sichergestellt, dass Verunreinigungen mit genomischer DNA minimiert sind. Dieser Arbeitsschritt wurde mit dem "Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase" nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Kontrolle wurden von jeder RNA-Probe zwei Ansätze genutzt, um eine Probe mit reverser Transkriptase zur quantitativen Analyse und eine Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase (NRT) zu gewinnen. Weiterhin wurde an jedem Tag, an dem die cDNA-Synthese durchgeführt wurde, eine sogenannte No-Template-Control (NTC), also ein Ansatz ohne RNA-Probe, aber mit Reverser Transkriptase erstellt, um Kontaminationen der genutzten Geräte und Chemikalien erkennen zu können. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

Zunächst wurden 1 μ L 10-fach dsDNAse Puffer und 1 μ L dsDNAse in 0,2 mL-Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurden 2 μ g der RNA-Probe zugegeben und das Volumen auf 10 μ L mit DEPC-Wasser ergänzt. Die NTC wurde dabei ohne RNA mit 8 μ L DEPC-Wasser versetzt. Die Proben wurden kurz gemischt und für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt.

In dasselbe Gefäß wurden anschließend 4 μ L Reaktionsgemisch pipettiert. In die Positivproben und die NTC wurden 2 μ L Enzymgemisch und dann 4 μ L DEPC-Wasser pipettiert. In NRT-Proben wurden 6 μ L DEPC-Wasser pipettiert. Die Proben wurden anschließend kurz gemischt, zentrifugiert und für 30 Minuten bei 25 °C, dann für 15 Minuten bei 50 °C und für 5 Minuten bei 85 °C inkubiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.6 Nicht-quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Erfolgskontrolle der bisherigen Arbeitsschritte wurde eine konventionelle PCR mit GAPDH-Primern (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit anschließender Gelelektrophorese in einem 2,5 % Agarose-Gel durchgeführt. Bei einer cDNA-Probe ohne Kontamination mit genomischer DNA war bei den +RT-Proben eine scharfe Bande bei 351 bp zu sehen und bei den NRT- und NTC-Proben keine Bande sichtbar. Im Fall der PCR für die Genotypisierung der Versuchstiere wurden Primer genutzt, die spezifisch für das eingebrachte Konstrukt mit PP2A α , PP5 oder PP2C β sind. Für PP2A α beträgt die erwartete Produktlänge 680 bp, für PP5 614 bp und für PP2C β 402 bp. Pipettiert wurde erfolgte unter sterilen Bedingungen in 0,2 mL-Gefäße. Zunächst wurden 10 μ l "2x Master-Mix" und je 1 μ l Forward-Primer (10 mM) und Reverse-Primer (10 mM) pipettiert. Nachfolgend wurden 1 μ l cDNA-Lösung und 7 μ l DEPC-Wasser zugegeben. Im fertigen Ansatz lag der Mastermix somit einfach konzentriert und die jeweiligen Primer in einer Konzentration von 500nM vor.

Am Thermocycler wurde je nach Primerpaar ein geeignetes Protokoll gewählt, um die PCR unter optimalen Bedingungen durchführen zu können. Hierfür wurden jeweils 30 Amplifikationszyklen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte stets bei 94 °C und die Elongation bei 72 °C. Für PP2A, PP2C und PP5 erfolgte die Primerhybridisierung bei 55 °C, für GAPDH bei 60 °C (Die Protokolle sind im Anhang aufgeführt).

3.4.7 DNA-Gelelektrophorese

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein nicht-denaturierendes 1 %-Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Für sehr kurze PCR-Produkte wurde alternativ ein 2 %-Agarosegel verwendet, welches analog mit höherer Agarosekonzentration vorbereitet wurde. Der Gelträger wurde gesäubert. Für ein 1 %-Agarosegel wurden 0,3 g Agarose in 30 ml TAE-Puffer (1x) aufgekocht, 3 μ l RedSafe zugegeben und in vorbereitete Kammer gegossen. Passende Kämme wurden eingesetzt und Gel erschütterungsfrei polymerisieren gelassen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer (1x). Für größere Gele wurde die Menge an Substraten in gleichem Verhältnis genutzt. Für ein 2 %-Agarosegel erfolgte die Herstellung analog, jedoch unter Verwendung von 0,6 g Agarose auf 30 ml

TAE-Puffer (1x) und 3 μ l RedSafe. Für größere Gele wurde die Menge an Substraten im gleichen Verhältnis eingesetzt.

Anschließend wurde das Gel auf einen Transilluminator überführt. Unter Durchleuchtung mit UV-Strahlung wurden entstandene Banden durch Fluoreszenz dargestellt. Es wird erwartet, dass bei vorliegender Zielsequenz und erfolgreicher Amplifikation eine Bande im erwarteten Längenbereich entsteht und bei Negativkontrollen oder fehlender Zielsequenz keine Bande darstellbar ist. Bei negativer +RT-Probe oder positiver NRT- oder NTC-Probe erfolgte eine erneute Durchführung der cDNA-Synthese, beziehungsweise der RNA-Extraktion mit allen darauffolgenden Schritten.

3.4.8 Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (Real-Time PCR)

Für die quantitative Real-Time PCR wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green genutzt, der in doppelsträngiger DNA interkaliert und ein Fluoreszenzsignal erzeugt. Durch Erfassung der Fluoreszenzen der einzelnen PCR-Ansätze nach jedem PCR-Zyklus, ließ sich im Folgenden die relative Anfangsmenge der enthaltenen cDNA ermitteln. Da keine Standardkurve mit bekannten DNA-Konzentrationen mitgeführt wurde, war eine Bestimmung der absoluten cDNA-menge nicht möglich. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen der +RT-Probe durchgeführt sowie Einfachbestimmungen der NRT- und NTC-Proben.

Es wurden zunächst 5 μ L "Bio-Rad iTaq Universal SYBR Green Supermix" je Well der 96-Well-Platte pipettiert. Dazu wurden 3 μ L des jeweiligen Primerpaares gegeben, in dem die Konzentrationen des forward- und reverse-Primers jeweils 1,67 μ M betragen. Schließlich eine Menge von cDNA zugegeben, die einer ursprünglich eingesetzten RNA-Menge von 25 ng entsprechend der fotometrischen Abschätzung entspricht. Im fertigen Ansatz betrug die Konzentration der Primer jeweils 500 nM. Das entspricht den Empfehlungen des Herstellers.

Die vorbereitete Platte wurde anschließend mit entsprechender Klebefolie flüssigkeitsdicht abgeklebt und im "Bio-Rad CFX Connect™ Optics Module" prozessiert. Es erfolgte ein Vorlauf bei 95 °C für 2 Minuten zur Aktivierung der Polymerase im PCR-Ansatz. Die Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 5 s, anschließend folgte die Anlagerung der Primer und Elongation bei 60 °C für 30 s und nachfolgend eine Fluoreszenzmessung. Insgesamt wurden 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. Abschließend erfolgte die Denaturierung bei 95 °C für 10 s und Erstellung einer Schmelzkurvenanalyse für den Temperaturbereich von 65 bis 95 °C in 0,5 K-Schritten.

Nach Durchführung der qPCR wurden die Platten zunächst eingefroren, um exemplarisch Gelelektrophoresen durchführen zu können.

3.4.9 Auswertung mittels vergleichender C(T)-Methode

Zuerst wurde geprüft, ob die Fluoreszenzsignale in den Schmelzkurven für +RT-Proben ein spezifisches Signal und für -RT und NTC-Proben ein davon verschiedenes Ergebnis zeigen. Bei Vorliegen anderer Signale wurden die Daten ausgeschlossen und die cDNA-Synthese und alle nachfolgenden Schritte wiederholt. Anschließend wurde der Verlauf der Fluoreszenzsignale der +RT-Proben überprüft und Proben ausgeschlossen, deren Kurven

nicht sigmoidal verlaufen. Lagen die C(T)-Werte der Mehrfachbestimmungen einer Probe um mehr als 1 Zyklus auseinander, wurden die Daten ausgeschlossen und die Quantitative Real-Time PCR wiederholt.

Erfüllten die Daten die zuvor aufgeführten Kriterien, erfolgte die Auswertung entsprechend der komparativen C(T)-Methode nach Schmittgen und Livak, 2008.

3.5 Quantitativer immunologischer Proteinnachweis

Das Ziel des Western Blots war die quantitative Bestimmung der Zielproteine. Da kein Mengenstandard mitgeführt wurde, war nur eine relative Mengenbestimmung möglich. Es erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung, der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und der immunologische Nachweis der Zielproteine mittels Antikörper. Durch Markierung der an die Zielproteine gebundenen Antikörper mittels Fluoreszenzfarbstoff war eine quantitative Auswertung möglich. Durch Erfassung von CSQ als internen Massenstandard wurde eine relative Vergleichbarkeit der Proben gewährleistet. Im Rahmen des quantitativen Proteinnachweises wurden folgende Proteine untersucht: Calsequestrin (CSQ) wurde als Massenabgleich verwendet. Calsequestrin ist ein calciumbindendes Protein im endoplasmatischen Retikulum. Im Herzen liegt die Isoform CSQ-2 vor, die Expression ist konstitutiv hoch (Faggioni und Knollmann, 2012). PP2A und PP5 wurde untersucht, um eine Überexpression bei transgenen Tieren nachzuweisen.

3.5.1 Puffer für den Proteinnachweis

Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die fertige Lösung.

Proteinextraktion

SDS-Homogenisierungspuffer: NaHCO₃ 10 mM; SDS 20 %; pH 7,4

Lösung A: 2 % Na₂CO₃ in 0,1 M NaOH

Lösung B: 1 % K-Na-Tartrat 4H₂O

Lösung C: 0,5 % CuSO₄

Lösung D: Mischen von 98 % (V/V) Lösung A; 1 % (V/V) Lösung B; 1 % (V/V) Lösung C

Lösung E: Folin-Ciocalteu (1:2)

Proteinstandard: 1 mg/ml bovines Serumalbumin in Aqua dest.

SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese und Western-Blot

Ladepuffer (2-fach): Tris-Base 0,125 M; SDS 4 %; Glycerol 20 %; Bromphenolblau 0,002 %; pH 6,8
Ladepuffer (1-fach): Ladepuffer (2-fach) 50 %; SDS-Homogenisierungspuffer 50 %

Acrylamid-Trenngel (10 %): Porziopuffer (2-fach) 47,4 %; 30 % Acrylamidlösung 31,6 %; Glycerol 7,9 %; Aqua dest. 12,6 %; TEMED 0,08 %; APS 0,38 %

Acrylamid-Sammelgel (4 %): Sammelgelpuffer (4-fach) 24,7 %; 30 %iges Acrylamid 12,2 %; Aqua dest. 61,1 %; TEMED 0,06 %; APS 1 %

Elektrophoresepuffer (10-fach): Tris-Base 0,4 M; Glycin 1,2 M; SDS 0,4 %; pH 8,8

Transferpuffer: Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 40 mM; Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat 7,9 mM; pH 8

Porziopuffer (2-fach): Tris-Base 0,2 M; Glycin 0,6 M; EDTA (Titriplex III) 0,12 M; SDS 0,2 %; Glycerol 10 %; Polyacrylamid 0,4 %; pH 8,6-9,0

Sammelgelpuffer (4-fach): Tris-Base 0,5 M; SDS 0,4 %; pH 6,8

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine C₆H₁₆N₂): Fertiglösung

APS: Ammoniumpersulfat 10 % gelöst in Aqua dest

Ponceau-Rot: PonceauS 0,2 %; Trichloressigsäure 2 % in Aqua dest.

TBST-Puffer: Tris-Base 10 mM; NaCl 150 mM; Tween20 0,1 % (V/V); pH 7,4

AP-Puffer: Triethanolamin 100 mM; NaCl 100 mM; MgCl₂·6H₂O 5 mM; pH 9,4

MP-Blockierungslösung: Magermilchpulver 5 % (W/V) in TBST gelöst

BSA-Blockierungslösung: bovines Serumalbumin 2 % (W/V) oder 5 % (W/V) in TBST gelöst

ECF-Substrat: ECF-Substrat 36 mg in ECF-dilution-buffer 60 ml gelöst

3.5.2 Herstellung der Homogenate

Eine Spatelspitze des Ventrikelpulvers wurde mit 100 µL Homogenisationspuffer versetzt, gevortext und auf Eis gelagert. Als Nächstes erfolgte die dreimalige Ultraschallhomogenisation für je 15 Sekunden mit 75 % Leistung. Danach wurden die Proben für 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend bei 4 °C für 30 Minuten mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und für die weiteren Versuche eingefroren. Für die Konzentrationsbestimmung nach Lowry et al., 1951 wurden 5 µL Proteinextrakt mit 495 µL DEPC-Wasser gesondert eingefroren.

3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Mithilfe der Konzentrationsbestimmung nach Lowry et al., 1951 wurde die jeweilige Proteinkonzentration in der 100-fach verdünnten Proteinextraktlösung bestimmt.

Als Proteinstandard wurde eine Albuminlösung genutzt, die eine Konzentration von 1 mg/mL hat.

Um eine Standardkurve zu erhalten, wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt und aufsteigend Proteinkonzentrationen von 0 µg/mL bis 100 µg/mL Albumin durchgeführt. Dafür wurde das entsprechende Volumen an Proteinlösung mit DEPC-Wasser zu 500 µL ergänzt. Anschließend wurden je 500 µL Lösung D zugegeben und die Proben gemischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Von den zu bestimmenden Proben wurden jeweils 10 µL eingesetzt und auf 500 µL mit DEPC-Wasser ergänzt. Auch hier wurden 500 µL Lösung D zugegeben, die Proben gemischt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Alle Proben wurden ab diesem Zeitpunkt gleich behandelt. Danach wurde jeweils 0,1 mL von Lösung E zugegeben, die Proben wurden erneut gemischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend konnte die Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm erfolgen. Zur effizienten Datenverarbeitung wurden die Extinktionswerte automatisch in eine Excel-Tabelle übernommen und eine automatisierte Konzentrationsberechnung gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz durchgeführt. Mit den

ermittelten Konzentrationen konnte die Menge an Protein abgeschätzt werden, um im folgenden Western-Blot mit vergleichbaren Proteinmengen arbeiten zu können.

3.6 Elektrophorese

Gemäß der bestimmten Konzentrationen wurden die Proteinlösungen mit Homogenisationspuffer verdünnt, sodass jeweils eine Proteinkonzentration von 1 µg/µL erreicht wurde. Im nächsten Schritt erfolgte die Gelelektrophorese. Als Erstes wurde die Apparatur gründlich gereinigt und zusammengebaut. Als Trenngel wurde ein 10 %-iges-Acrylamid-Gel gegossen. Das Gel wurde mit DEPC-Wasser überschichtet, mit Parafilm abgedichtet und musste erschütterungsfrei für mindestens 2 Stunden polymerisieren. Um die Polymerisation abzuschließen, erfolgte über Nacht die Lagerung bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde das Wasser der Überschichtung abgegossen. Auf das Trenngel wurde anschließend ein 4 %-iges Acrylamid-Gel als Sammelgel gegossen, welches für 1-2 h polymerisierte. Der Kryostat wurde genutzt, um die Elektrophoreseapparatur mit dem enthaltenen Elektrophoresepuffer auf etwa 8 °C zu kühlen. Die fertig polymerisierten Gele wurden für die Elektrophorese vorbereitet. Dafür wurden die Kämme aus dem Sammelgel entfernt, die obere Pufferkammer auf die Gele aufgesetzt und 600 ml Elektrophoresepuffer eingefüllt. Anschließend wurden 30 µL Protein-Größenstandard und je 60 µL der Probe je Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte anschließend mit einer Stromstärke von 40mA je Gel. Sobald die Laufmittelfront (Bromphenolblau-Bande) etwa 1 cm vor Ende des Gels angekommen war, wurde die Elektrophorese beendet.

3.6.1 Transfer auf die Nitrozellulosemembran

Die Gele wurden entnommen und der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran vorbereitet. Dafür wurde das Gel auf die Nitrozellulosemembran gelegt. Nun wurden von beiden Seiten Blottingpapier und Schwämme angelegt. Durch Kompression wurde ein direktes Anliegen der Membran an das Gel gewährleistet. Die entstandene Transfereinheit wurde anschließend in die Transferkammer unter Beachtung der Polarität eingesetzt, mit Transferpuffer aufgefüllt und einem homogenen elektrischen Feld ausgesetzt. Der Transfer nutzte die negative Ladung der SDS-Proteinkomplexe. Im elektrischen Feld erfolgte dadurch der Transport der Proteine in Richtung der Anode. Der Transfer benötigte 4 Ah und wurde üblicherweise bei 250 mA für 16 h bei 4 °C durchgeführt. Anschließend konnte das Gel verworfen werden und die Nitrozellulosemembran mit Ponceau-Lösung gefärbt werden. Nach Abwaschen überschüssiger Farbe mit destilliertem Wasser waren die Proteinbanden erkennbar. Die Membran wurde zur Dokumentation eingescannt. Membranbereiche wurden entsprechend der Größe der Zielproteine zugeschnitten und dem quantitativen immunologischen Proteinnachweis zugeführt.

3.6.2 Präparation der Nitrozellulosemembran für Fluoreszenzdiagnostik

Es erfolgte zunächst die Entfernung der reversiblen Ponceau-Färbung durch mehrere Waschschritte mit TBST-Puffer, bis keine Rotfärbung der Membran oder der Lösung sichtbar

war. Anschließend wurden unspezifische Proteinbindungsstellen mit Milchpulver (MP) oder bovinem Serumalbumin (BSA) blockiert. Die Wahl des Blockierungspuffers und dessen Konzentration war je nach Zielprotein und verwendetem Antikörper verschieden. Im Anhang findet sich eine detaillierte Auflistung. Danach wurde der erste Antikörper zugegeben und für mindestens 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Spülung der Membranstücke mit TBST-Puffer für 3x10 Minuten. Danach wurde der zweite Antikörper zugegeben und für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranstücke wurden danach zuerst 3x10 Minuten mit TBST-Puffer und darauffolgend 2x2 Minuten mit AP-Puffer gewaschen. Am Ende des Waschvorgangs wurde ECF-Substrat 1:10 mit AP-Puffer verdünnt und vorsichtig gemischt. Das ECF-Gemisch als Fluoreszenzsubstrat der alkalischen Phosphatase wurde dann vorsichtig auf die Membranstücke gegeben und für 5 Minuten dunkel inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgossen und die Membranen mit AP-Puffer überschichtet.

3.6.3 Fluoreszenznachweis

Im Anschluss erfolgte ein Fluoreszenzscan mit dem Typhoon Variable Mode Imager.

3.6.4 Bildauswertung

Nach erfolgtem Scan wurde die quantitative Auswertung mittels ImageQuant TL 7.0 durchgeführt. Für die Erstellung der Bilder wurde die Software GIMP 2.8 verwendet.

3.6.5 Statistische Auswertung

Für die Datenauswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse wurde die Software GraphPad-Prism 5.0 genutzt. Die Daten der Real-Time PCR, welche zuvor mit der vergleichenden C(T)-Methode ausgewertet wurden, wurden abschließend mittels einfaktoriel-ler Varianzanalyse (1way-ANOVA) und Bonferroni-Post-Test statistisch ausgewertet. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ angesehen. Die Daten des Western Blots, welche zuvor mit ImageQuant ausgewertet wurden, wurden abschließend mittels 1way-ANOVA und Bonferroni-Post-Test statistisch ausgewertet. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ angesehen. Das Vorliegen einer statistischen Signifikanz wurde durch entsprechende Symbolik kenntlich gemacht.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM).

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsgruppe PP2C β -Lipopolysaccharid

Im Folgenden sind die Auswertungen der Real-Time PCR der Versuchsgruppe PP2C β -LPS gezeigt. Verglichen wurden jeweils herzspezifisch PP2C β überexprimierende Mäuse mit WT-Geschwistertieren. Das Alter der Versuchstiere bei Tötung lag zwischen 108 und 227 Tagen. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Altersverteilung der Subgruppen.

In der Analyse der mRNA-Expressionen ergab sich keine veränderte Expression des Herzinsuffizienzmarkers *Nppa* (Abb. 5). Weiterhin zeigte sich eine deutliche Überexpression proinflammatorischer Zytokine nach LPS-Exposition unabhängig vom Genotyp (Abb. 6). Für Proteine des LPS-Bindungskomplexes zeigte sich bei CD14 nach LPS-Exposition unabhängig vom Genotyp eine deutlich erhöhte mRNA-Expression. Bei LBP zeigte sich diese Erhöhung stärker ausgeprägt bei PP2C-TG. Bei MD2 waren keine Unterschiede zu sehen, bei TLR4 bestand nur eine geringe Erhöhung nach LPS-Exposition unabhängig vom Genotyp (Abb. 7 und Abb. 8). Bei NF κ B und I κ B α zeigte sich eine Erhöhung nach LPS-Belastung unabhängig vom Genotyp, bei NF κ B war diese Erhöhung jedoch nur eine Tendenz (Abb. 9).

4.1.1 mRNA-Expression von Herzinsuffizienzmarkern

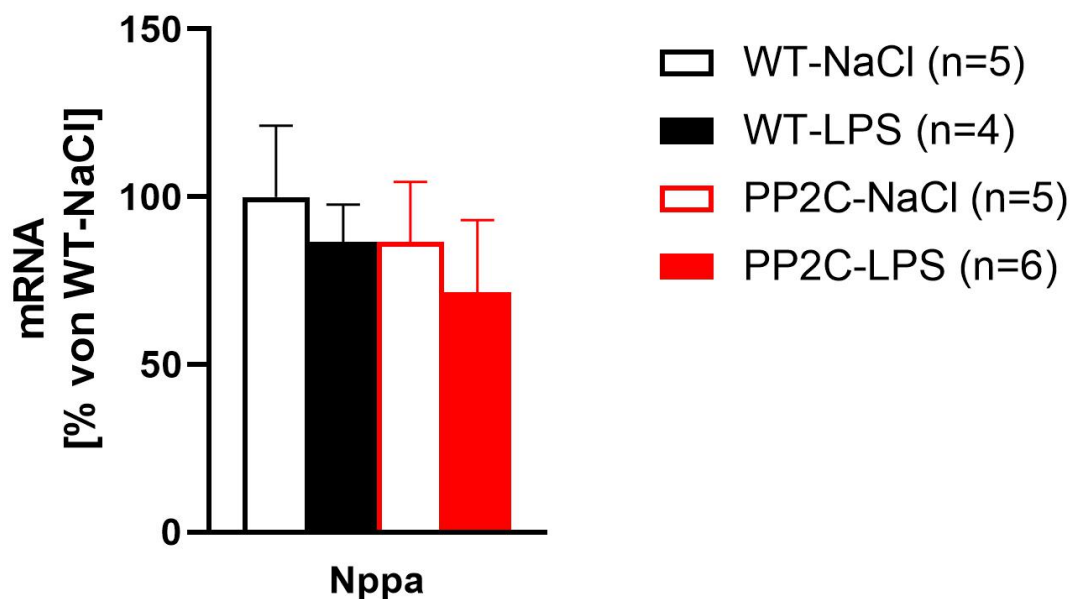


Abbildung 5: Die mRNA-Expression von *Nppa* unterschied sich nicht zwischen den Subgruppen. Es zeigte sich eine tendenzielle Verringerung in den Gruppen TG, die nicht signifikant war.

(WT-NaCl: n=5; WT-LPS: n=4; PP2C-NaCl: n=5; PP2C-LPS: n=6; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT-NaCl)

4.1.2 mRNA-Expression von Zytokinen

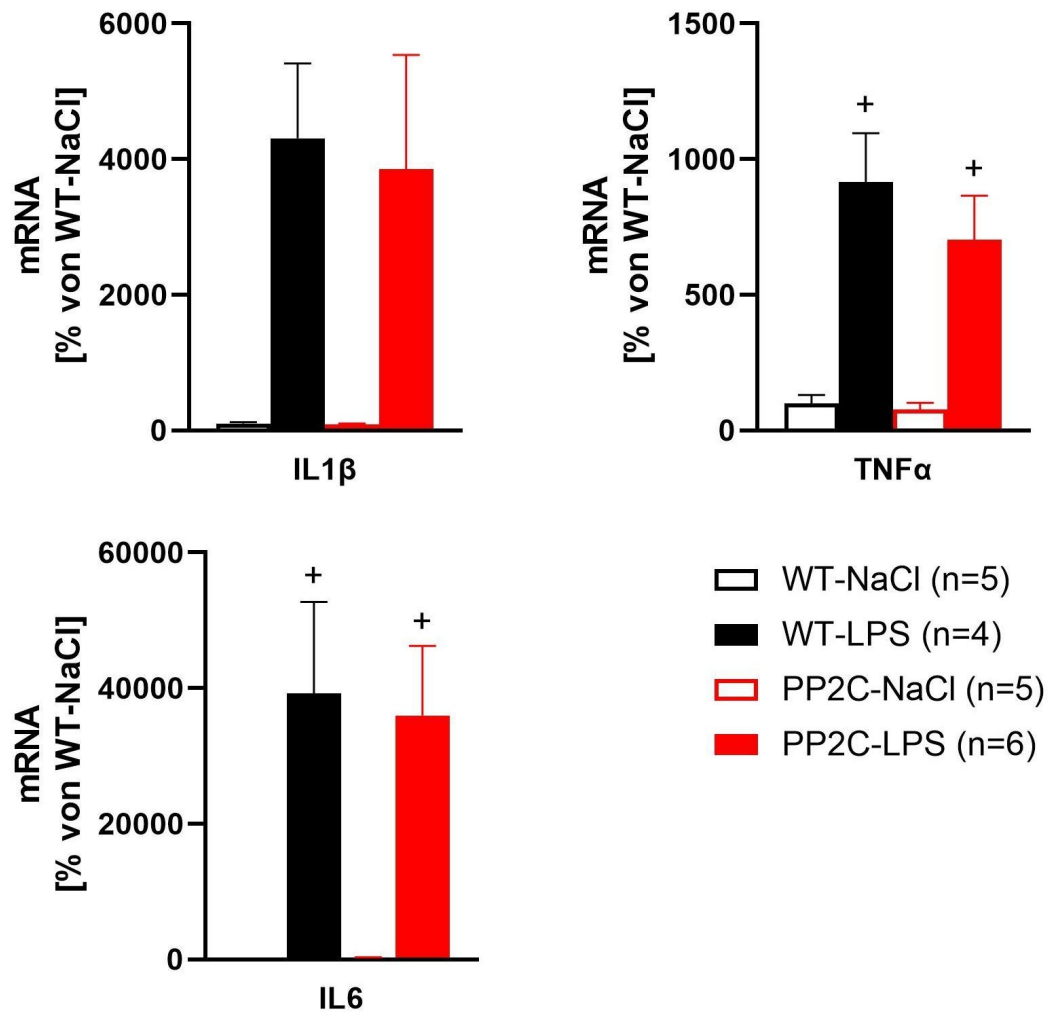


Abbildung 6: Die mRNA-Expression von TNF α , IL1 β und IL6 war nach Belastung mit LPS deutlich erhöht im Vergleich zur jeweiligen NaCl-Vergleichsgruppe. Die mRNA-Expression von IL1 β war nach Belastung mit LPS bei großer Streuung nicht signifikant erhöht. (+ $p < 0,05$ vs. NaCl)

(WT-NaCl: n=5; WT-LPS: n=4; PP2C-NaCl: n=5; PP2C-LPS: n=6; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT-NaCl)

4.1.3 mRNA-Expression des LPS-Bindungskomplexes

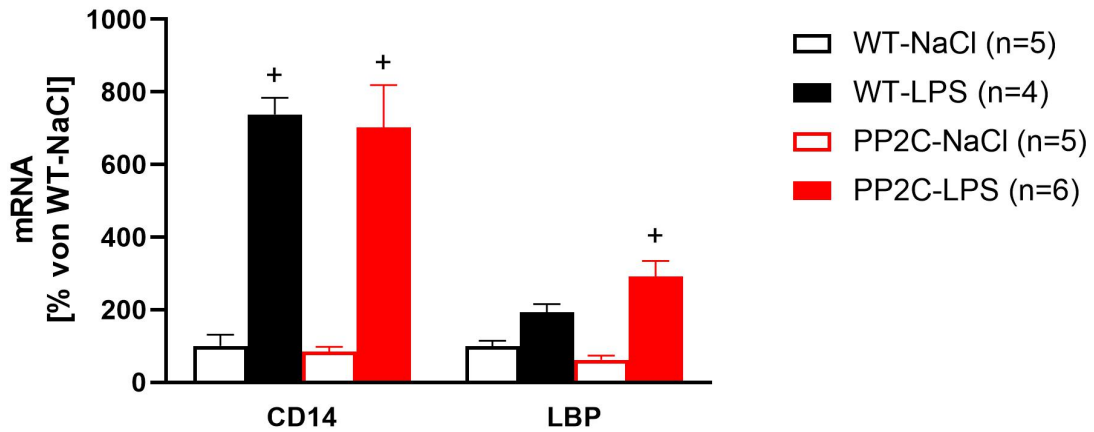


Abbildung 7: Die mRNA-Expression von CD14 war nach Belastung mit LPS signifikant erhöht. Die mRNA-Expression von LBP war nach Belastung mit LPS nur bei PP2C-TG signifikant erhöht. (+ $p < 0,05$ vs. NaCl)
(WT-NaCl: n=5; WT-LPS: n=4; PP2C-NaCl: n=5; PP2C-LPS: n=6; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT-NaCl)

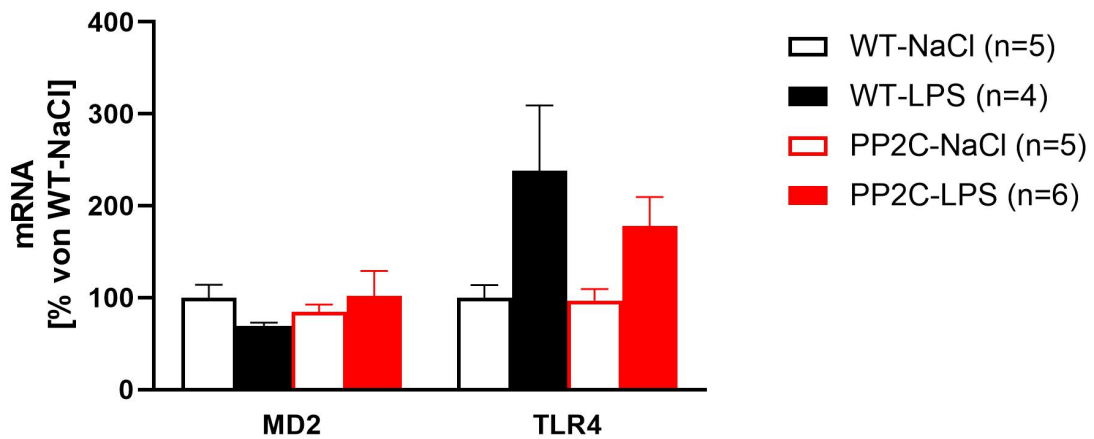


Abbildung 8: Die mRNA-Expression von MD2 war nach Belastung mit LPS unverändert in allen Gruppen. Die mRNA-Expression von TLR4 war nach Belastung mit LPS tendenziell erhöht (WT $p = 0,068$, PP2C $p = 0,057$). Es gab keine Unterschiede zwischen WT und PP2C-TG.
(WT-NaCl: n=5; WT-LPS: n=4; PP2C-NaCl: n=5; PP2C-LPS: n=6; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT-NaCl)

4.1.4 mRNA-Expression von $\text{NF}\kappa\text{B}$ und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$

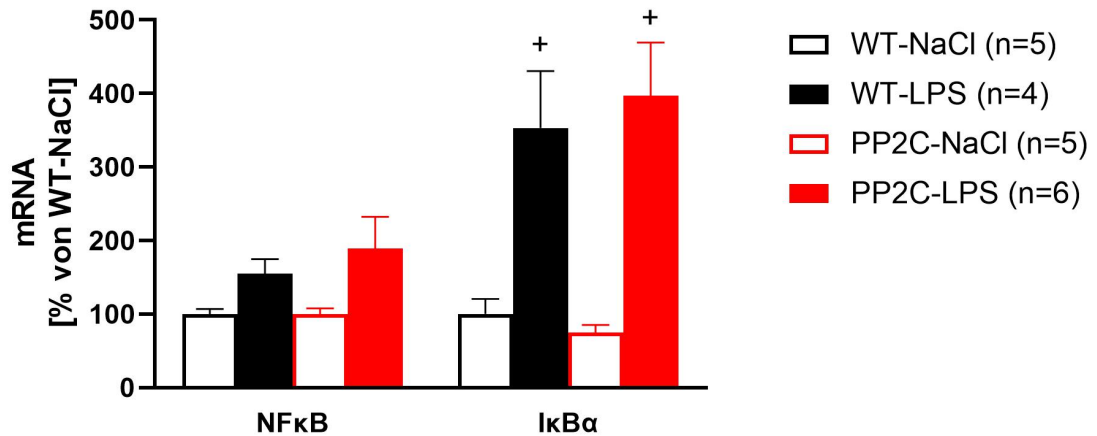


Abbildung 9: Die mRNA-Expression von $\text{NF}\kappa\text{B}$ war nach Belastung mit LPS geringfügig erhöht. Die mRNA-Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ war nach Belastung mit LPS in WT und PP2C-TG gleichermaßen erhöht. (+ $p < 0,05$ vs. NaCl)
(WT-NaCl: n=5; WT-LPS: n=4; PP2C-NaCl: n=5; PP2C-LPS: n=6; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT-NaCl)

4.2 Versuchsgruppe PP2C β -Isoprenalin

Im Folgenden sind die Auswertungen der Real-Time PCR der Versuchsgruppe PP2C β -Isoprenalin gezeigt. Verglichen wurden herzspezifisch PP2C β überexprimierende Mäuse mit WT-Geschwistertieren. Das Alter der Versuchstiere bei Tötung lag zwischen 103 und 166 Tagen mit durchschnittlich $133,8 \pm 7,25$ Tagen (Mittelwert \pm SEM in Tagen: WT-NaCl $134 \pm 24,0$; WT-ISO $149,2 \pm 11,13$; PP2C-NaCl $111 \pm 4,62$; PP2C-ISO $138,33 \pm 15,90$). Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Altersverteilung der Subgruppen.

Die Analyse der mRNA-Expressionen ergab unabhängig von einer β -adrenergen Stimulation eine tendenziell erhöhte Expression des Herzinsuffizienzmarkers Nppb (Abb. 10) und von Fibrosemarkern (Abb. 11) bei PP2C-TG. Eine statistische Signifikanz auf einem Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ konnte jedoch nicht gezeigt werden (PP2C-NaCl vs WT-NaCl $p=0,33$; PP2C-ISO vs WT-ISO $p=0,52$). Die mehrtägige Stimulation mit Isoprenalin führte bei den hier untersuchten Genen nur bei β -MHC zu einer Veränderung, in diesem Fall zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Expression bei WT und PP2C-TG (Abb. 12).

4.2.1 mRNA-Expression von Markern der Herzinsuffizienz

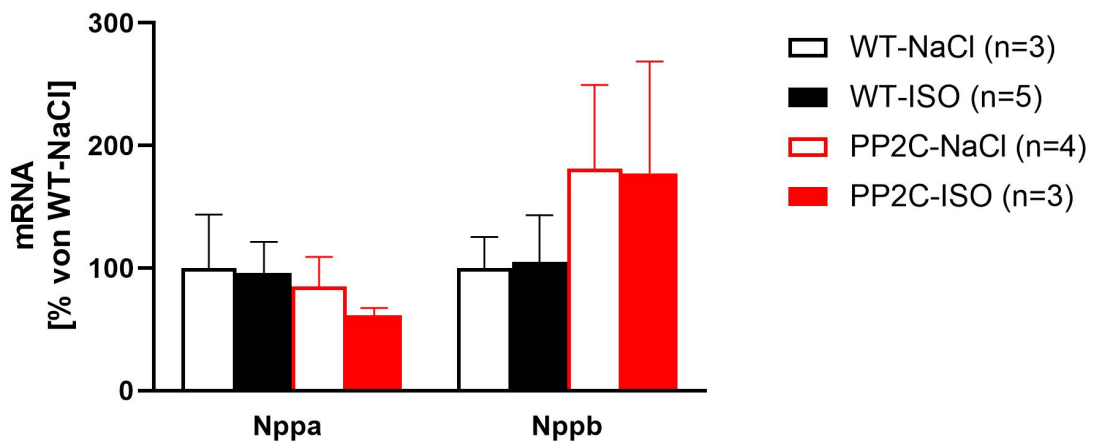


Abbildung 10: Die mRNA-Expression der natriuretischen Peptide Nppa und Nppb unterschied sich nicht signifikant zwischen den Subgruppen.

(WT-NaCl: n=3; WT-ISO: n=5; PP2C-NaCl: n=4; PP2C-ISO: n=3; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT-NaCl)

4.2.2 mRNA-Expression von Markern des fibrotischen Umbaus

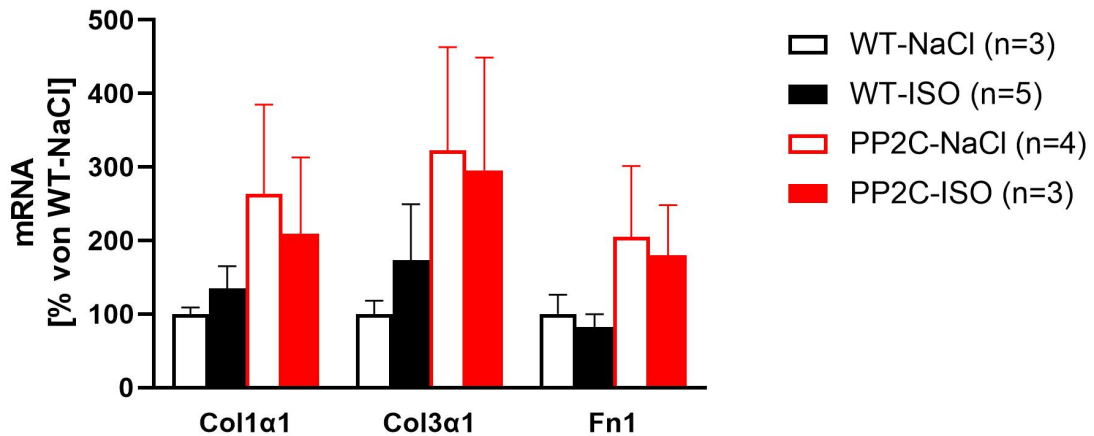


Abbildung 11: Die mRNA-Expression der Fibrosemarker Col1α1, Col3α1 und Fn1 unterschied sich nicht signifikant zwischen den Subgruppen. Es zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung in den PP2C-TG-Gruppen.

(WT-NaCl: n=3; WT-ISO: n=5; PP2C-NaCl: n=4; PP2C-ISO: n=3; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT-NaCl)

4.2.3 mRNA-Expression kardialer Myosinfilamente

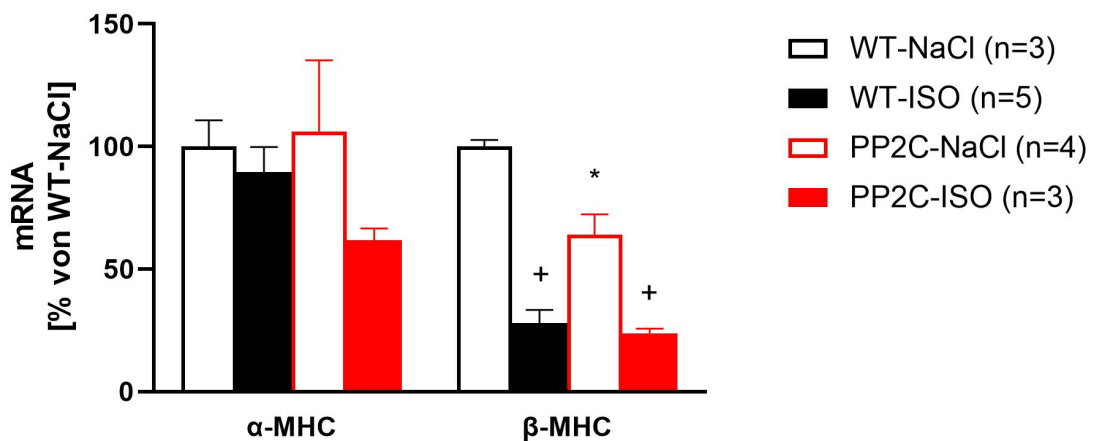


Abbildung 12: Die mRNA-Expression von α-MHC war unverändert in den Subgruppen. Es zeigte sich eine tendenzielle Verringerung in der Gruppe TG-ISO (vs. WT $p = 0,096$). Die mRNA-Expression von β-MHC war in TG-NaCl signifikant erniedrigt im Vergleich zu WT-NaCl. Die Expression von β-MHC-mRNA war bei Belastung mit Isoprenalin jeweils signifikant erniedrigt im Vergleich zu NaCl. (+ $p < 0,05$ vs. NaCl; * $p < 0,05$ vs. WT)
(WT-NaCl: n=3; WT-ISO: n=5; PP2C-NaCl: n=4; PP2C-ISO: n=3; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT-NaCl)

4.2.4 mRNA-Expression von Ionenkanälen

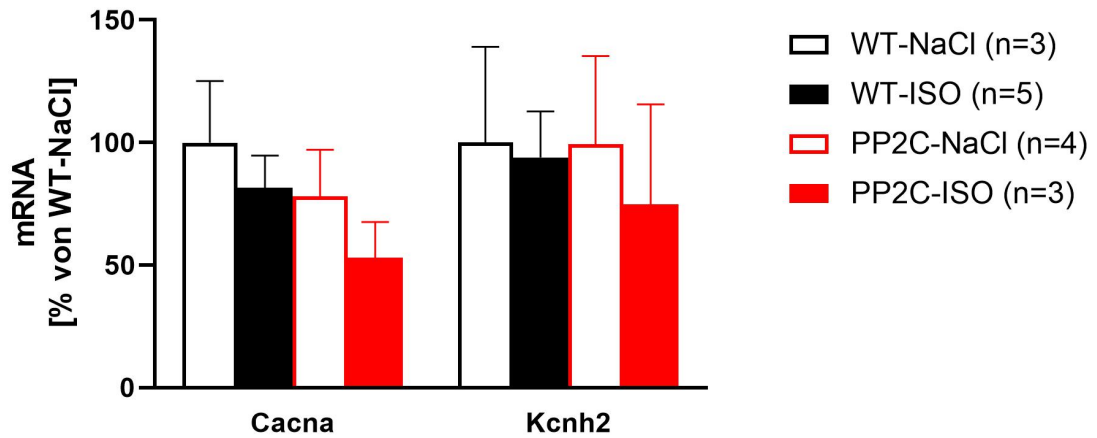


Abbildung 13: Die mRNA-Expression von zwei wichtigen Ionenkanälen, Cacna und Kcnh2, unterschied sich nicht zwischen den Subgruppen.
(WT-NaCl: n=3; WT-ISO: n=5; PP2C-NaCl: n=4; PP2C-ISO: n=3; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT-NaCl)

4.3 Versuchsgruppe Doppeltransgene Mäuse für PP2A α und PP5 im Vergleich zu Wildtyp- und monotransgenen Mäusen

Die in diesem Abschnitt dargestellten Versuchsgruppen unterschieden sich in ihrem Genotyp, sodass eine unterschiedliche genetische Belastung vorlag. Es handelte sich somit um eine genetisch bedingte Belastung, die zu einer Herzinsuffizienz führte. Zusätzliche Interventionen erfolgten in dieser Versuchsgruppe nicht. Das Alter der Versuchstiere bei Tötung lag zwischen 98 und 111 Tagen mit durchschnittlich $106,16 \pm 1,20$ Tagen (Mittelwert \pm SEM in Tagen: WT $108,6 \pm 1,91$; PP2A $109,6 \pm 0,68$; PP5 $101,6 \pm 2,21$; PP2C-ISO $104,5 \pm 2,96$). Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Altersverteilung der Subgruppen.

Die Analyse der mRNA-Expression erbrachte eine jeweils mäßige Überexpression der Herzinsuffizienzmarker Nppa und Nppb bei PP2A-TG und PP5-TG und eine deutliche Überexpression bei den DT (Abb. 14). Die untersuchten Fibrosemarker waren jeweils bei monotransgenen Gruppen gering und bei DT deutlich erhöht gegenüber WT (Abb. 15), zusätzlich konnte eine reduzierte Expression kardialer Myosinfilamente bei DT gezeigt werden (Abb. 16). Die mRNA-Expression von Kcnh2 war bei DT tendenziell verringert, während die Expression von Cacna vom Genotyp unabhängig war (Abb. 17).

Die Analyse der Proteinexpression von PP2A erbrachte eine signifikante Erhöhung in den Herzen PP2A-transgener Mäuse im Vergleich zu WT und PP5-TG. In der Gruppe der doppeltransgenen Mäuse zeigte sich die Proteinexpression von PP2A nur geringgradig über WT-Niveau (Abb. 19). Die Analyse der Proteinexpression von PP5 zeigte eine signifikante Erhöhung in den Herzen PP5-TG und DT im Vergleich zu PP2A-TG und WT. In der Gruppe DT war die Erhöhung etwas geringer ausgeprägt als in PP5-TG (Abb. 20).

4.3.1 mRNA-Expression von Markern der Herzinsuffizienz

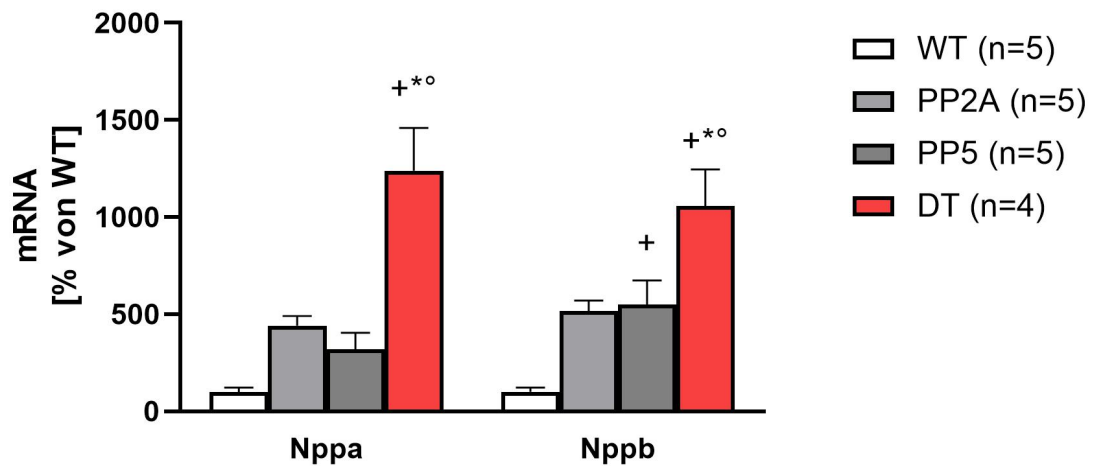


Abbildung 14: Die mRNA-Expression von Nppa war bei PP2A-TG und PP5-TG im Vergleich zu WT tendenziell erhöht. Bei DT war die mRNA-Expression von Nppa signifikant erhöht im Vergleich zu allen anderen Genotypen. Die mRNA-Expression von Nppb war bei PP5 im Vergleich zu WT signifikant erhöht. Bei DT war die mRNA-Expression von Nppb signifikant erhöht im Vergleich zu allen anderen Subgruppen.

(+ $p < 0,05$ vs. WT; * $p < 0.05$ vs. PP2A; ° $p < 0,05$ vs. PP5)

(WT: n=5; PP2A: n=5; PP5: n=5; DT: n=4; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT)

4.3.2 mRNA-Expression von Markern des fibrotischen Umbaus

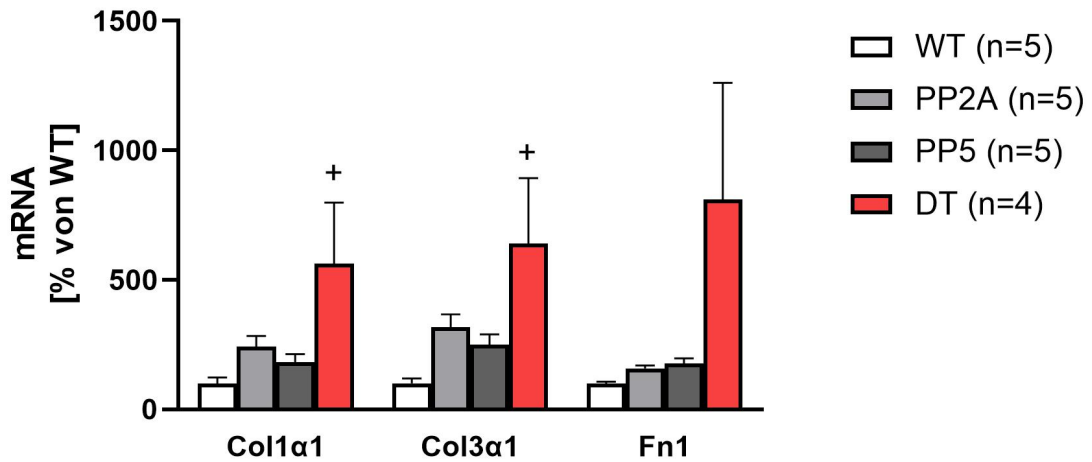


Abbildung 15: Die mRNA-Expression von Col1 α 1 war bei PP2A-TG und PP5-TG im Vergleich zu WT nicht erhöht. Bei DT war die mRNA-Expression von Col1 α 1 stark erhöht im Vergleich zu allen anderen Genotypen, Signifikanz bestand gegenüber WT. Die mRNA-Expression von Col3 α 1 war bei PP2A-TG und PP5-TG im Vergleich zu WT nicht erhöht. Bei DT war die mRNA-Expression von Col3 α 1 stark erhöht im Vergleich zu allen anderen Genotypen, Signifikanz bestand gegenüber WT. Die mRNA-Expression von Fn1 war bei PP2A-TG und PP5-TG im Vergleich zu WT nicht erhöht. Bei DT war die mRNA-Expression von Fn1 stark erhöht im Vergleich zu allen anderen Genotypen. (vs. WT $p = 0,116$; vs. PP2A $p = 0,143$; vs. PP5 $p = 0,154$) (WT: n=5; PP2A: n=5; PP5: n=5; DT: n=4; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT)

4.3.3 mRNA-Expression kardialer Myosinflamente

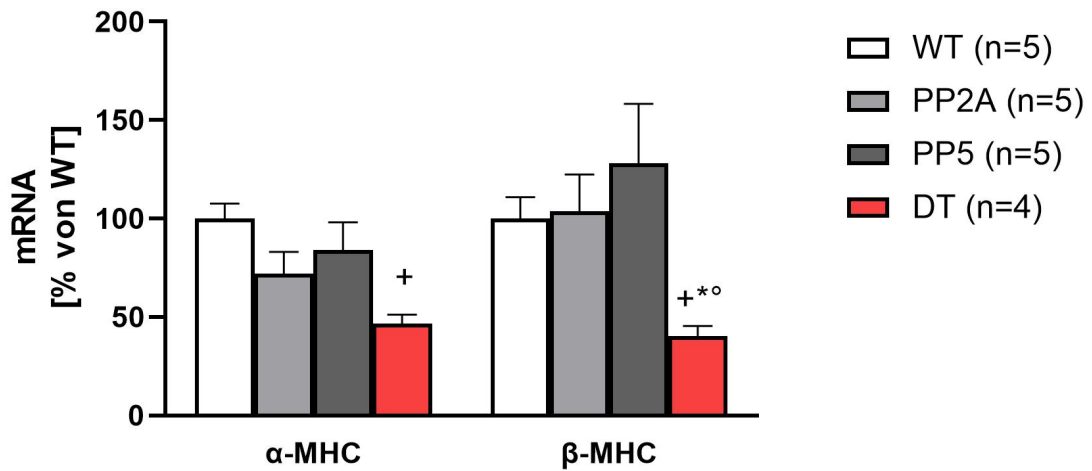


Abbildung 16: Die mRNA-Expression von α -MHC war bei DT im Vergleich zu WT signifikant verringert. Gegenüber PP5-TG und PP2A-TG bestand keine Signifikanz. Die mRNA-Expression von β -MHC war in DT signifikant erniedrigt im Vergleich zu WT, PP2A-TG und PP5-TG. (+ $p < 0,05$ vs. WT; * $p < 0,05$ vs. PP2A; ° $p < 0,05$ vs. PP5) (WT: n=5; PP2A: n=5; PP5: n=5; DT: n=4; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT)

4.3.4 mRNA-Expression von Ionenkanälen

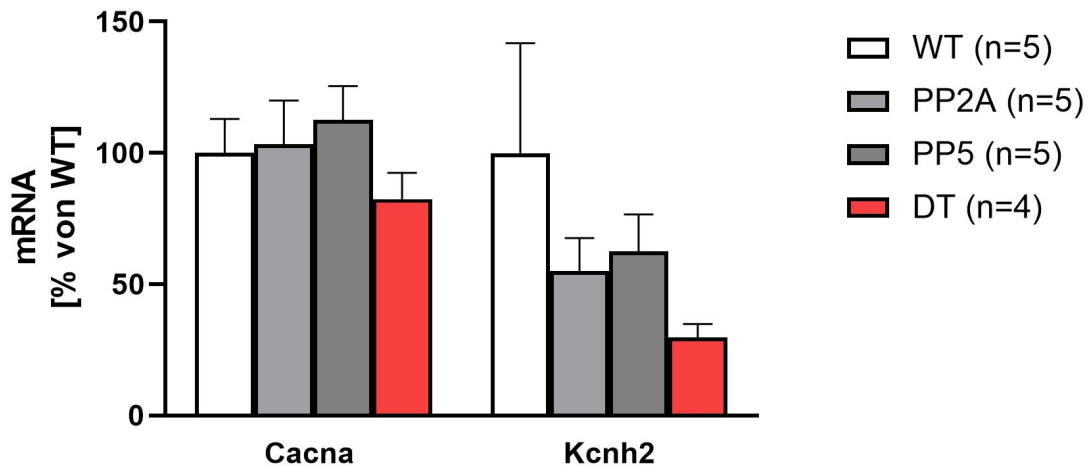


Abbildung 17: Die mRNA-Expression der zwei wichtigen Ionenkanäle Cacna und Kcnh2 war nicht signifikant verändert. Es zeigte sich eine tendenzielle Erniedrigung der Kcnh2-Expression bei DT, aber ohne Signifikanz. (WT: n=5; PP2A: n=5; PP5: n=5; DT: n=4; Ordinate: mRNA-Menge in % von WT)

4.3.5 mRNA-Expression von PP2A α und PP5 in Doppeltransgenen Tieren verglichen mit Monotransgenen Tieren

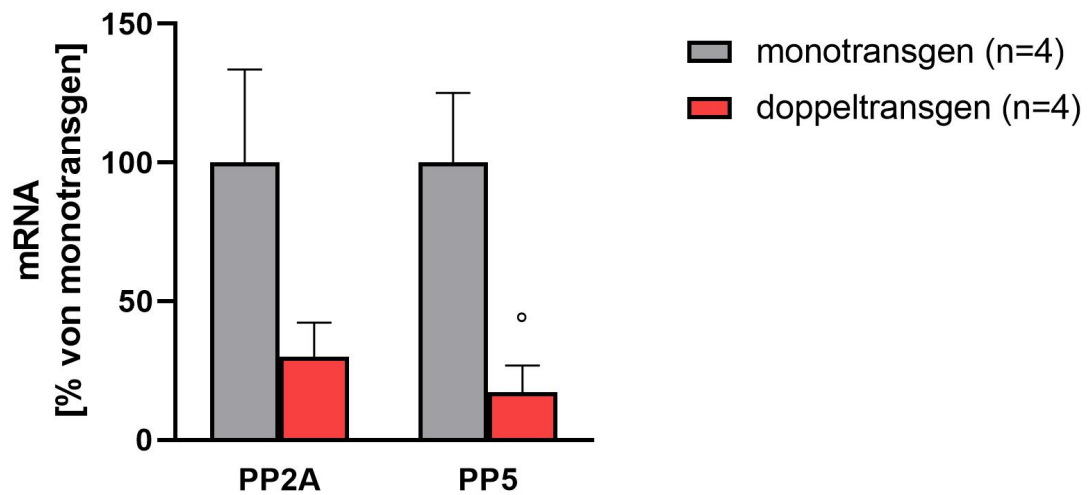


Abbildung 18: Die mRNA-Expression von PP2A war bei DT im Vergleich zu PP2A-TG stark verringert ($p = 0,097$). Die mRNA-Expression von PP5 war bei DT im Vergleich zu PP5 signifikant verringert. ($^{\circ}p < 0,05$ vs. monotransgen)
(PP2A: n=4; PP5: n=4; DT: n=4; Ordinate: mRNA-Menge in % von Monotransgen)

4.3.6 Proteinexpression für PP2A α und PP5

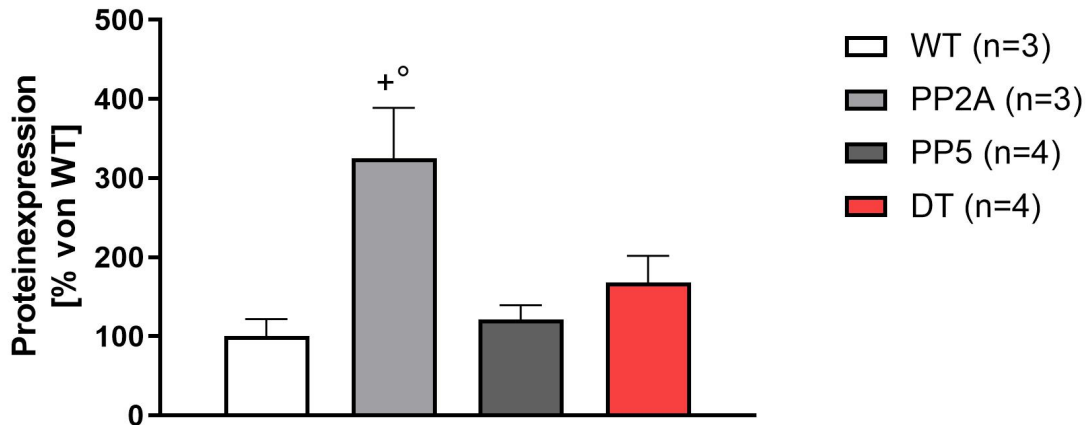


Abbildung 19: Die Proteinexpression von PP2A war in den Herzen der PP2A-TG signifikant gegenüber WT und PP5-TG erhöht. Die Proteinexpression von PP2A in der Gruppe DT war annähernd auf WT-Niveau vermindert. (+ $p < 0,05$ vs. WT; ° $p < 0,05$ vs. PP5) (WT: n=3; PP2A: n3; PP5: n=4; DT: n=4; Ordinate: Protein-Menge in % von WT)

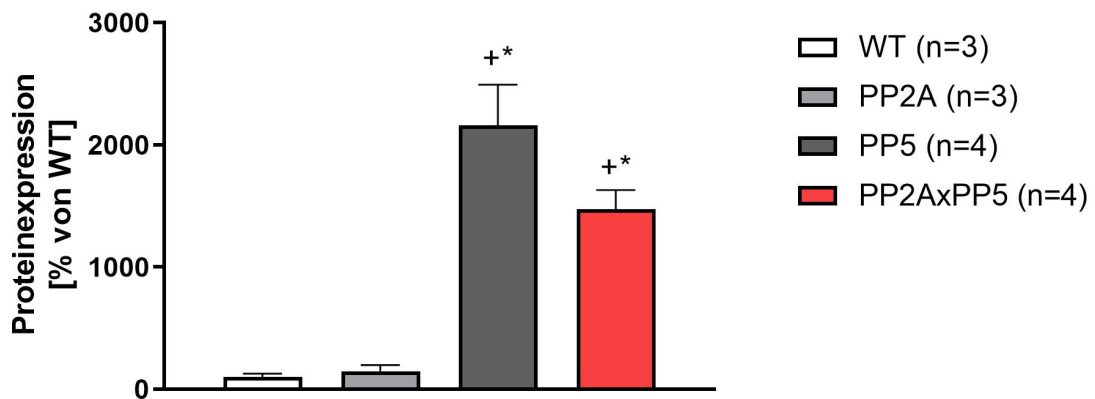


Abbildung 20: Die Proteinexpression von PP5 war in den Herzen der PP5-TG signifikant gegenüber WT und PP2A erhöht. Die Proteinmenge von PP5 in der Gruppe DT war signifikant erhöht gegenüber WT und PP2A-TG. Die Proteinexpression von PP5 war in DT geringer als in PP5-TG, es bestand keine Signifikanz. (+ $p < 0,05$ vs. WT; * $p < 0,05$ vs. PP2A) (WT: n=3; PP2A: n3; PP5: n=4; DT: n=4; Ordinate: Protein-Menge in % von WT)

5 Diskussion

5.1 Alter und Geschlecht der Versuchstiere

Das Alter der untersuchten Tiere lag zwischen 98 und 227 Tagen (103-182 Tage in der Gruppe "PP2C β -Isoprenalin", 108-227 Tage in der Gruppe "PP2C β -LPS" und 98-111 Tage in der Gruppe PP2AxPP5). Zwischen den Subgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede, eine vergleichbare Alterstruktur war gegeben, sodass keine systematische Verzerrung der Daten zu erwarten ist. Die relativ weite Altersspanne kann jedoch ein wichtiger Grund für die ausgeprägte Streuung sein. Beispielsweise konnte durch Starr et al., 2013 gezeigt werden, dass in Abhängigkeit vom Alter bei Mäusen eine unterschiedliche mRNA-Expression nach Belastung mit LPS besteht. Die dort betrachteten Altersunterschiede waren jedoch bedeutend größer. Es bleibt festzuhalten, dass die Alterstruktur eine wichtige potenzielle Fehlerquelle darstellt, über deren Einfluss im Rahmen dieser Arbeit keine sichere Aussage getroffen werden kann.

Es wurden zu etwa gleichen Anteilen weibliche und männliche Tiere untersucht. Eine geschlechtsgetrennte Auswertung konnte aufgrund der geringen Fallzahl und bei relevanter Streuung der Daten nicht durchgeführt werden. Hinweise auf eine unterschiedliche Altersstruktur zwischen den Geschlechtern fanden sich nicht. In ihrem Lebenszyklus befinden sich die untersuchten Tiere im frühen Zeitraum ihrer reproduktiven Phase (Dutta und Sengupta, 2016), in diesem Lebensabschnitt bestehen hohe Spiegel geschlechtsspezifisch verschiedener Sexualhormone. Eine geschlechtsgetrennte Auswertung könnte in dieser Altersgruppe bei höherer Fallzahl potenziell relevante Unterschiede aufzeigen.

5.2 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Die Maus ist ein sehr häufig genutztes Versuchstier (Meigs et al., 2018), die Haltung und Untersuchung ist aufgrund der geringen Größe und hohen Fruchtbarkeit einfach. Das kardiale Proteom ist spezieübergreifend relativ stark konserviert (Federspiel et al., 2019), sodass die Maus als Wirbeltier ein guter Modellorganismus für das Verständnis kardialer Erkrankungen des Menschen ist.

Mensch und Maus unterscheiden sich deutlich in ihrer Lebensdauer. Die Abfolge der Lebensphasen ist sich jedoch sehr ähnlich, sodass eine Umrechnung möglich ist (Dutta und Sengupta, 2016). Die Versuchstiere befinden sich in der reproduktiven Phase, was bei Menschen dem jungen Erwachsenenalter entspricht.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den Herzen von Menschen und Mäusen ist die Prädominanz einer unterschiedlichen Myosinisoform: im humanen Herzen ist β -MHC dominant und stellt im Ventrikel über 90% der schweren Myosinketten, während im murinen Herzen α -MHC dominant ist (Marian und Braunwald, 2017). Im Vergleich zu β -MHC ist die Kontraktionsgeschwindigkeit von α -MHC schneller, hat jedoch eine höhere ATPase-Aktivität. β -MHC zeigt dagegen eine bessere Energieeffizienz und kann bei geringerer Herzfrequenz eine effizientere Herzarbeit ermöglichen (Holubarsch C et al., 1985; Miyata et al., 2000). Eine erhöhte Expression von β -MHC in murinen Herzen führt zu einer deutlichen Einschränkung der Pumpfunktion (Tardiff et al., 2000). In humanen Herzen konnte

gezeigt werden, dass eine chronische Herzinsuffizienz mit einer verringerten Expression von α -MHC einhergeht (Miyata et al., 2000).

Eine Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen erfordert die Berücksichtigung der physiologisch dominanten Myosinisoform und unterliegt deutlichen Limitationen.

5.3 Limitationen durch geringe Fallzahl

Die Zahl der untersuchten Tiere war gering und limitiert die Aussagekraft der Ergebnisse erheblich. An vielen Stellen kann deshalb nur eine tendenzielle Veränderung gesehen werden. Da die teils erhebliche Streuung methodisch bedingt war und nicht relevant reduziert werden kann, wäre eine höhere Zahl an Versuchstieren erforderlich. Die Fallzahlen der Versuchstiere waren für physiologische Versuche ausgelegt, die dieser Arbeit vorausgingen, sodass eine Fallzahlerhöhung nicht möglich war. Im Rahmen dieser Versuche und der Tierhaltung kam es naturgemäß vor, dass Tiere starben und dadurch nicht in die weitere Auswertung einbezogen werden konnten. Hierdurch kommt es zu verschiedenen Limitationen. Die reduzierte Fallzahl schwächt einerseits die statistische Aussagekraft. Eine disproportionale Sterblichkeit in verschiedenen Versuchsgruppen kann durch Selektionseffekte die Ergebnisse verzerren. Eine besondere Relevanz einer disproportionalen Sterblichkeit ist in der Subgruppe PP2A \times PP5 zu erwarten, für diesen Genotyp konnten Dörner et al., 2021 eine deutlich erhöhte Mortalität ab einem Lebensalter von etwa 3 Monaten zeigen. Die vorzeitig verstorbenen Tiere sind nicht in die Versuche dieser Arbeit eingeflossen, über die Relevanz dieser Limitation kann deshalb nur spekuliert werden.

Aus tierschutzrechtlichen, ethischen und methodischen Gründen konnte die Zahl der Versuchstiere nicht beliebig erhöht werden, gewisse Limitationen müssen deshalb im Rahmen dieser Arbeit hingenommen werden.

5.4 Versuchsgruppe PP2C β -Lipopolysaccharidininjektion

In dieser Versuchsgruppe wurde durch intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden eine Sepsis induziert. Lipopolysaccharide sind Bestandteil der Zellwand gramnegativer Erreger (Bertani und Ruiz, 2018) und werden experimentell häufig genutzt, um eine Sepsis hervorzurufen (Korneev, 2019).

Es zeigte sich nach Gabe von LPS ein deutlicher Anstieg der Expression von Proteinen, die Lipopolysaccharide erkennen und binden. Dazu gehört neben TLR-4 auch MD-2, CD-14 und LBP. Des Weiteren war auch die Expression von Proteinen des NF- κ B-Signalwegs erhöht. Zusätzlich war neben NF- κ B auch die Expression des inhibitorischen Proteins I κ B α erhöht. Weiterhin zeigte sich eine stark vermehrte Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 als Effektoren der erfolgreich ausgelösten septischen Reaktion auf verabreichte Lipopolysaccharide.

Die leichte Verringerung der Expression von Nppa kann durch methodische Ungenauigkeiten bedingt sein und weist keine statistische Signifikanz auf. Ein erhöhtes Nppa in der schweren Sepsis ist ein negativer prognostischer Parameter und korreliert mit einem letalen Verlauf beim Menschen (Lipinska-Gediga et al., 2012).

Aus der veränderten Genexpression, nach Verabreichung von Lipopolysacchariden im Vergleich zu isotoner NaCl-Lösung, lässt sich ableiten, dass das Sepsismodell grundsätzlich funktioniert hat. Allerdings zeigten sich im Vergleich zu WT-Mäusen in PP2C β -transgenen Mäusen ähnliche Veränderungen in der Genexpression für Marker der septischen Reaktion. Aus den Daten der Real-time-PCR lässt sich somit kein Einfluss der PP2C β auf die Reaktion auf Lipopolysaccharide ableiten. In der in-vivo Untersuchung der kardialen Funktion wurde die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LV-EF) echokardiografisch bestimmt und als Parameter für das Ausmaß der septischen Kardiomyopathie genutzt. Dabei zeigte sich eine moderat verringerte LV-EF in PP2C β -transgenen Tieren ohne LPS-Belastung und eine vergleichbare Verringerung der LV-EF in WT- und PP2C β -transgenen Tieren nach LPS-Gabe (Bollmann et al., 2021). Im Kontext der Ergebnisse der in-vivo-Versuche erscheinen die Ergebnisse der Real-time-PCR plausibel und lassen in den bisherigen Versuchen keinen relevanten Einfluss kardialer Überexpression von PP2C β auf die Reaktion auf LPS vermuten.

Diese Ergebnisse sind jedoch aufgrund der geringen Stichprobengröße und einer ausgeprägten Streuung nur von eingeschränkter Aussagekraft. Eine weitere Einschränkung der Aussagekraft ergibt sich dadurch, dass die Versuchstiere bereits 7 Stunden nach Verabreichung der Lipopolysaccharide getötet wurden. Deshalb können nur Aussagen über die initiale Reaktion auf Lipopolysaccharide getroffen werden. Im klinischen Kontext ergeben sich jedoch wesentliche Komplikationen der Sepsis erst zu einem späteren Zeitpunkt. Der Tod tritt bei Patienten mit einer Sepsis unter Therapie in der Regel biphasisch und mit einer Latenz von wenigen Tagen beziehungsweise 3-4 Wochen ein (Delano und Ward, 2016).

In dem von uns verwendeten Tiermodell ist der weitere Verlauf nicht beurteilbar. Dementsprechend kann der Einfluss einer herzspezifischen Überexpression von PP2C β nicht im Zusammenhang mit einem höherwertigen Outcome, wie der Überlebensdauer oder Mortalität betrachtet werden. Solche Versuche wären aus tierschutzrechtlichen Gründen nur schwer genehmigungsfähig. Auch eine Interpretation der Ergebnisse wäre schwierig und kaum auf den Menschen übertragbar, da eine erkannte oder vermutete Sepsis im klinischen Setting schnellstmöglich behandelt wird.

Ein weiteres Problem ergibt sich daraus, dass in der klinischen Anwendung keine prognostisch zuverlässige Diagnostik für eine kardiale Beteiligung einer Sepsis besteht (Martin et al., 2017). Häufig wird im klinischen Alltag die LV-EF als diagnostisches Kriterium der septischen Kardiomyopathie genutzt. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei verringertem Vasotonus im Rahmen einer Sepsis eine normale LV-EF trotz verringerter kardialer Kontraktilität bestehen kann und damit das Ausmaß der kardialen Schädigung maskiert werden kann (Repešé et al., 2013). Eine ausreichende Korrelation zwischen eingeschränkter LV-EF und höherer Mortalität konnte nicht gezeigt werden (Sanfilippo et al., 2018).

Im verwendeten Modell der Sepsis erfolgte die Injektion von Lipopolysacchariden, die eine ausgeprägte Reaktion der Versuchstiere auslösen konnte. Lipopolysaccharide sind ein wichtiger Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Erreger (Bertani und Ruiz,

2018), allerdings wurden auch gramnegative Erreger nachgewiesen, die ohne Lipopolysaccharide lebensfähig sind (Steeghs et al., 1998). Klinisch relevante, häufige Erreger der Sepsis sind jedoch sowohl gram-negative als auch gram-positive Bakterien (Martinez und Wolk, 2016). Dabei ist für die Auslösung einer Immunreaktion bei gram-positiven Erregern Lipoteichonsäure essenziell (Ginsburg, 2002). Ein wichtiger Anteil auslösender Erreger kann methodisch bedingt nicht betrachtet werden. Andere Mechanismen der Sepsisinduktion können nicht untersucht werden. Eine weitere mögliche Störvariable ist die Gabe weiterer Medikamente während des Versuchs. Es konnte gezeigt werden, dass Isofluran in Kombination mit Sauerstoff einen protektiven Effekt in der Sepsis zeigt und dieser Effekt bereits bei subanästhetischer Dosierung nachweisbar ist (Huang et al., 2017). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Gabe von Isofluran einen inhibitorischen Effekt auf den NF- κ B-Signalweg hat (Huang et al., 2017), sodass eine Unterschätzung der tatsächlichen Veränderungen nach Lipopolysaccharidgabe die Folge sein könnte. Auch wurde gezeigt, dass Männer häufiger von einer Sepsis betroffen sind und geschlechtsspezifische Unterschiede zu bestehen scheinen (Ljungström et al., 2019). In unserem Versuchsaufbau wurden gleichmäßig weibliche und männliche Tiere untersucht. Durch die geringe Stichprobengröße ist jedoch keine sinnvolle Auswertung geschlechtsspezifischer Unterschiede möglich. Die Inzidenz der Sepsis ist stark vom Alter und Komorbiditäten abhängig (Ljungström et al., 2019). Bei der ausschließlichen Untersuchung junger Mäuse ist zu altersabhängigen Aspekten keine Aussage möglich. Weitere Untersuchungen sind zum Verständnis alters- und geschlechtsspezifischer Unterschiede erforderlich.

Interessant ist in diesem Zusammenhang der Vergleich zu Versuchsreihen LPS-induzierter Sepsis bei herzspezifischer Überexpression von PP5. Hier konnte eine geringgradige Einschränkung der basalen Herzfunktion und eine tendenziell reduzierte mRNA-Expression von NF κ B gefunden werden. Weiterhin konnte drei Tage nach LPS-Belastung eine verringerte mRNA-Expression von IL6 bei PP5-TG gefunden werden und eine möglicherweise erhöhte Resilienz gegenüber Sepsis durch PP5-Überexpression vermutet (Gergs et al., 2019). Dies scheint ein für PP5 spezifischer Effekt zu sein, der sich bei PP2C-Überexpression nicht zeigen lässt.

5.4.1 Fazit

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit dem hier durchgeführten Versuchsaufbau kein Einfluss einer kardialen Überexpression von PP2C β auf die untersuchten Parameter der Sepsis nachweisbar war. Durch Bollmann et al., 2021 wurde eine geringere Reduktion der linksventrikulären Ejektionsfraktion bei PP2C-überexprimierenden Mäusen nach LPS-Exposition gezeigt als in der Vergleichsgruppe. Dies wurde als Hinweis auf eine mögliche Kardioprotektion durch PP2C-Überexpression im Rahmen einer Sepsis gedeutet. Hierzu konnte kein Korrelat im Sinne einer veränderten mRNA-Expression gefunden werden. Methodisch bedingt ist die Aussagekraft jedoch verringert, sodass eine Modifizierung der Versuchsbedingungen möglicherweise robustere Ergebnisse erbringen könnte. Dabei wären die Meidung protektiver Substanzen wie Isofluran oder eine andere Induktion einer Sepsis mögliche Ansatzpunkte. Bezüglich des Outcomes wäre eine Erfassung der Mortalität

eine Möglichkeit, die Relevanz der erfassten Veränderungen zu überprüfen. Es erscheint möglich, dass Versuchstiere frühzeitig versterben und eine Verzerrung der Ergebnisse bewirken, da eine unmittelbare Gewebsasservierung in diesem Fall nicht möglich ist. Zudem wäre die Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede interessant, dafür wäre die Untersuchung größerer Stichproben erforderlich. Um die Auswirkungen von Alter oder Komorbiditäten zu erfassen, wären Experimente mit älteren oder adipösen Versuchstieren möglich.

5.5 Versuchsgruppe PP2C β -Isoprenalin

In dieser Versuchsgruppe wurde durch wiederholte β -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin eine rezidivierende akute Belastungssituation des Herzkreislaufsystems induziert. Isoprenalin ist ein unselektiver β -Adrenorezeptoragonist (Winsor et al., 1975) mit kurzer Halbwertszeit (Barisione et al., 2010), der historisch in der Humanmedizin bei Asthma bronchiale (Speizer et al., 1968) und in der Kardiologie (Ahlquist, 1973) eingesetzt wurde. Bekanntheit erlangte Isoprenalin durch einen Anstieg der Mortalität von Asthmatikern (Speizer und Doll, 1968; Speizer et al., 1968). Isoprenalin zeigt eine relevante Kardiotoxizität, die bei Hypoxämie deutlich verstärkt wird und durch den Einsatz von β -Adrenorezeptorblockern antagonisiert werden kann (Collins et al., 1969). Vergleichbare Dosierungen von Isoprenalin, wie von uns verwendet, wurden erfolgreich für die Erzeugung einer stressinduzierten Kardiomyopathie bei verschiedenen Mausstämmen genutzt (Chang et al., 2018). Es besteht eine höhere chronotrope und inotrope Potenz von Isoprenalin im Vergleich zu Noradrenalin in-vivo bei Hunden (Furnival et al., 1971). Ursächlich hierfür ist, dass Noradrenalin und Adrenalin einer Aufnahme und Speicherung vorwiegend in sympathischen Nervenendigungen unterliegt (Strömblad und Nickerson, 1961). Es besteht keine relevante Aufnahme und Speicherung von Isoprenalin in sympathisch innerviertem Gewebe bei Ratten (Hertting, 1964). Weiterhin konnte in geringerem Ausmaß eine Aufnahme und Speicherung für Noradrenalin und Adrenalin, nicht jedoch für Isoprenalin in isolierten perfundierten Herzen gezeigt werden (Andén et al., 1964). Diese pharmakokinetischen Besonderheiten tragen zu der ausgeprägten Kardiotoxizität von Isoprenalin im Vergleich zu Noradrenalin und Adrenalin bei und bedingen die gute Eignung in der Induktion von kardialer Belastung.

Die Expression von β -MHC war bereits unter Kontrollbedingungen bei PP2C β -transgenen Tieren im Vergleich mit nicht-transgenen Tieren (PP2C-NaCl vs WT-NaCl) statistisch signifikant erniedrigt. Bei Belastung mit Isoprenalin kam es allgemein zu einer Erniedrigung der β -MHC-Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die Expression von β -MHC nach Belastung mit Isoprenalin war unabhängig vom Genotyp nahezu identisch. Zudem war auch die Expression von α -MHC-mRNA bei der Versuchsgruppe "PP2C β -Isoprenalin" verringert. Von Interesse ist insbesondere die Expression von α -MHC, da die kardiale Überexpression von PP2C β an einen α -MHC-Promotor gekoppelt ist. Die verminderte Expression von α -MHC könnte eventuell auf eine Isoprenalin-induzierte Down-Regulation des α -MHC-Promotor hindeuten. In diesem Fall sollte nach Isoprenalingabe auch die Expression der artifiziell eingebrachten PP2C β reduziert sein. Jedoch zeigten Un-

tersuchungen zur Proteinexpression nach Isoprenalinbelastung eine tendenzielle Erhöhung von PP2C, sodass diese Spekulation nicht gestützt wird. Eine Untersuchung der mRNA-Expression des eingebrachten Genkonstrukts und der Proteinexpression von PP2C könnte darüber Aufschluss geben.

Zudem zeigt sich eine vermehrte Expression von Kollagenen und Fibronectin bei transgenen Tieren. Es liegt keine statistische Signifikanz vor, das kann jedoch auch durch methodisch bedingte Streuung und geringe Versuchsgruppengröße bedingt sein. Ein Einfluss von Isoprenalin auf die mRNA-Expression anderer wichtiger regulatorischer Gene wie *Nppa* und *Nppb* sowie ausgewählter Ionenkanäle konnte nicht nachgewiesen werden. Hier wäre zu erwarten gewesen, dass die Belastung mit Isoprenalin zu einer Elevation von *Nppa* und *Nppb* führt als Ausdruck einer Herzinsuffizienz. Allerdings zeigt sich in den PP2C-TG ohne Intervention jeweils eine geringe Erniedrigung von *Nppa*, wie auch in den PP2C-LPS-Versuchsgruppen. Durch verschiedene Alterstruktur und verschiedene Versuchsbedingungen ist eine direkte Vergleichbarkeit der Subgruppen nicht gegeben, sodass keine zusammenfassende Auswertung möglich ist. Eine Erniedrigung von *Nppa* wäre ein Zeichen für eine bessere Herzfunktion bei PP2C-TG, was bisherigen Erkenntnissen widersprechen würde, die eine Einschränkung der Herzfunktion und ventrikuläre Fibrose bei PP2C-TG sehen (Bollmann et al., 2021). Auch vor dem Hintergrund vielfältiger und am ehesten schädigender Einflüsse von erhöhter PP2C-Expression auf das Herz (Neumann et al., 2021), ist am ehesten von einer fehlenden Relevanz der tendenziell erniedrigten mRNA-Expression von *Nppa* auszugehen.

Insgesamt zeigen die Daten eine mäßig ausgeprägte kardiale Fibrose und eine deutlich verringerte Expression von β -MHC-mRNA. Diese Ergebnisse erscheinen im Kontext der Ergebnisse der echokardiografischer Untersuchungen plausibel (Bollmann et al., 2021). Auch im humanen Herzen wurde gezeigt, dass im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz ein Verlust von α -MHC erfolgt und dass bereits gering erscheinende Veränderungen der Balance kardialer Myosinisoformen relevante Folgen für die Pumpfunktion haben können (Narolska et al., 2005). Zudem ist bekannt, dass Mutationen kardialer Myosine eine Rolle in der Entwicklung einer hypertrophen Kardiomyopathie spielen (Marian und Braunwald, 2017). Vor diesem Hintergrund und mit dem Bild einer kardialen Hypertrophie in den physiologischen Versuchen kann die deutlich verringerte Expression von β -MHC-mRNA für die Entwicklung oder das Fortschreiten einer kardialen Hypertrophie mitverantwortlich sein.

5.5.1 Fazit

Die kardiale Überexpression von PP2C β führte zu kardialer Fibrose und signifikant verringerter Expression von β -MHC. Im Rahmen einer stressinduzierten Kardiomyopathie wurde die Expression von β -MHC zusätzlich verringert.

Um sichere Aussagen dazu treffen zu können, ist allerdings die genutzte Methodik unzureichend: Das Ausmaß kardialer Fibrosierung kann durch histologische Untersuchungen qualitativ und quantitativ besser beurteilt werden. Mittlerweile wurde dies durchgeführt und konnte vermehrte fokale Fibroseareale in ventrikulärem Myokard transgener Mäuse

zeigen (Bollmann et al., 2021). Untersuchungen hinsichtlich einer möglicherweise unterschiedlichen Mortalität von PP2C-Mäusen wären ein besserer Nachweis der Relevanz der beobachteten Veränderungen. Weiterhin wäre die Untersuchung älterer Versuchstiere interessant, um eine mögliche Altersabhängigkeit zu finden. Eine Untersuchung größerer Stichproben wäre nötig, um geschlechtergetrennte Analysen durchführen zu können. Da kardiale Veränderungen im Sinne von Fehlbildungen auch bei einem Knock-Down von PP2C zu finden sind (G. Lu et al., 2007), ist davon auszugehen, dass eine ausbalancierte Expression von PP2C für eine regelrechte Herzfunktion essenziell ist.

5.6 Versuchsgruppe PP2AxPP5

In dieser Versuchsgruppe wurde eine genetisch determinierte Doppelbelastung untersucht, eine weitere Intervention erfolgte nicht. Das Alter der untersuchten Mäuse bei Tötung unterschied sich nicht, sodass keine Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedliche Altersstruktur zu erwarten war.

In den Daten der Real-Time-PCR zeigte sich eine ausgeprägte Erhöhung der Fibroseparameter in der Gruppe der DT-Tiere. In den Gruppen der monotransgenen Tiere zeigte sich lediglich eine geringgradige Erhöhung von Fibroseparametern ohne statistische Signifikanz. Diese konnte bereits in Versuchen mit PP2A-überexprimierenden Mäusen (Gergs et al., 2004) und für PP5-überexprimierende Mäuse (Gergs et al., 2012) gezeigt werden.

Des Weiteren lag eine starke Erhöhung von Nppa und Nppb (ANP und BNP) bei DT verglichen mit WT vor. Bei den monotransgenen Gruppen zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung, die bei PP5-TG und PP2A-TG ein vergleichbares Ausmaß hat, die lediglich für PP5-TG bei Nppb Signifikanz gegenüber WT erreichte. Die Erhöhung von Nppa und Nppb ist typisch für eine manifeste Herzinsuffizienz (Gaggin und Januzzi, 2013).

Es zeigte sich auch eine nicht-signifikante Reduktion der Expression des ERG-Kaliumkanals, was eine Veränderung der kardialen Erregbarkeit bewirken könnte. Beeinträchtigungen des hERG-Kanals erhöhen das Risiko von Herzrhythmusstörungen bei Menschen (Kratz et al., 2017). In Dörner et al., 2021 wurde dieses Tiermodell funktionell charakterisiert und es konnte bei jungen DT-Tieren echokardiografisch eine deutlich reduzierte LV-EF als Hinweis für eine systolische Funktionsstörung und Relaxationsstörungen als Hinweis für eine diastolische Funktionsstörung gefunden werden. Als Hinweis für eine rechtsventrikuläre Funktionsstörung konnte zudem ein verminderter Fluss in der Arteria pulmonalis bei DT gezeigt werden. Weiterhin konnte ein erhöhtes relatives Herzgewicht bei PP2A-TG und DT gegenüber PP5-TG und WT gefunden werden. Eine klinische Relevanz dieser Veränderungen bei DT kann angenommen werden, da es zu einer massiv erhöhten Mortalität in dieser Subgruppe kam. Die Mortalität bei monotransgenen Tieren war nicht verändert. Vor dem Hintergrund einer erhöhten Mortalität bei DT und relevanten Zeichen der Herzinsuffizienz und Fibrose sowie bei Veränderungen des ERG-Kaliumkanals, stellt sich die Frage nach der Todesursache. Eine Untersuchung von Herzrhythmusstörungen in diesem Tiermodell wäre eine interessante Ergänzung. Die signifikante und ausgeprägte Elevation der mRNA-Expression von *Col1 α 1*, *Col3 α 1* und *Fn1* deuten auf eine kardiale Fibrose hin. Diese sind gut vereinbar mit den histologischen Zeichen einer kardialen Fi-

brose bei jungen DT-Mäusen und einer kardialen Fibrose bei PP2A-TG in höherem Alter (Dörner et al., 2021).

Die massiven kardialen Veränderungen bei DT-Mäusen, die sich sowohl in den physiologischen als auch den molekularbiologischen Untersuchungen zeigten, lassen eine Interaktion der Signalwege von PP2A und PP5 vermuten. Dafür spricht auch, dass für die eingebrachten Genkonstrukte für PP2A und PP5 jeweils eine deutlich reduzierte mRNA-Expression bei DT-Mäusen im Vergleich mit den jeweils monotransgenen Tieren zeigten. Diese Verringerung war auch in der quantitativen Analyse von PP2A und PP5 auf Proteinebene nachweisbar.

Eine mögliche Erklärung kann sein, dass im Rahmen des massiven fibrotischen Umbaus ein Verlust kardialer Myozyten besteht und die Expression deshalb verringert ist. Da die Versuchstiere überlebensfähig waren, erscheint diese Erklärung unzureichend. Es muss auch in Betracht gezogen werden, dass die Aktivität der Proteinphosphatasen trotz verminderter Proteinmenge nicht verringert war. Im Falle gleicher Aktivität bei verringerter Proteinmenge könnte eine wechselseitige Beeinflussung der posttranslationalen Aktivitätskontrolle möglich sein. Denkbar ist, dass eine Interaktion der Wirkungen von PP2A und PP5 besteht, die die Herzfunktion stärker als bei einzelner Überexpression beeinflussen.

Zu beachten ist, dass im verwendeten Tiermodell die Expression von PP2A und PP5 durch einen α -MHC-Promotor reguliert wurde. Da bei DT-Tieren sowohl PP2A, PP5 und α -MHC deutlich verringert exprimiert wurden, ist ein Herab-Regulation der Aktivität des α -MHC-Promotors eine mögliche Erklärung. Diese Hypothese wäre überprüfbar, indem ein Tiermodell der Überexpression untersucht wird, bei dem die Überexpression durch einen anderen Promotor realisiert wird oder die Expression weiterer Gene untersucht wird, die durch den α -MHC-Promotor reguliert werden. Möglicherweise handelt es sich dabei jedoch um einen spezifischen Effekt bei kombinierter Überexpression von PP2A und PP5, da bei einer kombinierten Überexpression von PP2A und 5 – HT_4 keine verringerte Proteinexpression von PP2A gezeigt werden konnte, allerdings bei einem Alter von 12 Monaten (Gergs et al., 2021).

Obwohl bei den Versuchstieren auch eine deutliche Reduktion von α -MHC-mRNA und β -MHC-mRNA gezeigt werden konnte, ist die Übertragbarkeit auf den Menschen komplex und kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geleistet werden.

Eine geschlechtergetrennte Analyse konnte aufgrund geringer Stichprobengrößen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, über geschlechtsspezifische Einflüsse können in dieser Arbeit daher keine Aussagen getroffen werden.

5.6.1 Fazit

Insgesamt ist festzuhalten, dass die Subgruppe der DT-Mäuse eine hochgradige Einschränkung der Herzfunktion im Sinne einer kardialen Fibrose und Hypertrophie zeigte, dies wurde von Dörner et al., 2021 beschrieben. Funktionell konnte eine schwere globale Herzinsuffizienz mit Zeichen diastolischer und systolischer Dysfunktion gezeigt werden konnten. Die beschriebenen Veränderungen entsprechen einer genetisch determinierten

Kardiomyopathie. Eine klinische Relevanz ist eindeutig gegeben, da Dörner et al., 2021 eine Übersterblichkeit bei DT bereits in jungem Alter beobachten konnten. Die Interaktionen zwischen PP5 und PP2A scheinen komplex zu sein und bewirken eine gegenseitige Down-Regulation bei DT-Mäusen. Möglicherweise besteht eine Inhibition des α -MHC-Promotors durch die kardiale Überexpression von Proteinphosphatasen.

Dieser Effekt wurde von Dörner et al., 2021 am ehesten als spezifisch gewertet, da bei vergleichbare Effekte bei einer kombinierten Überexpression von PP2A und 5 – HT_4 nicht gezeigt werden konnten (Gergs et al., 2021). In Dörner et al., 2021 werden mögliche Interaktionen zwischen Substraten der PP2A und PP5 als möglicherweise ursächlich angesehen für eine reduzierte Stabilität der codierenden mRNA oder der Proteine beziehungsweise einer Kombination auf beiden Ebenen. Auch eine veränderte Transkription wird als möglich angesehen, da sowohl PP2A als auch PP5 Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise p53 dephosphorylieren können.

Die veränderte Expression des ERG-Kaliumkanals könnte zu einer veränderten Anfälligkeit gegenüber Herzrhythmusstörungen führen und möglicherweise die erhöhte Mortalität der DT-Mäuse teilweise erklären. Untersuchungen hierzu fehlen jedoch bislang.

Künftige Versuche könnten die Effektivität einer medikamentösen Standardtherapie für Kardiomyopathien beinhalten oder untersuchen, wie eine Inhibition von Proteinphosphatasen sich auf die Herzfunktion auswirkt. Möglicherweise könnten auch Calcineurininhibitoren evaluiert werden, die in anderer Indikation bereits in der Humanmedizin genutzt werden, und die ein kardiales Remodeling im Tierversuch deutlich reduzieren konnten (Di Marco et al., 2011).

6 Zusammenfassung

Proteinphosphatasen spielen durch ihr ubiquitäres Vorliegen in vielen zellulären Signalwegen eine Rolle für physiologische Prozesse, aber auch für die Entstehung Vielzahl von Erkrankungen. Dementsprechend wäre das therapeutische Potenzial der Regulation von Proteinphosphatasen hoch, gleichzeitig ist aber ein komplexes Nebenwirkungsspektrum zu erwarten. Insbesondere können Störungen der Homöostase von Proteinphosphatasen sowohl die Ursache als auch die Folge kardialer Erkrankungen sein. Neue therapeutische Ansätze, die auf die Regulation von Proteinphosphatasen abzielen, haben mit hoher Wahrscheinlichkeit kardiale Wirkungen.

Bei Mäusen bewirkt die kardiale Überexpression von PP2C β eine moderate Einschränkungen der Herzfunktion und eine milde Fibrose mit Störung des Verhältnisses der kardialen Myosinfilamente (Bollmann et al., 2021). Nach Auslösung einer Sepsis durch Gabe von LPS (30 μ g/g Körpergewicht) konnte nach einer Latenzzeit von 7 Stunden eine ausgeprägter Anstieg proinflammatorischer Zytokine gezeigt werden, es bestand kein Unterschied zwischen den Genotypen. Bei kleinen Versuchsgruppen und ausgeprägter Streuung kann möglicherweise eine relevante Veränderung ohne Signifikanz sein. Für die Deutung einer möglichen Kardioprotektion durch PP2C-Überexpression im Rahmen einer Sepsis, welche durch Bollmann et al., 2021 erwogen wurde, konnte kein Korrelat im Sinne einer veränderten mRNA-Expression gefunden werden. Bei Applikation von Isoprenalin war eine geringe Elevation von BNP in der Gruppe der PP2C-transgenen Mäuse gezeigt werden, bei geringer Versuchszahl und ausgeprägter Streuung bestand keine statistische Signifikanz. Weiterhin konnte bei PP2C-transgenen Mäusen eine Elevation von Coll α 1, Col3 α 1 und Fn1 gezeigt werden. Dies steht im Einklang mit histologischen Untersuchungen, die eine milde Fibrose zeigten (Bollmann et al., 2021). Es kam zu einer Verringerung von α -MHC nach Applikation von Isoprenalin, dieser Effekt war bei PP2C-transgenen Mäusen stärker ausgeprägt. Die Expression von β -MHC war bei PP2C-transgenen Mäusen signifikant erniedrigt, nach Applikation von Isoprenalin war unabhängig vom Genotyp eine signifikante Erniedrigung der β -MHC-Expression auf ein gleiches Niveau zu beobachten. Die Reduktion von α -MHC und β -MHC könnte für das klinische Bild einer kardialen Hypertrophie ursächlich sein oder diese unterhalten.

In der Versuchgruppe PP2AxPP5 zeigte sich eine mäßiger Anstieg von Nppa und Nppb bei einzeltransgenen Mäusen und eine ausgeprägte Elevation bei doppeltransgenen Mäusen. Weiterhin zeigte sich eine mäßiggradige Elevation von Fibrosemarkern (Coll α 1, Col3 α 1 und Fn1) bei einzeltransgenen Mäusen und eine ausgeprägte Erhöhung bei doppeltransgenen Mäusen. Dem gegenüber steht eine Verringerung der mRNA-Expression von Myosinfilamenten (α -MHC und β -MHC) bei doppeltransgenen Mäusen. Dies sind Merkmale einer kardialen Fibrose mit der klinischen Auswirkung einer Herzinsuffizienz. Weiterhin zeigte sich eine Erniedrigung der mRNA-Expression des ERG-Kaliumkanals, die zu einer erhöhten Anfälligkeit von Herzrhythmusstörungen führen könnte und etwa das Risiko eines plötzlichen Herztodes erhöhen kann.

Es konnte eine verringerte mRNA-Expression von PP5 und PP2A bei doppeltransgenen Tieren im Vergleich zu den jeweiligen einzeltransgenen Tieren gezeigt werden. Es

bestand eine Verringerung auf 17,2 % bei PP5 und auf 29,9 % bei PP2A (jeweils n=4). Im vorliegenden Tiermodell wird ein α -MHC-Promotor zur Überexpression von PP2A und PP5 genutzt und es konnte eine Verringerung von drei Genprodukten (α MHC, PP2A, PP5) auf mRNA-Ebene gezeigt werden, welche jeweils unter Regulation des α MHC-Promotors stehen. Eine Down-Regulation des α MHC-Promotors durch Überexpression von PP2A und PP5 ist eine mögliche Erklärung hierfür, ist jedoch aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit spekulativ. Die verringerte Expression von PP2A und PP5 bei doppeltransgenen Mäusen im Vergleich zu einzeltransgenen Mäusen lässt sich auch auf Proteinebene abbilden. Ein zugrundeliegender Mechanismus hierfür konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Insgesamt zeigt sich in dieser Versuchgruppe eine hochgradige kardiale Fibrose, ein Verlust von Myosinfilamenten und eine Reduktion der Expression des ERG-Kaliumkanals als Korrelat einer Kardiomyopathie. Es ist zu vermuten, dass eine Interaktion der Signalwege von PP2A und PP5 erfolgt, genauere Zuschreibungen sind im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Das Tiermodell einer kombinierten Überexpression von PP2A und PP5 kann genetisch bedingte Kardiomyopathien darstellen und dahingehend weiterführende Versuche ermöglichen und das Verständnis der Interaktion von Proteinphosphatasen erweitern.

7 Literaturverzeichnis

- Ahlquist, R. P. (1973). Isoproterenol in cardiology. *American Heart Journal*, 86(2), 149–151. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(73\)90237-8](https://doi.org/10.1016/0002-8703(73)90237-8)
- Alvarado-Kristensson, M., und Andersson, T. (2005). Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in neutrophils by dephosphorylating both p38 MAPK and its substrate caspase 3. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 6238–6244. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409718200>
- Andén, N.-E., Corrodi, H., Ettles, M., Gustafsson, E., und Persson, H. (1964). Selective Uptake of Some Catecholamines by the Isolated Heart and its Inhibition by Cocaine and Phenoxybenzamine [eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1600-0773.1964.tb01789.x>]. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 21(3), 247–259. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1964.tb01789.x>
- Barford, D., Das, A. K., und Egloff, M.-P. (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into Catalysis and Regulation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 27(1), 133–164. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.133>
- Barisione, G., Baroffio, M., Crimi, E., und Brusasco, V. (2010). Beta-Adrenergic Agonists. *Pharmaceuticals*, 3(4), 1016–1044. <https://doi.org/10.3390/ph3041016>
- Bertani, B., und Ruiz, N. (2018). Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018>
- Bilbrough, T., Piemontese, E., und Seitz, O. (2022). Dissecting the role of protein phosphorylation: a chemical biology toolbox [Publisher: The Royal Society of Chemistry]. *Chemical Society Reviews*, 51(13), 5691–5730. <https://doi.org/10.1039/D1CS00991E>
- Bokník, P., Fockenbrock, M., Herzig, S., Knapp, J., Linck, B., Lüss, H., Müller, F. U., Müller, T., Schmitz, W., Schröder, F., und 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(3), 222–231.
- Bollmann, P., Werner, F., Jaron, M., Bruns, T. A., Wache, H., Runte, J., Boknik, P., Kirchhefer, U., Müller, F. U., Buchwalow, I. B., Rothmund, S., Neumann, J., und Gergs, U. (2021). Initial Characterization of Stressed Transgenic Mice with Cardiomyocyte-specific Overexpression of Protein Phosphatase 2C [Publisher: Frontiers]. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.591773>
- Brautigan, D. L. (2013). Protein Ser/ Thr phosphatases – the ugly ducklings of cell signalling. *The FEBS Journal*, 280(2), 324–325. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08609.x>
- Cacna1c calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o. D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12288>
- Cd14 CD14 antigen [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o. D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12475>

- Chang, S. C., Ren, S., Rau, C. D., und Wang, J. J. (2018). Isoproterenol-Induced Heart Failure Mouse Model Using Osmotic Pump Implantation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1816, 207–220. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8597-5_16
- Coll1a1 collagen, type I, alpha 1 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o. D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12842>
- Col3a1 collagen, type III, alpha 1 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o. D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12825>
- Collins, J. M., McDevitt, D. G., Shanks, R. G., und Swanton, J. G. (1969). The cardiotoxicity of isoprenaline during hypoxia. *British Journal of Pharmacology*, 36(1), 35–45. Zugriff 23. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1703542/>
- Davies, T. H., Ning, Y.-M., und Sánchez, E. R. (2005). Differential control of glucocorticoid receptor hormone-binding function by tetratricopeptide repeat (TPR) proteins and the immunosuppressive ligand FK506. *Biochemistry*, 44(6), 2030–2038. <https://doi.org/10.1021/bi048503v>
- Delano, M. J., und Ward, P. A. (2016). The Immune System’s Role in Sepsis Progression, Resolution and Long-Term Outcome. *Immunological reviews*, 274(1), 330–353. <https://doi.org/10.1111/imr.12499>
- (Destatis), ©. S. B. (2018, November). Statistisches Bundesamt Deutschland - GENESIS-Online. Zugriff 8. November 2018 unter <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/logon?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23631-0001&sachmerkmal=ICD10Y&sachschluessel=ICD10-I00-I99,ICD10-I10-I15,ICD10-I20-I25,ICD10-I21,ICD10-I22,Icd10-I30-I52,ICD10-I50,ICD10-I60-I69,ICD10-I60-I61,ICD10-I63,ICD10-I64,ICD10-I69,ICD10-I80-I89,ICD10-I83>
- Di Marco, G. S., Reuter, S., Kentrup, D., Ting, L., Ting, L., Grabner, A., Jacobi, A. M., Pavenstädt, H., Baba, H. A., Tiemann, K., und Brand, M. (2011). Cardioprotective effect of calcineurin inhibition in an animal model of renal disease. *European Heart Journal*, 32(15), 1935–1945. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq436>
- Dörner, M.-F., Boknik, P., Köpp, F., Buchwalow, I. B., Neumann, J., und Gergs, U. (2021). Mechanisms of Systolic Cardiac Dysfunction in PP2A, PP5 and PP2A \times PP5 Double Transgenic Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9448. <https://doi.org/10.3390/ijms22179448>
- Dutta, S., und Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences*, 152, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>
- Faggioni, M., und Knollmann, B. C. (2012). Calsequestrin 2 and arrhythmias. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 302(6), H1250–H1260. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00779.2011>
- Federspiel, J. D., Tandon, P., Wilczewski, C. M., Wasson, L., Herring, L. E., Venkatesh, S. S., Cristea, I. M., und Conlon, F. L. (2019). Conservation and divergence of protein pathways in the vertebrate heart. *PLoS Biology*, 17(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000437>

- Fn1 fibronectin 1 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o.D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14268>
- Furnival, C. M., Linden, R. J., und Snow, H. M. (1971). The inotropic and chronotropic effects of catecholamines on the dog heart. *The Journal of Physiology*, *214*(1), 15–28. Zugriff 4. Oktober 2023 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1331819/>
- Gaggin, H. K., und Januzzi, J. L. (2013). Biomarkers and diagnostics in heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1832*(12), 2442–2450. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.12.014>
- Gapdh glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o.D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14433>
- Gergs, U., Boknik, P., Buchwalow, I., Fabritz, L., Matus, M., Justus, I., Hanske, G., Schmitz, W., und Neumann, J. (2004). Overexpression of the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 2A Impairs Cardiac Function. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(39), 40827–40834. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405770200>
- Gergs, U., Boknik, P., Buchwalow, I. B., Fabritz, L., Gründker, N., Kucerova, D., Matus, M., Werner, F., Schmitz, W., und Neumann, J. (2012). Modulation of cardiac contractility by serine/threonine protein phosphatase type 5. *International Journal of Cardiology*, *154*(2), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.09.009>
- Gergs, U., Gerigk, T., Wittschier, J., Schmidbaur, C. T., Röttger, C., Mahnkopf, M., Edler, H., Wache, H., und Neumann, J. (2021). Influence of Serotonin 5-HT₄ Receptors on Responses to Cardiac Stressors in Transgenic Mouse Models. *Biomedicines*, *9*(5), 569. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050569>
- Gergs, U., Jahn, T., Werner, F., Köhler, C., Köpp, F., Großmann, C., und Neumann, J. (2019). Overexpression of protein phosphatase 5 in the mouse heart: Reduced contractility but increased stress tolerance – Two sides of the same coin? *PLoS ONE*, *14*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221289>
- Ginsburg, I. (2002). Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *The Lancet Infectious Diseases*, *2*(3), 171–179. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00226-8)
- Groenewegen, A., Rutten, F. H., Mosterd, A., und Hoes, A. W. (2020). Epidemiology of heart failure. *European Journal of Heart Failure*, *22*(8), 1342–1356. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1858>
- Hertting, G. (1964). The fate of 3H-iso-proterenol in the rat. *Biochemical Pharmacology*, *13*(8), 1119–1128. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(64\)90112-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(64)90112-1)
- Hinds, T. D., und Sánchez, E. R. (2008). Protein Phosphatase 5. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *40*(11), 2358–2362. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.08.010>
- Højlund, K., Poulsen, M., Staehr, P., Brusgaard, K., und Beck-Nielsen, H. (2002). Effect of insulin on protein phosphatase 2A expression in muscle in type 2 diabetes.

- European Journal of Clinical Investigation*, 32(12), 918–923. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2002.01098.x>
- Holubarsch C, Goulette R P, Litten R Z, Martin B J, Mulieri L A und Alpert N R. (1985). The economy of isometric force development, myosin isoenzyme pattern and myofibrillar ATPase activity in normal and hypothyroid rat myocardium. *Circulation Research*, 56(1), 78–86. <https://doi.org/10.1161/01.RES.56.1.78>
- Huang, Y., Wang, X.-X., Sun, D.-D., Zhang, Z.-X., Yang, W.-W., Shao, T., Han, H., Zhang, E.-F., Pu, Z.-S., Hou, Z.-X., Dong, H.-L., Xiong, L.-Z., und Hou, L.-C. (2017). Sub-anesthesia Dose of Isoflurane in 60% Oxygen Reduces Inflammatory Responses in Experimental Sepsis Models. *Chinese Medical Journal*, 130(7), 840–853. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.202734>
- Il1b interleukin 1 beta [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o.D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16176>
- Il6 interleukin 6 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o.D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16193>
- Kamada, R., Kudoh, F., Ito, S., Tani, I., Janairo, J. I. B., Omichinski, J. G., und Sakaguchi, K. (2020). Metal-dependent Ser/Thr protein phosphatase PPM family: Evolution, structures, diseases and inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 215, 107622. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107622>
- Kcnh2 potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o.D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16511>
- Keaney, N. (1970). Isoprenaline and practolol. *The Lancet*, 295(7641), 306–307. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(70\)90678-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(70)90678-1)
- Korneev, K. V. (2019). Mouse Models of Sepsis and Septic Shock. *Molecular Biology*, 53(5), 704–717. <https://doi.org/10.1134/S0026893319050108>
- Kratz, J. M., Grienke, U., Scheel, O., Mann, S. A., und Rollinger, J. M. (2017). Natural products modulating the hERG channel: heartaches and hope. *Natural Product Reports*, 34(8), 957. <https://doi.org/10.1039/c7np00014f>
- Krysiak, J., Unger, A., Beckendorf, L., Hamdani, N., von Frieling-Salewsky, M., Redfield, M. M., dos Remedios, C. G., Sheikh, F., Gergs, U., Boknik, P., und Linke, W. A. (2018). Protein phosphatase 5 regulates titin phosphorylation and function at a sarcomere-associated mechanosensor complex in cardiomyocytes. *Nature Communications*, 9, 262. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02483-3>
- Kudej, R. K., Iwase, M., Uechi, M., Vatner, D. E., Oka, N., Ishikawa, Y., Shannon, R. P., Bishop, S. P., und Vatner, S. F. (1997). Effects of Chronic β -Adrenergic Receptor Stimulation in Mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29(10), 2735–2746. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0508>
- Kumar, A., Thota, V., Dee, L., Olson, J., Uretz, E., und Parrillo, J. E. (1996). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 949–958. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.949>

- Lbp lipopolysaccharide binding protein [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o. D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16803>
- Li, H.-H., Cai, X., Shouse, G. P., Piluso, L. G., und Liu, X. (2007). A specific PP2A regulatory subunit, B56 γ , mediates DNA damage-induced dephosphorylation of p53 at Thr55. *The EMBO Journal*, *26*(2), 402–411. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601519>
- Li, L., Fang, C., Xu, D., Xu, Y., Fu, H., und Li, J. (2016). Cardiomyocyte specific deletion of PP2A causes cardiac hypertrophy. *American Journal of Translational Research*, *8*(4), 1769–1779. Zugriff 8. Mai 2018 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859906/>
- Lipinska-Gediga, M., Mierzchala, M., und Durek, G. (2012). Pro-atrial natriuretic peptide (pro-ANP) level in patients with severe sepsis and septic shock: prognostic and diagnostic significance. *Infection*, *40*(3), 303–309. <https://doi.org/10.1007/s15010-011-0235-0>
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., und Gong, C.-X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *The European Journal of Neuroscience*, *22*(8), 1942–1950. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x>
- Ljungström, L., Andersson, R., und Jacobsson, G. (2019). Incidences of community onset severe sepsis, Sepsis-3 sepsis, and bacteremia in Sweden - A prospective population-based study. *PloS One*, *14*(12), e0225700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225700>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., und Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275. Zugriff 8. Juli 2020 unter <http://www.jbc.org/content/193/1/265>
- Lu, G., Ren, S., Korge, P., Choi, J., Dong, Y., Weiss, J., Koehler, C., Chen, J.-n., und 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*(7), 784–796. <https://doi.org/10.1101/gad.1499107>
- Lu, Z., Zhu, X., Ye, Y., Fu, H., und Mao, J. (2021). PP2A protects podocytes against Adriamycin-induced injury and epithelial-to-mesenchymal transition via suppressing JIP4/p38-MAPK pathway. *Cytotechnology*, *73*(5), 697–713. <https://doi.org/10.1007/s10616-021-00484-1>
- Lüss, H., Klein-Wiele, O., Boknák, P., Herzig, S., Knapp, J., Linck, B., Müller, F. U., Scheld, H. H., Schmid, C., Schmitz, W., und 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*(12), 2349–2359. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1265>
- Lv, X., und Wang, H. (2016). Pathophysiology of sepsis-induced myocardial dysfunction. *Military Medical Research*, *3*. <https://doi.org/10.1186/s40779-016-0099-9>

- Ly96 lymphocyte antigen 96 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o. D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/17087>
- Marian, A. J., und Braunwald, E. (2017). Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circulation research*, 121(7), 749–770. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311059>
- Martin, L., Derwall, M., Thiernemann, C., und Schürholz, T. (2017). Herz in der Sepsis. *Der Anaesthetist*, 66(7), 479–490. <https://doi.org/10.1007/s00101-017-0329-x>
- Martinez, R. M., und Wolk, D. M. (2016). Bloodstream Infections. *Microbiology Spectrum*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0031-2016>
- Meigs, L., Smirnova, L., Rovida, C., Leist, M., und Hartung, T. (2018). Animal testing and its alternatives – the most important omics is economics [Number: 3]. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 35(3), 275–305. <https://doi.org/10.14573/altex.1807041>
- Miyata, S., Minobe, W., Bristow, M. R., und Leinwand, L. A. (2000). Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circulation Research*, 86(4), 386–390. <https://doi.org/10.1161/01.res.86.4.386>
- Myh6 myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o. D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/17888>
- Myh7 myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o. D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/140781>
- Narolska, N., Eiras, S., van Loon, R., Boontje, N., Zaremba, R., Spiegelen berg, S., Stooker, W., Huybregts, M., Visser, F., van der Velden, J., und Stienen, G. (2005). Myosin heavy chain composition and the economy of contraction in healthy and diseased human myocardium. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 26(1), 39–48. <https://doi.org/10.1007/s10974-005-9005-x>
- Natanson, C., Eichenholz, P. W., Danner, R. L., Eichacker, P. Q., Hoffman, W. D., Kuo, G. C., Banks, S. M., MacVittie, T. J., und Parrillo, J. E. (1989). Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *The Journal of Experimental Medicine*, 169(3), 823–832. <https://doi.org/10.1084/jem.169.3.823>
- Neumann, J., Boknik, P., Kirchhefer, U., und Gergs, U. (2021). The role of PP5 and PP2C in cardiac health and disease. *Cellular Signalling*, 85, 110035. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110035>
- Neumann, J., Eschenhagen, T., Jones, L. R., Linck, B., Schmitz, W., Scholz, H., und Zimmermann, N. (1997). Increased Expression of Cardiac Phosphatases in Patients with End-stage Heart Failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29(1), 265–272. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0271>
- Nfkb1 nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1, p105 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o. D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/18033>

- Nfkbia nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o.D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/18035>
- Nppa natriuretic peptide type A [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o.D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/230899>
- Perner, A., Gordon, A. C., Angus, D. C., Lamontagne, F., Machado, F., Russell, J. A., Timsit, J.-F., Marshall, J. C., Myburgh, J., Shankar-Hari, M., und Singer, M. (2017). The intensive care medicine research agenda on septic shock. *Intensive Care Medicine*, 43(9), 1294–1305. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4821-1>
- PubChem. (o.D.). Nppb - natriuretic peptide type B (mouse). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/Nppb/mouse>
- Repressé, X., Charron, C., und Vieillard-Baron, A. (2013). Evaluation of left ventricular systolic function revisited in septic shock. *Critical Care*, 17(4), 164. <https://doi.org/10.1186/cc12755>
- Ruediger, R., Ruiz, J., und Walter, G. (2011). Human cancer-associated mutations in the A α subunit of protein phosphatase 2A increase lung cancer incidence in A α knock-in and knockout mice. *Molecular and Cellular Biology*, 31(18), 3832–3844. <https://doi.org/10.1128/MCB.05744-11>
- Sanfilippo, F., Corredor, C., Fletcher, N., Tritapepe, L., Lorini, F. L., Arcadipane, A., Vieillard-Baron, A., und Cecconi, M. (2018). Left ventricular systolic function evaluated by strain echocardiography and relationship with mortality in patients with severe sepsis or septic shock: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*, 22. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2113-y>
- Sangodkar, J., Farrington, C., McClinch, K., Galsky, M. D., Kastrinsky, D. B., und Narla, G. (2016). All roads lead to PP2A: Exploiting the therapeutic potential of this phosphatase. *The FEBS journal*, 283(6), 1004–1024. <https://doi.org/10.1111/febs.13573>
- Schmittgen, T. D., und Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108.
- Shao, Y., Redfors, B., Ståhlman, M., Täng, M. S., Miljanovic, A., Möllmann, H., Troidl, C., Szardien, S., Hamm, C., Nef, H., Borén, J., und Omerovic, E. (2013). A mouse model reveals an important role for catecholamine-induced lipotoxicity in the pathogenesis of stress-induced cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure*, 15(1), 9–22. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfs161>
- Shi, Y. (2009). Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell*, 139(3), 468–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.006>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J.-L., und Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

- Speizer, F. E., und Doll, R. (1968). A century of asthma deaths in young people. *British Medical Journal*, *3*(5612), 245–246. <https://doi.org/10.1136/bmj.3.5612.245>
- Speizer, F. E., Doll, R., Heaf, P., und Strang, L. B. (1968). Investigation into use of drugs preceding death from asthma. *British Medical Journal*, *1*(5588), 339–343. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5588.339>
- Starr, M. E., Hu, Y., Stromberg, A. J., Carmical, J. R., Wood, T. G., Evers, B. M., und Saito, H. (2013). Gene expression profile of mouse white adipose tissue during inflammatory stress: age-dependent upregulation of major pro-coagulant factors. *Aging cell*, *12*(2), 194–206. <https://doi.org/10.1111/accel.12040>
- Steeghs, L., den Hartog, R., den Boer, A., Zomer, B., Roholl, P., und van der Ley, P. (1998). Meningitis bacterium is viable without endotoxin. *Nature*, *392*(6675), 449–449. <https://doi.org/10.1038/33046>
- Störk, S., Handrock, R., Jacob, J., Walker, J., Calado, F., Lahoz, R., Hupfer, S., und Klebs, S. (2017). Epidemiology of heart failure in Germany: a retrospective database study. *Clinical Research in Cardiology*, *106*(11), 913–922. <https://doi.org/10.1007/s00392-017-1137-7>
- Strack, S., Cribbs, J. T., und Gomez, L. (2004). Critical role for protein phosphatase 2A heterotrimers in mammalian cell survival. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(46), 47732–47739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408015200>
- Strömblad, B. C. R., und Nickerson, M. (1961). Accumulation of Epinephrine and Norepinephrine by Some Rat Tissues [Publisher: American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Section: Article]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *134*(2), 154–159. Zugriff 4. Oktober 2023 unter <https://jpet.aspetjournals.org/content/134/2/154>
- Swingle, M. R., Honkanen, R. E., und Ciszak, E. M. (2004). Structural basis for the catalytic activity of human serine/threonine protein phosphatase-5. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(32), 33992–33999. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402855200>
- Tardiff, J. C., Hewett, T. E., Factor, S. M., Vikstrom, K. L., Robbins, J., und Leinwand, L. A. (2000). Expression of the β (slow)-isoform of MHC in the adult mouse heart causes dominant-negative functional effects. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *278*(2), H412–H419. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.278.2.H412>
- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., und Nair, M. (2019). Alzheimer’s disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 5541–5554. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>
- Tlr4 toll-like receptor 4 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o. D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/21898>
- Tnf tumor necrosis factor [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (o. D.). Zugriff 24. Juli 2020 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/21926>
- Tomasoni, D., Adamo, M., Lombardi, C. M., und Metra, M. (2020). Highlights in heart failure. *ESC Heart Failure*, *6*(6), 1105–1127. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12555>

- Virshup, D. M., und Shenolikar, S. (2009). From Promiscuity to Precision: Protein Phosphatases Get a Makeover. *Molecular Cell*, 33(5), 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.015>
- Wang, J., Shen, T., Zhu, W., Dou, L., Gu, H., Zhang, L., Yang, Z., Chen, H., Zhou, Q., Sánchez, E. R., Field, L. J., Mayo, L. D., Xie, Z., Xiao, D., Lin, X., Shou, W., und Yong, W. (2018). Protein phosphatase 5 and the tumor suppressor p53 down-regulate each other's activities in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 293(47), 18218–18229. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004256>
- Wang, S. S., Esplin, E. D., Li, J. L., Huang, L., Gazdar, A., Minna, J., und Evans, G. A. (1998). Alterations of the PPP2R1B Gene in Human Lung and Colon Cancer [Publisher: American Association for the Advancement of Science Section: Report]. *Science*, 282(5387), 284–287. <https://doi.org/10.1126/science.282.5387.284>
- Winsor, T., Wright, R. W., und Berger, H. J. (1975). Isoproterenol toxicity. *American Heart Journal*, 89(6), 814–817. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(75\)90201-X](https://doi.org/10.1016/0002-8703(75)90201-X)
- Yang, J., Roe, S. M., Cliff, M. J., Williams, M. A., Ladbury, J. E., Cohen, P. T. W., und Barford, D. (2005). Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. *The EMBO Journal*, 24(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600496>
- Yoshikawa, T. (2015). Takotsubo cardiomyopathy, a new concept of cardiomyopathy: Clinical features and pathophysiology. *International Journal of Cardiology*, 182, 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.12.116>

8 Thesen

1. Eine herzspezifische Überexpression von PP2C β beeinflusst die kardiale Genexpression im Rahmen einer Reaktion auf Lipopolysaccharide nicht.
2. Eine herzspezifische Überexpression von PP2C β führt im Tiermodell unter basalen Bedingungen zu einem Verlust von β -MHC, bei Belastung mit Isoprenalin ist dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar.
3. Die gemeinsame herzspezifische Überexpression von PP2Ac α und PP5 führt zu einer deutlich stärkeren Fibrose und Expressionsminderung kardialer Myosinfilamente als die jeweils einzelne Überexpression.
4. Die herzspezifische Überexpression von PP2Ac α und PP5 kann zu einer verminderten Expression des ERG-Kaliumkanals führen und dadurch möglicherweise Herzrhythmusstörungen begünstigen.
5. Die herzspezifische Überexpression von PP2Ac α und PP5 führt zu einer wechselseitigen Down-Regulation der Expression, möglicherweise über eine Down-Regulation des α -MHC-Promotors.
6. Die herzspezifische Überexpression von PP2Ac α und PP5 führt zu einer Reduktion des Vorliegens der Gesamtproteinmenge von PP2Ac α und PP5. Die Reduktion ist jedoch geringer ausgeprägt als auf der mRNA-Ebene.
7. Eine Inhibierung des α -MHC-Promotors durch kombinierte verstärkte Expression oder Aktivität von PP2Ac α und PP5 kann einen bisher unbekanntem Mechanismus für die Induktion von Kardiomyopathien darstellen.

9 Anhang

9.1 Antikörper für Western Blots

Tabelle 3: 1. Antikörper

Zielprotein	Hersteller Charge	Größe des Zielproteins in kD	Verdünnung	Block jeweils in TBST-Puffer	2. Antikörper	Medium 2. AK
PP2A	Anti-PP2A alpha+beta antibody [Y119] Abcam, ab32141, Rabbit monoclonal	36	1:10000 BSA 2%	BSA 2%	Anti-Rabbit	MP 5% in TBST
PP5	BD Transduction Laboratories Purified Mouse Anti-PP5 (611021)	58	1:500 MP 5 %	MP 5 %	Anti-Mouse	MP 5 % in TBST
GAPDH	Abcam ab9484, Mouse monoclonal	37	1:1000 BSA 5 %	BSA 5 %	Anti-Mouse	BSA 5 % in TBST
CSQ	Abcam ab3516, Rabbit polyclonal	54/55	1:1000 MP 5 %	MP 5 %	Anti-Rabbit	MP 5 % in TBST

Tabelle 4: 2. Antikörper

Mouse IgG, A, M	Sigma-Aldrich A0162	Anti-Mouse Polyvalent Immunoglobulins (G, A, M)- Alkaline Phosphatase Antibody (produced in goat)	1:1000
Rabbit IgG	Sigma-Aldrich A3687	Anti-Rabbit IgG (produced in goat)	1:1000

9.2 Primer für Polymerase Kettenreaktion

Alle Primer wurden bereitgestellt von biomers.net.

Tabelle 5: Primer der PCR

Name	Basenpaare	Sequenz for 5'-. . . -3'	Sequenz rev 5'-. . . -3'
PP2A	680	ACCCTTACCCCA CACATAGACC	CTTAAACACTCG TCGTAGAACC
PP5	614	ACCCTTACCCCA CACATAGACC	GCTTCACCTTCAC CACCGTC
PP2C	402	CCCTTACCCAC ACATAGACC	GCGTGACCATCA TAAACTGC
GAPDH	351	ATGCATCCTG... AC CAAC	ATGCCTGCTT... ACCTTC
Nppa/ANP	123	GTGCGGTGCCAA CACAGAT	GCTTCCTCAGTCT GCTCACTCA
CD-14	72	GGCGCTCCG AGTTGTGACT	TACCTGCTTCAGC CCAGTGA
Il1 β	110	TCGTGCTGTC GGACCCATAT	GTCGTTGCTTG GTTCTCCTTGT
NF κ -B	194	GAAATTCCTGATC CAGACAAAAC	ATCACTTCAATGG CCTCTGTGTAG
Il-6	166	CCGGAGAGG AGACTTCACAG	TTCTGCAAGTG CATCATCGT
LBP	184	AGATCACACTA CCGGACTTCAGCG	TTCCATTTGCOCT CGGACACCGATG
MD-2	108	GTCCGATGGTCTT CCTGGCGAGT	GCTTCTCAGAT TCAGTCAATATGGG
I κ B α	151	ATGAAGGACGA GGAGTACGAGCAA	TCTCTTCGTGGAT GATTGCCAA
TNF- α	181	CACACTCAGATC ATCTTCTCAAAA	GTAGACAAGGTA CAACCCATCG
TLR-4	59	CTCTGCCTTCAC TACAGAGAC	TGGATGATGTTGG CAGCAATG
α MHC	121	GCTGACAGATCGG GAGAATCAG	CCCCTATGGCTG CAATGC
β MHC	213	ACTCAAGCGGGA GAACAAGA	ACCTGGGACAACCT CCAACCTG
Cacna1c	184	TCACTGGCTCACAGA AGTGC	GATCTTCGTCTC CACCAGGA
Fortsetzung auf der nächsten Seite			

Tabelle 5 – Fortsetzung

Name	Basenpaare	Sequenz for 5′-. . . -3′	Sequenz rev 5′-. . . -3′
Nppb/BNP	81	CCAGTCTCCAGAG CAATTCAA	AGCTGTCTCTGGG CCATTTTC
Col1 α 1	110	ACATGTTCA GCTTTGTGGACC	TAGGCCATTG TGTGTATGCAGC
Col3 α 1	283	TGGTAGAAAGGA CACAGAGGC	TCCAACCTTCAC CCTTAGCACC
Fn1	208	TTAAGCTCACATG CCAGTGC	TCGTCATAGC ACGTTGCTTC
Kcnh2	242	CGCAAGTTCAT CATCATCGCTAA	AGGAAGCAGCTCC CATCTTT

9.3 Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Programme

9.3.1 Geräte

Centrifuge 5424 R; Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

Centrifuge 5415 C; Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

3722L Microcentrifuge; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Vortex Genie 2; BenderHobein AG, Ismaning, Deutschland

Mikroliterpipetten (Einkanal) Eppendorf Research 50-1000 μ l, 20-200 μ l, 10-100 μ l, 2-20 μ l; Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

Mikroliterpipetten (Einkanal), Eppendorf Research Plus, 0,5-10 μ L, Eppendorf AG, Hamburg

Multipipette M4; Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

Mikroliterpipette (8-Kanal) SU1709 (0,5-10 μ l); Sunlab Germany

Thermomixer 5437, 5436, Compact; Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

Thermocycler: T Gradient Thermoblock; Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

RunOne Electrophoresis Cell; EmbiTec, San Diego, Kalifornien, USA

Gelkammer: Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Gelkammer Perfect Blue Maxi; Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

UV-Transilluminator: TFX-20MC; Vilber Lourmat, Collegien, Frankreich

UV-Transilluminator: BioDoc Analyze; Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Polytron: Ultra-Turrax T25; JankeKunkel GmbH CO. KG, Staufen, Deutschland

Digital Camera C-5060 Wide Zoom; Olympus Corporation, Tokyo, Japan

Mikrowelle: MW800; Continent

Dampfsterilisator VARIOKLAV 25T; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

BioPhotometer 6131; Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

Mikrodismembrator S mit PTFE-Schüttelgefäßen und Kugeln aus Chromstahl; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Präzisionswaage: XS205 Dual Range; Mettler Toledo
Elektronikrührer: Variomag; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermocycler für qPCR: CFX Connect™; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Typhoon 9410 Variable Mode Imager, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD 2070 MS 72 (Generator); Bandelin electronic GmbH Co. KG, Berlin
Ultraschallhomogenisator UW 2070 MS 73 (Sonotrode), Bandelin electronic GmbH Co. KG, Berlin, Deutschland
Netzgerät für Proteinelektrophorese: Phero-stab. 500; Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen, Deutschland
pH-Meter: inoLab pH 720; WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Küvetten für UV-Photometrie: UVette 50-2000µl; Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Elektrophoresesystem SE 600-15-1.5; Hoefer Inc., Holliston, USA
Orbitalschüttler: GFL 3015; DD Biolab S.L., Barcelona, Spanien
Kryostat F12-ED; Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Sterilbank: NuAire Inc., Caerphilly, Virginia, USA
Transfer-Netzgerät: PowerPac HC; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Western-Blot Transferrkammer: Trans-Blot Cell; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA

9.3.2 Verbrauchsmaterialien

Pipettierplatten für PCR “Hard-Shell PCR Plates 96-well, thin-wall”; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Verschlussystem für Pipettierplatten “Microseal ‘B’ Adhesive Seals”; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Safe-Lock Tubes 1,5ml/2ml; Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
µltraAmp PCR Tubes 0,2ml; Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, Utah, USA
Cellstar Tubes 15ml/50ml; Greiner Bio-One International GmbH, Gremsmünster, Österreich
epT.I.P.S. Standard/Bulk 2-200µl; Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Standard 50-1000µl; Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Präzisions-Pipettenspitzen Typ Eppendorf 0,5-20µl; A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Combitips Advanced 0,1ml; Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
MµltiFlex Round 1-200 µL; Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, Utah, USA
Nitrozellulosemembran: Amersham Protran 0.45µm NC; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
Parafilm M PM-996; Bemis Inc., Neenah, Wisconsin, USA

9.3.3 Chemikalien und Enzyme

Agarose NEEO Ultra-Qualität, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Trichlormethan (Chloroform) >99%, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland

Formaldehyd 37%; Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat); Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Ethanol $\geq 99.8\%$;
Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TRIzol Reagenz; Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
2-Propanol $\geq 99.8\%$; Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz RedSafe; INtRON Biotechnology DR, Seongnam, Südkorea RiboLock RNase Inhibitor; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
6X DNA Loading Dye; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA Fermentas Gene Ruler 1kb DNA Ladder/100bp DNA Ladder; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
2x PCR Super Master Mix; BioTool AG, Kirchberg, Schweiz iTaq Universal SYBR Green Supermix; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MOPS Pufferqualität, AppliChem; Darmstadt, Deutschland 30% Acrylamidlösung, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
SDS, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA TWEEN 20 für Synthese; Merck Schuchardt OHG; Hohenbrunn, Deutschland
Tris-Base: TRIS $\geq 99\%$; Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl: Trizma Hydrochloride; Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA
Glycerol $\geq 99,5\%$, wasserfrei; Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetranethylethylendiamin), SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
Glycine analytical grade; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat $\geq 99,5\%$, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III), Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz; Merck KgaA; Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat $\geq 98\%$; Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S; Sigma-Aldrich Inc.; St. Louis, Missouri, USA
Trichloressigsäure zur Analyse; E. Merck; Darmstadt, Deutschland
Sodium Chloride (NaCl) for analysis; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triethanolamin $\geq 99\%$, zur Synthese; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat; Sigma, St. Louis, Missouri, USA Magermilchpulver blotting grade; Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin pH 7,0, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
ECF Substrate for western blotting, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien

ECF-dilution-buffer for western blotting; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien

9.4 Software

GraphPad Prism 5; GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA

ImageQuant TL 7.0, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden

Bio-Rad CFX Manager 3.1; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA

AlphaDigiDoc RT, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Erklärungen

1. Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.
2. Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit dem Titel „Einfluss von kardialen Belastungen auf die Genexpression in Herzen von PP2A α -, PP2C β - und PP5-transgenen Mäusen“ an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.
3. Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit mit dem Titel „Einfluss von kardialen Belastungen auf die Genexpression in Herzen von PP2A α -, PP2C β - und PP5-transgenen Mäusen“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Jena, 12. August 2024

Friedrich Paul Georg Köpp

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Joachim Neumann bedanken, dass ich diese Arbeit in seinem Institut durchführen konnte. Seine fachliche Kompetenz und Erfahrung in der Betreuung von Doktoranden war strukturgebend und hat den experimentellen Teil der Arbeit ermöglicht. Ich danke ihm weiterhin, dass ich im Rahmen dieser Arbeit erste Erfahrungen im Bereich der Forschung sammeln konnte. Auch bedanke ich mich für seine Unterstützung, die meine Auslandsfamulatur in Südkorea ermöglicht hat. In diesem Zusammenhang möchte ich 김중해 danken, der mir im Rahmen dieses Aufenthaltes Einblicke in klinische Forschung gezeigt hat und weitere Motivation gegeben hat.

Dr. rer. nat. Ulrich Gergs war jederzeit bei Problemen im Verlauf des experimentellen Teils eine kompetente Hilfe und nahm sich Problemen an. Gerade wenn Experimente mehrfach ohne erkennbaren Grund nicht funktionierten, war seine Fehleranalyse für die Optimierung des nächsten Versuchs hilfreich. Diese Hilfestellung hat die Qualität der Ergebnisse stark verbessert. Besonders dankbar bin ich ihm auch für die Hilfe bei der Erstellung des Abstracts und Posters, und umso mehr bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei Pia Willmy, Hartmut Wache und Sonja Reber, den Mitarbeitenden des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie bedanken. Sie haben mich in die praktische Arbeit im Labor eingeführt und die meisten meiner experimentellen Probleme hatten sie bereits erlebt. Ihre Erfahrung und Gelassenheit hat mir auch für den weiteren Weg geholfen. Die Zusammenarbeit im Institut war sehr konstruktiv und angenehm.

Ich möchte mich bei Sophie Richter und Julian Kauk bedanken. Sie haben diese Arbeit in früheren Stadien gelesen und konstruktives Feedback und Motivation gegeben.