

**Rolle des Connective Tissue Growth Factors (CTGF) und  
des PKC-enhanced Protein-Phosphatase 1 Inhibitors (KEPI)  
für die Funktion des adulten Herzen – Studien an  
transgenen Tiermodellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von  
Diplom Biologin Anna Panek  
Geboren am 29.08.1975 in Zgorzelec (Polen)

Berlin, April 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für klinische kardiovaskuläre  
Forschung und in der Abteilung für Molekularbiologie von Hormonen im Herz-  
Kreislaufsystem des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin in Berlin-Buch  
angefertigt

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Heinemann
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Bader

Disputation am 11.09.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u>VORWORT</u></b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b><u>EINLEITUNG I</u></b>	<b>8</b>
2.1	KARDIALE HYPERTROPHIE, FIBROSE UND HERZINSUFFIZIENZ	8
2.1.1	BEGRIFFSDEFINITIONEN	8
2.1.2	KARDIALE UND VASKULÄRE VERÄNDERUNGEN BEI CHRONISCHER HERZINSUFFIZIENZ/ KOMPENSATIONSMECHANIEN	9
2.1.2.1	Kompensationsmechanismen des Herzens	9
2.1.2.1.1	Frank-Starling-Mechanismus	9
2.1.2.1.2	Myokardremodeling	10
2.1.2.2	Neurohumorale Kompensationsmechanismen	10
2.1.2.3	Veränderungen der extrazellulären Matrix bei Herzinsuffizienz	11
2.2	BIOLOGIE DES CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTORS (CTGF)	13
2.2.1	GESCHICHTLICHER RÜCKBLICK UND DIE MOLEKULARE STRUKTUR VON CTGF	13
2.2.2	MOLEKULARE STRUKTUR VON CTGF	14
2.2.3	CTGF VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION	15
2.2.3.1	Signalwege der CTGF-Induktion und –Regulation	15
2.2.3.2	Rezeptoren von CTGF	17
2.2.3.3	Synergie zwischen CTGF und TGFβ	18
2.2.4	FUNKTIONEN VON CTGF IM KARDIOVASKULÄREN SYSTEM: IMPLIKATION IN HERZFIBROSE /-HYPERTOPHIE	19
2.2.5	BEDEUTUNG VON CTGF BEI DER PATHOGENESE VON SYSTEMISCHER SKLEROSIS (SKLERODERMIE)	20
2.2.6	FUNKTION VON CTGF IN DER EMBRYONALENTWICKLUNG/ DAS CTGF-KNOCKOUT- MODELL	21
2.3	TIERMODELLE DER HERZINSUFFIZIENZ	22
<b>3</b>	<b><u>ZIELSETZUNG DER STUDIE I</u></b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>24</b>
4.1	MATERIAL	24
4.1.1	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	24
4.1.2	KITS, ENZYME UND MARKER	25
4.1.3	ANTIKÖRPER	26
4.1.4	PLASMIDE UND BAC'S	27
4.1.5	OLIGONUKLEOTIDE	27
4.1.6	ZELLINIEN	28
4.1.7	BAKTERIENSTÄMME	28
4.1.8	MAUS- UND ZEBRAFISCHSTÄMME	28
4.1.9	GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL	29
4.2	METHODEN	30
4.2.1	NUKLEINSÄUREN	30
4.2.1.1	Isolierung von Nukleinsäuren-analytischer Maßstab	30
4.2.1.2	Isolierung von genomischer DNA aus Geweben	31
4.2.1.3	Isolierung von RNA aus Geweben und Zellen	31
4.2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
4.2.1.5	Lagerung von Nukleinsäuren	32
4.2.1.6	Auftrennung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Gelen	32
4.2.1.6.1	Auftrennung von DNA mit Hilfe von Agarosegelen	32

4.2.1.7	Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	33
4.2.1.8	Restriktionsverdau von Nukleinsäuren.....	33
4.2.1.9	Ligation von Nukleinsäuren.....	34
4.2.1.10	Sequenzierung.....	34
4.2.1.11	Reverse Transkription.....	34
4.2.1.12	Polymerasekettenreaktion.....	35
4.2.1.12.1	PCR zur Genotypbestimmung.....	35
4.2.1.12.2	PCR kleiner Amplikons.....	36
4.2.1.12.3	PCR zur Klonierung großer Fragmente (Long Range PCR).....	37
4.2.1.13	Real-Time-PCR (TaqMan®-PCR).....	38
4.2.2	RIBONUCLEASE-PROTECTION-ASSAY (RPA).....	40
4.2.2.1	Vorbereitung der RNA.....	40
4.2.2.2	Sondenherstellung.....	40
4.2.2.3	Hybridisierung.....	41
4.2.2.4	Aufarbeitung.....	41
4.2.3	PROTEINBIOCHEMIE.....	42
4.2.3.1	Proteinisolation aus Geweben.....	42
4.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentraion mittels der Bradford-Methode.....	43
4.2.3.3	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidge-lelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
4.2.3.4	Proteinnachweis mittels Coomassie Färbung.....	43
4.2.3.5	Blotten von Proteinen.....	44
4.2.3.6	Blocken von Membranen.....	44
4.2.3.7	Inkubation mit primären Antikörpern.....	44
4.2.3.8	Inkubation mit sekundären Antikörpern.....	45
4.2.3.9	ECL-Reaktion.....	45
4.2.3.10	Pull down-Assay.....	45
4.2.3.11	Massenspektrometrie.....	46
4.2.4	BAKTERIEN- UND ZELLKULTUR.....	46
4.2.4.1	Transformation von Bakterien.....	46
4.2.4.2	Vermehrung und Selektion von Bakterien.....	46
4.2.4.2.1	Vermehrung auf Platten.....	46
4.2.4.2.2	Vermehrung in flüssigen Medien.....	47
4.2.4.3	Proteinexpression in Bakterien.....	47
4.2.4.4	Aufreinigung des rekombinanten KEPI-GST-Fusionsproteins.....	48
4.2.4.5	Homologe Rekombination in Bakterien („Gap repair“ ).....	48
4.2.5	ZELLKULTUR EUKARYOTISCHER ZELLEN.....	49
4.2.5.1	Präparation und Kultur von adulten Kardiomyozyten.....	49
4.2.5.2	Transfektion von adulten Kardiomyozyten.....	49
4.2.6	ZUCHT UND EXPERIMENTE AN VERSUCHSTIEREN.....	50
4.2.6.1	Tierzucht.....	50
4.2.6.2	Echokardiographie.....	50
4.2.6.3	Invasive Hämodynamik.....	51
4.2.6.4	Angiotensin II- und Isoproterenol-Applikation.....	51
4.2.6.5	Entnahme und Aufbereitung von Organen.....	52
4.2.6.6	Messungen der Kontraktilität im „Working heart-Modus“.....	52
4.2.6.7	Elektrokardiographie bei Mäusen.....	53
4.2.6.8	Messungen der Kontraktilität und des Ca <sup>2+</sup> -Transienten an isolierten adulten Kardiomyozyten (IonOptix System® ).....	54
4.2.7	MIKROINJEKTION DER FISCHOOZYTEN.....	54
4.2.8	HISTOLOGISCHE METHODEN.....	55
4.2.8.1	Fixierung, Einbettung und Schneiden der Gewebeprobe.....	55
4.2.8.2	Trichrom-Masson-Färbung.....	55
4.2.8.3	Kryoschnitte.....	55
4.2.8.4	Immunhistologische Färbung auf Kryoschnitten.....	56
4.2.8.5	Immunhistologische Färbung von Kardiomyozytenkulturen.....	56

4.2.8.6	In situ Hybridisierung.....	57
4.2.8.6.1	In vitro-Transkription und DIG-Markierung von RNA-Sonden.....	57
4.2.8.6.2	Herstellung von Embryopulver.....	57
4.2.8.6.3	Whole mount in situ-Hybridisierung.....	58
<b>5</b>	<b><u>ERGEBNISSE I.....</u></b>	<b>60</b>
5.1	GENEXPRESSIONSANALYSE DES ERBB2 KNOCKOUT-MODELS ALS GRUNDLAGE FÜR DIE FUNKTIONELLEN UNTERSUCHUNGEN VON CTGF.....	60
5.2	EXPRESSION VON CTGF IM HERZEN UNTER BASAL- UND HYPERTROPHIE-BEDINGUNGEN.....	61
5.3	GENERIERUNG DER CTGF-TRANSGENEN MAUS.....	62
5.3.1	KLONIERUNG DES DNA-KONSTRUKTS ZUR ÜBEREXPRESSION VON CTGF IM MAUSERZEN.....	62
5.4	EXPRESSION DES CTGF-TRANSGENS IM HERZEN.....	63
5.5	KARDIOVASKULÄRE CHARAKTERISIERUNG DER CTGF-TRANSGENEN MÄUSE UNTER BASALBEDINGUNGEN.....	64
5.5.1	ECHOKARDIOGRAPHISCHE CHARAKTERISIERUNG VON CTGF-TRANSGENEN MÄUSEN UNTER BASALBEDINGUNGEN.....	64
5.5.2	CHARAKTERISIERUNG DER KARDIALEN FUNKTION DER CTGF-TRANSGENEN-MÄUSE AM ISOLIERTEN HERZEN.....	66
5.5.3	KARDIALE MORPHOLOGIE UND HISTOLOGIE DER CTGF-TRANSGENEN MÄUSE.....	67
5.6	KARDIALE FUNKTION UND HERZMORPHOLOGIE VON CTGF-TRANSGENEN MÄUSEN UNTER HYPERTROPHIE/ INSUFFIZIENZ-BEDINGUNGEN.....	69
5.6.1	ECHOKARDIOGRAPHISCHE CHARAKTERISIERUNG VON CTGF-TRANSGENEN MÄUSEN NACH ANGIOTENSIN II-INDUZIERTER HYPERTROPHIE.....	69
5.6.2	KARDIALE MORPHOLOGIE UND HISTOLOGIE DER CTGF-TRANSGENEN MÄUSE NACH ANGIOTENSIN II-INDUZIERTEN HYPERTROPHIE.....	70
5.6.3	GENEXPRESSIONSANALYSE DER CTGF-TRANSGENEN MÄUSE IN ANGIOTENSIN II-INDUZIERTER HYPERTROPHIE.....	72
5.6.3.1	Expression von ANP und BNP als Marker für Hypertrophie in Angiotensin II-induzierter Hypertrophie.....	72
5.6.3.2	Expression von VEGF als Marker für Angiogenese in Angiotensin II-induzierter Hypertrophie.....	73
5.6.3.3	Expression von Kollagen 1 $\alpha$ als Marker für Fibrose in Angiotensin II-induzierter Hypertrophie.....	74
5.6.3.4	Expression von SERCA2 als Markergene für Ca <sup>2+</sup> -„Cycling“ in Angiotensin II-induzierter Hypertrophie.....	75
5.7	KARDIALE FUNKTION VON ISOLIERTEN CTGF-TRANSGENEN HERZEN UNTER BEDINGUNGEN EXPERIMENTELLER ISCHÄMIE UND REPERFUSION.....	75
5.8	STUDIE DES Ca <sup>2+</sup> -TRANSIENTEN UND DER KONTRAKTILITÄT EINZELNER KARDIOMYOZYTEN AUS CTGF-TRANSGENEN HERZEN.....	77
5.8.1.1	Analyse der Komponenten des Ca <sup>2+</sup> -Cyclings in CTGF-transgenen Mäusen	80
<b>6</b>	<b><u>DISKUSSION I.....</u></b>	<b>83</b>
6.1	CTGF-ÜBEREXPRESSION IM MURINEN HERZEN.....	84
6.2	KARDIALE FUNKTION VON CTGF UNTER BASALBEDINGUNGEN-CHARAKTERISIERUNG DER CTGF-TRANSGENEN MAUS.....	85
6.3	DIE ROLLE VON CTGF IN KARDIALER HYPERTROPHIE/ INSUFFIZIENZ.....	87
6.4	EFFEKTE DER CTGF-ÜBEREXPRESSION AUF DIE KINETIK UND DEN Ca <sup>2+</sup> -TRANSIENTEN ISOLIERTER KARDIOMYOZYTEN.....	90

6.5	EFFEKTE DER CTGF-ÜBEREXPRESSION UNTER BEDINGUNGEN DER ISCHÄMIE UND REPERFUSION .....	91
6.6	POTENTIELLER EINFLUSS DER CTGF ÜBEREXPRESSION AUF DIE SIGNALTRANSDUKTION.....	92
6.7	AUSBLICK .....	93
<b>7</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG I</u></b> .....	<b>95</b>
<b>8</b>	<b><u>EINLEITUNG II</u></b> .....	<b>97</b>
8.1	EC-KOPPLUNG .....	97
8.1.1	ROLLE DES SARCOPLASMATISCHEN RETICULUMS BEI DER EC-KOPPLUNG .....	98
8.1.2	MODULATION DER EC-KOPPLUNG DURCH SYMPATHISCHE AKTIVIERUNG.....	100
8.2	PROTEIN PHOSPHATASE 1 (PP1) UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE MYOKARDIALE FUNKTION.....	102
8.2.1	CHARAKTERISTIKA DER PP1.....	102
8.2.2	PP1 UND IHRE INHIBITOREN (I-1, I-2) IM HERZEN.....	103
8.2.3	ÜBEREXPRESSION VON PP1 IM HERZEN (TRANSGENE MAUS).....	104
8.2.4	FUNKTIONELLE ANALYSE VON INHIBITOR-1 UND -2 IM HERZEN ANHAND VON TIERMODELLEN .....	105
8.2.5	IMPLIKATION VON PP1 UND I-1 BEI DER KARDIALEN DYSFUNKTION BEIM MENSCHEN.....	106
8.2.6	PKC-DEPENDENT PROTEIN-PHOSPHATASE 1 INHIBITOR (KEPI) ALS EIN NEUER PP1-INHIBITOR IM HERZEN.....	106
<b>9</b>	<b><u>ZIELSETZUNG DER STUDIE II</u></b> .....	<b>108</b>
<b>10</b>	<b><u>ERGEBNISSE II</u></b> .....	<b>110</b>
10.1	GENEXPRESSIONSANALYSE DES ERBB2 KNOCKOUT-MODELS ALS GRUNDLAGE FÜR DIE FUNKTIONELLEN UNTERSUCHUNGEN VON KEPI.....	110
10.2	EXPRESSION VON KEPI IN DER MURINEN EMBRYONALENTWICKLUNG.....	110
10.3	BIOCHEMISCHE ANALYSE VON KEPI .....	111
10.3.1	IDENTIFIZIERUNG NEUER BINDUNGSPARTNER VON KEPI .....	111
10.3.1.1	Herstellung des rekombinanten KEPI-GST-Fusionsproteins .....	112
10.3.1.2	Pull-down-Assay zur Identifizierung von neuen KEPI-Bindungs-partnern	112
10.3.2	HERSTELLUNG EINES KEPI-SPEZIFISCHEN ANTISERUMS .....	113
10.4	GENERIERUNG DER KEPI TRANSGENEN MAUS.....	114
10.4.1	KLONIERUNG DES DNA-KONSTRUKTS ZUR ÜBEREXPRESSION VON KEPI IM MAUSERZEN .....	114
10.5	EXPRESSION DES KEPI-TRANSGENS IM HERZEN .....	115
10.6	KARDIOVASKULÄRE CHARAKTERISIERUNG DER KEPI TRANSGENEN MÄUSE UNTER BASALBEDINGUNGEN .....	116
10.6.1	ECHOKARDIOGRAPHISCHE CHARAKTERISIERUNG VON KEPI-TRANSGENEN MÄUSEN UNTER BASALBEDINGUNGEN. ....	116
10.6.2	ELEKTROKARDIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG (EKG) DER KEPI-TRANSGENEN MÄUSE	117
10.6.3	UNTERSUCHUNG DES Ca <sup>2+</sup> -GRADIENTEN IN KEPI-TRANSGENEN KARDIOMYOZYTEN .....	121
10.7	KLONIERUNG DES DNA-KONSTRUKTES ZUR HERSTELLUNG DER KARDIO-MYOZYTEN-SPEZIFISCHEN KEPI-KNOCKOUT-MAUS.....	123
10.8	DER ZEBRAFISCH ALS EIN ALTERNATIVES TIERMODELL.....	124

10.8.1	IDENTIFIZIERUNG DES KEPI-ORTHOLOGS IM ZEBRAFISCH .....	125
10.8.2	EXPRESSIONSMUSTER DER KEPI MRNA IM FISCH .....	127
10.8.3	FUNKTIONELLER KNOCK DOWN VON KEPI IM ZEBRAFISCH .....	128
<u>11</u>	<u>DISKUSSION II .....</u>	<u>130</u>
11.1	IDENTIFIZIERUNG VON KEPI IM HERZEN UND SEINE EXPRESSION WÄHREND DER EMBRYONALENTWICKLUNG .....	130
11.2	TROPONIN I ALS EIN NEUER BINDUNGSPARTNER VON KEPI .....	131
11.3	HERZSPEZIFISCHE ÜBEREXPRESSION VON KEPI IM TRANSGENEN MAUSMODELL 132	
11.3.1	EFFEKTE DER KEPI-ÜBEREXPRESSION AUF DIE ELEKTROPHYSIOLOGISCHE AKTIVITÄT DES HERZENS (EKG).....	132
11.3.2	EFFEKTE DER KEPI-ÜBEREXPRESSION AUF DEN INTRAZELLULÄREN $Ca^{2+}$ -TRANSIENTEN UND DIE KONTRAKTIONSKINETIK IN ISOLIERTEN KARDIOMYOZYTEN .....	134
11.4	IDENTIFIZIERUNG DES KEPI-ORTHOLOGS IM ZEBRAFISCH UND SEIN FUNKTIONELLER KNOCK-DOWN.....	137
11.5	AUSBLICK .....	137
<u>12</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG II .....</u>	<u>139</u>
<u>13</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS .....</u>	<u>142</u>
<u>14</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</u>	<u>155</u>
<u>15</u>	<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>157</u>
<u>16</u>	<u>STIPENDIEN, KONGRESSBEITRÄGE, PUBLIKATIONEN .....</u>	<u>158</u>
<u>17</u>	<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</u>	<u>160</u>



## 1 Vorwort

Die vorliegende Dissertationsarbeit beschreibt zwei Projekte, die unterschiedliche Aspekte der kardialen Physiologie und Molekularbiologie behandeln. Den Ursprung dieses Forschungsvorhabens bildet eine genomweite Expressionsanalyse des Herz-Transkriptoms eines Knockout-Mausmodells für dilatative Kardiomyopathie (ErbB2-KO). Beide hier beschriebenen Gene zeigten eine differentielle Expression unter Bedingungen der dilatativen Kardiomyopathie, so dass es plausibel erschien, ihre Rolle im Herzen zu untersuchen. Im Rahmen des ersten Projekts wurde die Bedeutung von Connective Tissue Growth Factor (CTGF) im Prozess des kardialen Remodelings erforscht. Hierbei stand die Untersuchung der Herzphysiologie anhand eines herzspezifischen CTGF-transgenen Mausmodells im Vordergrund. Diese Studie untersuchte die Bedeutung von CTGF im Herzen unter kardiopathophysiologischen Bedingungen mit klinischer Relevanz.

Im Fokus des zweiten Projekts stand die Aufklärung der Rolle von Kinase Enhanced Phosphatase Inhibitor (KEPI) im Herzen, die bisher noch nicht untersucht ist. Hier wurde die Grundcharakterisierung vorgenommen, wobei der Zebrafisch (*Danio rerio*) und eine transgene Maus mit herzspezifischer KEPI-Expression als Tiermodelle dienten. Dieses Projekt umfasste neben der biochemischen und zellbiologischen Charakterisierung von KEPI auch einige funktionelle Aspekte der KEPI-Biologie.

Die thematische Divergenz der Projekte ist reflektiert in der getrennten Dokumentation (Einleitung, Ergebnisse und Diskussion) der beiden Studien, wobei der Abschnitt „Material und Methoden“ für beide Projekte gemeinsam verfasst wurde.

## 2 Einleitung I

Die Herzinsuffizienz ist eine Erkrankung, bei der das Herz, aufgrund seiner Leistungsschwäche, eine dem Bedarf angemessene Blutzirkulation nicht aufbringen kann. Die große gesellschaftspolitische Bedeutung der Erkrankung wird durch Schätzungen untermauert, wonach mehr als 14 Millionen Menschen in Europa an einer Herzinsuffizienz leiden. Man erwartet sogar, dass in den nächsten Jahren ca. 20% der Europäer vor ihrem Tod eine Herzinsuffizienz entwickeln werden. Bei Patienten über 65 Jahren ist die Herzinsuffizienz bereits heute die häufigste Einweisungsdiagnose ins Krankenhaus. Die Kosten für die Behandlung der Herzinsuffizienz in Deutschland werden auf ca. 5 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt, wobei 55% der Kosten allein auf die stationäre Behandlung entfallen.<sup>1,2</sup>

### 2.1 Kardiale Hypertrophie, Fibrose und Herzinsuffizienz

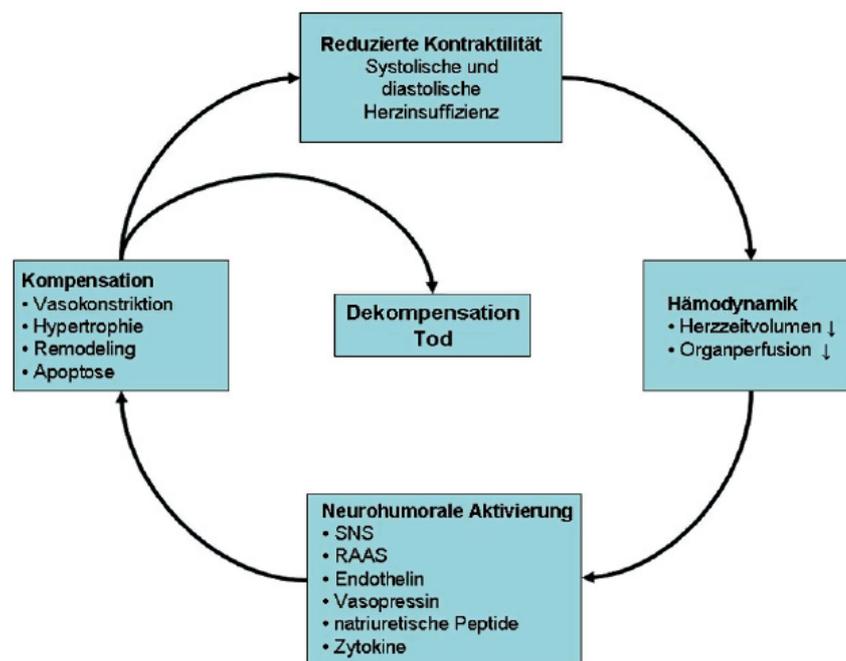
#### 2.1.1 Begriffsdefinitionen

Von einer Herzinsuffizienz spricht man, wenn das Herz unter Ruhe- oder Belastungsbedingungen, trotz ausreichenden venösen Blutangebots, nicht in der Lage ist ein ausreichendes Herzminutenvolumen zu fördern und den venösen Rückfluss voll wieder aufzunehmen.<sup>3</sup> Als Folge des erhöhten mechanischen Stresses und durch den Einfluss von zirkulierenden und myokardialen Neurohormonen werden Veränderungen der myokardialen Architektur vollzogen. Dieser in der Fachliteratur als myokardiales *Remodeling* bezeichneter Prozess zieht hauptsächlich zwei Konsequenzen auf zellulärer Ebene nach sich: (1) Zum einen werden Hypertrophie, Dysfunktion, und Zelltod der Kardiomyozyten beobachtet und zum anderen (2) wird eine verstärkte Einlagerung und Veränderung der kardialen extrazellulären Matrix (ECM) festgestellt. Die letztere wird auch als myokardiale Fibrose bezeichnet.

Als Hypertrophie bezeichnet man die Vergrößerung eines Organs oder Gewebes, z.B. infolge einer erhöhten Leistungsanforderung (Adaptation) oder im Rahmen einer Herzerkrankung (Maladaptation). Es handelt sich um eine Volumenzunahme der Zellen bei gleich bleibender Zellzahl.<sup>4</sup>

## 2.1.2 Kardiale und vaskuläre Veränderungen bei chronischer Herzinsuffizienz/ Kompensationsmechanismen

Die kardiale Dysfunktion geht mit vielfältigen Veränderungen auf der Ebene der kardialen Funktion, des Blutvolumens und des neurohumoralen Status einher. Diese Veränderungen dienen dem Erhalt der kardialen Auswurfsleistung (hauptsächlich durch den Frank-Starling-Mechanismus) und des arteriellen Blutdrucks (durch systemische Vasokonstriktion). Sie erlauben kurzfristig eine Stabilisierung der Myokardfunktion und damit die Perfusion lebenswichtiger Organe. Bei chronischer Aktivierung über Monate oder gar Jahre tragen dieselben kompensatorischen Mechanismen jedoch zur Progression der Herzinsuffizienz bei, es entsteht ein *circulus vitiosus*<sup>5</sup> (Abb.1).



**Abb. 1 Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz.** (SNS=sympathisches Nervensystem; RAAS=Renin-Angiotensin-Aldosteron-System)<sup>5</sup>

### 2.1.2.1 Kompensationsmechanismen des Herzens

#### 2.1.2.1.1 Frank-Starling-Mechanismus

Der Frank-Starling-Mechanismus beschreibt die Fähigkeit des Herzens die Stärke der Kontraktion und somit des Schlagvolumens als Antwort auf eine

Veränderung des venösen Rückflusses (enddiastolisches Ventrikelvolumen) anzupassen. Beispielsweise führt die Bewegung der Extremitäten (Muskelpumpe) während einer physischen Übung zu einem erhöhten venösen Rückfluss des Blutes in den Ventrikel und das Herz passt sich an dieses Ereigniss mit einem erhöhten Herzschlagvolumen an. Die Kontraktilität nimmt dabei proportional zur Sarkomerlänge zu. Auf molekularer Ebene ist dieses Phänomen wahrscheinlich in der längenabhängigen Kalzium-Sensitivität des Troponin C begründet. Der Frank-Starling-Mechanismus ist in der Herzinsuffizienz abgeschwächt, da er nur bis zu einem gewissen Grad der Sarkomerdehnung wirkt. Im Falle einer übermässigen Dilatation des Ventrikels nimmt daher die Kontraktilität ab.<sup>6</sup> Die verminderte Kontraktilität geht mit einem Remodeling des Herzgewebes einher.

#### *2.1.2.1.2 Myokardremodeling*

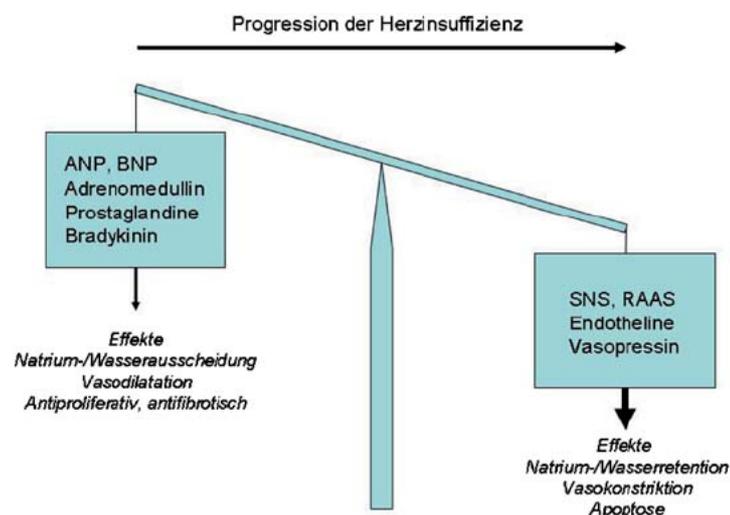
Das pathologische Myokardremodeling schließt die Zunahme der Myokardmasse ein, verbunden mit Hypertrophie der Einzelmyozyten und Änderungen in Qualität und Quantität der zellulären Matrix sowie eine Apoptoseinduktion.<sup>7</sup> A priori ist die Zunahme der Herzmuskelmasse durch Hypertrophie vorteilhaft für die Steigerung des Herzzeitvolumens und wird im gesunden Herzen durch Training herbeigeführt. Wird jedoch infolge einer chronischen Druck- oder Volumenbelastung ein kritisches Herzgewicht überschritten, so kommt es zur Unterversorgung des Myokards mit Nährstoffen und Sauerstoff und die Muskelleistung nimmt ab. Im Zuge einer Maladaptation wird die schwache Auswurfsleistung schrittweise durch eine Zunahme der Herzfrequenz, gesteigerte Kontraktilität, Vorlaststeigerung und Zunahme der Zahl kontraktiler Elemente „ausgeglichen“, wobei diese Prozesse mit der Zeit und zunehmender Ventrikeldilatation im Sinne des *circulus vitiosus* ihre Wirksamkeit verlieren.

#### **2.1.2.2 Neurohumorale Kompensationsmechanismen**

Von entscheidender Bedeutung für den Verlauf der chronischen Herzinsuffizienz ist die Aktivierung der humoralen Kompensations-

mechanismen, insbesondere des adrenergen Systems (Katecholamine), des Renin-Angiotensin-Systems (Angiotensin II, Aldosteron) und der antidiuretischen Hormone (Vasopressin, Endothelin) (Abb.2).

Der Gesamteffekt dieser Faktoren ist die arterielle Vasokonstriktion (Erhaltung des arteriellen Blutdrucks), venöse Konstriktion (Anstieg des venösen Drucks) und erhöhtes Blutvolumen. Im Ergebnis kann zeitlich begrenzt der Blutbedarf gedeckt und damit die metabolischen Funktionen aufrechterhalten werden. Langfristig jedoch beobachtet man einen zunehmenden Wirkungsverlust dieser Systeme und eine verstärkte Aktivierung von natriuretischen Peptiden (ANP, BNP), Bradykinin, Adrenomedullin und Stickstoffmonoxyd (NO), die vasodilatorisch und z.T. natriuretisch wirken.



**Abb. 2 Ungleichgewicht zwischen verschiedenen aktivierten neurohumoralen Systemen als Ursache für die Progression der chronischen Herzinsuffizienz.** (ANP, BNP= Atrial natriuretic peptide, Brain natriuretic peptide; SNS=sympathisches Nervensystem; RAAS= Renin-Angiotensin-Aldosteron-System)<sup>5</sup>

### 2.1.2.3 Veränderungen der extrazellulären Matrix bei Herzinsuffizienz

Die kardiale extrazelluläre Matrix ist definiert als ein Netzwerk, welches die konstitutiven Zellen des Myokardiums umgibt und diese stützt.<sup>8</sup> Es ist ein dynamisches, metabolisch aktives Gebilde, welches eine wichtige und unabhängige Rolle bei der Progredienz der Herzinsuffizienz spielt. Während die Hypertrophie der Kardiomyozyten ein gemeinsames Merkmal eines insuffizienten und gesunden, durch Training hypertrophierten, Herzens ist,

sind die Veränderungen und Akkumulation der ECM ein exklusives Merkmal einer Kardiomyopathie.<sup>9</sup> Bei einer Herzinsuffizienz wirkt die Anlagerung von Kollagen in der ECM anfangs adaptiv und somit förderlich für den Erhalt der adäquaten Herzleistung. Mit dem Fortschritt der Kardiomyopathie kommt es zur maladaptiven Anlagerung der ECM, welche zur systolischen und diastolischen Dysfunktion sowie Erregungsleitungsstörungen führt.<sup>10</sup>

Der Prozess des *ECM-Remodelings* ist ein dynamischer Prozess, der abhängig von der Ätiologie der Herzinsuffizienz, unterschiedlich ablaufen kann.<sup>10</sup> Das myokardiale *Remodeling* ist gekennzeichnet durch eine veränderte Zusammensetzung und Verteilung der ECM sowie eine abnorme räumliche Orientierung von Zellen und intrazellulären Komponenten. Ferner wird eine veränderte Ultrastruktur der Kardiomyozyten mit abnormer Verteilung der Mikrotubuli, Desminfilamente und Isomyosins beobachtet.<sup>11, 12</sup> Eine entscheidende Rolle beim *Remodeling* spielen die Fibroblasten, die auch der zahlreichste Zelltyp im Myokardium sind.<sup>10</sup> Diese synthetisieren und sekretieren ECM-Proteine wie Fibronectin, Laminin, Kollagen I und III, deren Anreicherung final zur Fibrose und somit zur Versteifung der Herzkompartimente führt.<sup>13, 14</sup>

Die fundamentalen Mechanismen, die der Fibrosebildung zugrunde liegen, sind bislang nur unzureichend aufgeklärt. Die intensive Forschung der letzten zehn Jahre zeigte eine Schlüsselrolle von mehreren Zytokinen bei fibrotischen Prozessen. Eine essentielle Bedeutung wird dem *Transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) zugeschrieben, der die Genexpression sowie die Anreicherung der extrazellulären Matrix induziert.<sup>15, 16</sup> Eines der zentralen Effektorproteine, die durch TGF $\beta$  induziert werden, ist *Connective tissue growth factor* (CTGF), welcher in der letzten Zeit, gemessen an der wachsenden Anzahl von Publikationen, in den Fokus der Forschung von verschiedenen Laboren rückt. CTGF ist kürzlich als ein neuer profibrotischer Faktor beschrieben worden, der einige der TGF $\beta$  Effekte wie Apoptose und Fibrose vermittelt.<sup>17</sup> Es ist gezeigt worden, dass CTGF in verschiedenen fibrotischen Erkrankungen der Haut, Niere, Lunge und des kardiovaskulären Systems stark hochreguliert ist.<sup>17</sup> Die Überexpression von CTGF steht in Zusammenhang mit einer Akkumulation der ECM in humanen atherosklerotischen Läsionen, nach Herzinfarkt sowie im valvulären und

kardialen Gewebe beim experimentellen Bluthochdruck.<sup>18-21</sup> Die starke CTGF-Überexpression sowie die Assoziation mit der Bildung der extrazellulären Matrix, lässt eine essentielle Rolle von CTGF bei fibrotischen Prozessen vermuten. In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung von CTGF für die Entwicklung, Funktion und Pathogenese des Herzens untersucht.

## **2.2 Biologie des Connective tissue growth factors (CTGF)**

### **2.2.1 Geschichtlicher Rückblick und die molekulare Struktur von CTGF**

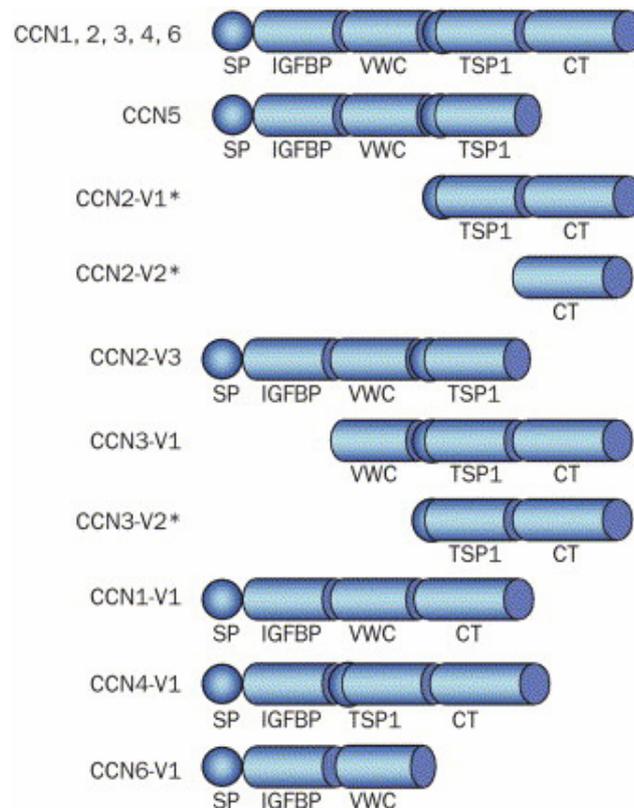
CTGF gehört zur Familie der CCN-Proteine, die im Menschen aus sechs Mitgliedern besteht.<sup>17</sup> Das Akronym CCN wurde von P. Bork 1993 geprägt um die ersten drei Mitglieder der Proteinfamilie zu beschreiben: Cysteine-rich 61 (CYR61 oder CCN1), connective tissue growth factor (CTGF oder CCN2) und nephroblastoma overexpressed (NOV oder CCN3).<sup>22</sup> Später wurden weitere drei Proteine der Familie identifiziert: Wnt-1-induced secreted protein-1 (WISP-1 oder CCN4), Wnt-1-induced secreted protein-2 und -3 (WISP-2 bzw. WISP-3 oder CCN5 bzw. CCN6). Die anfängliche Charakterisierung der CCN-Proteinfamilie als Wachstumsfaktoren ist inzwischen durch Arbeiten an transgenen und Knockout-Tieren widerlegt worden. Eine komplexe Vielfalt von neuen Funktionen der CCN-Familie ist gezeigt worden.<sup>23</sup> Es wurde daher empfohlen, die CCN-Nomenklatur anzuwenden. In der kardiovaskulär orientierten Literatur wird jedoch traditionell die ursprüngliche Nomenklatur genutzt, so dass im Laufe dieser Arbeit der Name CTGF durchgehend verwendet wird.

CTGF wurde erstmals 1991 als ein sekretorisches Protein im konditionierten Medium einer humanen umbilicalen vaskulären Endothelialzellkultur (HUVECs) gefunden und als mitogener und chemotaktischer Faktor identifiziert.<sup>24</sup> Etwa zur gleichen Zeit wurde der murine CTGF im differentiellen Screening von Serum-stimulierten Maus-NIH 3T3 Fibroblasten und TGF $\beta$ -stimulierten Maus AKR-2B Zellen gefunden.<sup>25</sup> Seit seiner Entdeckung wurde ein breites Spektrum an zellulären Aktivitäten CTGF zugeschrieben. Dazu

gehören Zelladhäsion, Produktion der extrazellulären Matrix, Proliferation, Chemotaxis und Zellmigration.<sup>26</sup>

## 2.2.2 Molekulare Struktur von CTGF

Die CCN-Proteinfamilie ist durch ihren modularen Aufbau charakterisiert.<sup>27</sup> Wie in der Abb.3 gezeigt, bestehen die CCN-Proteine aus einer N-terminalen Signalsequenz, die von vier konservierten strukturellen Modulen gefolgt wird.



**Abb. 3 Modularer Aufbau der CCN-Proteine.** Dargestellt sind full-length und trunkierte CCN Proteinisoforen, die potentiell eine biologische Aktivität zeigen. Es wird angenommen, dass CCN2-V1, CCN2-V2, und CCN3-V2 durch posttranskriptionelle Prozessierung entstehen. Ihre Anwesenheit wurde in biologischen Flüssigkeiten und Zellkulturmedium festgestellt. CCN2-V3, auch als CTGF-L bezeichnet, wurde als ein neuer Regulator der Osteoblastenfunktion identifiziert. CCN3-V1 wurde im Nukleus von Krebszellen detektiert. CCN1-V1 wurde identifiziert in normalen humanen Fibroblasten, während CCN4-V1 und CCN6-V1 vom verschiedenen Karzinomarten exprimiert werden.<sup>17</sup>

Das erste Modul zeigt eine 32%-ige Homologie zu den Insulin-like growth factor binding proteins 1-6 (IGFBPs), so dass eine biologische Funktionen der CCN-Proteine, die auf einer Bindung an IGFs beruht, postuliert wird.<sup>22, 28</sup>

Obwohl die Bindungsaffinität von CTGF an IGF deutlich geringer ist, als die von IGF und IGF-BPs, konnte eine direkte Interaktion von CTGF und IGF *in vitro* gezeigt werden.<sup>28, 29</sup> Interessanterweise gibt es CTGF-Isoformen, die das erste Modul nicht ausprägen, aber dennoch eine biologische Aktivität zeigen.<sup>26</sup> Es ist daher zu vermuten, dass IGF auf die CTGF-Isoformen mit intaktem N-Terminus eine modulatorische Funktion ausübt.

Das zweite Modul beinhaltet eine konservierte von Willebrandfaktor Typ C (VWC) Wiederholungssequenz, welcher die Funktion der Oligomerisierung zugeschrieben wird.

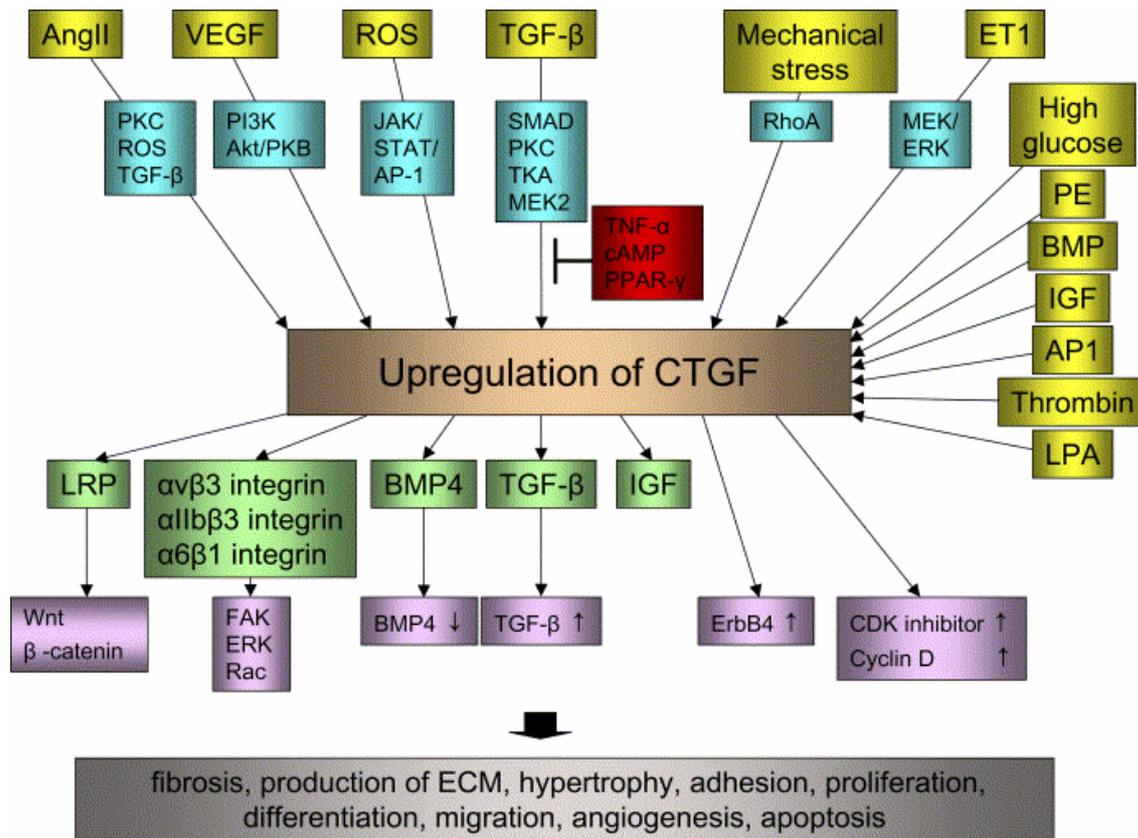
Das dritte Modul repräsentiert die Thrombospondin Typ 1 (TSP-1) Wiederholungssequenz, welche in anderen extrazellulären Proteinen gefunden wird. Der TSP-1-Domäne wird die Bindung an lösliche und matrixgebundene Glykokonjugate zugeordnet.<sup>22, 30</sup> Es konnte gezeigt werden, dass CTGF an das *low-density lipoprotein receptor associated protein (LRP)* innerhalb des TSP-Moduls bindet.<sup>31</sup>

Die letzte C-terminale Domäne beinhaltet 10 konservierte Cysteine, die in ähnlicher Form in unterschiedlichen Wachstumsfaktoren wie TGF $\beta$ , PDGF und *Nerve Growth Factor (NGF)* vorkommen. In diesen Proteinen bilden die Cysteinreste Strukturen, die der Rezeptorbindung dienen. Zwar ist so eine Bindung von CTGF nicht bekannt, aber CTGF Isoformen, die nur aus Modulen 3 und 4 bzw. Modul 4 allein bestehen, zeigen eine starke Bioaktivität.<sup>26, 32-34</sup> Weiter konnte gezeigt werden, dass CTGF mittels der C-terminalen Domäne eine Bindung mit Heparin und verschiedenen Integrinen eingehen kann.<sup>34-36</sup>

## **2.2.3 CTGF vermittelte Signaltransduktion**

### **2.2.3.1 Signalwege der CTGF-Induktion und –Regulation**

Die Expression und Induktion von CTGF wird Zelltyp-abhängig von zahlreichen Faktoren und Signalmolekülen gesteuert (siehe in Abb. 4). Hierzu gehören Agonisten von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCRs) und Wachstums- und stressinduzierte Faktoren.



**Abb. 4 Netzwerk CTGF-abhängiger Signalwege.** PKB, protein kinase B; STAT, signal transducer and activator of transcription; MEK, extracellular signal-regulated kinase. (Andere Abkürzungen sind im Text erläutert)<sup>37</sup>

So wird eine starke Hochregulation von CTGF unter Einfluss von Endothelin 1 (ET-1) und Phenylephrin (PE), Angiotensin II (AngII), Lysophosphatidischer Säure (LPA), TGFβ, *Bone Morphogenic Protein* (BMP), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Insulin-like growth factor* (IGF), mechanischem und oxidativem Stress sowie hohem Glukosespiegel beobachtet. Hingegen wirkt *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF- α), Zyklisches AMP (cAMP) und *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-γ* (PPAR-γ) inhibitorisch auf die CTGF-Induktion durch TGFβ.<sup>38-40</sup> Die Expression von CTGF wird ebenso durch Insulin gehemmt, was im Einklang mit der verstärkten CTGF-Expression während der Diabetes-induzierten Kardiomyopathie steht.<sup>41</sup> Verschiedene Signalwege sind relevant bei der Hochregulation von CTGF. Hierzu gehört die Signaltransduktion über SMAD, Protein Kinase C (PKC), Reactive Oxygen Species (ROS), RhoA, Janus Kinase (JAK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) und Extracellular-Regulated Kinase (ERK).<sup>37</sup>

### 2.2.3.2 Rezeptoren von CTGF

Trotz intensiver Bemühungen zahlreicher Forschungsgruppen konnte bislang kein spezifischer Rezeptor für CTGF gefunden werden. Vielmehr vermittelt CTGF seine Aktivität durch die Bindung an Integrine.<sup>42</sup> Integrine sind nicht kovalent assoziierte  $\alpha\beta$ -heterodimere Rezeptoren an der Zelloberfläche, die die extrazelluläre Matrix oder andere Rezeptoren auf benachbarten Zellen in einer von divalenten Kationen abhängigen Art, erkennen.<sup>43</sup> Integrine spielen eine Schlüsselrolle bei zahlreichen zellulären Prozessen wie Zelladhäsion, -migration, -signaling, -proliferation, und Zellüberleben. Hierbei stellen sie eine Transmembranverbindung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett liefern her.<sup>42, 44</sup> Beispielsweise wird die Angiogenese von Endothelialzellen durch die Bindung von CTGF an Integrin  $\alpha\beta 3$  gefördert.<sup>45</sup> Die Adhäsion der humanen Thrombozyten wird durch das Integrin  $\alpha 1\beta 3$ , die der Endothelialzellen durch  $\alpha\beta 3$  und die der Blutmonozyten durch das Integrin  $\alpha M\beta 2$  vermittelt.<sup>45-47</sup>

Ferner wird die Bindung von CTGF an Heparansulfat-Proteoglykane auf der Zelloberfläche als essentiell für die Fibroblastenproliferation und -adhäsion erachtet.<sup>34, 35</sup> Obwohl keine spezifischen Heparansulfatproteoglykane und Heparinseitenketten, die an CTGF binden, charakterisiert wurden, konnte in einer Studie gezeigt werden, dass CTGF die Proliferation und Migration von Chondrozyten durch die Bindung an das Heparansulfat-Proteoglycan Perlecan induzieren kann.<sup>48</sup>

Des Weiteren gibt es eine Studie, die die Interaktion von CTGF mit dem *low-density* Lipoproteinrezeptor (LRP) beschreibt, wobei die Signaltransduktion, bei der diese Interaktion relevant ist, nicht vollständig geklärt ist.<sup>49</sup> Es gibt Evidenzen, dass die Interaktion mit dem *low-density* Lipoproteinrezeptor eine Rolle bei der Internalisierung und Degradation von CTGF am Endosom spielt.<sup>49, 50</sup> Interessanterweise wurde gezeigt, dass CTGF durch seine Interaktion mit dem LRP den Wnt-Signalweg reguliert, wobei LRP ein Korezeptor von Wnt ist.<sup>51</sup>

### 2.2.3.3 Synergie zwischen CTGF und TGF $\beta$

Mehrere frühere Studien haben eine Verbindung zwischen CTGF und dem TGF $\beta$  hergestellt.<sup>52-54</sup> Nach einer Stimulation von Fibroblasten mit TGF $\beta$  wird die CTGF mRNA innerhalb von Minuten induziert ohne eine de novo Proteinsynthese. Ursprünglich wurde diese Stimulation auf die Aktivierung des *TGF $\beta$  response elements* im CTGF Promoter zurückgeführt.<sup>55</sup> Weitere Studien haben jedoch gezeigt, dass die TGF $\beta$  induzierte CTGF Stimulation auch mit einer Smad-Bindung an eine spezifische Promoterregion, die bevorzugt in Fibroblasten aktiviert ist, assoziiert ist.<sup>56-58</sup>

Während TGF $\beta$  und CTGF gemeinsam starke profibrotische Wirkungen zugeschrieben werden, scheinen die antiinflammatorischen und immunsuppressiven Effekte von TGF $\beta$  unabhängig von CTGF zu sein.<sup>59</sup> TGF $\beta$  und CTGF sind beide stark bei zahlreichen fibrotischen Erkrankungen überexprimiert und stimulierten die Fibrose sowohl *in vivo* als auch *in vitro*.<sup>60</sup> Die TGF $\beta$  induzierte Produktion von Kollagen kann durch CTGF-Antikörper oder Antisense-Oligonukleotide in normalen Ratten-Nieren-Zellen (NRK) oder humanen Fibroblasten aufgehoben werden.<sup>39</sup> In einem Tiermodell der Hautfibrose konnte gezeigt werden, dass nach einer subkutanen Injektion von TGF $\beta$  eine verstärkte Granulation des Gewebes auftritt mit Anreicherung von Bindegewebe, welches eine starke CTGF-Expression aufwies.<sup>61</sup> Die Gabe von CTGF alleine führte zu einer moderaten Fibroseantwort, während eine gleichzeitige Applikation von CTGF und TGF $\beta$  zu einer langfristigen und starken Anlagerung des fibrotischen Gewebes führte.<sup>61</sup>

Insgesamt bestätigen die genannten Daten die Bedeutung von CTGF als eines *down stream* Mediators von TGF $\beta$ , insbesondere im Hinblick auf die fibrotischen Effekte von TGF $\beta$ .

CTGF ist ebenso bekannt als ein Regulator der TGF $\beta$ -Aktivität. Es wurde gezeigt, dass CTGF direkt an TGF $\beta$  binden kann, wodurch es zu einer Verstärkung der TGF $\beta$ -Aktivität kommt.<sup>62</sup> Diese Bindung basiert auf der Chaperon-Funktion von CTGF, welche die Affinität von TGF $\beta$  zu seinen verschiedenen Rezeptoren erhöht. Hierbei wird die Wirkung von TGF $\beta$  an den Effektorrezeptoren intensiviert und verlängert.<sup>62</sup> Ferner konnte ein weiterer CTGF-vermittelter Mechanismus zur Potenzierung der TGF $\beta$ -Effekte gezeigt

werden. Hierbei verstärkt CTGF den TGF $\beta$ /Smad-Signalweg durch die transkriptionelle Suppression von Smad 7 und eine rasche Induktion des Transkriptionsfaktors TIEG-1.<sup>63</sup> Smad 7 ist ein bekannter Antagonist der TGF $\beta$  Signaltransduktion und TIEG-1 ist ein Repressor der Smad 7-Transkription.<sup>64, 65</sup> Durch diesen Mechanismus blockiert CTGF die durch Smad 7-vermittelte negative *Feedback*-Schleife und erhält die TGF $\beta$ -Signaltransduktion aufrecht.<sup>63</sup>

#### **2.2.4 Funktionen von CTGF im kardiovaskulären System: Implikation in Herzfibrose /-hypertrophie**

CTGF ist ein Faktor, der bei verschiedenen Prozessen wie Fibrose, Narbenbildung, Wundheilung, Angiogenese und Knochenbildung beteiligt ist. Die CTGF-mRNA und -Protein sind in einer Vielzahl von fibrotischen Läsionen der Lunge, Leber, Haut, Pankreas und Niere stark überexprimiert. Es gibt mehrere Evidenzen, dass CTGF ebenso verstärkt in kardiovaskulären Erkrankungen wie kardialer Fibrose und Atherosklerose überexprimiert wird. Nach einem akuten Myokardinfarkt wird CTGF vermehrt sowohl in Kardiomyozyten als auch in kardialen Fibroblasten expimiert.<sup>66</sup> Interessanterweise wird eine Woche nach dem Infarkt, zum Zeitpunkt, wo die Kardiomyozyten bereits aus den Infarktareal verschwunden sind, eine Kolokalisation von CTGF und TGF $\beta$  exklusiv in Fibroblasten des Narbengewebes beobachtet.<sup>67</sup> Dies stützt die gemeinsame Rolle der beiden Faktoren bei pathologischer Fibrosebildung. Ebenso wird während der fortgeschrittenen Atherosklerose beim Menschen und in der diabetischen Apolipoprotein-E-defizienten Maus CTGF stark induziert.<sup>20, 68</sup>

Mehrere Studien geben Hinweise auf die Beteiligung von CTGF bei kardialer Hypertrophie.<sup>69, 70</sup> Es ist gezeigt worden, dass zwei Hypertrophie-stimulierende Substanzen wie Phenylephrin (PE) und Endothelin-1 (ET-1) die CTGF-mRNA und -Proteinexpression explizit in Kardiomyozyten und nicht in Fibroblasten induzieren.<sup>71</sup> In Anbetracht der essentiellen Bedeutung von CTGF bei der Hypertrophie von Mesangialzellen und Chondrozyten, könnte die sehr rasche Hochregulation der mRNA (innerhalb einer Stunde) und des Proteins (innerhalb von 2-24 Stunden) in Kardiomyozyten ein autokriner

Mechanismus zur Hypertrophiestimulation sein.<sup>72, 73</sup> Die Studie funktioneller Aspekte von CTGF im kardiovaskulären System war bislang beschwerlich, da die Herstellung des rekombinanten Proteins sehr schwierig und die CTGF-defiziente Maus früh postnatal letal ist.<sup>74</sup> Histologische Analysen des Herzens der CTGF-Knockout-Maus zeigen jedoch nach ersten Untersuchungen keine Auffälligkeiten in der Herzmorphologie und -entwicklung.<sup>74</sup> Die Studie der CTGF-Funktion im adulten Herzen wäre mit Hilfe eines konditionellen Knockout-Modells möglich.

### **2.2.5 Bedeutung von CTGF bei der Pathogenese von systemischer Sklerosis (Sklerodermie)**

Systematische Sklerosis ist eine klinisch heterogene Erkrankung des Bindegewebes, die mit einer starken Immunaktivierung, einer vaskulären Schädigung sowie Fibrose assoziiert ist.<sup>75</sup> Die Morbidität und Mortalität hängt hauptsächlich mit Komplikationen in Organen wie Lunge, Herz, Nieren und Verdauungstrakt zusammen. Klinische und experimentelle Daten zeigen, dass Sklerodermie eine multifaktorielle Erkrankung ist, die auf umweltbedingte und genetische Faktoren zurückzuführen ist.<sup>76</sup> Es ist gezeigt worden, dass CTGF stark in Hautbiopsien und kultivierten Lungenfibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerosis hochreguliert ist.<sup>77, 78</sup> Es gibt genetische Indizien, dass CTGF bei der Pathogenese von systematischer Sklerosis beteiligt ist. Eine genomweite Studie an Choctaw-Indianern aus Nordamerika, die eine hohe Inzidenz für systemische Sklerosis zeigen, identifizierte eine mit der Erkrankung assoziierte Region auf dem Chromosom 6, wo auch CTGF lokalisiert ist.<sup>79</sup> Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte einen Polymorphismus im CTGF-Promoter, der mit einer signifikanten Anfälligkeit für systemische Sklerosis assoziiert ist.<sup>80</sup> Der Polymorphismus betrifft eine Region, die für die transkriptionelle Regulation von CTGF durch Sp1 und Sp3 essentiell ist. Die Balance zwischen der Sp1/Sp3-Bindung ist in Patienten mit Sklerodermie in Richtung Sp1 verschoben, was zu einer stärkeren Expression von CTGF führt.<sup>80</sup> Eine weitere Studie zeigte, dass die Regulation von CTGF mittels Sp1 und Sp3 besonders relevant im sklerotischen Gewebe ist und unabhängig vom TGF $\beta$ -Signalweg abläuft.<sup>58, 81</sup>

### 2.2.6 Funktion von CTGF in der Embryonalentwicklung/ Das CTGF-Knockout-Modell

Die Analyse der embryonalen CTGF-Expression im mittleren Entwicklungsstadium zeigte eine starke Expression der mRNA in vaskulären Geweben sowie in reifenden Chondrozyten.<sup>74</sup>

CTGF<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen einen frühen postnatal letalen Phänotyp möglicherweise aufgrund einer abnormen Atmung, die durch eine starke Deformierung des Skeletts verursacht ist. Dieser Deformierung liegt eine fehlerhafte Entwicklung des Knorpelgewebes zugrunde, die auf eine gestörte Chondrozytenproliferation und/oder -differenzierung zurückzuführen ist. Die sog. Wachstumsplatte der mutanten Knorpel zeigt eine veränderte Zusammensetzung der knorpelspezifischen extrazellulären Matrix, die für die mechanischen Eigenschaften der Knorpel verantwortlich ist. Im Laufe einer normalen Knochenentwicklung aggregieren Mesenchymalzellen zu charakteristischen Anhäufungen und differenzieren zu Chondrozyten, die die ECM sekretieren. Im Laufe der Entwicklung schreiten die in Schichten angeordneten Zellen in der Differenzierung fort. In Knorpeln, die für eine endochondriale Ossifizierung und damit Knochenbildung bestimmt sind, werden terminal differenzierte Chondrozyten apoptotisch und die Wachstumsplatte wird von Blutgefäßen und Osteoblasten beherrscht. Der Phänotyp der CTGF-Mutanten verdeutlicht ebenso die Bedeutung von CTGF für die Angiogenese an der Wachstumsplatte. Die hypertrophen Zonen der Wachstumsplatten sind in CTGF-Mutanten erweitert und die endochondriale Ossifikation ist aufgrund einer gestörten Angiogenese verhindert. Diese Defekte stehen im Zusammenhang mit einer reduzierten Expression von VEGF in der hypertrophen Zone.<sup>74</sup>

Dieser Phänotyp zeigt die Rolle von CTGF bei Zellproliferation und Matrixremodeling während der Chondrogenese sowie seine regulatorische Funktion bei der Kopplung des ECM-Remodelings und Angiogenese an der Knochenwachstumsplatte.

### 2.3 Tiermodelle der Herzinsuffizienz

Hypertrophie- und Herzinsuffizienzmodelle sind bei Mäusen gut etabliert und dienen seit langem der Untersuchung der pathophysiologischen Mechanismen, die den Herz-Kreislauf-Erkrankungen zugrunde liegen. Sie bieten ebenso ein hervorragendes Werkzeug zur Evaluation neuer Therapiekonzepte. Die Modelle beruhen auf einer mechanischen oder chemischen Behandlung der Tiere, die in einer Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz mündet. So führt eine partielle Ligatur des aufsteigenden Teils der Aorta (Aortic Banding) zur Druckbelastung, was nach 2-3 Wochen eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie zur Folge hat. Ein verbreitetes ischämisches Modell stellt die Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) dar, der zu einem akuten Herinfarkt führt.

Die chemische Stimulation mit dem Isoproterenol oder Angiotensin II, die über mikroosmotische Pumpen verabreicht werden, ist ebenso ein gut kontrollierbares und reproduzierbares Modell der kardialen Hypertrophie. Isoproterenol, strukturell ähnlich wie Adrenalin, ist ein  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenorezeptor-Agonist, der zu einer verstärkten sympathischen Reaktion führt. Eine dauerhafte Gabe von Isoproterenol induziert eine verstärkte Ino- und Chronotropie des Herzens, das in eine ausgeprägte Hypertrophie mündet. Angiotensin II ist ein Angiotensin-Rezeptor-Agonist, das über AT1-Rezeptoren vasokonstriktorisch wirkt und über eine arterielle Hypertonie zu einer kardialen Hypertrophie führt.

### **3 Zielsetzung der Studie I**

Der Ausgangspunkt dieser Studie waren Gen-Chip-Analysen an ErbB2 KO-Mäusen, die ein Modell für dilatative Kardiomyopathie darstellen. Diese Analyse ergab eine verstärkte Expression von CTGF in der KO-Maus, was mit den Literaturdaten, die über eine Überexpression von CTGF in Kardiomyopathien berichten, im Einklang steht. Außerdem gilt die Assoziation von CTGF mit der Fibrosebildung und der Akkumulation der extrazellulären Matrix als etabliert. Die Fibrose ist ein exklusives Merkmal der Kardiomyopathie, und der Grad ihrer Ausprägung korreliert mit der Progredienz der Herzinsuffizienz. Aus diesem Grund ist die Aufklärung der molekularen Ursachen der Fibrose von großer Relevanz. Im Fokus dieser Studie stand die Aufklärung der Rolle von CTGF bei diesem Prozess.

Im Rahmen der vorgestellten Arbeit sollte zunächst ein transgenes Mausmodell mit spezifischer Überexpression von CTGF im Herzen generiert werden. Die Eignung dieses Modells für eine weitere kardiovaskuläre Charakterisierung sollte durch die Validierung der CTGF-Überexpression sowie ihrer Lokalisation im kardialen Gewebe im Vergleich zu anderen pathophysiologischen Modellen überprüft werden. Im Zuge der physiologischen Charakterisierung sollten die CTGF-transgenen Mäuse zunächst hinsichtlich kardialer Hypertrophie, Herzfunktion und der profibrotischen Effekte der CTGF-Überexpression untersucht werden. Auch die Untersuchung der Auswirkung der CTGF-Überexpression auf die Kinetik des Kardiomyozyten sollte durchgeführt werden. Durch die Induktion der hypertrophen Herzinsuffizienz (Stimulation mit Angiotensin II) sollte eine mögliche Rolle von CTGF bei der Entstehung und Progredienz dieser Erkrankung aufgedeckt werden. Hierbei werden die Tiere einer eingehenden morphologischen und funktionellen Analyse des Herzens unterzogen. Insgesamt sollte dieses Projekt zum weiteren Verständnis pathophysiologischer Mechanismen, die bei Kardiomyopathie und insbesondere bei Fibrosebildung eine Rolle spielen, beitragen, um so zu neuen therapeutischen Konzepten zu gelangen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller, Standort</b>
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] UTP	PerkinElmer, Meriden, CT, USA
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP	PerkinElmer, Meriden, CT, USA
Acrylamid-/Bisacrylamid 19:1	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-/Bisacrylamid 37,5:1	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Groningen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Sigma, Steinheim
Arabinose	Sigma, Steinheim
Bactoagar	Difco Microbiology
Bactotrypton	Difco Microbiology
BH4	Sigma, Steinheim
Borsäure	Sigma, Steinheim
Bradford Reagenz	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
BSA	Sigma, Steinheim
Chloroform	Sigma, Taufkirchen
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma, Steinheim
DAPI	Sigma, Steinheim
DEPC	Serva, Heidelberg
DMEM	Gibco, Paisley, Scotland, UK
DNaseI	Boehringer Mannheim, Mannheim
dNTPs	Amersham Bioscience, NJ, USA
DTT	Sigma, Steinheim
EDTA	Sigma, Steinheim
EGTA	Sigma, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Sigma, Steinheim
FKS	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Fluoreszenzeinbettungsmedium	Dako, Glostrup, DK
G-418	Sigma, Steinheim
G418-Sulfat (Geneticin)	Invitrogen, Groningen
Glucose	Sigma, Steinheim
Glutathione Sepharosebeads	Amersham Bioscience, NJ, USA
Glycerol	Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma, Steinheim
Ham's F12K	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Harnstoff	Sigma, Steinheim
HCl	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
IPTG	Fermentas, Burlington, CDN
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Isopropanol	Sigma Taufkirchen
Kaliumacetat	Sigma, Steinheim
Kanamycin	Sigma, Steinheim

KCl	Sigma, Steinheim
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
LB-Ager	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
MEM	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	Sigma, Steinheim
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma, Steinheim
NP-40	Sigma, Steinheim
NSD1015	Sigma, Steinheim
NTPs	Promega, Madison, WI, USA
Paraffin	Roth, Karlsruhe
PCPA	Sigma, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Perchlorsäure 70 %	Sigma, Steinheim
PFA	Roth, Karlsruhe
Phosphatase Inhibitor Cocktail I + II	Roche, Mannheim
PMSF	Sigma, Steinheim
Random Hexamer Primer	Boehringer Mannheim, Mannheim
RNasin	Promega, Madison, WI, USA
Roti®-Block	Roth, Karlsruhe
Roti®-Load	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Sigma, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Steinheim
TRIZOL	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypsin/EDTA	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Tween-20	Sigma, Steinheim
Urea	Merc, Darmstadt
X-Gal	Fermentas, Burlington, CDN
Xylol	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim

#### 4.1.2 Kits, Enzyme und Marker

Tabelle 2: Kits, Enzyme und Marker

<b>Komponente</b>	<b>Hersteller, Standort</b>
Expand™ Long Template PCR System	Boehringer Mannheim, Mannheim
JetStar Plasmid Purification MAXI Kit 2.0	Genomed GmbH, Löhne
RNeasy MiniElute Cleanup-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange® II Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Cedar Creek, TX, USA
QuickSpin Columns for radiolabeled DNA purification	Roche, Mannheim
R.T.U. VECTASTAIN® Universal <sub>Elite</sub> ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
RPA II Kit	Ambion, Austin, TX, USA
Trichrom-Masson-Kit	Sigma, Steinheim

Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System	Promega, Madison, WI, USA
Prime-it RmT Random Primer Labeling-Kits	Stratagene, Cedar Creek, TX, USA
Universal Buffer für Taqman®	Roche, Mannheim
DNaseI	Roche, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, WI, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RNaseA	Boehringer Mannheim, Mannheim
SP6-RNA-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison, WI, USA
T7-RNA-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
TaqDNA Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Precision Blue Protein™ Standard All Blue	BioRad Laboratories Richmond, USA
SeeBlue®Plus2 Pre-stained Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
λ DNA/EcoRI + HindIII Marker, 3	Fermentas, Burlington, CDN
Quick-Load 100bp ladder	NEB, Frankfurt a. M.
Hyperladder 1	Bioline, Luckenwalde

### 4.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Block/ Verdünnung in</b>	<b>Hersteller, Standort</b>
Primär:			
Goat anti-CTGF	1:1000	TBST	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Mouse-anti-Phospholamban	1:500	4% Milch /TBST	Affinity BioReagents, Golden, CO, USA
Rabbit anti-GFP	1:2000	2% Milch	Dako, Glostrup, Dänemark
Rabbit anti-KEPI	1:5000	2% Milch	Charls River, Kisslegg
Rabbit anti-PP1	1:2000	TBST	Upstate, Lake Placid, USA
Rabbit anti-Ser16-PLB	1:1000	4% Milk	Badrilla, Leeds, UK
Rabbit anti-SERCA3 ATPase	1:1000	4% Milch /TBST	Affinity BioReagents, Golden, CO, USA
Rabbit anti-TroponinI	1:500	4% Milch /TBST	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Sekundär			
Donkey anti-mouse FITC	1:500	TBST	Jackson Immuno Research, Suffolk, USA
Donkey anti-rabbit Cy3	1:500	TBST	Jackson Immuno Research, Suffolk, USA
Goat-anti-mouse HRP	1:2000	TBST	Pierce, Rockford, USA
Goat-anti-rabbit HRP	1:2000	TBST	Pierce, Rockford, USA

#### 4.1.4 Plasmide und BAC's

Plasmide wurden im E.coli Stamm XL-Blue vermehrt und nach den unten aufgeführten Methoden isoliert.

Tabelle 4: Plasmide

<b>Vektorbezeichnung</b>	<b>Firma</b>
pGEM-T-easy	Promega, Heidelberg
pGEX-4T-1	Fermentas, Havover, USA
pNEOduoFRT	AG.Prof. C. Birchmeier, MDC, Berlin
pDTA	AG.Prof. C. Birchmeier, MDC, Berlin
pEGFP-N1	Clontech, Montain View, USA

Tabelle 5: BAC's und Klone

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
mKEPI CDNA (IRAVp968D08116D6)	RZPD, Berlin
BAC mit KEPI Locus (RZ24-328K10)	BACPAC, Oakland, USA

#### 4.1.5 Oligonukleotide

Die Primer wurden durch die Firma BioTeZ GmbH (Berlin-Buch) synthetisiert und im lyophilisierten Zustand geliefert. Die Oligonukleotide wurden im Wasser auf die Konzentration von 50µg/µl verdünnt und in dieser Konzentration für die PCR verwendet. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte bei -20°C.

Die für den Knock-down im Zebrafisch verwendeten Morpholinos stammten von der Firma GeneTools (Philomath, USA) und wurden für die Langzeitaufbewahrung im Wasser auf die Konzentration von 1mM verdünnt. Für die Mikroinjektion in Fischoozyten wurden die Morpholinos mit 1x Danieau Puffer auf die Konzentration von 50-200µM verdünnt.

Tabelle 6: Morpholinos

<b>Bezeichnung</b>	<b>Organismus</b>
KEPI1	GCTGGCGGTGGACATGATGGCGATG
1e2KEPI	CATTCCTCTTCTATACAACCACA
1e3KEPI	GTGATTCCTGAGGGACAGAAATAGA

<b>1xDanieau Puffer</b>	NaCl	58 mM
	KCl	0.7 mM

MgSO <sub>4</sub>	0.4 mM
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.6 mM
HEPES pH 7.6	5mM

#### 4.1.6 Zelllinien

Die HEK293-Zelllinie stammt aus den Beständen der Zellbank ATCC (Rockville, MD, USA). Die embryonalen Stammzellen (Stammname E10.4) und die Fibroblasten stammen aus dem Labor von Prof. C. Birchmeier (MDC, Berlin-Buch).

Tabelle 7: Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Organismus</b>	<b>Organ</b>
HEK293	<i>Homo sapiens</i>	Niere
E14.1 ES-Zellen	<i>Mus musculus</i>	Embryonale innere Zellmasse
Fibroblasten	<i>Mus musculus</i>	Embryonen des Mausstamms ros <sup>ex</sup> mit Neomycinresistenz

#### 4.1.7 Bakterienstämme

Tabelle 8: Bakterienstämme

<b>Stamm</b>	<b>Verwendung</b>
DH5 alpha	Plasmid-DNA-Amplifikation
XLblue	Plasmid-DNA-Amplifikation, Proteinüberexpression
DY380	Hitze induzierte homologe Rekombination
EL250	Arabinose induzierte <i>Flp</i> -Rekombination
EL350	Arabinose induzierte <i>Cre</i> -Rekombination

#### 4.1.8 Maus- und Zebrafischstämme

Für die Etablierung der KEPI<sup>-/-</sup> oder der KEPI<sup>fllox</sup> sowie der KEPI transgenen Mausstämme wurde der C57BL/6J-Inzuchtstamm verwendet. Die KEPI transgenen Mäuse wurden in der Animal Core Facility des MDC mit Hilfe des C57BL/6J-Inzuchtstamms hergestellt. Für die Stammhaltung wurden Mäuse der MDC-Tierhaltung benutzt. Die CTGF-transgenen Mäuse wurden im Labor von Prof. M. Bader am MDC im FVBN-Mausstamm hergestellt. Die Zebrafische (cmlc2:GFP) stammten aus der Zucht von Dr. S. Seyfried am MDC und wurden ursprünglich von Huang et al. beschrieben.<sup>82</sup>

#### 4.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 9: Geräte und Verbrauchsmaterialien

<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller, Standort</b>
8-Kanal-Pipette M300	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
96-Well-Fluoreszenzleser Fluoroscans Ascent FL	Labsystems, Ramsey, MS, USA
96-Well-Photometer anthos htll	Anthos Labtech Instruments, Salzburg, AT
Adhäsions-Objektträger	Histobond, Marienfeld, Lauda-Königshofen
Aldo-Xer-Geltrockner	Schütt-Labortechnik, Göttingen
Alzet®-Pumpen	Alzet, Cupertino, CA, USA
Automatische Pipette Witoped XP	Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim
Bakterienschüttler Certomat®H	B. Braun, Melsungen
Binokular MZFLIII	Leica, Wetzlar
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
C18 Protein und Peptid HPLC Säule	Vydac™, Hesperia, CA, USA
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene®Nunc, Rochester, NY, USA
Dialyseplättchen	Millipore, Billerica, MA, USA
Einwegpipetten Cellstar® 1, 2, 5, 10, 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Elektroporator 2510	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Tubes	TPP®, Trasadingen, Schweiz
Feinwaage	Sartorius Research, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
GenePulse® Küvetten	BioRad Laboratories, Richmond, USA
Horizontale Agarosegelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
HPLC-Anlage	Shimadzu, Duisburg
Hybridisierungssofen 3032	GFL, Hannover
Inkubator Zellkultur Heracell	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
IonOptix-System®	IonOptix, Milton, MA, USA
Kryoröhrchen Cryo.S	Greiner bio-one, Frickenhausen
Kryostat Microm HM560 Cryo-Star	Microm, USA
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
Kühlzentrifuge Sigma 3K12	Sigma, Osterode am Harz
Kühlzentrifuge Sorvall®PC5C Plus	Kendro, Hanau
LabTec Chamber Slides	Nunc, NY, USA
Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 1900 TR	PerkinElmer, Meriden, CT, USA
Magnetrührer MR3001	Heidolph, Schwabach
Mikrotom SM2500	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrowelle 8020	Privileg, Fürth
Millar-Katheter	Millar, A Gulf Freeway Houston, TX, USA
Mikroskop CKX31	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Nitrocellulosemembranen	Amersham Bioscience, Little Chalfon, UK
Nylonmembranen	Amersham Bioscience, Little Chalfon, UK
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Tubes	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
pH-Meter pH Level 1	WTW, Weilheim
Phosphoimager Fujix BAS2000	Fuji, Tokyo, J
Phosphoimagerplatte BAS-III	Fuji, Tokyo, J
Photometer GeneQuant pro	Amersham Bioscience, Little Chalfon, UK
Pipetten	Gilson, Langenfeld
Pipettierroboter Biomek®FX	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Potter-Homogenisator	Roth, Karlsruhe
Präzisions-Quarzglasküvetten Suprasil®	Hellma, Müllheim
PVDF-Membranen	Amersham Bioscience, Little Chalfon, UK
Refrigerated Condensation Trap RT100	Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA
Roller Mixer SRT1	Snijders, Tilburg, NL
Röntgenfilme X-ray Retina	Fotochemische Werke GmbH, Berlin
Save-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg

Schwenkplattform Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
SDS-PAGE-Gelelektrophoresekammer	BioRad Laboratories Richmond, USA
Spannungsquellen PowerPac™HC	BioRad Laboratories Richmond, USA
SpeedVac SVC100	Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA
Sterilbank Laminair®HB2448	Heraeus Instuments GmbH, Düsseldorf
Tankblotter	BioRad Laboratories Richmond, USA
TaqMan 7900HT AbiPrism	Applied Biosystems, Darmstadt
Test-Tube Rotator	Snijders, Tilburg, NL
Thermocycler PTC-200	BioRad Laboratories Richmond, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tierfutter	Sniff, Soest
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instuments GmbH, Düsseldorf
Tischzentrifuge Labofuge 400e	Heraeus Instuments GmbH, Düsseldorf
Tissue-Tek O.C.T Compound	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Transilluminator MultiImage™Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation, CA, USA
Ultraschallgerät Sonoplus	Bandelin electronic, Berlin
Ultra-Turrax T25 basic	IKA® Labortechnik, Staufen
Vakuumpumpe Vacusafe comfort	IBS Integra Bioscience, Chur, SUI
Vertikale Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Visual Sonics Vevo770 (Echogerät)	Toronto, Ontario, Kanada
Vortexer Genic 2	Bender & Hobein AG, Zürich, SUI
Waage 440-43N	Kern & Sohn GmbH, Baldingen-Frommern
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Whatmanpapier	Whatman® International, Maidstone, UK
Zellkulturschalen und -flaschen	TPP®, Trasadingen, SUI

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Nukleinsäuren

#### 4.2.1.1 *Isolierung von Nukleinsäuren-analytischer Maßstab*

Die Plasmid DNA wurde aus einer Bakterienkultur (4ml LB-Medium), die über Nacht bei 37°C kultiviert wurde, gewonnen. Sie wurde mittels alkalischer Lyse nach Birnboim & Doly (1978) isoliert. Die Bakterien wurden pelletiert, in GTE-Puffer resuspendiert und durch Zugabe des gleichen Volumens Lysispuffer aufgeschlossen. Durch Zugabe von 1.7 M Kaliumacetat (Endkonzentration) wurden die genomische DNA und Zelltrümmer ausgefällt und durch eine Zentrifugation pelletiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde mit Isopropanol ausgefällt, mit 75 %igem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer bzw. ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Bei größeren Ansätzen (ca. 250 ml Kulturmedium) wurde zur Plasmidisolierung der JetStar Plasmid Purification MAXI Kit 2.0 nach den Angaben des Herstellers genutzt.

<b>GTE-Puffer</b>	Glucose	50 mM
	EDTA pH 8.0	10 mM
	Tris-HCl pH 8.0	25 mM
	RNaseA	0.4 mg/ml
<b>Lysispuffer</b>	NaOH	100 mM
	SDS	0.5 %
<b>TE-Puffer</b>	Tris-HCl pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM

#### 4.2.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus Geweben

Für die Genotypisierung der Versuchstiere wurde ihre genomische DNA benötigt. Hierzu wurden Schwanzbiopsien über Nacht in je 100 µl Ohrenpuffer bei 55°C verdaut. Anschließend wurde die im Puffer enthaltene Proteinase K durch Erhitzen der Proben für 10 min auf 95°C denaturiert. Zu den Proben wurden dann je 750 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNaseA gegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Lösungen für die PCR verwendet werden.

<b>Ohrenpuffer</b>	Tris-HCl pH 8.0	100 mM
	Proteinase K	1 mg/ml
	EDTA	5 mM
	NaCl	200 mM
	SDS	0.2 %
<b>TE-Puffer</b>	Tris-HCl pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM

#### 4.2.1.3 Isolierung von RNA aus Geweben und Zellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben wurde diese im flüssigen Stickstoff zum feinen Pulver zermörsert. Das Pulver wurde im TRIZOL-Reagenz aufgenommen (100mg Gewebepulver/ 1ml Trizol) und sorgfältig resuspendiert. Die Isolierung wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die durch Isopropanolfällung gereinigte RNA wurde anschließend in DEPC-Wasser aufgenommen.

Die RNA-Isolierung mit TRIZOL hat den Vorteil der geringen DNA-Kontamination. Trotzdem wurden die RNA-Präparationen vor ihrer



durch Vergleich mit den oben aufgeführten Molekulargewichtsmarkern abgeschätzt werden.

<b>TAE-Puffer</b>	Tris-Acetat EDTA	pH 7.8	40 mM 1 mM
<b>10 x DNA-Proben-Puffer</b>	Saccharose Bromphenolblau in TE-Puffer		40 % 0.02 %

#### **4.2.1.7 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen**

Die durch Agarosegelelektrophorese nach Größe aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht (300 nm) visualisiert, die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel isoliert. Ein Aliquot der isolierten DNA wurde erneut einer Agarosegelelektrophorese unterzogen und Ausbeute und Fragmentgröße durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker abgeschätzt.

#### **4.2.1.8 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren**

Restriktionsenzyme wurden mit den vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Reaktionspuffern verwendet. Ein analytischer Restriktionsansatz enthielt ca. 0.2-1 µg DNA, 1 µl des entsprechenden 10-fach-Puffers, 1 µl (circa 10 u) des Restriktionsenzym und ddH<sub>2</sub>O ad. 10 µl. Die Ansätze wurden 1-2 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Sollte DNA im präparativen Maßstab geschnitten werden, wurden bis zu 50 µg DNA in einem entsprechend größerem Volumen mit ca. 50 u Restriktionsenzym über Nacht angesetzt. Bei Doppelrestriktionen wurde ein Puffer gewählt, in dem beide Restriktionsenzyme über eine Aktivität von 75-100 % verfügten.

#### 4.2.1.9 Ligation von Nukleinsäuren

Für die Ligation doppelsträngiger DNA in Plasmid-DNA wurden folgende Ansätze genutzt: ca. 25 ng Vektor-DNA, zu klonierendes Fragment im 2-5-fachen molaren Überschuß, 1 µl des 10-fach Ligasepuffers, 1 µl T4-DNA-Ligase (1 u/µl) und H<sub>2</sub>O ad. 10 µl. Die Ansätze wurden 20 min. In Raumtemperatur inkubiert und dann für die Transformation in Bakterien verwendet.

#### 4.2.1.10 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen von Plasmiden und PCR-Produkten wurden von der Firma Invitek (Berlin-Buch) durchgeführt. Ein Großteil der benötigten Primer wurde von der Firma bereitgestellt, alle weiteren Primer sind in Tab. 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Sequenzierungsprimer

<b>Konstrukt</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Primersequenz 5´-3´</b>
pDTA/ Exon1 KEPI	Kepiseqrev.	GATCCGGACACCGCTCTT
	Kepiseq for.	GGATCCAGCGTCTAGGCCG
pDTA/ Exon1 KEPI	BelowUfor	CAC TCT GTC AGG CTA AAG
pNEO duoFRT	FRTrev	TCCATTCTCGTACGAACGGTTAC
DTA-Vektor	DTA_Antisense	TGTTCGAATTCGCCAATGAC

#### 4.2.1.11 Reverse Transkription

Die Erstellung von cDNA aus mit DNaseI vorbehandelter Gesamt-RNA wurde folgendermaßen durchgeführt: Die RNA wurde mit 6.5 µM Random Hexamer Primern in DEPC (Endvolumen 15.25 µl) für 3 min bei 80°C denaturiert und sofort auf 0°C abgekühlt. Danach wurde pro Ansatz der in Tab. 11 angegebene Mastermix hinzu pipettiert.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für Reverse Transkription

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
1st strand buffer (5 x)	6 µl
dNTPs (5 mM)	3 µl
RNasin (40 u/µl)	0.75 µl
DTT (100 mM)	3 µl
M-MLV (200 u/µl)	2 µl

Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte wiederum für 10 min eine Denaturierung bei 80°C, die mit einer schnellen Abkühlung auf Eis endete. Die erhaltene cDNA-Lösung konnte nun als Template für eine PCR eingesetzt werden.

#### 4.2.1.12 Polymerasekettenreaktion

##### 4.2.1.12.1 PCR zur Genotypbestimmung

Die PCR zur Bestimmung des Genotyps der CTGF- und KEPI- transgenen Mäuse wurde unter Verwendung der *Taq* DNA Polymerase mit dem in Tab.14 abgebildeten Reaktionsansatz durchgeführt.

Tabelle 12: Primer für die Genotypisierung der transgenen CTGF- und KEPI Tiere.

<b>Primerbezeichnung</b>	<b>Primersequenz 5´-3´</b>
Hnetup	ATGTTATATGGAGGGGGGCAAA GTT
Hnetlo	TCCACGCCAGCCAGAA

Tabelle 13: PCR-Programm für Genotypisierung von transgenen Tieren

<b>Schritt</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1	Denaturierung	94°C	3min.
2 x35	Denaturierung	94°C	20sec.
	Annealing	58°C	30 sec.
	Elongation	72°C	50sec.
3		72°C	5min.
4		4°C	For ever

Tabelle 14 : Reaktionsansatz für Genotypisierung

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
genomische DNA	2µl
PCR-Puffer (10x)	5µl
upper Primer (20µg/µl)	1,5µl
lower Primer (20µg/µl)	1,5µl
dNTPs (5mM)	2,5µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2µl
<i>Taq</i> Polymerase	0,2µl (1U)
ddH <sub>2</sub> O	35,3µl

Anschließend erfolgte die Analyse der PCR-Fragmente auf einem 2% Elektrophoresegel.

4.2.1.12.2 PCR kleiner Amplikons

Kurze Fragmente (bis zu 1000bp) wurden ebenfalls mit Hilfe der *Taq*-Polymerase amplifiziert. Die PCR-Produkte dienten zu verschiedenen Zwecken, die in den nachfolgenden Tabellen angegeben sind. Alle PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEMTeasy subkloniert.

Tabelle 15. PCR-Programm für kurze Fragmente.

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	94°C	3min.
2 x35	Denaturierung	94°C	20sec.
	Annealing	primerabhängig	40 sec.
	Elongation	72°C	50sec.
3		72°C	5min.
4		4°C	forever

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die Amplifikation von kleinen PCR-Fragmenten

Komponente	Volumen
genomische DNA	2µl
PCR-Puffer (10x)	5µl
upper Primer (20µg/µl)	1,5µl
lower Primer (20µg/µl)	1,5µl
dNTPs (5mM)	2,5µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2µl
<i>Taq</i> Polymerase	0,2µl (1U)
ddH <sub>2</sub> O	35,3µl

Tabelle 17: Primer für den KEPI-Targeting Vektor zur Herstellung der klassischen und konditionellen „Knockout“ Maus.

Konstrukt	Bezeichnung	Primersequenz 5'-3'
pDTA	U5'homtotal	CTAGACTAGT CATCTTAGCAAAAGGGAAC
	T3'homtotal 3'	CTAGACTAGTGTTTCATGGCTAGCATGCCCTGG
pNEOduoFRT	I3'HL5'Xho1	CCGCTCGAGAAGAGCGGTGTCCGGATC
	J3'HL3'SpeHind	CCCAAGCTTGACTAGTGAGCCACCCAGGTGTAGT
	K3'HL5'Not	ATAAGAATGCGGCCGCCCTTTGCCTGCGCCCTAA
	L3'HL3'Sac	CCCCGAGCTC TCTTAAGACTCTCGGGAA
pNEOduoFRT	M5'HL5'XhoNot	CCGCCTCGAGACGCGGCCGCAATGCTCCAGGTC
		TTGAT
	N5'HL3'Hind3	CCCCAAGCTTAGGCAGGAGACAGTCGGT
	O5'HL5'BamH1	CGCGGATCC CCCAGACGATCCACGCCA
	P5'HL3'Not1	ATAGTTTAGCGGCCGCATCCTTGCGGAGGGAGGC
		G
pNEOduoFRT	O5'HL5'Kpn1	GGTACCCAGACGATCCACGCCA
	P5'HL3'Hind3	AAGCTTATCCTTGCGGAGGGAGGCG
	I3'HL5' Not/Spe1	GCGGCCGCACTAGTAAGAGCGGTGTCCGGATC
	J3'HL3' Sac2	CCGCGGAGCCACCCAGGTGTAGT

Tabelle 18: Primer zur Herstellung der transgenen MLC-2-KEPI Maus

<b>Konstrukt</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Primersequenz 5'-3'</b>
β-Globin+SV40pA in pBlueScript SK	KEPstfor.	CTGCAGATGTCGGTGGTGACTIONGGC
	KEPstfev.	CTGCAGTCATACGCTCTTCTTCTG
β-Globin+SV40pA in pBlueScript SK	MLC2Kpn1	GGTACCGCCCATGTGGCTGGGCCG
	MLC2Xho1	CTCGAGTGGCCGGCCCTGCTGTG

Tabelle 19: Sonden für Southern Blot

<b>Konstrukt</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Primersequenz 5'-3'</b>
pGEM-T-easy	A3'SOUTH5'5'	CATCTTAGCAAAAGGGAAC
	B3'SOUTH3'	TTAGGGAAGGGCTTCAAAG
pGEM-T-easy	C5'SOUTH5'	TATATTCATTCCAGAACACTIONG
	D5'SOUTH3'	TGCCAAGATTCTCTGCCTC

Tabelle 20: Primer für die RPA-Sonden

<b>Bezeichnung</b>	<b>Primersequenz 5'-3'</b>
KepiRPAup (Ratte)	GTGCTGGAAGAATGGATCGT
KepiRPAlo (Ratte)	TCAGCTTCCTCATGCCTCTT
CTGFprotub	
CTGFprotlo	

Tabelle 21: Primer für die Amplifikation der KEPI cDNA

<b>Konstrukt</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Primersequenz 5'-3'</b>
pGEX-4T-1	formKEPISma1	CCCGGGATGTCGGTGGTGACTIONGGC
	revmKEPIXho1	CTCGAG TCATACGCTCTTCTTCTG
pEGFP-N1	formKEPIXho1	CTCGAGATGTCGGTGGTGACTIONGGC
	revEGFPPvu1	CACAACCTAGAATGCAGTGCGATCG

Tabelle 22: Primer für in situ-Sonden

<b>Bezeichnung</b>	<b>Nachgewiesene mRNA</b>	<b>Primersequenz 5'-3'</b>
CTGFprodub	Ratten CTGF	GGCTCCTTGAATCGATAAGC
CTGFprotlow		
ZfKEPIforw	Zebrafisch KEPI	TCCACCGCCAGCGCAGAGAC
ZfKEPIrev		TCTTATCCTGCCGAGCAGC
KEPIup	Maus KEPI	ACAAGGCCAGGTGTGTTTTTC
KEPIdo		GGCAAAGCATCTCAACCAAT

#### 4.2.1.12.3 PCR zur Klonierung großer Fragmente (Long Range PCR)

Um den KEPI-Lokus zu amplifizieren, der anschließend in den Targeting-Vektor pDTA eingebracht werden sollte, wurde das Expand™ Long Template

PCR System verwendet, welches DNA-Polymerasen mit *proof-reading*-Aktivität enthält. Es wurde hierbei nach der beigefügten Vorschrift gearbeitet. Als Template der PCR diente die gereinigte BAC-DNA.

Tabelle 23: PCR-Programm für Long Range PCR.

<b>Schritt</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1	Denaturierung	94°C	2min.
2 x10	Denaturierung	94°C	10sec.
	Annealing	primerabhängig	30 sec.
	Elongation	68°C	1kb/min.
3 x20	Denaturierung	94°C	10sec.
	Annealing	Primer-abhängig	30 sec.
	Elongation	68°C	1kb/min.+20 sec./Zyklus
4		68°C	7min.
5		4°C	forever

Tabelle 24: Reaktionsansatz für die Long Range PCR.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
DNA (100 ng/µl)	5 µl
Puffer 2 (10 x)	5 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Primer for (10 µM)	1 µl
Primer rev (10 µM)	1 µl
Enzym-Mix (5 u/µl)	0.75 µl
ddH <sub>2</sub> O	35.75 µl

Tabelle 25: Primer für die Long range-PCR

<b>Bezeichnung</b>	<b>Primersequenz 5´-3´</b>
U5´homtotal	CTAGACTAGTCATCTTAGCAAAAGGGAAC
T3´homtotal 3´	CTAGACTAGTGTTTCATGGCTAGCATGCCCTGG

#### 4.2.1.13 Real-Time-PCR (TaqMan®-PCR)

Real-Time-PCR ist eine effiziente Methode zur quantitativen Analyse der Genexpression. Die TaqMan®-PCR ist eine von vielen Formen der Real-Time PCR, und sie benötigt neben dem Forward- und Reverse-Primer eine spezifische TaqMan®-Sonde. TaqMan®-Sonden sind Oligonukleotide, die kovalent mit einem Quencher- und Reportermolekül (TAMRA/FAM) markiert sind. Durch den Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) kommt es nach Hydrolyse des Nukleotids, durch die Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase, zur Fluoreszenz. Dieses Fluoreszenzsignal, steht in

proportionaler Beziehung zur Menge des Amplikons. Die TaqMan<sup>®</sup>-PCR wurde gemäß der Tab. 26 durchgeführt.

Tabelle 26: Reaktionsansatz für die TaqMan<sup>®</sup>-PCR.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
cDNA	4 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
Sonde (TAMRA/ FAM) (10 µM)	1 µl
Universal PCR Master Mix	10 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad. 20µl

Tabelle 27: PCR-Programm für TaqMan<sup>®</sup>-PCR.

<b>Schritt</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1	Denaturierung	95°C	10 min
2	Denaturierung	95°C	15 sec
3	Annealing	60°C	1 min
4	Elongation	50°C	1 min
5	Denaturierung	94°C	10sec.
2-5			39 Wiederholungen
5		4°C	For ever

Tabelle 28: PCR-Primer für TaqMan<sup>®</sup>-PCR.

<b>Primerbezeichnung</b>	<b>Primersequenz</b>
serca+2-981R	CCCCAAACTCGTCTAGCTTCTG
serca+2-906F	GGCAAGATCCGGGATGAAAT
serca+2-928T (Probe)	TGGCAACAGAACAGGAGAGAACACCCCTA
CTGF Ratte. 491F	CGCCAACCGCAAGATTG
CTGF Ratte -556R	ACGGACCCACCGAAGACA
CTGF Ratte 509T (Probe)	CGTGTGCACTGCCAAAGATGGTGC
HIF-1alpha384F	CACCGATTCCGCATGG
HIF-1alpha450R	TTCGACGTTCAGAACTCATCTTTT
HIF-1alpha406T(Probe)	CCGGCGGCGAGAACGAGAAG
TGFβ1.1001F	AAACGGAAGCGCATCGAA
TGFβ1.1063R	GGGACTGGCGAGCCTTAGTT
VEGF-70F	CATCTTCAAGCCGTCCTGTGT
VEGF.txt-136R	CTCCAGGGCTTCATCGTTACA
VEGF.txt-93T	CGCTGATGCGCTGTGCAGGCT
PECAM-1745F	CTGCAGGCATCGGCAAA
PECAM-1807R	GCATTTTCGCACACCTGGAT
PECAM-1763T	TGGTCAAGAGAAGCGGCCTGGTACC
GAPDH-F	AACGACCCCTTCATTGACCTC
GAPDH-R	CTTCCCATTCTCAGCCTTGACT
GAPDH-T	ACCCACGGCAAGTTCAACGGCAA

#### **4.2.2 Ribonuclease-Protection-Assay (RPA)**

Der Ribonuklease Protection Assay (RPA) ist eine sensitive Methode zur Detektion und Quantifizierung von mRNA. Das Prinzip basiert auf der Bindung einer radioaktiv markierten Antisense-RNA an ihre komplementäre RNA. Die resultierende Doppelstrang-RNA ist im Gegensatz zu den einzelsträngigen RNAs vor dem Abbau durch RNA-spezifische Nukleasen (RNase A/TI) geschützt und kann nach elektrophoretischer Auftrennung im Harnstoffgel anhand ihrer Radioaktivität qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Für die RPAs wurde der RPA-Kit II genutzt. Als Kontrollen werden bei einem RPA immer eine Y<sup>+</sup>- und ein Y<sup>-</sup>-Probe mitgeführt. Sie enthalten jeweils eine den Proben gleiche Yeast-RNA-Menge. Die Y<sup>-</sup>-Probe wird nicht mit RNase A/TI verdaut. Sie enthält also am Ende des RPA die unverdaute Sonde und ist somit eine Kontrolle für Sondenzustand und -größe. Die Y<sup>+</sup>-Probe hingegen sollte theoretisch keine Homologien zur nachzuweisenden RNA aufweisen. Hier erwartet man am Ende der RPA eine komplett verdaute Sonde und damit eine leere Spur auf dem Gel. Die Y<sup>+</sup>-Probe ist also eine Kontrolle für die Wirksamkeit des RNase Verdaus.

##### **4.2.2.1 Vorbereitung der RNA**

10-40 µg der RNA Probe wurden jeweils in ein Tube pipettiert und mit einer SpeedVac lyophilisiert. Die so vorbereitete RNA wurde entweder sofort für die Hybridisierung eingesetzt oder bei -20°C eingelagert.

##### **4.2.2.2 Sondenherstellung**

Mittels spezifischer Primer und Nutzung der PCR wurde zunächst ein zwischen 200 und 400 bp langes Fragment der cDNA der interessanten RNA amplifiziert. Dieses wurde in den pGEM<sup>®</sup>-T<sub>easy</sub> Vektor ligiert und sequenziert. Je nach Orientierung des Inserts wurde der T-Vektor anschließend mit Hilfe eines passenden Restriktionsenzym linearisiert. Hierzu wurden 10 µg DNA mit 5 µl Enzym und 5 µl passenden 10 x Puffer in einem Gesamtvolumen von

50 µl über Nacht bei 37°C verdaut. Anschließend wurde die linearisierte DNA über eine Qiagen-Säule aufgereinigt.

500-1000 ng des geöffneten Sondenvektors wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl 1 h bei 37°C zusammen mit den Ribonukleotiden ATP, GTP und CTP (0.4 mM) und dem radioaktiven [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP (2 mM) inkubiert. Ferner befanden sich RNA-Polymerasepuffer, DTT (4 mM), RNasin (2 u/µl) und die jeweilige RNA-Polymerase (SP6 oder T7 mit 4 bzw. 1 u/µl) in dem Ansatz. Es folgte ein Verdau mit 0.1 u/µl DNaseI für 30 min. Die so entstandenen Sondenmoleküle wurden mit Hilfe der QuickSpin Kolumne für radioaktiv markierte DNA Aufreinigung entsprechend der Herstellerhinweise von freien Nukleotiden gereinigt. Zur Kontrolle der Sonden wurden 2 µl der gereinigten Sonde zusammen mit 7 µl Ladepuffer auf ein Harnstoffgel aufgetragen. Dieses Gel lief anfänglich bei einer Spannung von 250 V und später bei 300 V. Als Laufpuffer diente TBE. Die Sondenaktivität in cpm/µl wurde mit Hilfe eines Szintillators bestimmt.

<b>Harnstoffgel</b>		
	Harnstoff 9M	7M
	10 x TBE	1X
	Acrylamid-/Bis-Acrylamid 19:1	5% (v/v)
	APS	0,0008% (v/v)
	TEMED	0,001% (v/v)

#### **4.2.2.3 Hybridisierung**

Zu den eingeeengten RNA-Proben wurden jeweils 20 µl Hybridisierungspuffer gegeben. Der Puffer enthielt 20.000-40.000 cpm der spezifischen RNA-Sonde und je nach Versuchsaufbau zusätzlich 2500-20.000 cpm einer L32- oder GAPDH-Sonde. Die RNA und das Sondengemisch wurden gut gemischt und zur Entfernung von eventuell ausgebildeten Sekundärstrukturen 5 min bei 95°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C für 12-18 h in einem Hybridisierungsofen.

#### **4.2.2.4 Aufarbeitung**

Nach Ablauf der Hybridisierungszeit wurden die nicht hybridisierten Sondenmoleküle und RNAs mit 200 µl Verdauungspuffer und 2.5 µl RNase

A/TI 1 h bei 37°C verdaut. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der RNase und die gleichzeitige RNA-Fällung mit 300 µl des Inaktivierungsmix für 20 min bei -20°C. Die RNA wurde anschließend pelletiert (13.000 g, 20 min, 4°C) und vollständig vom Überstand befreit. Die entstehenden Pellets wurden in 8 µl Ladepuffer aufgenommen und auf ein Harnstoffgel aufgetragen. Das Gel wurde mit 250 V gestartet und dann später 90 min bei 300 V gefahren. Als Laufpuffer diente wiederum TBE. Danach wurde das Gel auf Whatman-Papier überführt und 2 h bei 80°C auf einem Vakuumgeltrockner getrocknet. Anschließend wurde für 4 - 48 h eine Phosphoimagerplatte aufgelegt, welche die Autoradiografie des Gels festhielt. Die Platte wurde abschließend in einen Phosphoimager eingelesen.

### 4.2.3 Proteinbiochemie

#### 4.2.3.1 Proteinisolation aus Geweben

Eingefrorene Organe wurden im flüssigen Stickstoff zum feinen Pulver zermörsert und in 1 ml RIPA-Puffer (mit 1 mM PMSF und Complete Protease Inhibitor Cocktail) je 100 mg Gewebe lysiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert, 30 sec ultraschallbehandelt und zentrifugiert (13.000 g, 20 min, 4°C). Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde photometrisch mit der Bradford-Methode bestimmt. Es wurden Aliquots mit 30 µg Gesamtprotein angelegt, bei -80°C eingelagert oder direkt bei der SDS-PAGE eingesetzt.

<b>RIPA-Puffer</b>	Tris	6g
	NP 40	10g
	Natriumdesoxycholat	2,5g
	NaCl	8,7g
	NaF	42mg
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	183mg
	EGTA	380mg
	Aprotinin	1mg
	Leupeptin	1mg
	Pepstatin	1mg

#### **4.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentraion mittels der Bradford-Methode**

Die Gesamtproteinmenge der Lysate wurde mit der Bradfordmethode bestimmt. Hierzu wurde bei jeder Messung eine Standardkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen im jeweilig verwendeten Lysispuffer der Proben mitgeführt. Dabei wurden 10 Werte von 0.1-2.5 µg BSA/µl verwendet. Die Proben wurden ggfs. verdünnt, um innerhalb des Konzentrationsbereiches der Standardreihe zu liegen. Für die eigentliche Messung wurden je 5 µl Probe bzw. BSA-Standard mit 250 µl Bradfordreagenz gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die 96-Well-Platte wurde in einem 96-Well-Photometer bei 595 nm vermessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde unter Nutzung der Standardgeraden bestimmt.

#### **4.2.3.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die Auftrennung mit Hilfe der SDS-PAGE, wurden die mit Roti<sup>®</sup>-Load SDS-Ladepuffer versetzten Proben zunächst 5 min bei 95°C denaturiert.

Die zur Auftrennung verwendeten Trenngele hatten üblicherweise eine Konzentration von 8-15 % Acrylamid-/Bisacrylamid 37,5:1 in 375 mM Tris pH 8.8. Die Sammelgele waren 5 %ig in 125 mM Tris pH 6.8.

Der Gellauf erfolgte zunächst bei 80 V für 15 min und anschließend bei 150 V für ca. 1 h in SDS-PAGE-Laufpuffer.

<b>SDS-PAGE-Laufpuffer</b>	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0.1 %

#### **4.2.3.4 Proteinnachweis mittels Coomassie Färbung**

Um überexprimierte Proteine aus dem Lysat von Bakterien nachzuweisen, wurden diese zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde

das Gel in der Coomassie-Färbelösung in der Mikrowelle bis zum Aufsteigen erster Kochblasen erwärmt. Die Coomassie-Lösung wurde verworfen und durch die Entfärbelösung ersetzt. Nach 1 h Entfärbereaktion wurde das Gel in ddH<sub>2</sub>O überführt.

<b>Comassie-Färbelösung</b>	Comassie Brilliant Blue R250	0.025 %
	Methanol	40 %
	Essigsäure	7 %
<b>Comassie-Entfärbelösung</b>	Methanol	40 %
	Essigsäure	7 %

#### 4.2.3.5 Blotten von Proteinen

Zum Blotten wurden PVDF-Membranen genutzt. Diese wurden zuvor jeweils 1 min in Methanol inkubiert. Geblottet wurde in einer eisgekühlten Tankblotvorrichtung für 2 h bei 100 V oder über Nacht bei 20V.

<b>Transferpuffer</b>	Glycin	200mM
	Tris	25mM
	Methanol	20 %

#### 4.2.3.6 Blocken von Membranen

Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen nach dem Blotten kurz in ddH<sub>2</sub>O gespült und anschließend je nach verwendetem Antikörper für 1 h bei RT in TBS, TBST oder PBST mit 5 % Milchpulver oder in Roti-Block auf einem Roller Mixer inkubiert.

<b>TBS</b>	Tris	50mM
	NaCl	150mM
	pH 7.5	
<b>TBST</b>	Tween20	0,5%
	In TBS	

#### 4.2.3.7 Inkubation mit primären Antikörpern

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte nach den Angaben des Herstellers entweder in Roti-Block, TBS oder TBST mit Milchpulver über Nacht bei 4°C oder 2 h bei RT auf einem Roller Mixer. Anschließend wurden die Membranen 2- bis 4-mal für 5-10 min in TBST gewaschen.

#### **4.2.3.8 Inkubation mit sekundären Antikörpern**

Die Inkubation mit dem sekundären Meerrettichperoxidase-konjugierten Antikörper erfolgte in Roti-Block bzw. in TBS, TBST oder PBS mit Tween und 5 % Milchpulver für 1 h bei RT auf dem Roller Mixer. Anschließend wurde die Membran 2- bis 4-mal 5 min mit TBST oder PBST gewaschen.

#### **4.2.3.9 ECL-Reaktion**

Für die ECL-Reaktion wurde das SuperSignaling<sup>®</sup> West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) oder ECL-Kit (Amersham) nach den Angaben des Hersteller genutzt. Nach 5 min Inkubation mit dem Lumineszenzsubstrat wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm für 5 sec bis 1 h auf die Membran aufgelegt und anschließend entwickelt.

#### **4.2.3.10 Pull down-Assay**

Für den Pull down-Assay wurden Glutathione-Sepharosebeads verwendet, die mit 50µg rekombinatem KEPI-GST bzw. GST in 1ml PBS 2h bei RT beschichtet wurden. Die beschichteten Beads wurden 4-5 mal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 500µg Herzproteinlysate unter einer sanften Rotation in 4°C inkubiert. Nach 3 min Zentrifugation bei 2000 rpm in einer gekühlten Tischzentrifuge wurden die Beads pelletiert und 5-mal mit dem Proteinlysispuffer (meistens RIPA-Puffer) gewaschen. Anschließend wurde der Puffer möglichst vollständig entfernt und das Bead-Pellet im 30µl Ladepuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert. Das Bead-Pellet wurde erneut pelletiert und der Überstand mit Ladepuffer auf ein Acrylamidgel aufgetragen.

War das Experiment für eine weitere Analyse mittels Massenspektrometrie bestimmt, so wurden besondere Schutzmassnahmen getroffen, um Kontaminationen mit Keratin vorzubeugen. So wurde zu jeder Zeit ein Schutzkittel, Kopfhaut, Handschuhe und Mundschutz getragen. Alle Plastik-

und Glasmaterialien wurden besonders gründlich mit ddH<sub>2</sub>O und 70% Ethanol gewaschen.

#### **4.2.3.11 Massenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie wurde in der Core facility des MDC von Herrn Dr. A. Otto durchgeführt. Das Acrylgel, in dem die Pull-down-Fraktion elektrophoretisch aufgetrennt wurde, wurde in 6 Fragmente unterteilt. Die Fragmente enthielten Proteine mit der molaren Masse zwischen 50-25 kD.

#### **4.2.4 Bakterien- und Zellkultur**

##### **4.2.4.1 Transformation von Bakterien**

Für die Einbringung von Plasmid- bzw. BAC-DNA in Bakterien wurde die Methode der Elektroporation genutzt. Hierzu wurden je Ansatz 50 µl elektrokompente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Ligationsansatz bzw. 10µg frisch präparierter BAC-DNA versetzt. Dieses Gemisch wurde in eine GenePulse<sup>®</sup> Elektroporationsküvette (Spaltgröße 0,1 cm) überführt und in einem Elektroporator für 5 msec einem Impuls von 1350 mV ausgesetzt. Daraufhin wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zu den Bakterien gegeben und diese 1 h bei 37°C angeschüttelt. Anschließend wurden 100 µl des Ansatzes auf einer antibiotikahaltigen LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

##### **4.2.4.2 Vermehrung und Selektion von Bakterien**

###### **4.2.4.2.1 Vermehrung auf Platten**

Um erfolgreich transformierte Bakterien zu selektieren, wurden die Transformationsansätze mit einem Dregalskispatel auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

<b>LB-Platten</b>	Baktoagar	10-15 %
	X-Gal	100 µg/ml
	IPTG	80 µg/ml
	Ampicillin oder Kanamycin in LB-Medium	100 µg/ml

#### 4.2.4.2.2 Vermehrung in flüssigen Medien

Um Bakterien in Flüssigmedien zu vermehren, wurde entweder eine Bakterienkolonie von einer Platte in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt, oder 1 ml einer Flüssigkultur mit hoher optischer Dichte wurde in 250 ml LB-Medium gegeben und auf die gleiche Weise behandelt.

<b>LB-Medium</b>	Hefeextrakt	5 g
	Bactotrypton	10 g
	NaCl	10 g
	Ampicillin oder Kanamycin	100 µg/ml
	ad. 1000 ml H <sub>2</sub> O	

#### 4.2.4.3 Proteinexpression in Bakterien

Die Expressionskonstrukte wurden mit Hilfe der Elektroporation in die *E.coli* des XLblue-Stammes eingebracht. Von einer LB-Platte wurde am nächsten Tag eine Kolonie gepickt und über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Medium angeschüttelt. Am nächsten Morgen wurden je 2.5 ml der Kultur mit 2.5 ml frischem LB-Medium gemischt. Zu einem der Ansätze wurde zwecks Expressionsinduktion 1 mM IPTG (Endkonzentration) gegeben, der andere Ansatz blieb als Kontrolle uninduziert. Die Ansätze wurden weitere 4 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien pelletiert (8000 g, 5 min, 4°C) und mit 600 µl PBS oder RIPA-Lysispuffer, 1 mM PMSF und Complete-Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt. Die Zellyse erfolgte durch 2 mal 30 sec Ultraschallbehandlung. Nach anschließender Zentrifugation (16.000 g, 20 min, 4°C) wurde der Überstand bei -80°C eingefroren bzw. direkt für ein Pull-down-Assay oder bei einer SDS-PAGE eingesetzt. Bei 200ml Kulturen wurde das Bakterienpellet mit Hilfe der French-Press aufgeschlossen und anschließend 40 min bei 10000g abzentrifugiert.

#### **4.2.4.4    *Aufreinigung des rekombinanten KEPI-GST-Fusionsproteins***

Bei der Aufreinigung des KEPI-GST-Fusionsproteins wurden Glutathione-Sepharose-Säulen verwendet und nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

#### **4.2.4.5    *Homologe Rekombination in Bakterien („Gap repair“)***

Die Klonierung mittels „Gap repair“ wurde für die Herstellung eines Konstrukts zur gezielten Mutagenese des KEPI-Lokus in ES-Zellen angewendet. Die auf homologer Rekombination in *E.coli* basierende Methode erlaubt es große DNA Fragmente schnell, unabhängig von Restriktionsstellen und hoch effizient in ein high-copy Plasmid zu klonieren. Die Methode ermöglicht eine große Flexibilität bei der Wahl der Integrationsstellen für Selektionskassetten, Marker und loxP-Kassetten.

Zur Herstellung der Targetting-Konstrukte wurden elektro-kompetente Bakterienstämme *E.coli* DY380 und EL350 benötigt. Diese enthielten bereits das pDTA Plasmid mit einer 6,5kb langen Region, die den Locus des ersten KEPI-Exons beinhaltet. Die Bakterienkulturen wurden aus einem Glycerinstock in 5ml LB-Medium angeimpft und bei 32°C üN kultiviert. Anschließend wurde 1ml der Übernachtskultur in 100ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert.

Zur Induktion der homologen Rekombination in DY380-Zellen wurden diese nach der Kultivierung für 15 min bei 42°C inkubiert und dann für 10 minütige im Eiswasser abgekühlt. Die Bakterienmasse wurde durch eine 10 min Zentrifugation bei 2500g geerntet und anschließend in drei Waschschritten mit kaltem, sterilem 10% Glycerin gewaschen. Bei jedem Waschschriff wurde die Zentrifugationsgeschwindigkeit von 3000g über 6500g auf 7700g erhöht. Abschließend wurden die Bakterien in einem möglichst kleinem Volumen 10% Glycerin aufgenommen und in 30µl-Aliquots aufgeteilt. Die frischen Bakterien wurden für eine Elektroporation genutzt oder in flüssigen Stickstoff

eingefroren. Die DY380 *E.coli* wurden mit 50µg des linearen DNA-Fragments, welches die NEO-Kassete enthielt, elektroporiert.

Für die Induktion der Cre-Recombinase in EL350-Zellen, erfolgte die Kultur bei 32°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4. Danach wurde L(+)-Arabinose zugegeben (Endkonzentration 0,1 %), und die Zellen 1h bei 32°C inkubiert. Nach den oben beschriebenen Waschschritten wurden die Zellen mit einer Plasmid-DNA transformiert, die eine von *loxP*-Stellen flankierte NEO-Kassete beinhaltet.

## 4.2.5 Zellkultur eukaryotischer Zellen

### 4.2.5.1 Präparation und Kultur von adulten Kardiomyozyten

Die Präparation der adulten Kardiomyozyten wurde freundlicherweise von der technischen Assistentin Frau Pierschalek aus der Arbeitsgruppe von Prof. Morano am MDC ausgeführt. Dabei wurden Kardiomyozyten aus Herzen von 23 Wochen alten Männchen des Stammes C57/Bl6 enzymatisch isoliert. Hierfür wurden die Herzen retrograd mit einer Ca<sup>2+</sup>-freien Hepeslösung, die Kollagenasen (Worthington type II, 60 IU ml<sup>-1</sup>) enthielt, mit 6 ml pro min perfundiert. Die frisch dissoziierten Zellen wurden für 2h bei RT in eine physiologische Lösung aufgenommen, die 0.3 mM Ca<sup>2+</sup> und 0.5% BSA enthielt. Nach 2h Ruhezeit wurden die Zellen entweder für Ionoptix-Messungen oder Transfektion verwendet.

#### **Perfusionslösung** pH 7.15

137 mM NaCl  
1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
4.4 mM NaHCO<sub>3</sub>  
1.7 mM MgCl<sub>2</sub>  
21 mM Hepes  
20 mM Taurine  
10 mM Glucose  
5.7 mM KCl

### 4.2.5.2 Transfektion von adulten Kardiomyozyten

Die adulten Kardiomyozyten wurden mit Lipofektamin 2000™ und 1µg Plasmid-DNA (pEGFP-N1-KEPI) transfiziert. Hierbei wurden die Hinweise des

Herstellers befolgt. Nach der Transfektion wurden die Zellen 24h bei 37°C im Kardiomyozytenmedium kultiviert.

## **4.2.6 Zucht und Experimente an Versuchstieren**

### **4.2.6.1 Tierzucht**

Die *KEPI*- und *CTGF*-transgenen wurden in der Animal Core Facility des MDC generiert. Die Tiere erhielten herkömmliche Versuchstierkost und Trinkwasser ad libitum. Die Haltung erfolgte unter infektionsfreien Bedingungen in klimatisierten Tierhaltungsräumen unter Einhaltung des 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Alle Tierversuche und Organentnahmen wurden vom Berliner Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit (LaGetSi) genehmigt.

Die Zebrafische wurden im Fischlabor von Dr. S. Abdelilah-Seyfried am MDC gezüchtet.

### **4.2.6.2 Echokardiographie**

Die echokardiographische Untersuchung erfolgte am MDC durch den technischen Assistenten Herrn Martin Taube. Dazu wurden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert, der Brustkorb wurde enthaart und mit Ultraschallgel bestrichen. Die Tiefe der Isoflurannarkose wurde auf die Herzfrequenz von 450 Schläge/ min abgestimmt. Die Messungen erfolgten mit einem Visual Sonics Vevo 770 und einem 45-Mhz-Ultraschallkopf, der speziell für die Untersuchung von Kleintieren geeignet ist. Durch zweidimensionale Echokardiographie (M-Mode) wurde die Stärke des intraventrikulären Septums, der posterioren Wand sowie der Innendurchmesser des linken Ventrikels während der Systole und Diastole gemessen. Aus den gemessenen Parametern wurden die linksventrikulären Volumina, das Schlagvolumen sowie die Ejektionsfraktion errechnet. Die fraktionelle Verkürzung („fractional shortening“, FS) wurde aus dem Verhältnis der Abstände des Septums (LVS) zur Hinterwand (LVPW) des linken Ventrikels in der Diastole und Systole berechnet ( $FS = \frac{LVS - LVPW \text{ Abstand in der Diastole}}{LVS - LVPW \text{ Abstand in der Systole}}$ ).

LVS-LVPW Abstand in der Systole). Die Messpunkte wurden direkt unterhalb des Pappilarmuskels abgeleitet.

#### 4.2.6.3 Invasive Hämodynamik

Die invasive Messung der hämodynamischen Parameter erfolgte mit dem Aria Hämodynamiksystem mittels eines Millar-Mikrotip-Katheters<sup>®</sup>. Dazu wurden die Mäuse mit Isofluran anästhetisiert. Der Blutdruck wurde in der Arteria carotis communis dextra und die linksventrikulären Parameter nach dem Verschieben des Katheters durch die Aurtenklappe (Valva Tricuspidalis) gemessen. Die im Rahmen der invasiven Hämodynamik aquirierten Parameter sind in der Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Hämodynamische Parameter

<b>Parameter</b>	<b>Abkürzung</b>
Systolischer Blutdruck	SBP
Diastolischer Blutdruck	DBP
Herzfrequenz	HR
Kontraktilität des linken Ventrikels	$dP/dt_{\max}$
Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels	$dP/dt_{\min}$
Linksventrikulärer enddiastolischer Blutdruck	LVEDP
Linksventrikulärer endsystolischer Blutdruck	LVESP

#### 4.2.6.4 Angiotensin II- und Isoproterenol-Applikation

Zur subkutanen Applikation von Angiotensin II (1,4 mg/ kg/ Tag) bei Mäusen wurden Alzet<sup>®</sup>-osmotische Pumpen mit 14 tägiger Pumpdauer, 100 µl Pumpvolumen und 0,25 µl/ h Pumpleistung verwendet. Um eine luftblasenfreie Füllung der Pumpen zu gewährleisten, wurden diese vor und nach der Ladung mit Angiotensin II-Lösung auf einer Feinwaage gewogen. Für die Implantation wurden die Tiere durch Inhalationsnarkose mit Isofluran anästhetisiert und die Pumpen wurden durch einen 0,5 cm langen Hautschnitt unter die Haut am Nacken eingeführt und vernäht.

Isoproterenol (30mg/ kg/ Tag) wurde 14 Tage lang subkutan gespritzt.

#### 4.2.6.5 Entnahme und Aufbereitung von Organen

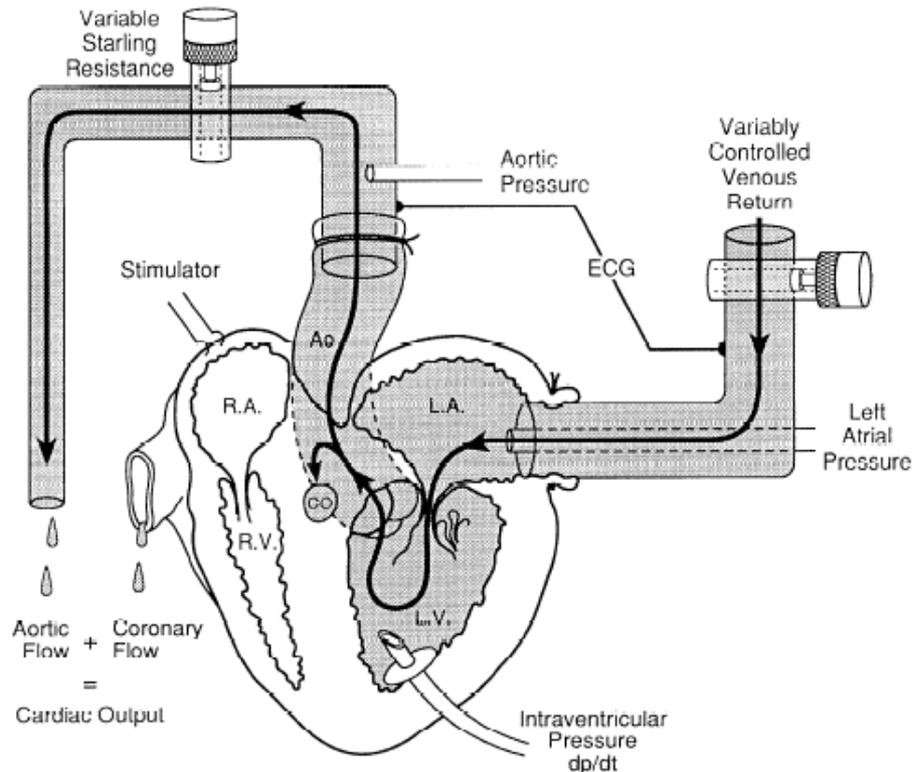
Unter Isoflurananästhesie wurde das Blut aus der Aorta abdominalis abgenommen und sofort in EDTA- Röhrcchen (7 mM Endkonzentration) überführt. Das Blut wurde 10 min bei 2200 rpm bei 4°C in einer Tischzentrifuge fraktioniert und aliquotiert und bei -80°C gelagert. Anschließend wurden das Herz und die Lunge herauspräpariert, in physiologischer NaCl-Lösung gespült, gewogen und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Herzen, die für die Analyse der Phosphorylierung von PLB bestimmt waren, wurden sofort nach der Entnahme mit Hilfe einer Wollenbergerzange schockgefroren.

#### 4.2.6.6 Messungen der Kontraktilität im „Working heart-Modus“

Die Messungen der Kontraktilität im „working heart-Modus“ an adulten isolierten Herzen wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Prof. Morano vom technischen Assistenten Herrn W. Schlegel ausgeführt. Hierfür wurden Herzen aus den Versuchstieren entnommen, in das Messsystem eingespannt und mit dem Nährmedium gemäss der Abb. 5 perfundiert. Bei der Ausführung des Ischämie-Reperfusionsexperiments wurde der Fluss des Nährmediums für 30 min unterbrochen und anschließend wieder für 60 min aufgenommen. Die Messdaten wurden unmittelbar vor der Ischämie, am Ende der Ischämiephase und am Ende der Reperfusionsphase erhoben.

Tabelle 30: Hämodynamische Parameter erhoben im „Working heart-Modus“

<b>Parameter</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Gemessen durch:</b>
Herzrate	HR	Sensor im linken Ventrikel
Intrakardialer Druck in der Systole	ICPsys	Sensor im linken Ventrikel
Intrakardialer Druck in der Diastole	ICPdia	Sensor im linken Ventrikel
Kontraktilität des linken Ventrikels	$dP/dt_{max}$	Sensor im linken Ventrikel
Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels	$dP/dt_{min}$	Sensor im linken Ventrikel
Linksventrikulärer endsystolisches Volumen	EV	Sensor im linken Ventrikel
Linksventrikulärer endsystolischer Blutdruck	LVESP	Sensor im linken Ventrikel
Vorlastfluss (Preload flow)	PLF	Sensor im linken Atrium
Vorlastdruck (Preload pressure)	PLP	Sensor im linken Atrium
Nachlastfluss (Afterload flow)	ALF	Sensor in der Aorta
Nachlastdruck (Afterload pressure)	ALP	Sensor in der Aorta



**Abb. 5 Fluss-Diagramm einer Präparation murinen Herzens im „Working heart-Modus“.** Links: Kontrolle des Starling Widerstandes (Nachlast); rechts: Kontrolle des venösen Rückflusses (Vorlast). Im linken Ventrikel (LV) ist ein Drucksensor platziert, mit dem der Druck gemessen wird. RA: Rechtes Atrium, Ao: Aorta, LA: Linkes Atrium, CO: Fluss in die Koronarien, RV: Rechter Ventrikel.<sup>83</sup>

#### 4.2.6.7 Elektrokardiographie bei Mäusen

Vor der Ableitung der Elektrokardiogramme wurden die Mäuse mit Isofluran anästhetisiert (1.6 Vol% Isoflurane/Luft) und adhäsive Elektroden wurden an den Extremitäten festgeklebt. Die EKG-Standardintervalle wurden auf 6 Leitungen gemessen wie von Royer et al. (2005) beschrieben. Die Ableitung des basalen EKG's dauerte 5 min und anschließend wurde den Tieren intraperitoneal Isoproterenol gespritzt (2mg Isoproterenol/ml NaCl; Endkonzentration 0.3g/10mg Körpergewicht). Die Ableitung im stimulierten Zustand dauerte ebenso 5 min. Die aquirierten Daten wurden offline ausgewertet.

#### **4.2.6.8 Messungen der Kontraktilität und des $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten an isolierten adulten Kardiomyozyten (IonOptix System<sup>®</sup>)**

Die Messungen der Kontraktilität sowie des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten an isolierten adulten Kardiomyozyten wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Prof. Morano vom technischen Assistenten Herrn W. Schlegel ausgeführt. Das IonOptix-System erlaubt beide Messgrößen (Zellverkürzung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten) gleichzeitig zu erheben. Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung werden die Kardiomyozyten mit Fura-2 beladen und anschließend elektrisch stimuliert (Bipolare Impulse 5 ms, 1 Hz). Fura-2 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator, der auf Konzentrationsänderungen des freien zellulären  $\text{Ca}^{2+}$  mit einer Änderung seiner Fluoreszenz reagiert. Fura-2 wird bei der Wellenlänge von 340nm und 380nm erregt und das Verhältnis (Ratio) beider Emissionen bei den genannten Wellenlängen korreliert direkt mit der Menge des intrazellulären Kalziums. Die Verwendung des Quotienten hat den Vorteil, dass die Messung unabhängig von zahlreichen Variablen ist und nur von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängt. Im Laufe der Messung werden folgende Parameter des Transienten erhoben: Basalamplitude, „Peak“-Amplitude, Maximale Anstieg-/Abfall-Geschwindigkeit, Zeit zu X % des „Peaks“ und Zeit zu X % der „Grundlinie“. Als Mass der Kardiomyozyten-Kontraktilität wird die Zellverkürzung im Vergleich zur Ausgangslänge (Ruhezustand) herangezogen. Hierbei wird die Bewegung der einzelnen Kardiomyozyten in Echtzeit mit der Frequenz von 240Hz digital visualisiert und dokumentiert.

#### **4.2.7 Mikroinjektion der Fischoozyten**

Die Mikroinjektion wurde an frisch geernteten Oozyten im Einzellstadium ausgeführt. Hierbei wurden die Eier kettenartig in Agaroseschneisen immobilisiert und mit Hilfe eines Mikromanipulators wurde die Morpholinosuspension in den Dottersack des Embryos appliziert. Für die Injektion wurde eine handangefertigte Glasnadel verwendet. Die injizierten Embryos wurden bei 28°C im Fischwasser weiter kultiviert und ihre Entwicklung am Binokular verfolgt und dokumentiert.

## **4.2.8 Histologische Methoden**

### **4.2.8.1 *Fixierung, Einbettung und Schneiden der Gewebeproben***

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden frisch präparierte Herzen 48 h in 4% PFA in 4°C fixiert. Dann wurden die Präparate 2 mal kurz mit PBS gewaschen und in einem Methanolbad kontinuierlich dehydriert (je 1h in 25%, 50%, 75% und zweimal in 100% Methanol in PBS). Anschließend folgte 1h Inkubation in 100% Ethanol und 1h in Toluol bis die Präparate vollständig dehydriert waren. Für die Paraffineinbettung wurden die Biopsien in Histogitter platziert und in 60°C-Paraffinbad eingetaucht. An den beiden folgenden Tagen wurde die Biopsie in ein frisches Paraffinbad gelegt. Um das Gewebe schneiden zu können wurde es in eine Metallform gelegt, ausgerichtet, mit frischem Paraffin überschichtet und von der Gitterform abgedeckt. Nachdem das Paraffin langsam ausgehärtet ist, konnten die Gewebe entweder bei 4°C gelagert oder am Mikrotom (Microm HM360) in 5-10µm dicke Schnitte geschnitten werden. Die Schnitte wurden im 45°C-Bad geglättet und auf Glasobjektträger platziert.

### **4.2.8.2 *Trichrom-Masson-Färbung***

Die Trichrom-Masson-Färbung wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Diese Färbemethode wurde angewendet um fibrotisches Gewebe im Herzen sichtbar zu machen. Es handelt sich um eine dreifarbige Färbung, bei der Kollagen-Fasern tief blau, Kerne leuchtend rot und das Zytoplasma blaurosa gefärbt wird.

Vor der Färbung wurden die Paraffinschnitte in 3 Xylol-Bädern entparaffinisiert in einer absteigenden Ethanolreihe (je 5 min in 100%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30% und H<sub>2</sub>O) rehydriert.

### **4.2.8.3 *Kryoschnitte***

Zur Herstellung von Kryoschnitten wurde das frisch präparierte Herzgewebe in PBS gespült und auf einem Stück Pappe ausgerichtet. Das Gewebe wurde in 2-Methylbutan schockgefroren, welches vorher auf Trockeneis

heruntergekühlt wurde. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Unmittelbar vor dem Schneiden des Gewebes wurde es direkt auf dem Stempel des Kryostaten in TissueTeq ausgerichtet und eingebettet.

Die Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostaten (Microm HM560 Cryo-Star; Microm) angefertigt; die Schnittdicke betrug 12 oder 20  $\mu\text{m}$ . Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger aufgezogen, bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet und luftdicht verpackt bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **4.2.8.4 Immunhistologische Färbung auf Kryoschnitten**

Um immunhistochemische Färbungen auf Gefrierschnitten auszuführen, wurden diese vorerst aufgetaut, bei RT getrocknet, und in  $-20^{\circ}\text{C}$ -Aceton für 10 min fixiert. Das Gewebe wurde für 10 min bei RT äquilibriert und mit einem Fettstift umrandet. Anschließend wurden die Objektträger für 5 min mit TBS inkubiert, so dass sie quallen. Sodann wurden sie 30 min mit 10% Eselserum geblockt. Es folgt 1h Inkubation mit dem primären Antikörper und 3 Waschrunde je 10min mit TBS. Anschließend wurden die Objekte mit einem Fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper 1h lang inkubiert und 3 mal à 10 min mit TBS gewaschen. Bevor das Gewebe am Fluoreszenzmikroskop angeschaut werden konnte, wurde es in einem DAPI-haltigem Medium eingebettet.

#### **4.2.8.5 Immunhistologische Färbung von Kardiomyozytenkulturen**

Die immunhistochemische Färbung der adulten Kardiomyozyten erfolgte an Zellen, die frisch mit 2% PFA für 15 min fixiert wurden. Nach einem Waschschrut mit PBS wurden die Zellen mit 0.25% (v/v) Triton-X100 für 5 min permeabilisiert, einmal mit PBS gewaschen und für 1h in 10% (v/v) PBS normal Eselserum geblockt. Anschließend wurden die Objekte gewaschen und mit dem ersten Antikörper gelöst in PBS über Nacht inkubiert (rabbit KEPI-serum 1:200 and Troponin I 1:200). Nach einem Waschschrut wurden die Zellen 2h bei RT mit dem Fluoreszenzgekoppelten zweiten Antikörper inkubiert (1:500 in PBS). Die Objektträger wurden mit Vectashild-Mountingmedium (ergänzt mit DAPI) eingedeckt und die Fluoreszenz wurde am Zeiss LSM 5 Pascal Konfokalmikroskop visualisiert. Die Auswertung der

Bilder wurde mit Hilfe der Zeiss-LSM-Software und mit Adobe Photoshop ausgeführt.

#### **4.2.8.6 In situ Hybridisierung**

##### **4.2.8.6.1 In vitro-Transkription und DIG-Markierung von RNA-Sonden**

Zur Herstellung einer RNA-Antisense-Sonde für die *in situ*-Hybridisierung wurden 30µg Plasmid-DNA für die anschließende *in vitro*-Transkription und DIG-Markierung in 100µl Volumen linearisiert und aufgereinigt. Für die *in vitro*-Transkription und DIG-Markierung von RNA-Sonden wurden Reagenzien und Enzyme von Roche (Mannheim) verwendet. Der Reaktionsansatz der *in vitro*-Transkription und DIG-Markierung ist in der Tabelle 31 angegeben.

*Tabelle 31: Reaktionsansatz für in vitro-Transkription und DIG-Markierung von RNA-Sonden.*

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Aufgereinigte DNA	1,2µl
DIG-RNA-Labeling.Mix	2µl
Transkriptionspuffer	2µl
RNAse-Inhibitor	1µl
RNA-Polymerase (T7, SP6 oder T3)	1µl
ddH <sub>2</sub> O	13µl

Die *in vitro*-Transkription erfolgte für 2h bei 37°C. Anschließend wurde die Sonde mit Hilfe des RNeasy MiniElute Cleanup-Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Sonde wurde zweimal mit 25µl ddH<sub>2</sub>O/DEPC eluiert und mit 50µl Formamid ergänzt. Für die *in situ*-Hybridisierung wurden 1-5µl der Sonde verwendet.

##### **4.2.8.6.2 Herstellung von Embryopulver**

Die Herstellung von Embryopulver erfolgte mit E10.5-E13.5 Mausembryonen, die nach der Präparation bei -20°C eingefroren worden waren. Je nach Größe wurden 10-20 Embryonen in einem möglichst kleinen Volumen von eiskaltem PBS homogenisiert. Sodann wurden 4 Volumen eiskaltes Aceton zugegeben und die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat 10 min mit 10000 x g in einer Bodenkühlzentrifuge bei 4°C pelletiert,

mit eiskaltem Aceton gewaschen und erneut pelletiert. Das Präzipitat wurde nun ausgebreitet, luftgetrocknet, fein gemörsert und bei -20°C gelagert.

#### 4.2.8.6.3 Whole mount *in situ*-Hybridisierung

Am ersten Tag der whole mount *in situ*-Hybridisierung wurden die Präparate in kleine Glasfläschchen (3 ml Volumen) überführt, in einer Methanolreihe (je 15 min in 75 %, 50%, 25 % Methanol in PBT) bei 4°C rehydriert und dreimal 15 min mit PBT bei 4°C gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe 20 min in 20 µg/ml Proteinase K in PBT bei RT verdaut. Anschließend wurden die Präparate 20 min in 0,2 % Glutaraldehyd/ 4 % PFA in PBS-DEPC refixiert und dreimal 15 min mit PBT gewaschen. Dann wurde 15 min in Hybridisierungslösung umgepuffert und 1-3 h in Hybridisierungslösung bei 65°C prähybridisiert. Vor der Hybridisierung wurden 1-5 µl DIG-markierte RNA-Sonde pro 3ml Hybridisierungslösung 10 min bei 80°C denaturiert. Danach wurde die Sonde auf die Präparate in Hybridisierungslösung gegeben und üN bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate zweimal 40 min mit Lösung I bei 65°C gewaschen, dann z. T. 15 min in 1:1 Lösung I:Lösung II bei 65°C und dreimal 15 min in Lösung II bei RT umgepuffert. Weiterhin optional wurde die unspezifische Bindung der Sonde mit einem Verdau in 50 µg/ml RNase A in Lösung II für zweimal 30 min bei 37°C weiter reduziert. Immer wurde danach dreimal 1 h mit Lösung III bei 62°C stringent gewaschen und anschließend dreimal 15 min in TBST bei RT umgepuffert. Vor der Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper, an den AP gekoppelt war, wurden die Schnitte 1 h in TBST mit 20% Ziegen Serum (Blockierungslösung) vorinkubiert. Währenddessen wurde ein kleiner Laborlöffel Embryopulver 30 min in 4 ml TBST bei 65°C hitzeinaktiviert. Das Embryopulver wurde 5 min mit 5000 rpm in einer Bodenkühlzentrifuge bei RT pelletiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 0,75 ml TBST mit 5 % Ziegen Serum und der Antikörper 1:500 zugegeben, mit dem Embryopulver vermischt und 1 h bei 4°C präadsorbiert. Das Embryopulver wurde wieder 5 min mit 5000 rpm bei 4°C pelletiert und der Überstand 1:4 mit TBST und 5 % Ziegen Serum verdünnt. Die Blockierungslösung wurde abgenommen und die Präparate üN mit anti-DIG-Antikörper 1:2000 in 3 ml TBST mit 5 % Ziegen Serum bei 4°C

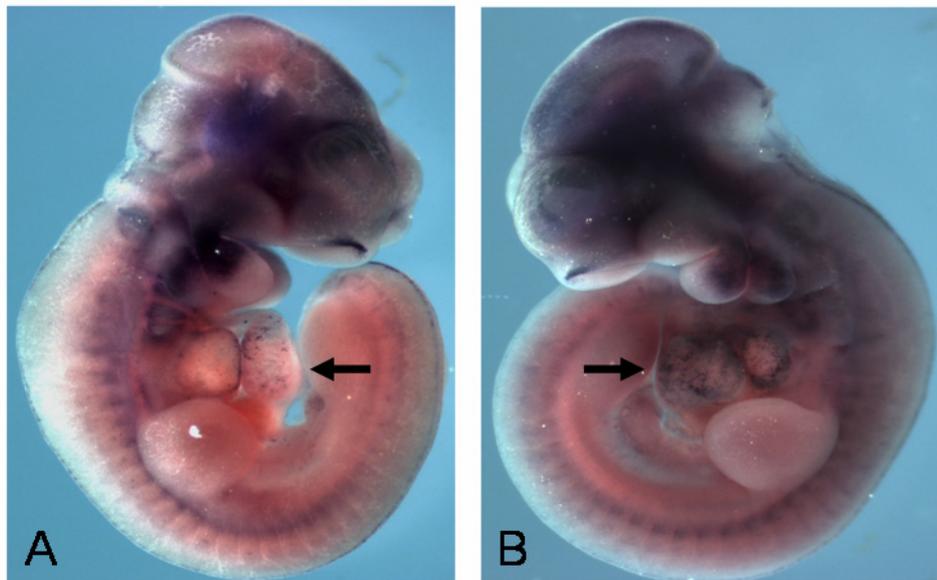
inkubiert. Am dritten Tag wurde dreimal 15 min in TBST bei RT, dann 8-10 Mal 40-60 min in TBST bei RT und schließlich üN mit TBST bei 4°C gewaschen. Am vierten Tag wurden die Präparate zweimal 45 min in AP-Puffer bei RT umgepuffert und anschließend wurde die filtrierte Färbelösung mit je 0,035-0,35 µl/ml NBT und BCIP in AP-Puffer zugegeben. Die Präparate wurden mehrere Tage lichtgeschützt bei 4°C in der Lösung inkubiert, bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht war. Die Lösung wurde dabei alle zwei Tage gewechselt und ihre Konzentration an die gewünschte Reaktionsgeschwindigkeit angepasst. Zum Schluss wurde zweimal in AP-Puffer und dreimal mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden danach üN in 4 % PFA in PBS bei 4°C postfixiert, zweimal mit filtriertem PBS gewaschen und darin bei 4°C gelagert.

<b>Hybridisierungslösung</b>	ultrareines, deionisiertes Formamid	50ml
	20x SSC/DEPC	25ml
	1 M Zitronensäure/DEPC	6ml
	10 mg/ml Lachsspermien-DNA (10 min bei 95°C denaturiert)	1ml
	50 mg/ml tRNA (10 min bei 95°C denaturiert)	100µl
	Tween 20	150µl
	100 mg/ml Heparin	40µl
	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	Ad 100ml
<b>Lösung I</b>	Formamid	125ml
	20x SSC	62,5ml
	Tween 20	375µl
	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	Ad 250ml
<b>Lösung II</b>	5 M NaCl	25ml
	1 M Tris·HCl, pH 7,5	2,5ml
	Tween 20	375µl
	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	Ad 250ml
<b>Lösung III</b>	Formamid	125ml
	20x SSC	25ml
	Tween 20	375µl
	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	Ad 250ml
<b>AP-Puffer</b>	1 M Tris·HCl, pH 9,5	25ml
	1 M MgCl <sub>2</sub>	12,5ml
	5 M NaCl	5ml
	Tween 20	375µl
	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	Ad 250ml

## 5 Ergebnisse I

### 5.1 Genexpressionsanalyse des ErbB2 Knockout-Modells als Grundlage für die funktionellen Untersuchungen von CTGF

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden in der Gruppe von Prof. Dr. C. Birchmeier am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch, Affymetrix®-Genexpressionsanalysen an der ErbB2 Knockout-Maus durchgeführt. Diese Mutante, welche ein etabliertes Modell für dilatative Kardiomyopathie darstellt, wurde am zwölften Tag post partum auf seine mRNA-Expressionsprofil hin untersucht.<sup>84</sup> Dieser Zeitpunkt wurde so gewählt, dass die dilatative Kardiomyopathie noch nicht eingetreten ist und somit sekundäre Effekte in der Analyse nicht erfasst werden. Die Untersuchung erbrachte eine starke Hochregulation (Fold change 3,25x) des Gens *Connective tissue growth factor* (CTGF) in mutanten Herzen im Vergleich zu Wildtyp.



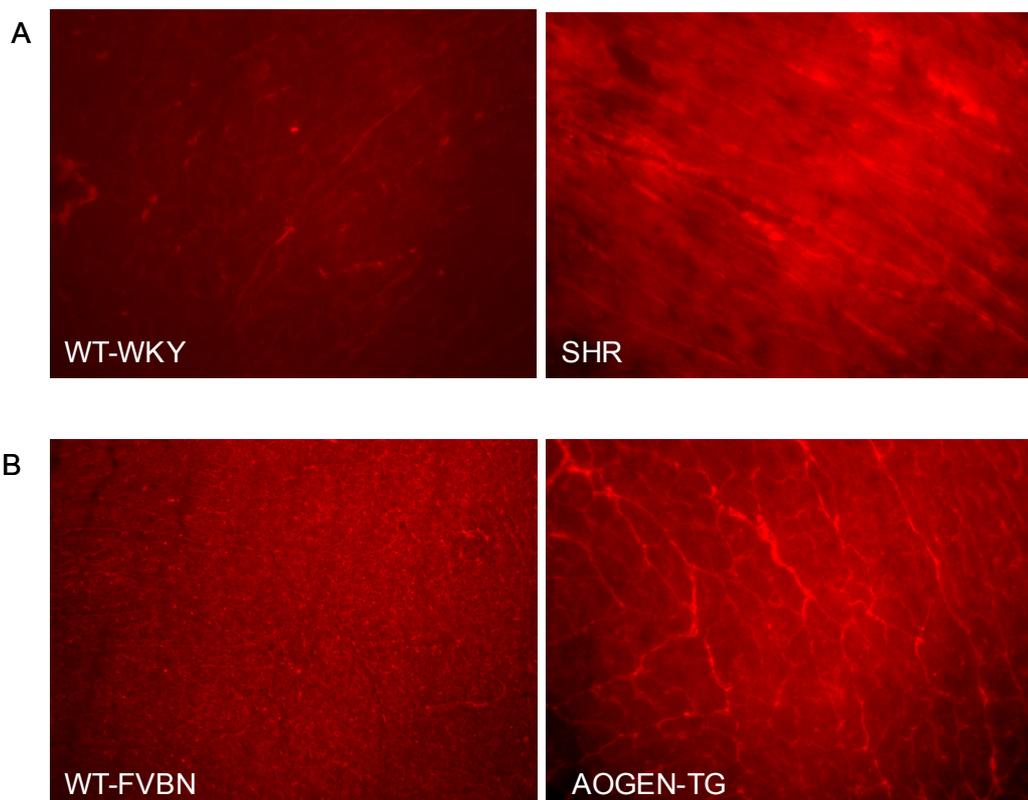
**Abb. 6 CTGF mRNA-Expression im ErbB2 KO-Modell.** Die *in situ*-Hybridisierung an E10.5-Embryos zeigt eine verstärkte Expression von CTGF im Herzventrikel (Pfeilspitze) der ErbB2 mutanten Maus (B) im Vergleich zum Wildtyp (A).

Dieser Befund wurde mittels einer *in situ*-Hybridisierung mit einer CTGF-spezifischen antisense-Sonde an E10.5-Embryos der ErbB2 Mutante und des Wildtyps verifiziert. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine starke Korrelation

zwischen embryonal exprimierten Genen und Genen, die bei der Herzinsuffizienz differenziell exprimiert sind, besteht. So ergab die Färbung einen deutlichen Anstieg der CTGF-Expression im mutanten Herzen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 6). Es folgte eine funktionelle Analyse von CTGF im Herzen, die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt wird.

## 5.2 Expression von CTGF im Herzen unter Basal- und Hypertrophie-Bedingungen

Da im Mittelpunkt dieser Arbeit die kardiale Funktion von CTGF steht, wurde zuerst die Expression dieses Proteins unter basalen und pathologischen Bedingungen im Herzen untersucht. Hierfür wurde das Gewebe vom linken Herzventrikel von Wildtyp- sowie spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Alter von 9 Wochen histologisch untersucht und spezifisch mit einem antiCTGF-Antikörper gefärbt.



**Abb. 7 CTGF-Expression im linken Ventrikel unter Basal- und Hypertrophiebedingungen.** Das CTGF-Protein wird im Herzen basal nur sehr schwach exprimiert. Die kardiale Hypertrophie führt sowohl im spontan hypertensiven Rattenmodell (**A**) als auch bei der hypertensiven AOPEN transgenen Maus (**B**) zum deutlichen Anstieg der Expression.

Das SHR-Rattenmodell zeigt im Alter von 6 Wochen eine durch Bluthochdruck verursachte Hypertrophie des Herzens.<sup>85</sup> Die histologischen Bilder zeigten eine kaum detektierbare CTGF-Expression bei gesunden Wildtyp-Ratten des WKY-Stammes und einen deutlichen Anstieg des CTGF-Proteins im Interstitium des linken Ventrikels der hypertensiven Ratten (Abb. 7A). Des Weiteren wurde das linksventrikuläre Gewebe von AOGEN-transgenen Mäusen, die das Angiotensinogen-Gen überexprimieren, in Vergleich zum Wildtyp untersucht. Die AOGEN-transgenen Tiere zeigen ebenso eine kardiale Hypertrophie, die durch Hypertonie hervorgerufen ist.<sup>86</sup> Auch dieses Modell zeigte eine Anreicherung des CTGF-Proteins im interstitiellen Raum verglichen mit Wildtyp (Abb. 7B).

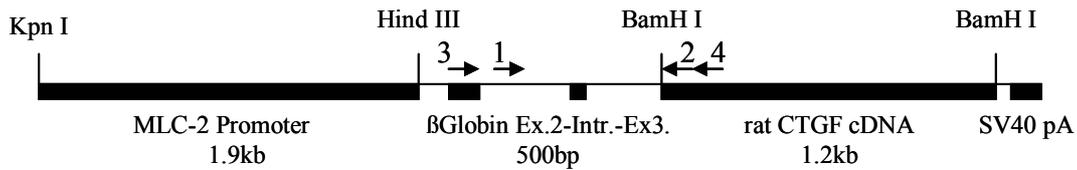
### **5.3 Generierung der CTGF-transgenen Maus**

#### **5.3.1 Klonierung des DNA-Konstrukts zur Überexpression von CTGF im Mauserzen**

Zur Herstellung der transgenen Mauslinie mit herzspezifischer Überexpression von CTGF, wurde ein DNA-Konstrukt hergestellt, bei dem die Ratten-CTGF-cDNA unter der Kontrolle des herzspezifischen *Myosin light chain-2* Promoters (MLC-2) stand. In den pBluescript SK+ Vektor wurde die MLC-2-Promotersequenz kloniert, gefolgt von dem Kaninchen- $\beta$ -Globin Intron-Exon-Sequenz zur Verstärkung der Expression des Transgens. Hinter das anschließende CTGF-cDNA-Fragment wurde die SV40 Polyadenylierungssequenz kloniert (Abb. 8). Durch den Verdau mit KpnI und XhoI wurde das Konstrukt aus dem pBluescript SK+ Vektor herausgeschnitten und nach Auftrennung im Agarosegel und Gelextraktion im Mikroinjektionspuffer aufgenommen. Danach erfolgte die Mikroinjektion in den männlichen Pronukleus einer Zygote des FVBN-Maus-Inzuchtstamms, die nachfolgend in scheinchwangere Mäuse reimplantiert wurde.

Die Mikroinjektion wurde im Labor von Prof. Dr. M. Bader am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin von Dr. N. Alenina ausgeführt.

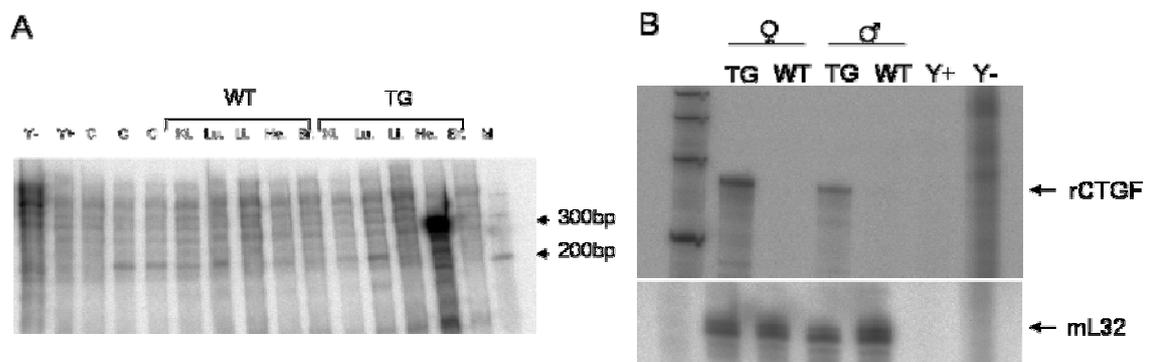
Durch PCR wurden die Nachkommen auf die Integration des Transgens getestet. Für alle Experimente wurden heterozygote Tiere verwendet.



**Abb. 8 Konstrukt zur Herstellung der CTGF transgenen Maus.** Der MLC-2-Promoter wurde mit KpnI und HindIII in die multiple cloning site (MLC) des pBluescript SK+-Vektors einkloniert. Die Klonierung der CTGF-cDNA erfolgte durch die Restriktion mit BamHI. Die Zahlen 1 und 2 symbolisieren die Primer, die für die Genotypisierungs-PCR verwendet wurden und die Zahlen 3 und 4 zeigen die Lage der Primer, die für die Herstellung der Antisense-Sonde für den RNase-Protection-Assay verwendet wurden.

#### 5.4 Expression des CTGF-Transgens im Herzen

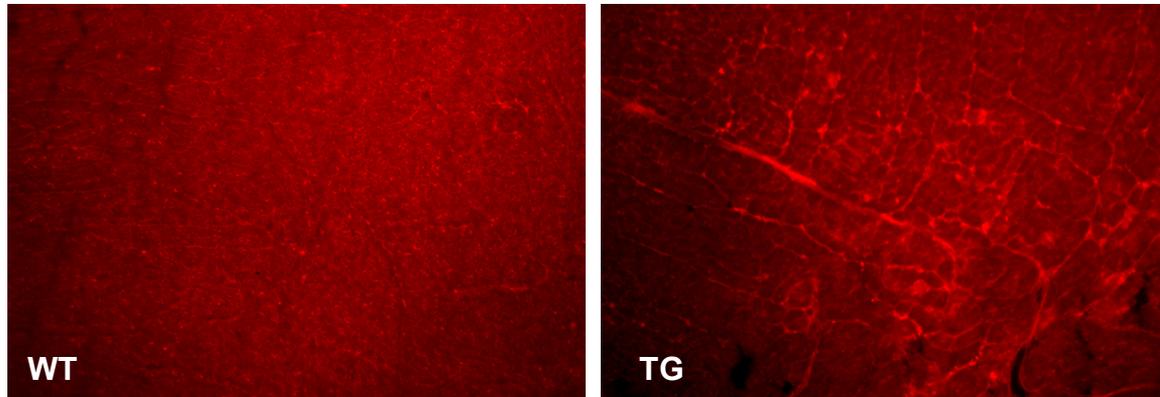
Eine erste Expressionsanalyse der mRNA des Transgens erfolgte in mehreren Organen mittels des RNase-Protection Assays (RPA). Hierbei wurde die spezifische Überexpression von CTGF im Herzen nachgewiesen. Des Weiteren wurde die transgene CTGF-mRNA in beiden Geschlechtern bestimmt. Die Expression des Housekeeping-Gens L32 diente als Ladekontrolle (Abb. 9).



**Abb. 9 Expressionsnachweis von CTGF im transgenen Mausmodell.** Im Wildtyp und transgenen Tier wurde das Gewebe der Niere (Ki.), Lunge (Lu.), Leber (Li.), des Herzens (He.) und des Gehirns (Br.) getestet. Für den RPA wurden 50µg RNA verwendet (A). Die Expression des Transgens wurde ebenso in beiden Geschlechtern im Herzen überprüft und auf die Expression des Housekeeping-Gens L32 normalisiert. Für diesen RPA wurden 20µg RNA eingesetzt.

Um die Lokalisation des überexprimierten CTGF-Proteins im Herzen zu überprüfen wurden Kryoschnitte des linken Herzventrikels einer 3 Monate alten transgenen und einer Wildtyp-Maus angefertigt und histologisch mittels

des spezifischen CTGF-Antikörpers angefärbt. Das CTGF-Protein wurde in Wildtyp-Ventrikel unter Basalbedingungen nicht detektiert, während das transgene Gewebe eine starke Färbung im Interstitium zeigte (Abb. 10).



**Abb. 10 Lokalisation des transgenen CTGF-Proteins im linken Ventrikel.** Das CTGF-spezifische Signal ist im Wildtypherzen kaum detektierbar, während die Interstitialräume des transgenen Herzens eine deutliche Färbung aufweisen.

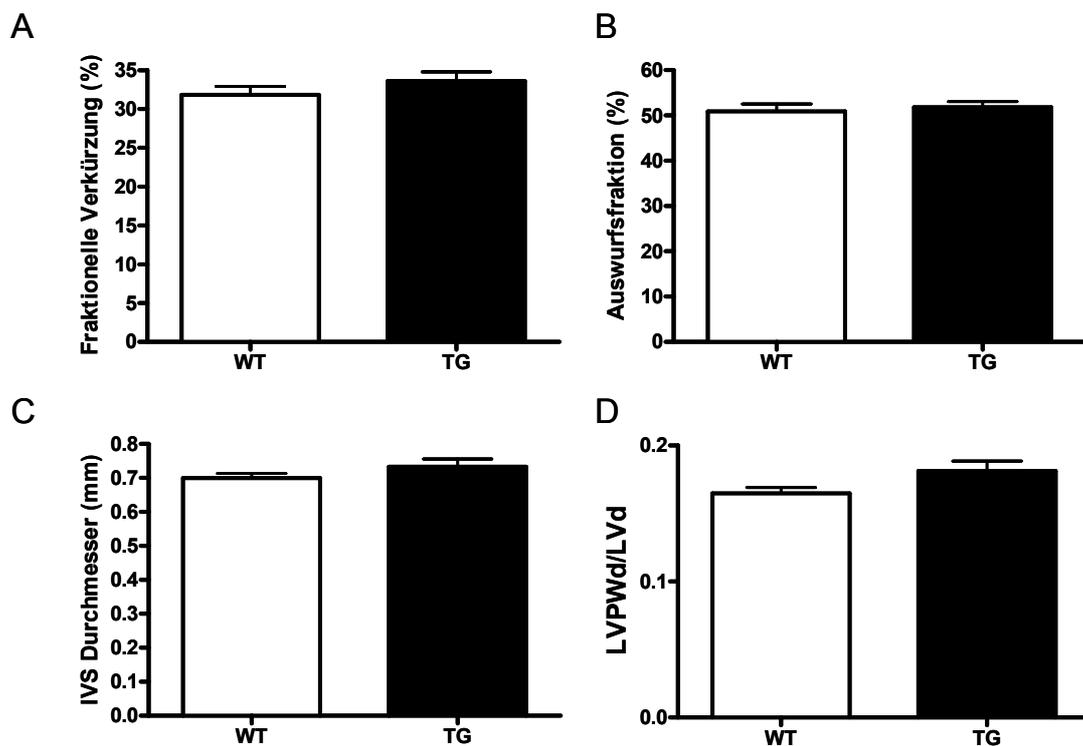
## **5.5 Kardiovaskuläre Charakterisierung der CTGF-transgenen Mäuse unter Basalbedingungen**

Die CTGF-transgenen Mäuse zeigten keine erhöhte Mortalität innerhalb des ersten Lebensjahres, so dass eine ausführliche kardiovaskuläre Charakterisierung vorgenommen werden konnte.

### **5.5.1 Echokardiographische Charakterisierung von CTGF-transgenen Mäusen unter Basalbedingungen**

Als Echokardiographie bezeichnet man die Untersuchung des Herzens mittels Ultraschall. Neben dem EKG ist die Echokardiographie eine der wichtigsten technischen nicht invasiven Untersuchungsmethoden des Herzens und mittlerweile unverzichtbarer Bestandteil der kardiologischen Diagnostik. Die echokardiographische Messung im Motion-Mode (M-Mode) ist eine zweidimensionale Aufnahme der Kinetik des Herzens aufgezeichnet im zeitlichen Verlauf. Hierbei wird die Geometrie des linken Ventrikels mit seinen Wanddicken und Innendurchmesser in der Systole und Diastole evaluiert. Aus

den Durchmessern kann die Auswurfsleistung (Ejektionsfraktion) der Herzens sowie die fraktionelle Verkürzung berechnet werden. Die fraktionelle Verkürzung beschreibt das Verhältnis des Abstands des interventrikulären Septums von der posterioren Wand des linken Ventrikels in der Systole und Diastole. Dieser Parameter dient zur Beurteilung der kontraktile Leistung des Herzens. Die Ejektionsfraktion ist beschrieben als der Prozentsatz des Blutes, welcher während der Systole aus dem linken Ventrikel herausgepumpt wird. Beim gesunden humanen Herzen liegt die Ejektionsfraktion bei 55%.



**Abb. 11 Echokardiographische Charakterisierung der CTGF-transgenen Mäuse (TG) im Vergleich zum Wildtyp (WT).** Bestimmt wurde die fraktionelle Verkürzung (A) und die Ejektionsfraktion (B) als Parameter für die systolische Funktion. Die Messung des intraventrikulären Septumdurchmessers (IVS) (C) und des Quotienten zwischen der linksventrikulären posterioren Wanddicke in der Diastole (LVPWd) und dem diastolischen Durchmesser des linken Ventrikels (D) wurde zur Beurteilung der kardialen Hypertrophie erhoben. Alle genannten Parameter zeigen keine signifikanten Veränderungen in Wildtyp verglichen mit CTGF-transgenen Mäusen. Die Daten sind mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Gruppenumfang: WT n=10, TG n=11.

Im Alter von 3 Monaten wurden die CTGF-transgenen Mäuse hinsichtlich ihrer linksventrikulären Dimensionen und Pumpfunktion echokardiographisch untersucht. Im Vergleich zu der Wildtypgruppe zeigten die CTGF-transgenen Mäuse keine signifikante Veränderung der linksventrikulären Leistung und

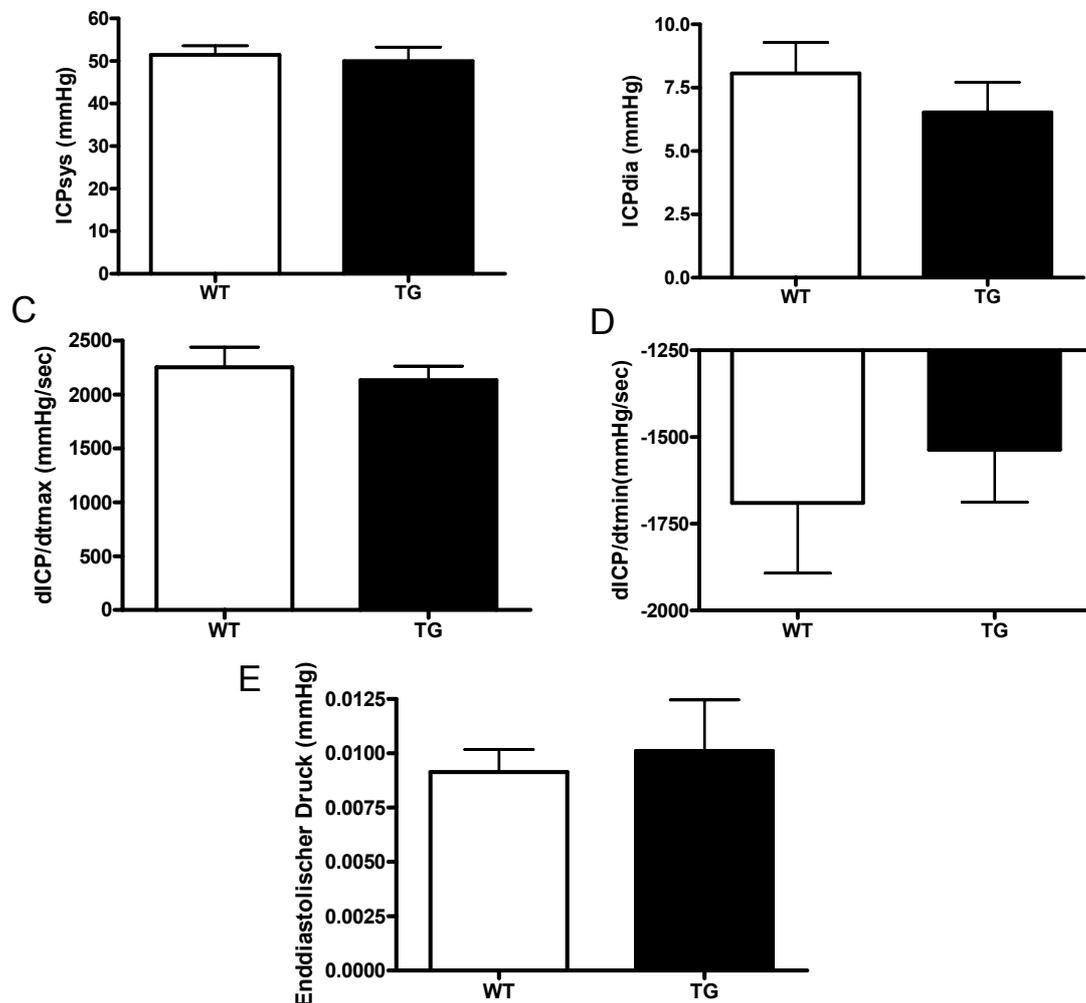
keine Anzeichen für eine Hypertrophie. Die Bewertung der fraktionellen Verkürzung und der Auswurfsfraktion brachten keinen Anhalt für eine veränderte diastolische oder systolische Funktion im transgenen Tier im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 11A,B). Die Messung des intraventrikulären Septumdurchmessers (IVS) zeigte keine signifikante Veränderung, so dass kein Indiz für eine Hypertrophie bestand (Abb. 11C). Auch der Quotient zwischen der linksventrikulären posterioren Wanddicke in der Diastole (LVPWd) und den diastolischen Durchmesser des linken Venrikels war in beiden Gruppen unverändert, so dass auf eine Veränderung der Herzgeometrie im Sinne einer Hypertrophie nicht geschlossen werden konnte (Abb. 11D).

### **5.5.2 Charakterisierung der kardialen Funktion der CTGF-transgenen-Mäuse am isolierten Herzen**

Um den Einfluss der CTGF-Überexpression auf die linksventrikuläre Funktion des Herzens zu bestimmen, wurden hämodynamische Messungen am isolierten Herzen im „*working heart*“-Modus durchgeführt.

Diese Methode ist gut reproduzierbar, präzise und ermöglicht eine Analyse intrinsischer ventrikulärer Mechanismen unabhängig von systemischer Interferenz und Seiteneffekten, die eine Analyse am lebendigen Tier mit sich bringt. So ist die Messung unabhängig von Einflüssen der sympathischen Stimulation, zirkulierenden Neurohormonen sowie Blutdruck. Des Weiteren können experimentelle Bedingungen wie ventrikuläre Vor- und Nachlast, Substratverfügbarkeit, Fluss in Koronarien, Herzschlagrate und Temperatur sowie viele andere Parameter abhängig vom Experiment eingestellt werden. Im Verlauf dieser Messung wird das isolierte Herz mit einem Nährmedium perfundiert, wobei die Perfusionsrichtung dem physiologischen Blutfluss entsprechend bleibt. Mit Hilfe des im linken Ventrikel platzierten Minisensors können funktionelle Parameter wie Herzschlagrate, linksventrikulärer Druck in der Systole und Diastole sowie der linksventrikuläre maximale und minimale  $dP/dt$  (Kontraktilität und Relaxation) erhoben werden. Der Vergleich der Wildtyp und der CTGF-transgenen Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied im entwickelten systolischen und diastolischen intrakardialen

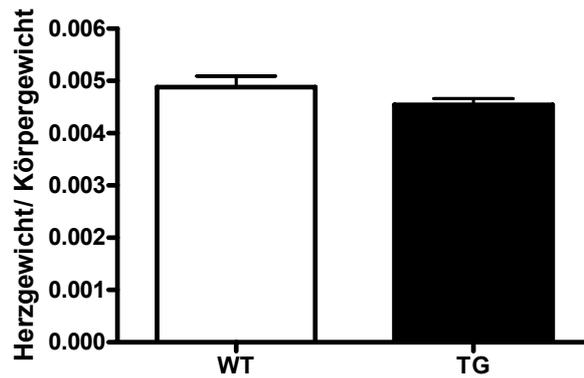
Druck (Abb. 12 A, B). Ebenso ist die Kontraktilität und Relaxation bei beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 12 C, D).



**Abb. 12 Messung der Herzleistung im „working heart“- Modus.** Bewertet wurde der intrakardiale systolische (ICPsys) und diastolische (ICPdia) Druck (A, B), die Kontraktions- und Relaxationsrate (maximale bzw. minimale Druckentwicklungsrate) (C, D) sowie der enddiastolische Druck (E). Alle genannten Parameter zeigen keine signifikanten Veränderungen in Wildtyp verglichen mit CTGF-transgenen Mäusen. Die Daten sind mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Gruppenumfang: WT n=7, TG n=8.

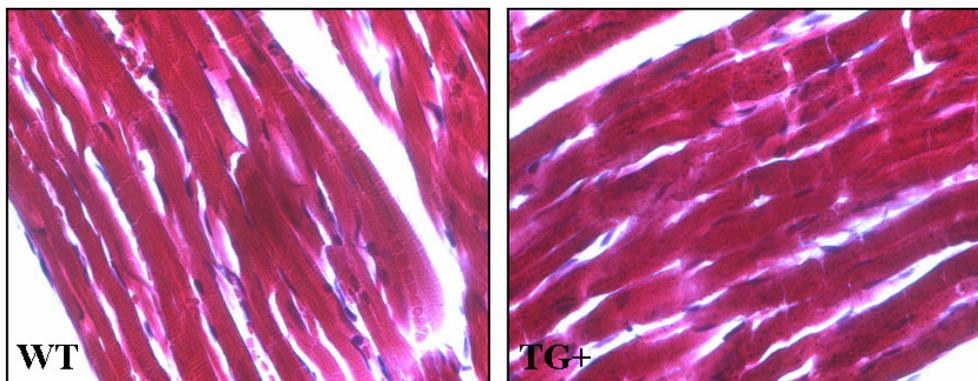
### 5.5.3 Kardiale Morphologie und Histologie der CTGF-transgenen Mäuse

Die echokardiographischen Befunde sowie die Diagnostik der kontraktile Leistung im „working heart“-Modus wurden durch die Untersuchungen der

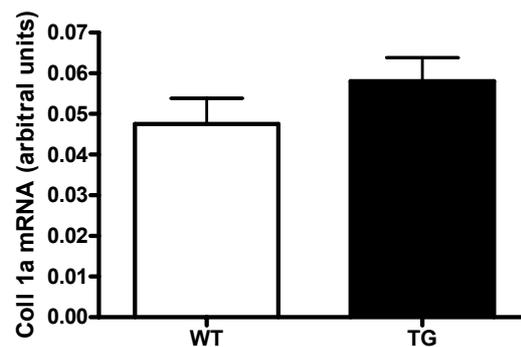


**Abb. 13 Relatives Herzgewicht von Wildtyp (WT) und CTGF-transgenen Maus (TG).** Das relative Herzgewicht zum Körpergewicht war bei 3 Monate alten CTGF-transgenen Mäusen verglichen mit Wildtyp nicht signifikant unterschiedlich. Die Balken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. (WT n=6, TG n=7 Tiere je Gruppe)

A



B



**Abb. 14 (A) Trichrom-Masson-Färbung von Herzschnitten 3 Monate alter Mäuse. (B) Relative mRNA-Expression von Kollagen 1α bezogen auf die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH gemessen mit Hilfe der TaqMan-PCR®.** Es wurde weder morphologisch noch auf der Ebene der Genexpression von Kollagen 1α Unterschiede in der Ausprägung der Fibrose in beiden Gruppen gefunden. Die Balken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. (n=4 Tiere je Gruppe)

Herzmorphologie und -histologie verifiziert. Hierbei wurde die Herzgröße als Maß für eine eventuelle Hypertrophie herangezogen. Die histologische

Färbung mit Trichrom-Masson wurde durchgeführt um mögliche fibrotische Veränderungen des Herzgewebes zu detektieren. Diese Färbemethode erlaubt es Muskel- und Bindegewebe voneinander abzugrenzen, wobei die Muskelfasern rötlich erscheinen, und das Bindegewebe blau dargestellt wird. Zusätzlich wurde die Expression des Fibrosemarkers Kollagen 1 $\alpha$  in mittels quantitativer TaqMan<sup>®</sup>- PCR verifiziert. Der Herzgewicht/ Körpergewicht-Quotient ist in der Wildtyp und CTGF-transgenen Maus nicht signifikant unterschiedlich, was einen Hypertrophie-bedingten Zuwachs des kardialen Gewebes ausschließt (Abb. 13). Hinsichtlich fibrotischer Veränderungen wurde ebenso kein Unterschied im Gehalt des Bindegewebes zwischen den beiden Gruppen festgestellt (Abb. 14A). Die Analyse der Expression des Fibrosemarkers Kollagen 1 $\alpha$  zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und CTGF-transgener Maus (Abb. 14B).

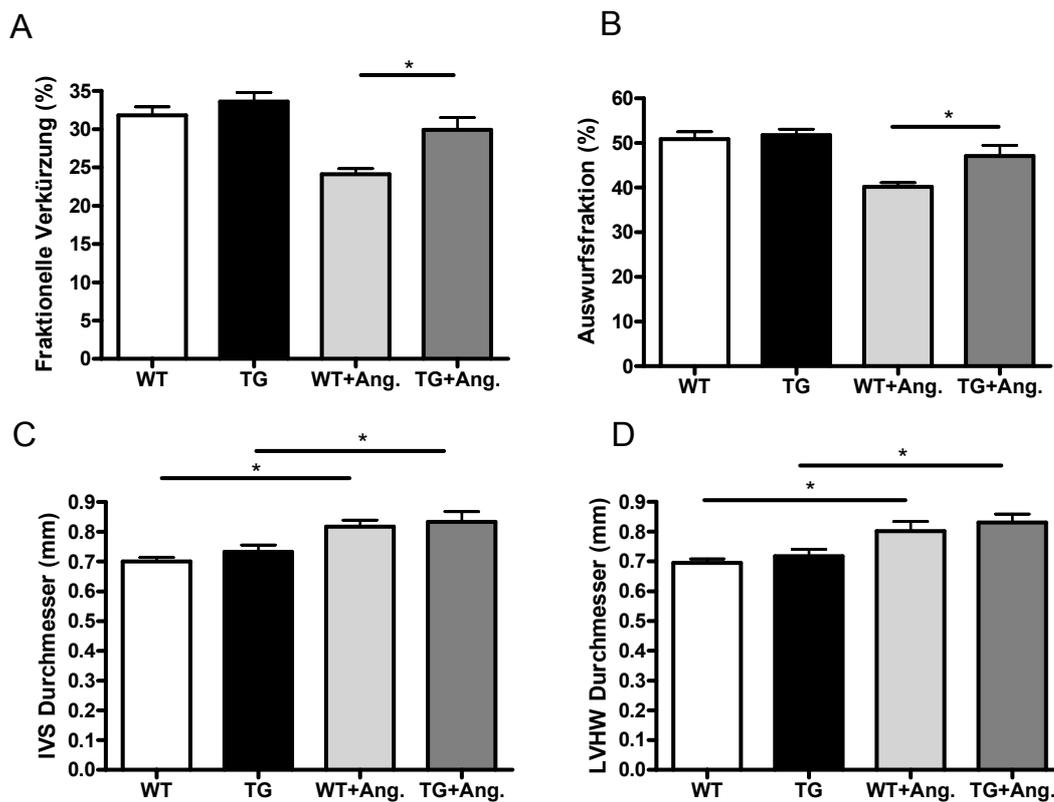
## **5.6 Kardiale Funktion und Herzmorphologie von CTGF-transgenen Mäusen unter Hypertrophie/ Insuffizienz-Bedingungen**

Um die Rolle von CTGF im Myokardium während der kardialen Hypertrophie zu untersuchen, wurden die CTGF-transgenen Tiere sowie eine Wildtyp-Kontrollgruppe mit Angiotensin II, einem potenten Hypertrophie-Induktor, zwei Wochen lang mittels osmotischer Minipumpen infundiert. Nachfolgend erfolgte die echokardiographische Charakterisierung mit anschließender Organentnahme.

### **5.6.1 Echokardiographische Charakterisierung von CTGF-transgenen Mäusen nach Angiotensin II-induzierter Hypertrophie**

Die reduzierte fraktionelle Verkürzung und Auswurfsfraktion in beiden Angiotensin II-behandelten Gruppen zeigt, dass die Behandlung mit Angiotensin II zu der erwarteten Reduktion der Kontraktilität und somit zu einer kardialen Dekompensation führte. Der erhöhte Durchmesser des intraventrikulären Septums (IVSd) sowie der posterioren Wand des linken Ventrikels (LVPWd) in den Angiotensin II-behandelten Gruppen dokumentiert

eine Veränderung der Herzgeometrie im Sinne der Hypertrophie. Auffällig ist der Unterschied in der fraktionellen Verkürzung und Auswurffraktion zwischen den beiden Ang II-behandelten Gruppen. So zeigt die behandelte transgene Gruppe eine mildere Einschränkung der kontraktilen Leistung im Vergleich zur Ang II-behandelten Wildtypgruppe. Dieser funktionelle Unterschied geht nicht mit einem signifikanten Unterschied der Herzwanddurchmesser (IVSd, LVPWd) der beiden behandelten Gruppen einher. Letztere zeigen keinen signifikanten Unterschied nach der Behandlung.

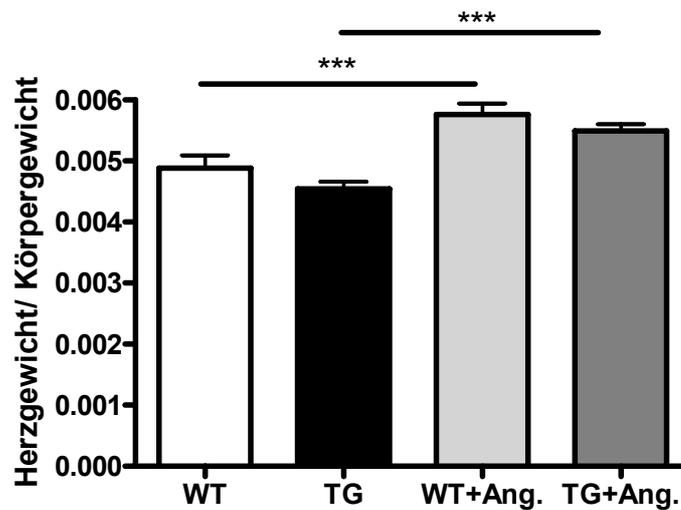


**Abb. 15 Echokardiographische Charakterisierung der CTGF-transgenen Mäuse (TG) im Vergleich zum Wildtyp (WT) während der Ang II-induzierten Hypertrophie.** Bewertet wurde die fraktionelle Verkürzung (A) und die Auswurffraktion (B) als Parameter für die systolische Funktion. Die Messung des intraventrikulären Septumdurchmessers (IVS) (C) und des Durchmessers der posterioren Wand des linken Ventrikels (LVPWd) (D) wurde zur Beurteilung der kardialen Hypertrophie erhoben. Die Daten sind mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Gruppenumfang: WT n=10, TG n=11, WT+Ang n=8, TG+Ang n=11. \*p<0,05

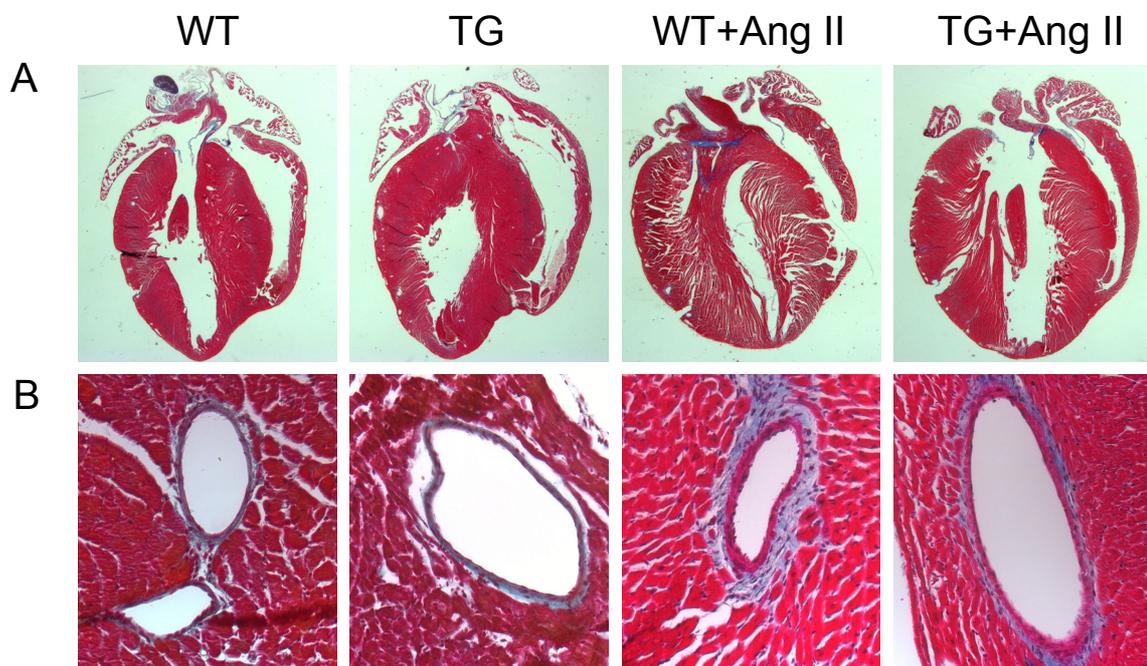
### 5.6.2 Kardiale Morphologie und Histologie der CTGF-transgenen Mäuse nach Angiotensin II-induzierten Hypertrophie

Die in der echokardiographischen Messung gewonnenen Daten über die Zunahme der Herzmasse nach der Stimulation mit Angiotensin II wurden

durch morphologische und histologische Analysen ergänzt. Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren



**Abb. 16 Relatives Herzgewicht von Wildtyp (WT) und CTGF-transgenen Maus (TG) während der Ang II-induzierten Hypertrophie.** Das relative Herzgewicht zum Körpergewicht war nach der Stimulation mit Angiotensin II in Wildtyp- und CTGF-transgenen Tieren tendenziell gestiegen. Die Balken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. (WT n=6, TG n=7, WT+Ang. n=8, TG+ang. n=8 Tiere je Gruppe)



**Abb. 17 Repräsentative histologische Trichrom-Masson Färbungen der Herzen der Wildtyp-Gruppe (WT), CTGF-transgenen (TG) sowie Wildtyp- und CTGF-transgenen Gruppe mit Angiotensin II behandelt (WT+Ang II, TG+ Ang II).** Dargestellt sind die Aufnahmen des gesamten Herzen (A) und der linksventrikulären Blutgefäße (B).

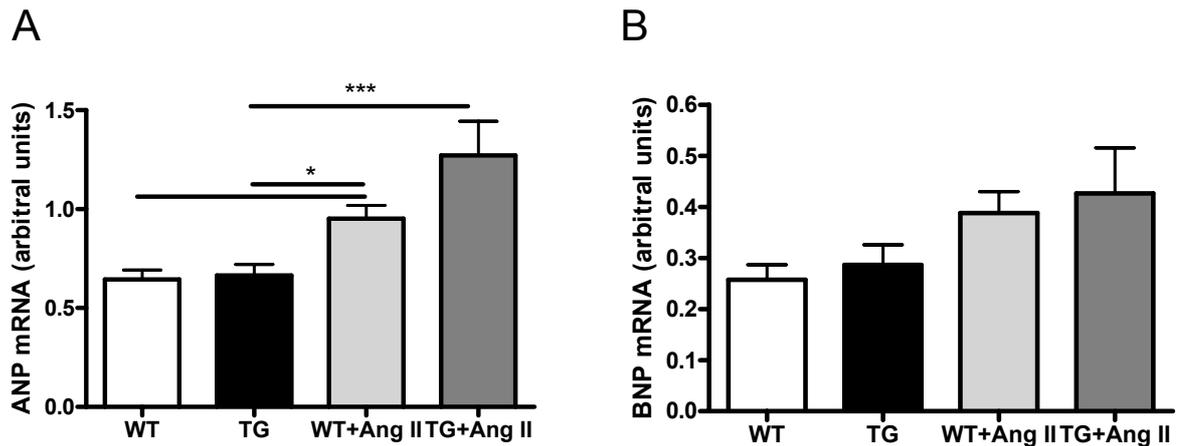
zeigten die Ang II-stimulierten Gruppen einen Anstieg des Herzgewichts/Körpergewicht-Quotienten. Innerhalb der beiden Angiotensin II-behandelten Gruppen ist der Quotient nicht signifikant unterschiedlich.

### **5.6.3 Genexpressionsanalyse der CTGF-transgenen Mäuse in Angiotensin II-induzierter Hypertrophie**

Wie aus den echokardiographischen Daten hervorgeht, zeigen die CTGF-transgenen Mäuse verglichen mit Wildtyp eine verbesserte Erhaltung der kardialen Pumpleistung unter Hypertrophie-Bedingungen. Die Analyse der Genexpression wurde im Experiment der Angiotensin II-induzierten Hypertrophie durchgeführt um einen Anhalt für eine mögliche Ursache der kardialen Protektion zu gewinnen. So wurden bekannte Gene untersucht, die als Marker für Hypertrophie, Angiogenese, Fibrosebildung sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -„Cycling“ dienen, und möglicherweise für die kardioprotektive Funktion von CTGF von entscheidender Bedeutung sind.

#### **5.6.3.1 Expression von ANP und BNP als Marker für Hypertrophie in Angiotensin II-induzierter Hypertrophie**

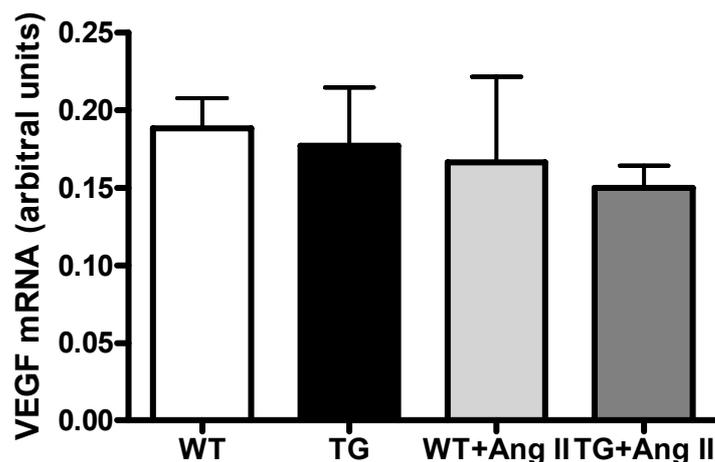
Pathophysiologische Belastungen wie z.B. einer gesteigerten Druck- oder Volumenbelastung begegnet das Herz mit einer Ausprägung kompensatorischer Hypertrophie. Kennzeichnend für diese Veränderung ist eine drastische Erhöhung der Expression des *Atrial Natriuretic Peptide* (ANP) und *Brain Natriuretic Peptide* (BNP). Mit Hilfe der quantitativen Taqman<sup>®</sup>-PCR wurde die mRNA-Expression der beiden Gene in Wildtyp- und CTGF-transgenen Herzen unter Basalbedingungen und Angiotensin II-induzierten Hypertrophie untersucht. Die Messung erbrachte, dass ANP signifikant und BNP tendenziell nach der Stimulation mit Angiotensin II in beiden Gruppen (WT, TG) hochreguliert war (Abb. 18 A, B). Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Ang II-behandelten Gruppen, was keinen Anhalt für eine stärkere Kompensation in einer der beiden Gruppen lieferte.



**Abb. 18 ANP- (A) und BNP-mRNA (B) Expression in Herzen von Wildtyp- (WT) und CTGF-transgenen Mäusen (TG) während der Ang II-induzierten Hypertrophie.** Die relative Expression von ANP und BNP nach der Stimulation mit Angiotensin II ist in WT und TG gestiegen jedoch war sie nicht signifikant verändert innerhalb der beiden behandelten Gruppen (WT+Ang II, TG+Ang II). Die Expression von ANP und BNP wurde im Verhältnis zur Expression von GAPDH gesetzt. Die Balken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. (WT n=5, TG n=5, WT+Ang II n=4, TG+Ang II n=5 Tiere je Gruppe)

### 5.6.3.2 Expression von VEGF als Marker für Angiogenese in Angiotensin II-induzierter Hypertrophie

Eine verstärkte Angiogenese und somit eine verbesserte Blutversorgung des linken Ventrikels könnte ebenso eine Ursache für eine verbesserte Kontraktion unter Hypertrophie-Bedingungen darstellen.

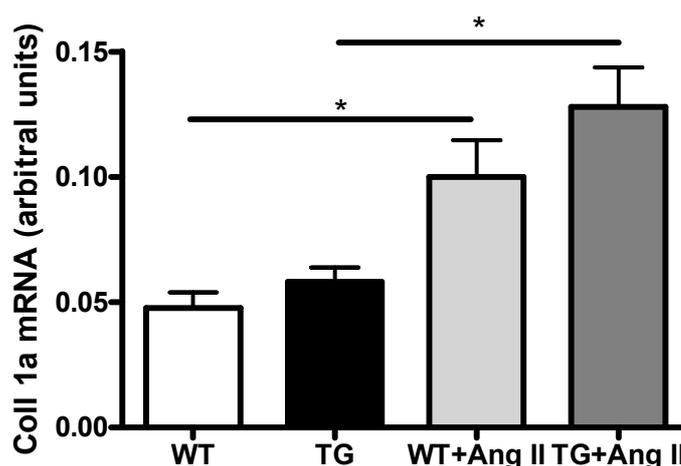


**Abb. 19 VEGF-mRNA Expression in Herzen von Wildtyp- (WT) und CTGF-transgenen Mäusen (TG) während der Ang II-induzierten Hypertrophie.** Die relative Expression von VEGF blieb unter basal- und Hypertrophie-Bedingungen unverändert. Die Expression von VEGF wurde im Verhältnis zur Expression von GAPDH gesetzt. Die Balken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. (WT n=5, TG n=5, WT+Ang II n=4, TG+Ang II n=5 Tiere je Gruppe)

Als Markergen für Angiogenese wurde *vascular endothelial growth factor* (VEGF) auf seine mRNA-Expression untersucht. Die quantitative PCR erbrachte bei Wildtyp und CTGF-Transgenen keine Unterschiede in der Expression von VEGF weder unter basalen- noch unter Hypertrophie-Bedingungen. Dieser Befund gibt keinen Anhalt für eine Korrelation zwischen der CTGF-Überexpression und Angiogenese (Abb. 19).

### 5.6.3.3 Expression von Kollagen 1 $\alpha$ als Marker für Fibrose in Angiotensin II-induzierter Hypertrophie

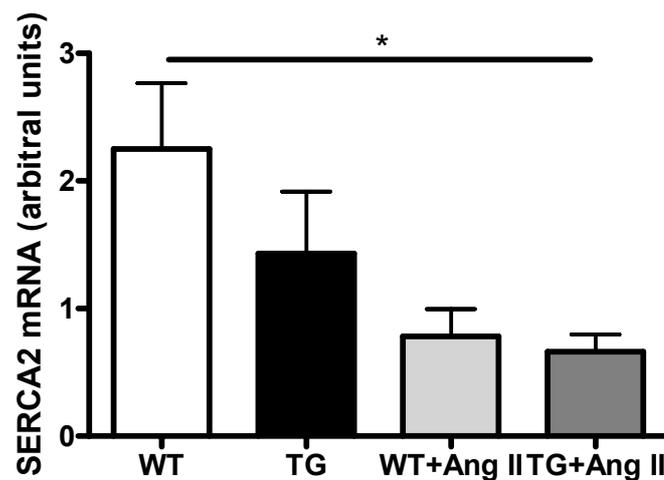
Ein reduzierter Grad der Fibrose könnte ein Grund für eine verbesserte Kontraktilität während der Ang II-induzierten Hypertrophie sein. Als Marker für eine quantitative Bestimmung der Fibrose wurde Kollagen 1 $\alpha$  untersucht. Die mRNA-Bestimmung ergab einen signifikanten Anstieg der Kollagen 1 $\alpha$ -Expression im hypertrophierten Gewebe sowohl der Wildtyp- als auch der CTGF-transgenen Mäuse, zeigte aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Ang II-behandelten Gruppen (Abb. 20). So lässt sich schließen, dass die Überexpression von CTGF keinen Einfluss auf den Ausprägungsgrad der Fibrose hat.



**Abb. 20 Kollagen 1 $\alpha$ -mRNA Expression in Herzen von Wildtyp- (WT) und CTGF-transgenen Mäusen (TG) während der Ang II-induzierten Hypertrophie.** Die relative Expression von Kollagen 1 $\alpha$  nach der Stimulation mit Angiotensin II ist in beiden Gruppen gestiegen jedoch war sie nicht signifikant verändert innerhalb der beiden Ang II-behandelten Gruppen. Die Expression von Kollagen 1 $\alpha$  wurde im Verhältnis zur Expression von GAPDH gesetzt. Die Balken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. (WT n=5, TG n=5, WT+Ang II n=4, TG+Ang II n=5 Tiere je Gruppe)

### 5.6.3.4 Expression von SERCA2 als Markergene für Ca<sup>2+</sup>-„Cycling“ in Angiotensin II-induzierter Hypertrophie

Ein effizienter Transport von Ca<sup>2+</sup> ins sarkoplasmatische Reticulum ist essentiell wichtig für die Kontraktion des Kardiomyozyten. Eine entscheidende Rolle bei diesem Prozess spielt die *Sarcoendoplasmatisches Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase* (SERCA2a), die als eine Ca<sup>2+</sup>-Pumpe fungiert. Ihre Effizienz sowie Quantität ist ausschlaggebend für die kontraktile Leistung des Kardiomyozyten. So wurde der Einfluss des CTGF-Transgens unter basalen und Hypertrophie-Bedingungen auf die Expression von SERCA2a untersucht. Die quantitative TaqMan<sup>®</sup>-PCR ergab, dass SERCA2a während der Hypertrophie/Insuffizienz zwar herunterreguliert wird, aber die Expression ist nicht unterschiedlich in beiden Angiotensin II-behandelten Gruppen (Abb. 21).

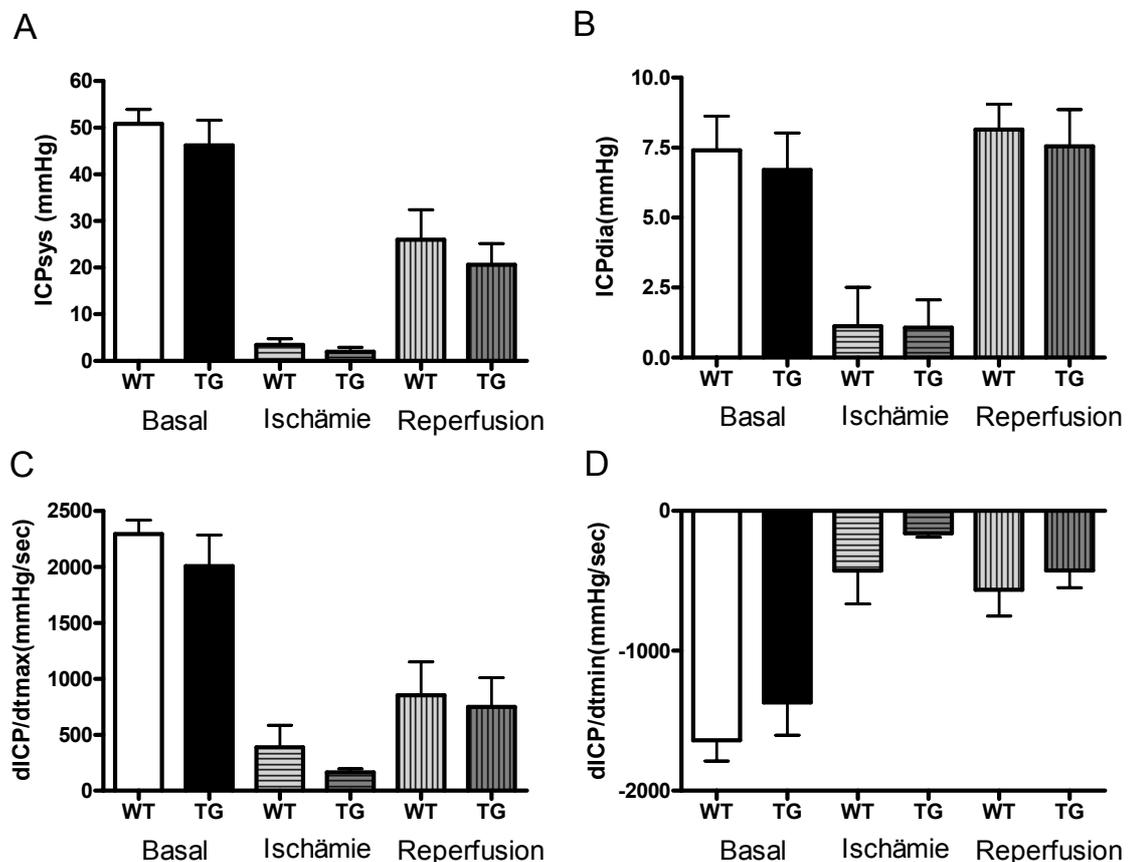


**Abb. 21 SERCA2-mRNA Expression in Herzen von Wildtyp- (WT) und CTGF-transgenen Mäusen (TG) während der Angiotensin II-induzierten Hypertrophie.** Die relative Expression von SERCA2a nach der Stimulation mit Angiotensin II ist in beiden Gruppen gesunken jedoch war sie nicht signifikant verändert innerhalb der beiden Angiotensin II-behandelten Gruppen. Die Expression von SERCA2a wurde im Verhältnis zur Expression von GAPDH gesetzt. Die Balken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. (WT n=5, TG n=5, WT+Ang II n=4, TG+Ang II n=5 Tiere je Gruppe)

## 5.7 Kardiale Funktion von isolierten CTGF-transgenen Herzen unter Bedingungen experimenteller Ischämie und Reperfusion

Das Modell der Ischämie und Reperfusion im „*working heart*-Modus“ stellt einen experimentellen Ansatz dar, in dem das isolierte Herz einem

kurzfristigen, kontrollierten oxidativen Stress ausgesetzt wird und anschließend wieder mit Nährmedium und Sauerstoff reperfundiert wird. Dieser Ansatz ahmt die Situation einer Reperfusionsläsion nach, die im Fall z.B. eines apoplektischen Insults/Gehirnschlaganfalls oder eines myokardialen Infarktes zu beobachten ist. Die kontinuierliche Ableitung von Parametern wie intrakardialer Druck in der Systole und Diastole sowie Kontraktions- und Relaxationsrate erlaubt eine präzise Bewertung des Effekts der oxidativen Restriktion auf kardiales Gewebe. Diese Methode ist hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit dem in vivo Infarkt-Modell überlegen, da die Infarktgröße nicht variabel ist.



**Abb. 22** Charakterisierung der kardialen Leistung isolierter Herzen von CTGF-transgenen Mäusen (TG) im Vergleich zum Wildtyp (WT) während einer experimentellen Ischämie und Reperfusion. Es wurden Parameter erhoben wie der intrakardiale Druck in der Systole und Diastole (ICPsys, ICPdia) (A, B), die Kontraktionsrate (dP/dtmax) sowie die Relaxationsrate (dP/dtmin) (C, D). Alle genannten Parameter sind im linken Ventrikel gemessen worden und sind bei Wildtyp- im Vergleich mit CTGF-transgenen- Herzen unter den Basal-, Ischämie- und Reperusionsbedingungen nicht signifikant unterschiedlich. Die Daten sind mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Gruppenumfang: WT n=7, TG n=8

Da gezeigt wurde, dass die Expression von CTGF während des myokardialen Infarktes stark hochreguliert ist, ist es von Interesse zu untersuchen, welche Rolle CTGF in derartiger Pathologie spielt. So wurden die isolierten Herzen in einem „*working heart*“-Modell mit Nährmedium gespült bis sie sich erholt haben, und anschließend wurde der Mediumfluß für 30 min unterbrochen. Die nachfolgende Reperfusion dauerte eine Stunde.

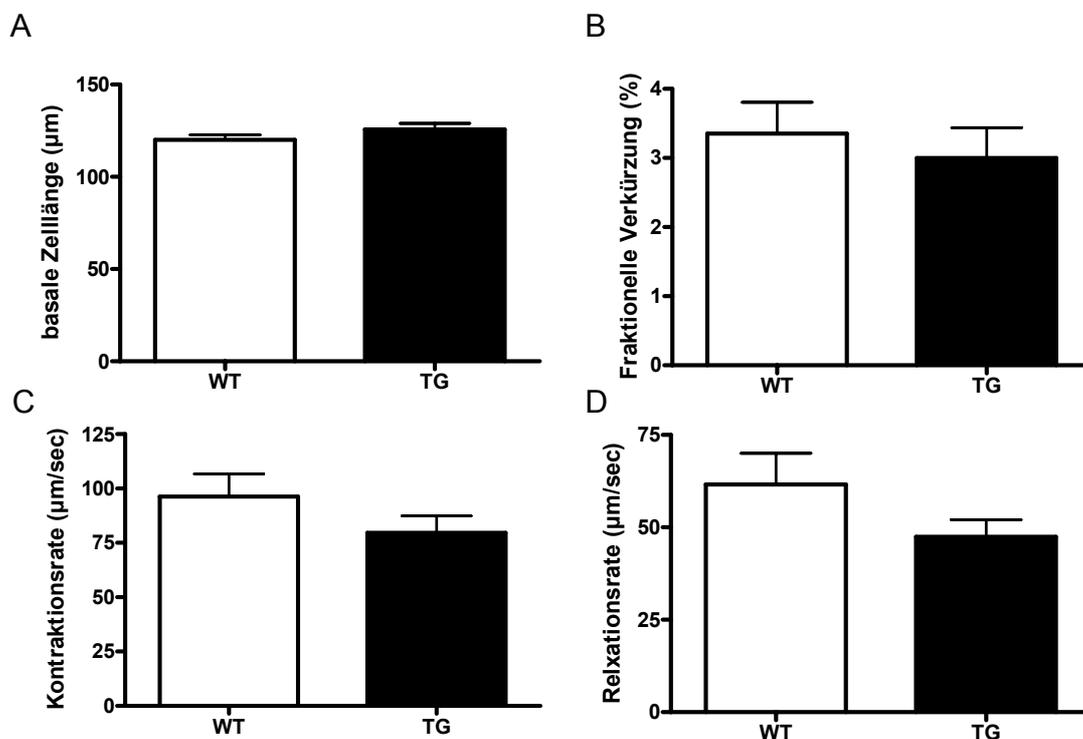
Die mittels einer intrakardialen Sonde im linken Ventrikel abgeleiteten Größen gaben Auskunft über die Empfindlichkeit des Gewebes gegenüber einer Ischämie und über ihre Fähigkeit sich von dieser wieder zu erholen. Der intrakardiale Druck in der Systole und Diastole ist ein Parameter für die Kontraktions- bzw. Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels. Sowohl der intrakardiale Druck in der Systole und Diastole als auch Kontraktions- und Relaxationsrate fielen während der Ischämie in beiden Gruppen (WT, CTGF-TG) deutlich ab, was ein Hinweis auf eine Verringerung der Pumpleistung ist. Der Abfall der Pumpleistung war beim Vergleich der Wildtyp- und transgenen Gruppe nicht signifikant unterschiedlich. Nach der Reperfusion des Gewebes war ein signifikanter Anstieg der kontraktilen Leistung in beiden Gruppen zu beobachten, der jedoch verglichen mit der präischämischen Leistung nur eine partielle Erholung reflektierte. Beide Gruppen zeigten nach der Reperfusion keine signifikant unterschiedliche Erholung. So war nach der Reperfusion der intrakardiale Druck in der Systole und Diastole sowie die Kontraktions- und Relaxationsrate in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

### **5.8 Studie des $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und der Kontraktilität einzelner Kardiomyozyten aus CTGF-transgenen Herzen**

Die Messung der Kontraktilität sowie des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten einzelner, isolierter Kardiomyozyten erlaubt Aussagen über die Kinetik und die zugrunde liegende intrazelluläre Funktion des Kardiomyozyten. Diese Analyse ist relevant, da sich das Verhalten einzelner Zellen in die Leistung des gesamten Herzens übersetzen kann. Die Analyse des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten ist von großer Bedeutung, da der stringent funktionierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux aus dem sarkoplasmatischen Reticulum (SR) ins Zytoplasma und zurück ins SR essentiell wichtig für die Kontraktion und Relaxation des Kardiomyozyten ist.

Dieser Regelkreis funktioniert auf einer „Beat to beat“-Basis und jegliche Unregelmäßigkeiten führen langfristig zur Veränderung der kardialen Funktion.

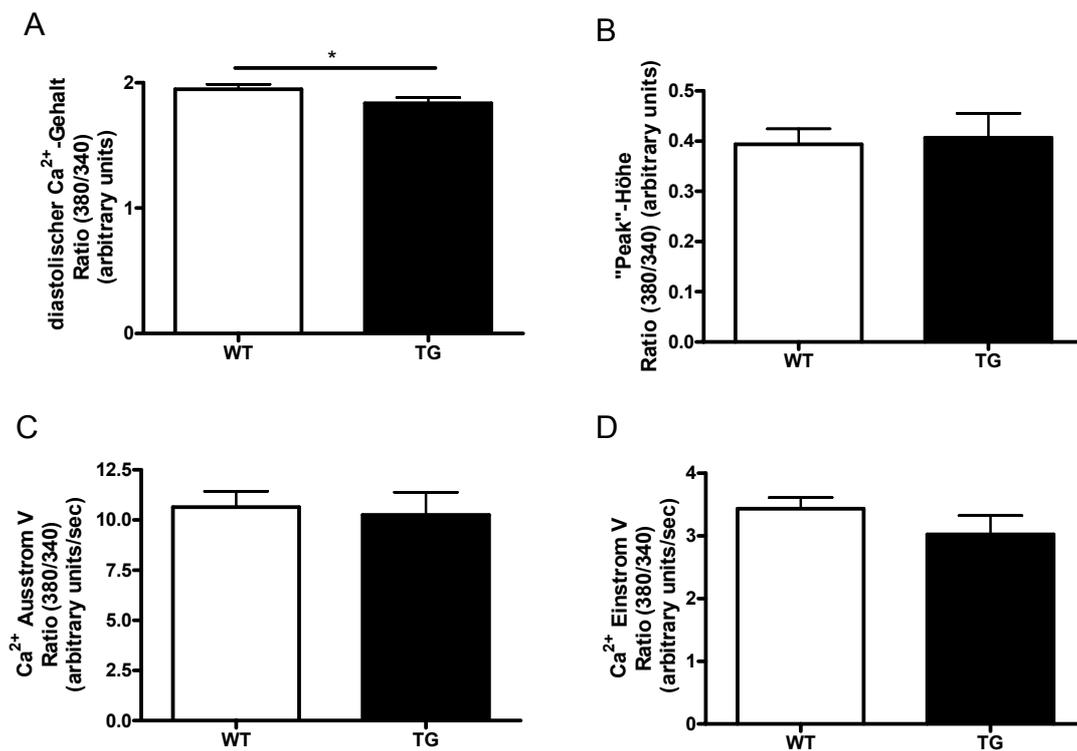
Die Kontraktion sowie der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient der isolierten Kardiomyozyten wurden mit Hilfe des IonOptix®-Systems gleichzeitig erhoben. Die gemessene Zelllänge der Kardiomyozyten in der Diastole zeigte, dass die Zellgeometrie bei Wildtyp und CTGF-transgenen Kardiomyozyten nicht unterschiedlich ist. Die kontraktile Bewegung der Kardiomyozyten wurde durch die fraktionelle Verkürzung sowie die Kontraktions- und Relaxationsrate charakterisiert (Abb. 23). Alle drei Parameter deuten auf ein unverändertes Kontraktionsverhalten der CTGF-transgenen Kardiomyozyten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, da sie nicht signifikant unterschiedlich sind.



**Abb. 23 Charakterisierung der Kontraktilität von isolierten Kardiomyozyten aus CTGF-transgenen (TG) im Vergleich zum Wildtyp-Mäusen (WT) mittels des IonOptix®-Systems.** Bewertet wurde der Zelllänge in der Diastole (A), die fraktionelle Verkürzung (B), die Kontraktions- sowie die Relaxationsrate (C, D). Alle genannten Parameter zeigen keine signifikanten Veränderungen in Wildtyp verglichen mit CTGF-transgenen Mäusen. Die Daten sind mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Gruppenumfang: WT n=40, TG n=38 Kardiomyozyten.

Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung werden die Kardiomyozyten mit Fura-2 beladen und anschließend elektrisch stimuliert. Fura-2 wird bei der Wellenlänge von

340nm und 380nm erregt und das Verhältnis (Ratio) beider Emissionen bei den genannten Wellenlängen korreliert direkt mit der Menge des intrazellulären Kalziums. Im Laufe der Messung werden folgende Parameter des Transienten erhoben: Basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Ratio, „Peak“-Amplitude, Maximale Anstieg-/Abfall- Geschwindigkeit. Die Erhebung der Menge des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes (Calcium basal-Ratio) in der Diastole ergab, dass die CTGF-transgenen Kardiomyozyten einen signifikant reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt im Vergleich zu Wildtyp-Zellen hatten.



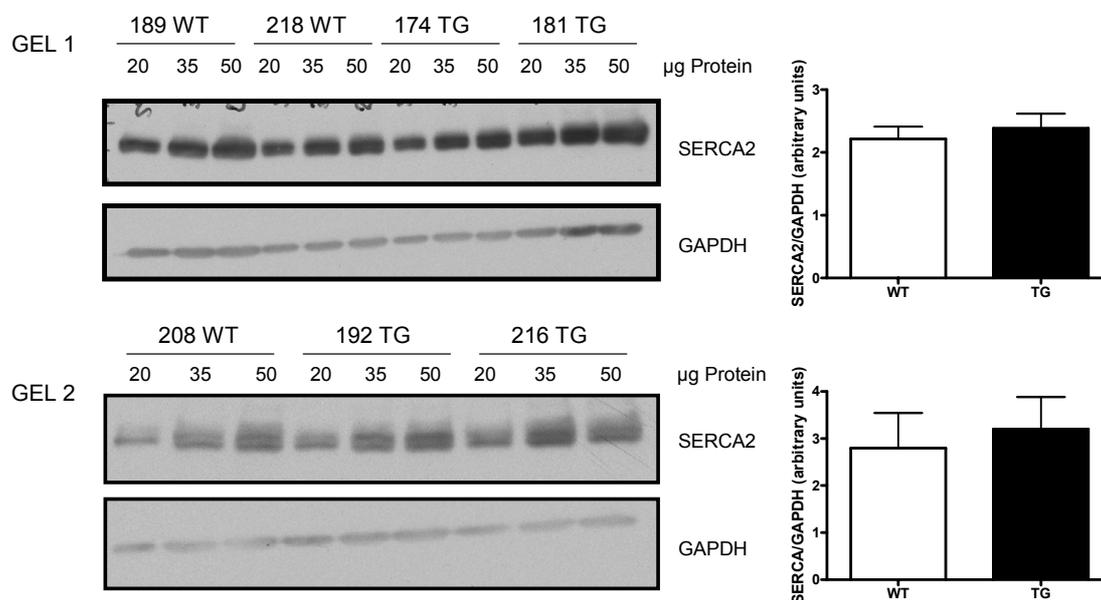
**Abb. 24 Charakterisierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von isolierten Kardiomyozyten aus CTGF-transgenen (TG) im Vergleich zum Wildtyp-Mäusen (WT) mittels des Ionoptix®-Systems.** Bewertet wurde der basale zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in der Diastole (A), die  $\text{Ca}^{2+}$ -„Peak“-Amplitude (B), die Geschwindigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ein- und Ausstroms aus dem Zytosol (C,D). Der zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in der Diastole war bei CTGF-transgenen- im Vergleich zu Wildtyp-Kardiomyozyten signifikant reduziert. Alle anderen Parameter zeigen keine signifikanten Veränderungen in Wildtyp verglichen mit CTGF-transgenen Mäusen. Die Daten sind mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Gruppenumfang: WT n=40, TG n=38 Kardiomyozyten. \*p<0.05 vs. Wildtyp.

Dies ist ein Hinweis auf eine höhere Effizienz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme ins SR bzw. des  $\text{Ca}^{2+}$ -Exports aus dem Zytosol in den extrazellulären Raum in CTGF-transgenen Kardiomyozyten. Hingegen ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak-Höhe sowie die Geschwindigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxes aus und in das SR ( $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom V,

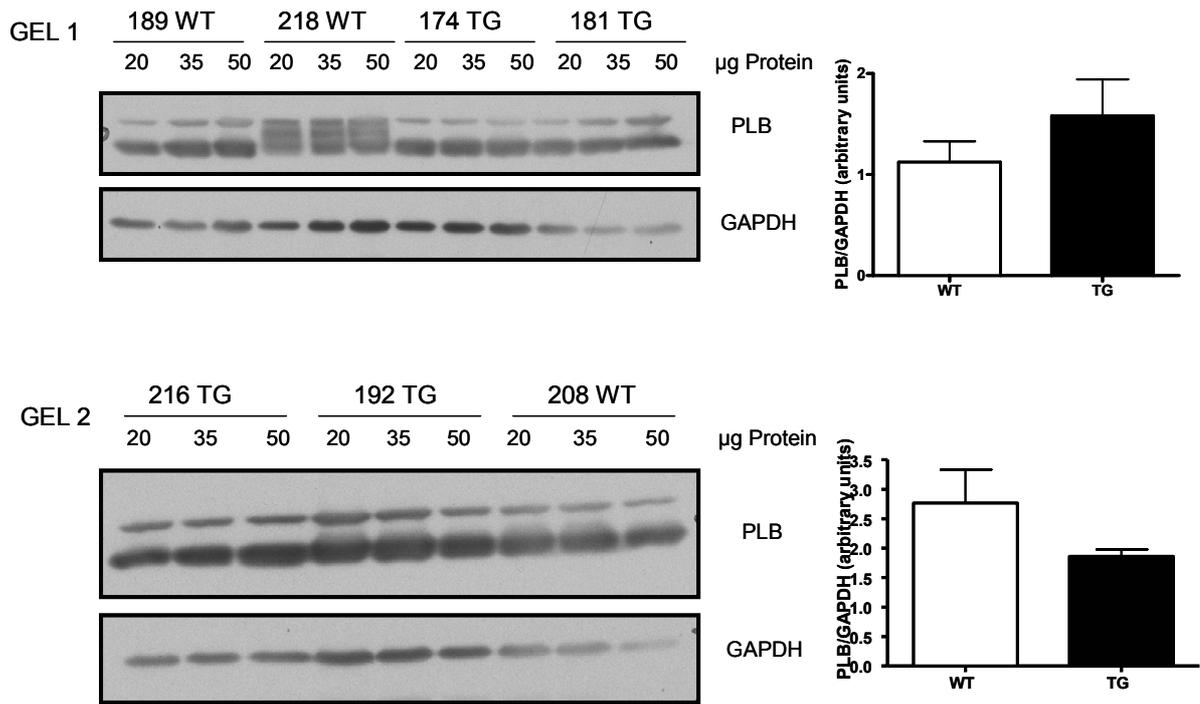
Ca<sup>2+</sup>-Einstrom V) in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 24).

### 5.8.1.1 Analyse der Komponenten des Ca<sup>2+</sup>-Cyclings in CTGF-transgenen Mäusen

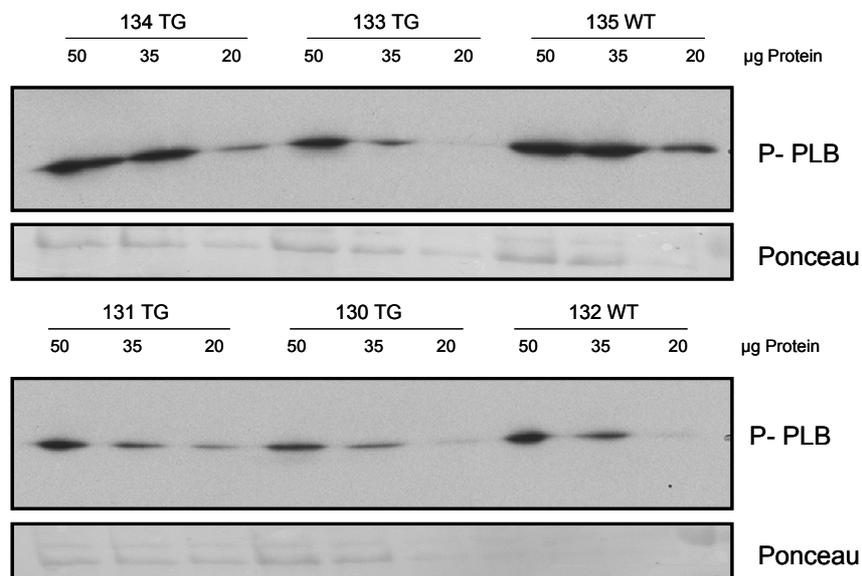
Die Messung des Ca<sup>2+</sup>-Transients in isolierten CTGF-transgenen Kardiomyozyten ergab ein vermindertes Ca<sup>2+</sup>-Niveau im Zytosol in der Diastole, was mit einer verbesserten Ca<sup>2+</sup>-Wiederaufnahme ins sarkoplasmatische Reticulum zusammenhängen kann. Diese Möglichkeit wurde überprüft, indem die Proteinexpression der Schlüsselkomponenten des Ca<sup>2+</sup>-Rücktransports, SERCA und Phospholamban (PLB), analysiert wurde. Wie erwähnt wird der Ca<sup>2+</sup>-Rücktransport ins SR von der ATPase SERCA2a bewerkstelligt, deren Aktivität von PLB reguliert wird. Ist PLB von PKA phosphoryliert, so dissoziiert es von SERCA2a und Ca<sup>2+</sup> kann ins SR zurückgepumpt werden. So wurde neben der Proteinexpression auch der Phosphorylierungszustand von PLB untersucht.



**Abb. 25 Western-Blot Analyse der Proteinexpression von SERCA2a in Wildtyp (WT) und CTGF-transgenen Mäusen.** Die Analyse wurde auf zwei Gelen durchgeführt. Expression von SERCA2a wurde im Verhältnis zur Expression von GAPDH gesetzt. Das Expressionsniveau von SERCA2a war in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Die Daten sind mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Gruppenumfang: WT n=3, TG n=5.



**Abb. 26 Western-Blot Analyse der Proteinexpression von PLB in Wildtyp (WT) und CTGF-transgenen Mäusen.** Die Analyse wurde auf zwei Gelen durchgeführt. Expression von PLB wurde im Verhältnis zur Expression von GAPDH gesetzt. Das Expressionsniveau von PLB war in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Die Daten sind mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Gruppenumfang: WT n=3, TG n=5.



**Abb. 27 Western-Blot Analyse der Proteinexpression von Phospho-PLB in Wildtyp (WT) und CTGF-transgenen Mäusen.** Die Analyse wurde auf zwei Gelen durchgeführt. Die Expression von Phospho-PLB wurde im Verhältnis zu einer unspezifische Bande, die mit Ponceau-Färbung detektiert wurde, gesetzt. Das Expressionsniveau von Phospho-PLB war in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Gruppenumfang: WT n=2, TG n=4.

Die Western Blot-Analyse der Wildtyp- vs. CTGF-transgenen Herzen ergab, dass sowohl SERCA2a als auch PLB sich in ihren Expressionsniveaus nicht unterscheiden (Abb 24, 25). Soweit die Quantifizierung des Western Blots es zulässt, war auch die Phosphorylierung von PLB in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 27).

## 6 Diskussion I

Der Ausgangspunkt für die funktionellen Untersuchungen von CTGF im Rahmen dieser Arbeit waren Affymetrix<sup>®</sup>-Gen-Chip-Analysen, die an herzspezifischen ErbB2-Knockout-Mutanten durchgeführt wurden. Diese erbB2-defiziente Maus repräsentiert ein etabliertes Modell für die dilatative Kardiomyopathie. Der konditionelle Knockout von erbB2 führt bei diesen Tieren bereits im Alter von 2 Monaten zu einer schweren kardialen Dysfunktion.<sup>84</sup> Die Expressionsanalyse, die noch vor der Ausprägung des kardialen Phänotyps, durchgeführt wurde, erbrachte eine starke Hochregulation der CTGF-mRNA in mutanten Herzen. Da aus der Literatur bekannt ist, dass die embryonale Genexpression mit der differentiellen Genexpression während der kardialen Pathogenese korreliert, erschien es sinnvoll die Befunde der Expressionsanalyse an Embryos zu verifizieren. So wurde mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung an E10.5-Embryos gezeigt, dass CTGF im mutanten Ventrikel deutlich stärker exprimiert wird als im Wildtyp. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Literaturdaten, die über eine Beteiligung von CTGF bei verschiedenen Arten von Kardiomyopathien berichten. Die Überexpression von CTGF im kardialen Gewebe wurde u.a. nach einem Infarkt, während fortgeschrittener Atherosklerose und in mehreren diabetischen Mausmodellen, die ebenso eine Kardiomyopathie ausprägen, festgestellt.<sup>41, 66</sup> Eine große Anzahl von Publikationen stellt eine Verbindung zwischen Fibrose verschiedener Organe und der Überexpression von CTGF her. Es wurde eine Hochregulation von CTGF in der Fibrose der Haut (Sklerodermie), Nieren, Lungen, Leber und mehreren kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben.<sup>18, 80, 87-89</sup> Fibrotische Veränderungen des Myokardiums repräsentieren ein charakteristisches Merkmal zahlreicher kardialer Pathologien. Es gibt sogar Berichte, die CTGF als einen diagnostischen Marker der kardialen Fibrose vorschlagen.<sup>70</sup> Weitere Arbeiten zeigen eine Beteiligung von CTGF bei der kardialen Hypertrophie. So führen hypertrophe Stimuli wie Endothelin-1 und Phenylephrin zu einer Induktion der CTGF-mRNA-Expression in Kardiomyozyten.<sup>71</sup>

Die Assoziation von CTGF mit Fibrose und seine Hochregulation in verschiedenen Formen von Kardiomyopathie implizieren seine mögliche Rolle bei der Pathogenese dieser Erkrankungen. Im Fokus des vorgestellten Projekts liegt die Untersuchung der Rolle von CTGF bei der Ausprägung von Fibrose und Hypertrophie im Herzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die kardiale Funktion von CTGF mit Hilfe eines herzspezifischen transgenen Mausmodells untersucht.

### 6.1 CTGF-Überexpression im murinen Herzen

Die transgene Maus wurde mit Hilfe eines Konstrukts hergestellt, bei dem die CTGF-cDNA, stammend von der Ratte, unter der Kontrolle eines Kardiomyozyten spezifischen *Myosin light chain-2* Promoters (MLC-2) stand. Die Verwendung der Ratten cDNA hat den Vorteil, dass es eine Unterscheidung zwischen endogener und transgener CTGF-Expression zulässt. Aufgrund der sehr starken Konservierung des CTGF-Proteins zwischen Maus und Ratte (98% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz) kann man davon ausgehen, dass das von der Ratte stammende CTGF-Protein im der Maus funktionell wirksam und somit für eine Überexpression in der Maus geeignet ist.

Wie mit Hilfe des RNase-Protection-Assays gezeigt werden konnte ist die Überexpression des transgenen CTGF wie erwartet auf das kardiale Gewebe beschränkt und ist in beiden Geschlechtern gleich stark vorhanden. Um die Lokalisation des überexprimierten CTGF-Proteins zu bestimmen, wurden histologische Färbungen des linksventrikulären Gewebes der transgenen und der Wildtyp-Mäuse durchgeführt. Die Färbung zeigte eine deutliche Anreicherung des CTGF-Proteins im interstitiellen Raum des linken Ventrikels der transgenen Maus, während der Wildtyp eine kaum detektierbare Expression aufwies. Die sehr schwache Expression von CTGF im gesunden linken Ventrikel des Wildtyp-Herzens ist übereinstimmend mit Daten aus der Literatur, die im postnatalen Herzen eine auf das Atrium beschränkte CTGF-Expression beschreiben.<sup>67</sup>

Um zu überprüfen, ob die Lokalisation des transgenen Proteins mit dem physiologischen CTGF-Expressionsort übereinstimmt, wurde das

linksventrikuläre Gewebe von zwei Modellen der kardialen Hypertrophie mit der transgenen Maus verglichen. Sowohl die spontan hypertensive Ratte (SHR) als auch die AOPEN-transgene Maus zeigen eine durch arterielle Hypertonie bedingte kardiale Hypertrophie mit begleitender Fibrose.<sup>85, 86</sup> Die Expression von CTGF in diesen Modellen wurde im linken Ventrikel im interstitiellen Raum beobachtet, was mit dem Expressionsort des transgenen CTGF korreliert.

Die Anwesenheit von CTGF im Interstitium ist insofern nicht überraschend, als dass CTGF ein sekretorisches Protein ist, welches im Fall des Transgens von Kardiomyozyten und im Wildtyp hauptsächlich von Fibroblasten sezerniert wird.<sup>18, 25</sup> Seine Assoziation mit der extrazellulären Matrix (ECM) und fibrotischem Bindegewebe steht im Einklang mit der Expression im interstitiellen Raum.<sup>70</sup>

Die Übereinstimmung der CTGF-Lokalisation im physiologischen Tiermodell und in der transgenen Maus lässt den Schluss zu, dass die CTGF-überexprimierende Maus ein geeignetes Modell zur Studie der CTGF-Funktion *in vivo* im Herzen darstellt.

## **6.2 Kardiale Funktion von CTGF unter Basalbedingungen- Charakterisierung der CTGF-transgenen Maus**

Um die Rolle von CTGF unter Basalbedingungen im Herzen zu ermitteln wurde initial eine echokardiographische Diagnostik an 3 Monate alten transgenen Mäusen durchgeführt. Diese nicht invasive Methode erlaubt Aussagen über die kontraktile Leistung sowie die linksventrikulären Dimensionen. Die Bewertung der fraktionellen Verkürzung und der Ejektionsfraktion, die ein Maß für die Kinetik des linken Ventrikels sind, waren in beiden Tiergruppen nicht signifikant unterschiedlich. Somit gab es keinen Anhalt für eine systolische oder diastolische Dysfunktion im transgenen Herzen. Ebenso die Messung des Durchmessers des Septums sowie des Quotienten aus der posterioren Wanddicke und dem diastolischen Durchmesser des linken Ventrikels, welche als Maß für eine eventuelle Hypertrophie dienen können, ergab keine Veränderungen der ventrikulären Geometrie. Die sehr gut reproduzierbare und präzise Messung der

kontraktilen Funktion an isolierten Herzen im „*working heart*“-Modus ergab keine Veränderungen des systolischen und diastolischen linksventrikulären Innendrucks sowie keine Abweichungen der Kontraktions- und Relaxationsrate. Der Vergleich der relativen Herzgewichte, als Mass für eine eventuelle hypertrophe Vergrößerung des Herzens, erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen und den Wildtyp-Mäusen. Die histologische Analyse des linksventrikulären Gewebes der beiden Gruppen zeigte keine sichtbaren Veränderungen der Gewebestruktur und keine Anzeichen für die Ausprägung einer Fibrose. Die Expression des Fibrose-Markers Kollagen 1 $\alpha$  zeigte ebenso keine signifikante Abweichung innerhalb der beiden Gruppen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Überexpression von CTGF basal zu keiner funktionellen Veränderung im Herzen führt. Auch strukturelle Veränderungen auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene sind durch die CTGF-Überexpression nicht entstanden.

Aus den gannanten Daten kann man schließen, dass die Anwesenheit von CTGF alleine nicht ausreichend ist um eine Kardiomyopathie auszulösen. Auch in einem weiteren transgenen Modell, welches CTGF in der Niere Podozyten-spezifisch überexprimiert, wurde berichtet, dass CTGF basal zu keinerlei Veränderungen der Histologie oder Funktion der Niere führt.<sup>90</sup> Diese Daten suggerieren, dass eine erhöhte CTGF-Expression in Gewebe keinen primären Stimulus für eine Hypertrophie oder Fibrose darstellt, sondern dass CTGF seine Funktion eher in Assoziation mit anderen Faktoren, die während der Kardiomyopathie aktiv sind, ausübt. CTGF scheint ein „*downstream*“-Mediator der Fibrose und Hypertrophie zu sein.

Die hypertrophen und fibrotischen Vorgänge im Myokardium werden durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Dazu gehören mechanische Belastung, autokrine, parakrine und endokrine Faktoren wie Angiotensin II, Aldosteron, Endothelin-1, natriuretische Peptide, Osteopontin und TGF- $\beta$ .<sup>91, 92</sup> In Anbetracht dieses komplexen Netzwerks von Faktoren, die die Hypertrophie regulieren, ist ein fehlender Phänotyp bei der alleinigen Überexpression von CTGF im Herzen naheliegend.

### 6.3 Die Rolle von CTGF in kardialer Hypertrophie/ Insuffizienz

Um die Rolle von CTGF bei der kardialen Hypertrophie und Fibrose zu untersuchen wurden transgene und Wildtyp-Mäuse mit Angiotensin II, einem Hypertrophie-Induktor, behandelt. Die echokardiographische Analyse ergab eine erwartungsgemäße Einschränkung der kontraktile Funktion in der transgenen und Wildtyp-Gruppe. Interessanterweise war aber die Kontraktionsschwäche bei den transgenen Tieren deutlich milder ausgeprägt. Die bessere LV-Funktion bei den CTGF-überexprimierenden Tieren korrelierte nicht mit einer stärkeren Hypertrophie, die durch die Messung der Septum- und posterioren Wand des linken Ventrikels echokardiographisch bestimmt wurde. Auch die relativen Herzgewichte, obwohl sie in beiden Angiotensin II-behandelten Gruppen angestiegen sind, waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen insuffizientem CTGF-Transgen und Wildtyp. Des Weiteren wurde die mRNA-Expression von ANP und BNP als Marker für die kardiale Hypertrophie untersucht. Diese Messung zeigte im Fall von ANP eine signifikante und bei BNP eine tendenzielle Induktion nach der Behandlung mit Angiotensin II, aber keine signifikanten Unterschiede zwischen der behandelten CTGF-transgenen und Wildtyp-Gruppe. Die genannten Ergebnisse weisen auf eine protektive Wirkung der CTGF-Überexpression im Herzen hin, ohne dass eine stärkere kompensatorische Hypertrophie-Antwort bei den transgenen Tieren zu beobachten ist. Eine verstärkte Induktion der Hypertrophie wäre eine plausible Ursache für eine verbesserte kontraktile Funktion insbesondere im Hinblick auf Studien, die CTGF mit Hypertrophie korrelieren.<sup>71</sup> Kemps et al. konnten zeigen, dass CTGF innerhalb von 1h nach der Stimulation mit prohypertrophen Substanzen wie Endothelin-1 und Phenylephrin in Kardiomyozyten hochreguliert wird.<sup>71</sup> Diese Reaktion ist Kardiomyozyten-spezifisch und ist nicht in anderen Zelltypen des Myokardiums zu beobachten. So wird vermutet, dass CTGF in Kardiomyozyten für die Propagierung der hypertrophen Stimuli verantwortlich ist.<sup>71</sup> Das hier vorgestellte Modell gibt keinen Anhaltspunkt für eine prohypertrophe Rolle von CTGF im Herzen. Allerdings wäre eine genauere Untersuchung der mikroskopischen Ultrastruktur der einzelnen Kardiomyozyten von Nutzen, um diese Aussage zu festigen.

Darüber hinaus ist der protektive Effekt der CTGF-Überexpression insofern überraschend, als CTGF in anderen Organsystemen bereits als ein profibrotischer Faktor etabliert ist.<sup>24, 26, 52, 60, 93</sup> Die Quantifizierung des Fibrose-Markers Kollagen 1 $\alpha$  sowie die histologische Evaluation des linksventrikulären Gewebes ergaben zwar einen Anstieg des Kollagen-Gehalts nach Stimulation mit Angiotensin II, aber der Fibrosegrad war bei beiden behandelten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Wenn man postuliert, dass CTGF für seine funktionelle Wirkung als profibrotischer Faktor die Präsenz von weiteren Faktoren benötigt, die im „*Setting*“ der Hypertrophie und Fibrose aktiviert werden, so sollten in der Situation einer Angiotensin II-induzierten Kardiomyopathie solche „Kofaktoren“ vorhanden sein. Dies würde implizieren, dass die transgenen Tiere nach der Stimulation mit Angiotensin II eine verstärkte Fibrose ausprägen sollten. Unsere Befunde suggerieren, dass CTGF im Herzen während der Fibrose zwar hochreguliert wird, aber seine potentiellen funktionellen Effekte auf die Ausprägung der Fibrose nicht dosisabhängig sind und somit im Transgen nicht sichtbar werden. Frazer et al. haben berichtet, dass CTGF die mRNA-Expression von Kollagen 1 $\alpha$  verstärkt.<sup>94</sup> Der in unserer Studie unter Angiotensin II-Stimulation beobachtete Anstieg der Kollagen 1  $\alpha$ - mRNA ist möglicherweise partiell durch CTGF verursacht, aber auch hier ist der Effekt unabhängig von der Menge des CTGF-Proteins.

Darüber hinaus steht die protektive Wirkung von CTGF im Herzen in Kontrast zu den Befunden die an der Podozyten-spezifischen CTGF-transgenen Maus gewonnen wurden. Diese Maus zeigt in einem Streptozotocin induzierten Diabetes Typ1-Modell eine Verschlechterung der Nierenfunktion.<sup>90</sup> Diese ist begleitet von verstärkter Albuminurie, von einer Erweiterung des glomerulären Mesangialareals, Podozyten-Vakuolisierung und reduzierter Anzahl der Podozyten. Auch in diesem Modell ist die mRNA-Expression von Kollagen 4A3 und Fibronectin in den beiden diabetischen Gruppen nicht unterschiedlich, allerdings ist die Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2), die den Abbau von Kollagen und Fibronectin steuert, in der transgenen diabetischen Maus deutlich verringert. Dieser Effekt trägt möglicherweise zur Verschlechterung der Nierenleistung bei. Die Autoren schlagen vor, dass der von Podozyten sezernierte CTGF parakrin die CTGF-

Expression in Mesangialzellen induziert und diese dann eine Inhibition der ECM-Degeneration zur Folge hat. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde die Auswirkung der CTGF-Überexpression auf die Aktivität der MMP-2 nicht ermittelt, da die histologische Analyse keinen Anhalt für eine verstärkte Fibrose bei Angiotensin II-behandelten CTGF-Tieren ergab.

Da der protektive Phänotyp der CTGF-Überexpression im Herzen weder in Korrelation mit dem Grad der Fibrose noch mit dem Grad der kompensatorischen Hypertrophie steht, wurde in der vorliegenden Studie eine verstärkte Vaskularisierung des kardialen Gewebes als eine weitere mögliche Grundlage des Phänotyps untersucht. So ist z.B. denkbar, dass eine verstärkte Vaskularisierung zu einer verbesserten Pumpleistung unter Insuffizienz-Bedingungen führen könnte. Da CTGF aus der Literatur für seine proangiogene Wirkung bekannt ist,<sup>93, 95</sup> erscheint es plausibel, dass eine verstärkte Angiogenese als Effekt der CTGF-Überexpression möglich wäre. Als Maß für den Grad der Angiogenese wurde die mRNA-Expression von VEGF bewertet. VEGF ist ein wichtiges angiogenes Mitogen und ein etablierter Marker für diesen Prozess.<sup>96</sup> Die Ergebnisse der quantitativen PCR zeigten, dass VEGF unter hypertrophen Bedingungen nicht reguliert ist und seine Expression im Wildtyp und CTGF-transgener Maus vergleichbar stark ist. Dieser Befund suggeriert, dass die CTGF-Überexpression in Kardiomyozyten keinen Effekt auf die Angiogenese hat. Allerdings wären weitere Untersuchungen notwendig um diese Aussage zu bestätigen. Die Bewertung der VEGF-mRNA-Expression lässt leider die regulatorischen Aspekte der VEGF-Aktivität außer Betracht. So ist es bekannt, dass CTGF in der Lage ist an VEGF zu binden und dessen proangiogene Effekte zu inhibieren.<sup>97</sup> Untersuchungen der Expression von weiteren Markern sowie der Gefässdichte in Herzen transgener Tiere bieten sich als eine aufschlussreiche Alternative zum Untermauern der Aussage an.

#### 6.4 Effekte der CTGF-Überexpression auf die Kinetik und den $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten isolierter Kardiomyozyten

Obwohl CTGF von den Kardiomyozyten exprimiert wird ist seine Bedeutung für die Kontraktion bislang vollständig ungeklärt. Im Rahmen dieses Projekts wurde die kontraktile Leistung einzelner CTGF-überexprimierender Kardiomyozyten untersucht. Bei der Analyse der zellulären Kontraktion ist die Betrachtung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unumgänglich. Die Kontraktion der Kardiomyozyten ist abhängig von einem stetigen Fluss des Calciums aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) ins Zytoplasma in der Systole und einer anschließenden Wiederaufnahme des zytosolischen Calciums ins SR um die Diastole einzuleiten. Dieser Prozess ist stringent reguliert und jede Unregelmässigkeit führt kurz- oder langfristig zu einer kontraktilen Dysfunktion. Mit Hilfe des IonOptix<sup>®</sup>-Systems wurde an den isolierten Kardiomyozyten die Kontraktion und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient gleichzeitig abgeleitet. Die Messungen ergaben, dass die CTGF-transgenen Kardiomyozyten verglichen mit Wildtyp ein normales Kontraktionsverhalten aufwiesen. Bei einer unauffälligen Zellgeometrie zeigten die CTGF-transgenen Zellen eine normale fraktionelle Verkürzung sowie eine unveränderte Kontraktions- und Relaxationsrate. Die Analyse des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zeigte bemerkenswerterweise einen signifikant verminderten diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt im Zytosol der transgenen Kardiomyozyten, was auf eine verstärkte „Clearance“ des Calciums hindeutet. Die Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -„Peaks“ sowie die Geschwindigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ein- und Ausstroms aus dem SR blieben bei beiden Gruppen unverändert. Eine gesteigerte „Klärung“ des Zytosols von  $\text{Ca}^{2+}$  könnte ein Zeichen für eine verbesserte Wiederaufnahme ins SR sein. Dies könnte in einer verstärkten Aktivität und/oder Expression der wichtigsten  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe (SERCA2a) begründet sein. Eine weitere Option ist eine reduzierte Expression oder Phosphorylierung des SERCA2a-Inhibitorrs Phospholamban (PLB). Eine Analyse der Proteinexpression von SERCA2a, PLB und phospho-PLB zeigte keine Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Herzen. Auch die mRNA-Expressionsanalyse von SERCA2a zeigte keine signifikanten Unterschiede

zwischen der CTGF-transgenen- und Wildtyp-Gruppe. Nach Angiotensin II-induzierter Hypertrophie war eine Herunterregulation der SERCA-mRNA zu beobachten, die jedoch beide behandelten Gruppen im gleichen Masse betraf. So zeigen diese Befunde, dass der Prozess der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme wahrscheinlich nicht verändert ist und von der CTGF Überexpression unbeeinflusst bleibt. Eine weitere Möglichkeit, die dem verminderten diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt zugrunde liegen könnte, ist ein verstärkter Efflux von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Kardiomyozyten heraus in den interzellulären Raum. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Möglichkeit nicht untersucht. Diese Hypothese würde einer Analyse des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers verlangen. Dieser Ionen-Austauscher ist im murinen Herzen für die „Clearance“ von 7% des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  verantwortlich.<sup>98</sup>

Zusammenfassend kann man sagen, dass obwohl die Gründe für die verbesserte „Clearance“ von Calcium aus dem Zytosol nicht geklärt werden konnten, ein solcher Phänotyp unter Umständen zu einer verbesserten kontraktile Leistung führen kann. Obwohl diese veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik zu keiner offensichtlichen Verbesserung der Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten im Basalzustand führte, ist es denkbar, dass dieser Effekt unter Belastungsbedingungen, wie beispielsweise arterielle Hypertonie von Vorteil ist. So ist es nicht auszuschließen, dass die Protektion, die CTGF-transgenen Herzen nach der Behandlung mit Angiotensin II ausprägen auf diese modifizierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik zurückzuführen ist.

Offen bleibt die Frage, welcher molekulare CTGF-vermittelte Mechanismus dem verbesserten  $\text{Ca}^{2+}$ -Cycling zugrunde liegt. Dieses Ergebnis impliziert eine neue, bislang nicht beschriebene, Funktion von CTGF im Kardiomyozyten, welche ein Gegenstand weiterer Forschung bleibt.

## **6.5 Effekte der CTGF-Überexpression unter Bedingungen der Ischämie und Reperfusion**

Das Modell der Ischämie und Reperfusion ahmt eine pathologische Situation nach, wie sie beim Herzinfarkt oder Appoplex (Schlaganfall) vorkommt. Das isolierte Herz wird hierbei einem kurzfristigen oxidativen Stress ausgesetzt und anschließend wieder mit Nährmedium und Sauerstoff reperfundiert. Da

gezeigt wurde, dass die Expression von CTGF während des myokardialen Infarktes stark hochreguliert ist, ist es von Interesse zu untersuchen, welche Rolle CTGF in derartiger Pathologie spielt.

Die Messungen der Kontraktilität und Relaxation nach der Ischämie haben ergeben, dass die Wildtyp- und CTGF-transgene Gruppe auf die Sauerstoffrestriktion im gleichen Masse reagieren. Auch die Erholungsrate nach der Reperfusion gemessen am systolischen und diastolischen intrakardialen Druck sowie an Kontraktions- und Relaxationsrate zeigt einen ähnlichen Grad der Erholung in beiden Gruppen. Aus diesen Befunden ist zu schließen, dass die Überexpression von CTGF sich nicht auf die unmittelbare Reaktion des kardialen Gewebes auf die Ischämie und Reperfusion auswirkt. Wahrscheinlicher ist es, dass CTGF seine Rolle zu einem späteren Zeitpunkt nach einem Infarkt ausübt. Chuva de Sousa Lopes et al. haben berichtet, dass die CTGF-mRNA nach einer Woche Erholung post-Infarkt im Narbengewebe sowohl von Kardiomyozyten als auch von Fibroblasten verstärkt exprimiert wird.<sup>67</sup> Auch noch nach vier Wochen war eine CTGF-Expression in Fibroblasten des Narbengewebes zu verzeichnen. Obwohl die genaue Funktion von CTGF bei der Heilung des Narbengewebes nicht bekannt ist, ist davon auszugehen, dass diese mit TGF $\beta$  assoziiert ist. Dies erscheint aufgrund des gemeinsamen Expressionsmusters plausibel.<sup>67</sup>

## **6.6 Potentieller Einfluss der CTGF Überexpression auf die Signaltransduktion**

Das bemerkenswerte Ergebnis dieser Studie, dass CTGF alleine nicht ausreichend ist um phänotypische Veränderungen hervorzurufen, wirft die Frage nach den kostimulatorischen Faktoren auf, die die Aktion von CTGF fördern oder sogar ermöglichen. Da die CTGF-Expression im Herzen auf pathologische Situationen beschränkt ist, ist davon auszugehen, dass solche Kofaktoren im pathologischen *Setting*, wie z.B. während einer Hypertrophie, gegeben sind. Naheliegend ist die Beteiligung von TGF $\beta$ , welcher bekannt ist, in verschiedenen Kardiomyopathien hochreguliert zu sein. Ferner ist bekannt, dass CTGFs biologische Rolle von der Präsenz von TGF $\beta$  abhängig ist.<sup>62</sup> In

der Tat ist eine direkte Interaktion zwischen CTGF und TGF $\beta$ 1 dokumentiert, die die Bindung an den TGF $\beta$  Typ II-Rezeptor potenziert.<sup>62</sup> Gleichzeitig interagiert CTGF mit anderen Signalwegen. So ist von einer physikalischen Bindung zwischen *bone morphogenic protein's* (BMPs) and CTGF berichtet worden.<sup>62</sup> Diese Bindung resultiert in einer Inhibierung der Bindung von BMP an den BMP1a-Rezeptor und im gestörtem *downstream Signaling*. Interessanterweise hat Zeisberg et al. kürzlich berichtet, dass TGF $\beta$  und BMP-7 antagonistische Wirkungsweisen bei kardialer Fibrose haben.<sup>99</sup> Diese gegensätzlichen Effekte betreffen den Prozess der endothelial-mesenchymalen Transition (EndMT), welche stattfindet, wenn während der Fibrose endotheliale Zellen zu kardialen Fibroblasten übergehen und somit zur Verstärkung der Fibrose beitragen. TGF $\beta$ 1 induziert die Fibrose und auch den Prozess des EndMT, während BMP-7 den endothelialen Phänotyp bewahrt und sogar die TGF $\beta$ 1 induzierte Transition aufhebt.<sup>99</sup> Es ist denkbar, dass CTGF beide Signalwege simultan beeinflusst und für eine Balance zwischen ihnen sorgt. Zweifellos sollte diese Hypothese experimentell belegt werden, aber sie repräsentiert eine mögliche Erklärung für das überraschende Ergebnis dieser Studie, welches die CTGF-assoziierte Protektion während der Hypertrophie ist. Auch andere Signalwege, die durch Integrin- und Neurotrophinrezeptoren vermittelt werden, sind mit der Aktion von CTGF assoziiert.<sup>42, 51, 63</sup> Darüberhinaus ist gezeigt worden, dass CTGF mit dem Wnt-Corezeptor LRP6 interagiert und die Wnt-abhängige Signaltransduktion inhibiert.<sup>51</sup> Diese Daten legen die Vermutung nah, dass CTGF als eine Matrix-assoziiertes regulatorischer „Hebel“ verschiedener Signaltransduktionswege agiert. Die Aufklärung der Rolle der einzelnen molekularen Targets von CTGF in der Entstehung der Kardiomyopathie bleibt eine spannende Herausforderung für die zukünftige Forschung.

## 6.7 Ausblick

Die bisherigen Ergebnisse lassen einige Fragen unbeantwortet. So bleibt es zu klären wie robust die protektive Wirkung der CTGF-Überexpression in anderen Modellen der Herzinsuffizienz ist. Als ein gut geeigneter experimenteller Ansatz bietet sich eine Kreuzung der CTGF-transgenen Linie

mit der AOGEN-überexprimierenden Mauslinie an. Die letztere repräsentiert ein etabliertes Modell des Bluthochdrucks mit einer ausgeprägten kardialen Hypertrophie und Fibrose im Alter von 8-12 Wochen.<sup>86</sup> Dieses experimentelle Modell kommt der humanen kardialen Hypertrophie, wie sie bei Patienten mit chronischem Bluthochdruck beobachtet wird, sehr nahe.

Derüber hinaus bleibt zu untersuchen welche Effekte die CTGF-Überexpression in andern transgenen Linien hat. Diese Analyse ist notwendig, da die Integration des transgenen Konstrukts im Genom zufällig ist und somit Lokus-assoziierte Effekte ausgeschlossen werden müssten.

Von Interesse ist ebenso die Aufklärung der molekularen „Targets“ von CTGF. Eine genomweite Transkriptanalyse wäre ein sinnvoller und schnell realisierbarer experimenteller Ansatz, um die Aktivierung verschiedener Signalwege in der transgenen- im Vergleich zur Wildtypmaus zu untersuchen.

## 7 Zusammenfassung I

Connective tissue growth factor (CTGF) ist ein sekretorisches Protein, das bei verschiedenen experimentellen Modellen sowie während der humanen Herzinsuffizienz stark induziert ist. Die Überexpression von CTGF steht im Zusammenhang mit einer Akkumulation der extrazellulären Matrix in humanen atherosklerotischen Läsionen, nach myokardialem Infarkt sowie im vaskulären und kardialen Gewebe bei experimentellem Bluthochdruck. Die starke Überexpression sowie die Assoziation mit der Bildung der extrazellulären Matrix, lässt eine essentielle Rolle von CTGF bei fibrotischen Prozessen vermuten. Im Rahmen dieser Studie wurde die Rolle von CTGF bei der kardialen Funktion sowie Fibrosebildung untersucht. Um den Einfluss von CTGF im Myokardium zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell mit herzspezifischer CTGF-Überexpression generiert. In vivo Untersuchungen zeigten bei CTGF-transgenen- verglichen mit Wildtyp-Mäusen eine unveränderte kardiale Funktion ohne einen Anhalt für eine kontraktile Dysfunktion. Die Herzmorphologie und –gewicht blieben ebenso unverändert. Eine mögliche Relevanz von CTGF in kardialen Belastungssituationen wurde im Modell der Angiotensin II induzierten Hypertrophie untersucht. Dieser Ansatz zeigte, dass CTGF-überexprimierende Mäuse eine im Vergleich zum behandelten Wildtyp besser erhaltene kontraktile Funktion aufweisen. Der Grad der Hypertrophie und der kardialen Fibrose blieb in der transgenen Maus unverändert. Eine weiterführende Analyse des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Transienten in CTGF-transgenen Kardiomyozyten erbrachte einen signifikant niedrigeren diastolischen intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Gehalt im Vergleich zum Wildtyp, was sich potentiell protektiv auf die Kontraktilität unter Hypertrophie-Bedingungen auswirken kann. Die genannten Daten liefern eine Evidenz, dass CTGF kein Schlüsselaktivator für Fibrose ist. Vielmehr unterstützen die folgendenden Ergebnisse eine neue Funktion von CTGF als kardioprotektiver Faktor bei ventrikulärer Hypertrophie. Dieser protektive Effekt beruht möglicherweise auf einer CTGF-abhängigen Verbesserung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Haushalts. Die genaue Funktion von CTGF beim  $Ca^{2+}$ -Handling des Kardiomyozyten bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

## Abstract I

Connective tissue growth factor (CTGF) is a secretory protein being strongly induced in various experimental models as well as in human heart failure. The overexpression of CTGF is robustly associated with the accumulation of the extracellular matrix in human atherosclerotic lesions, after myocardial infarction and in myocardial and vascular tissue in experimental hypertension. Both, the strong induction in fibrotic disorders as well as the association with the formation of the extracellular matrix implies an essential contribution of CTGF in the pathogenesis of fibrosis. The aim of this study was to elucidate the role of CTGF in the cardiac function and fibrosis formation. In order to determine the impact of CTGF on the myocardium a transgenic mouse model with heart specific CTGF overexpression was generated. In vivo experiments revealed an unchanged cardiac function in transgenic mice compared to wild type without an indication of contractile dysfunction. The heart morphology and weight remained also unaltered. The relevance of CTGF for the cardiopathogenesis was examined in the Angiotensin II induced cardiac hypertrophy model. In this experimental setting the CTGF overexpressing mice exhibited a better preserved contractile function than the wild-type mice. However, both, treated wild type and transgenic mice displayed hypertrophy and cardiac fibrosis to the same extent. Further analyses of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -transients indicated a reduced cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  content during the diastole in transgenic cardiomyocytes. This may result in a protective effect on the contractile function under hypertrophic conditions. This data provide evidence, that CTGF itself is not able to induce fibrosis. Moreover, these results imply a new function of CTGF as a cardioprotective factor in hypertrophy. The protective effect of CTGF is possibly based on its action on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -cycling. The comprehensive understanding of CTGFs role in  $\text{Ca}^{2+}$ -handling remains an object of further investigation.

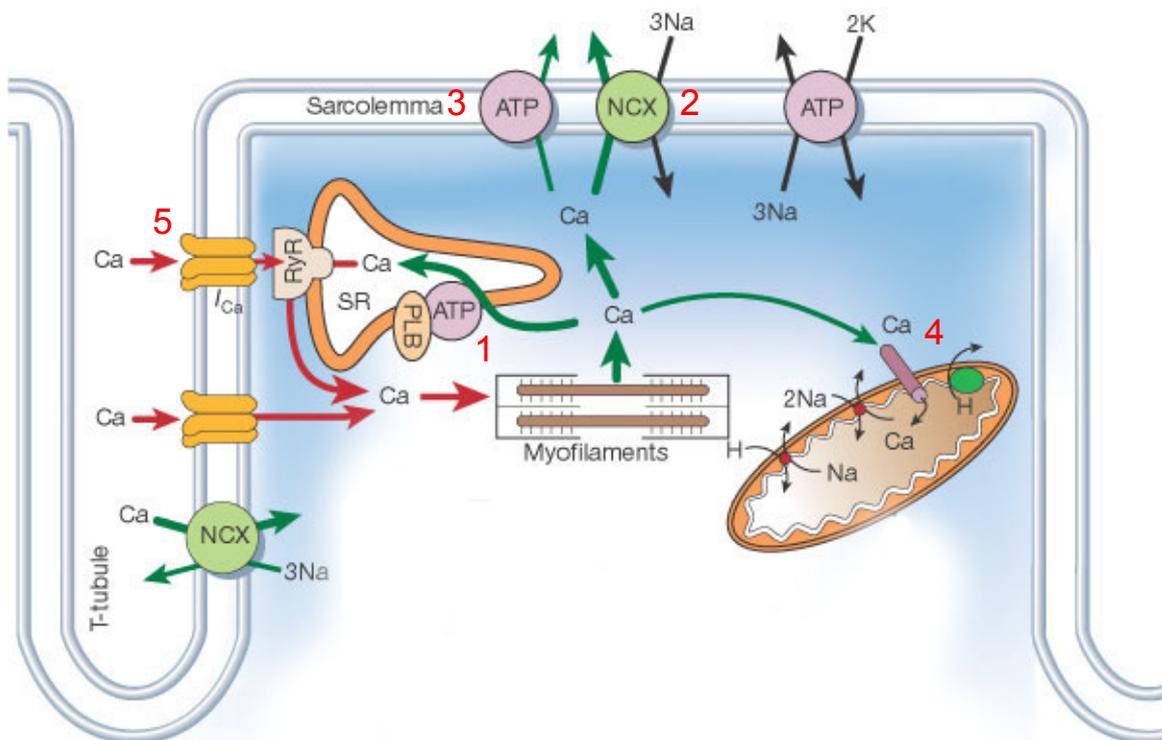
## 8 Einleitung II

Die Herzinsuffizienz kann sehr vielfältige Ursachen haben und ihre Aufklärung ist von essentieller Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Zahlreiche neue Studien haben ergeben, dass eine defekte Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes der Kardiomyozyten die Hauptdeterminante einer progressiven kardialen Dysfunktion und Arrhythmien ist.<sup>100, 101</sup> Der ubiquitäre *second messenger*  $\text{Ca}^{2+}$  ist essentiell für die elektrische Aktivität des Kardiomyozyten und ist ein direkter Aktivator der Myofilamente, die für die Kontraktion zuständig sind.<sup>102</sup>

### 8.1 EC-Kopplung

Die kardiale EC-Kopplung (*Excitation-Contraction-coupling*) ist ein Begriff, der 1952 etabliert wurde, und den physiologischen Prozeß von der elektrischen Erregung des Kardiomyozyten bis zur Kontraktion des Herzens beschreibt.<sup>103</sup> Während eines Aktionspotentials fließt  $\text{Ca}^{2+}$  durch die depolarisationsaktivierten L- und T-Typ Kanäle in die Zelle hinein. Dies führt zu einem Plateau des Aktionspotentials und zu einem erhöhten cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, der die Freisetzung von weiterem  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Reticulum (SR) triggert. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und die Freisetzung aus dem SR resultieren in einer massiven cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anreicherung, die schließlich zu einer Bindung des freien  $\text{Ca}^{2+}$  an das Myofilament-Protein Troponin C führt und somit die Kontraktion (Systole) einleitet. Die Relaxation (Diastole) ist mit der Senkung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  und der Dissoziation von Troponin C verbunden, die durch den Transport des freien  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Cytosol erreicht wird. Diese „ $\text{Ca}^{2+}$ -clearance“ aus dem Cytosol geschieht auf vier unterschiedlichen Wegen. So ist die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) für den Rücktransport ins SR verantwortlich, die sarcolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher exportieren  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle heraus, und durch den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniport wird  $\text{Ca}^{2+}$  in Mitochondrien aufgenommen (Abb. 28). Die genannten „ $\text{Ca}^{2+}$ -clearance“-Systeme haben jedoch bei unterschiedlichen Spezies unterschiedliche

Gewichtung.<sup>104</sup> So ist bei der Maus die SERCA für den Rücktransport von ca. 92% des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  verantwortlich, 7% leistet der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und der Rest wird von den langsamen Systemen zurückgepumpt.<sup>105, 106</sup> Beim Menschen, wie auch beim Kaninchen, Hund, Katze und Meerschweinchen werden ca. 70% des  $\text{Ca}^{2+}$  von SERCA zurücktransportiert, 28% entfallen auf den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und 2% auf die restlichen Pumpen.



**Abb. 28  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in ventrikulären Kardiomyozyten.** NCX,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange; ATP, ATPase; PLB, Phospholamban; SR, sarcoplasmatisches Reticulum; RyR, Ryanodin-Rezeptor; 1, SERCA; 2,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher; 3, Sarkolemmale ATPase; 4, mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe; 5, L-Typ-Kanal. Adaptiert aus Bers et al.<sup>98</sup>

### 8.1.1 Rolle des sarcoplasmatischen Reticulums bei der EC-Kopplung

Die Aufnahme und Freisetzung des Calciums aus dem sarcoplasmatischen Reticulum ist ein sehr präzise regulierter Prozess. Wie erwähnt, wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Rücktransport durch die sarcoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ausgeführt. Die Aktivität dieser „Pumpe“ wird durch den endogenen Inhibitor, Phospholamban (PLB), reguliert. PLB wird seinerseits durch cAMP und die Calmodulin-

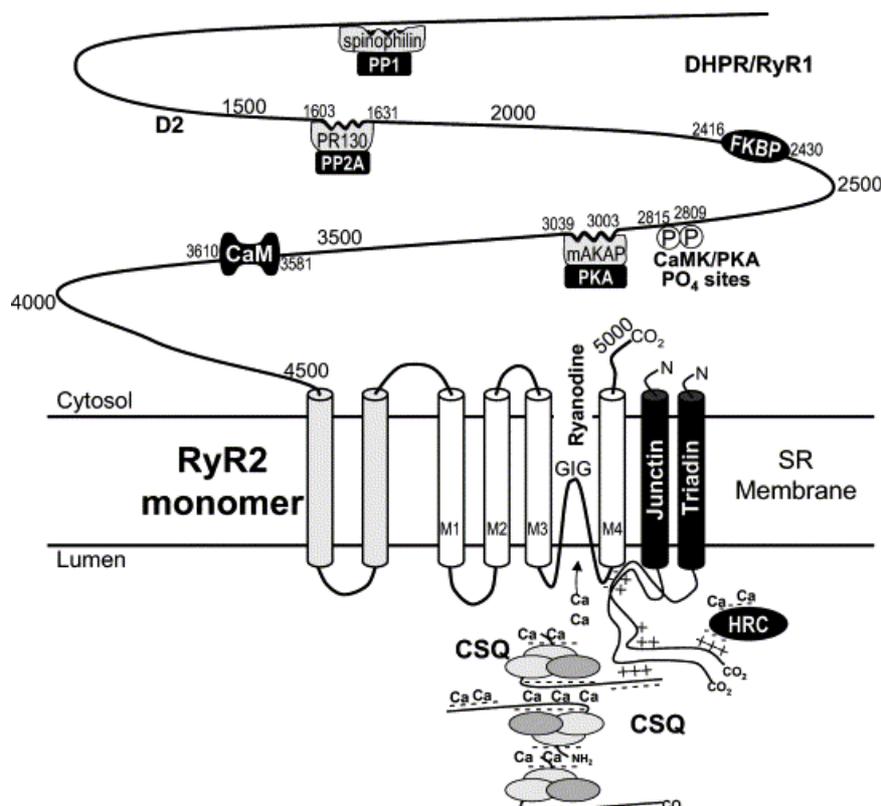
abhängige Kinase (PKA oder CaMKII) phosphoryliert und kann so von SERCA dissoziieren. Dieser Vorgang führt zu einer massiven Aktivierung der Pumpe und initiiert die Phase der Relaxation. In vereinfachten Worten, kann man sagen, dass die Phosphorylierung von Phospholamban den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt im SR erhöht, was eine Voraussetzung für die nächste Freisetzung und somit eine Kontraktion ist. In der Tat zeigt die PLB-knockout-Maus ein hyperdynamisches Herz, mit wenigen negativen Nebeneffekten.<sup>107</sup>

Eine ausgewogene  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ist von zentraler Bedeutung, da eine Überladung des SR mit  $\text{Ca}^{2+}$  zu „spontaner“ Freisetzung führt, die in Arrhythmien münden kann.<sup>102</sup> Andererseits ist eine unzureichende Aufnahme und somit ein reduzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel im SR oft nicht fähig den  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Vorgang der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über den Ryanodin Rezeptor (RyR) zu triggern, so dass die Kontraktion gestört ist.

Der RyR bildet eine sehr große funktionelle Einheit von ca. 500kD, die einerseits ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ist, der das  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR entlässt, andererseits dient er als Gerüst für zahlreiche regulatorische Proteine. Dazu zählen Calmodulin (moduliert die Aktivität von RyR)<sup>108</sup>, FK-506 Bindungsprotein (FKBP 12.6, welches die Durchlässigkeit benachbarter RyRs koordiniert)<sup>109</sup>, PKA (reguliert den Phosphorylierungszustand von RyR und somit seine Durchlässigkeit), Protein Phosphatase 1 und 2A (liefern Gegenbalance für die Phosphorylierung durch Kinasen)<sup>110</sup> und Sorcin (bindet an RyR und L-Typ-Kanal)<sup>111, 112</sup> (Abb. 29).

Durch eine Akkumulation von sehr vielen RyRs bilden diese riesige funktionelle Einheiten, die sog. Couplons, die koordiniert  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freisetzen. Der Mechanismus der Initiation und Beendigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freilassung wird immer noch kontrovers diskutiert, wobei das Konzept der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freilassung weitestgehend akzeptiert ist. Hierbei ist die räumliche Nähe der RyRs zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen der äusseren Zellmembran von essentieller Bedeutung. Der durch eine Depolarisation verursachte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch den L-Typ Kanal triggert eine schlagartige Öffnung aller RyRs eines Couplons. Diese Reaktion ist extrem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiv und basiert auf dem alles-oder-nichts-Prinzip ( $\text{Ca}^{2+}$  aus einem L-Typ Kanal kann 100 RyRs aktivieren). Haben die RyRs gefeuert, so ist eine zuverlässige und rasche Schließung der Rezeptoren notwendig. Für diesen Prozess werden mehrere

Mechanismen diskutiert, wobei zwei Ansätze experimentell bestätigt wurden. Das erste Konzept beruht auf einer kurzfristigen Inaktivierung des RyRs, bis zum Zeitpunkt einer „Erholung“. <sup>113-116</sup> Die andere Vorstellung basiert auf einer Adaptation, die zwar nach einer Freisetzung eine unmittelbare Öffnung des RyRs ermöglicht, aber eine sehr hohe  $Ca^{2+}$ -Konzentration zur Aktivierung benötigt. <sup>117</sup>

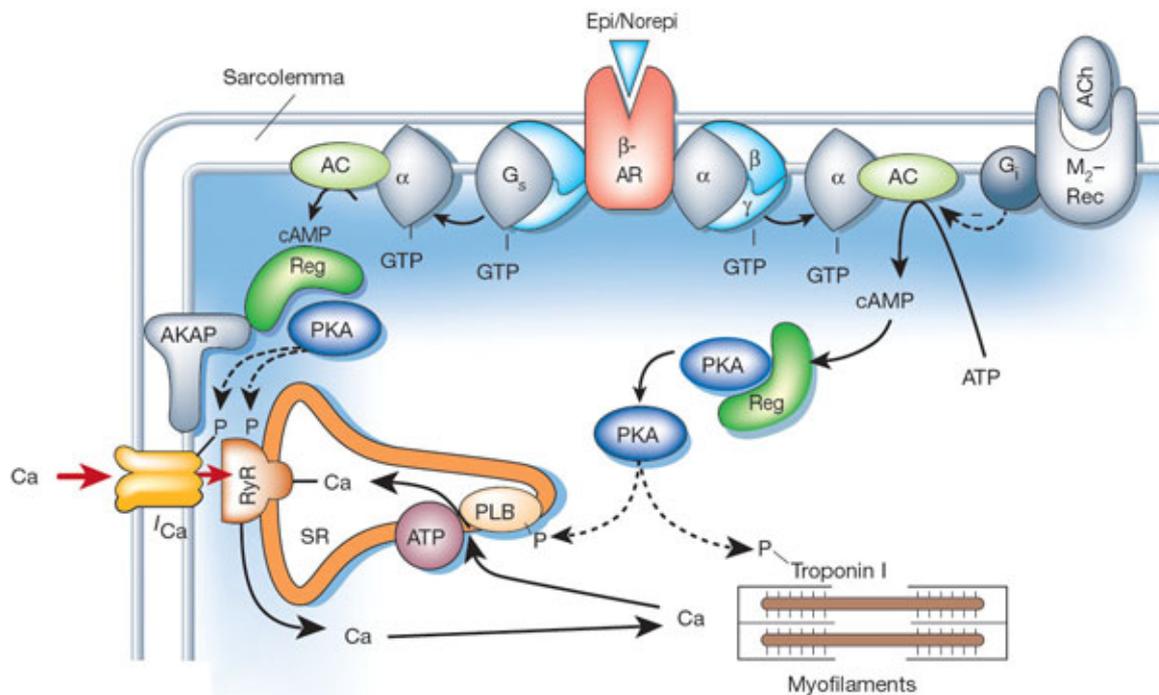


**Abb. 29 Kardialer RyR mit Interaktionsdomänen von einigen assoziierten Proteinen (Erklärungen im Text).** M1–M4: Vier Transmembrandomänen mit putativer Porenregion (GIG). Adaptiert aus <sup>118</sup>

### 8.1.2 Modulation der EC-Kopplung durch sympathische Aktivierung

Eine physiologische sympathische oder pharmakologische Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren auf der Oberfläche der Kardiomyozyten führt zur verstärkten Kontraktilität (Inotropie) und beschleunigten Relaxation (Lusitropie). Eine solche Reizung ist z.B. in einer „fight or flight-Situation“ essentiell, wenn das Herz in kürzester Zeit den physischen Anforderungen

des Körpers gerecht werden muss. Durch die Stimulation des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors z.B. durch Adrenalin (physiologische Stimulation) oder Isoproterenol (pharmakologische Stimulation) wird ein GTP-Bindungsprotein ( $G_s$ ) aktiviert, welches die Adenylyl Cyclase stimuliert, cAMP zu produzieren. cAMP aktiviert seinerseits die PKA. Diese Kinase phosphoryliert verschiedene für die EC-Kopplung EC-Kopplung-relevante Proteine (Phospholamban, L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal, RyR, Troponin I und *myosin binding protein C* (MBPC)). Der lusitrope Effekt von PKA wird durch die Phosphorylierung von PLB und Troponin I vermittelt, welche zur verstärkten  $Ca^{2+}$ -Aufnahme ins SR bzw. leichter Dissoziation des  $Ca^{2+}$  von den Myofilamenten führt. Von den beiden Effekten hat jedoch die PLB-Phosphorylierung eine dominante Auswirkung auf die Lusitropie. Der inotrope Effekt der PKA äußert sich in der Verstärkung des  $Ca^{2+}$ -Influges und einer gesteigerten Verfügbarkeit des  $Ca^{2+}$  aus dem SR. Diese synergische Kombination steigert deutlich die Amplitude des  $Ca^{2+}$ -Transienten. Der Effekt der PKA-Aktivität auf die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR-Kanäle bei der EC-Kopplung wird kontrovers diskutiert. Einerseits zeigt Valdivia et al., dass beim abrupten  $Ca^{2+}$ -Anstieg die Phosphorylierung durch PKA die RyR-Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht, wohingegen die *steady-state*-Öffnungswahrscheinlichkeit sinkt.<sup>117</sup> Im Gegensatz berichtet Marx et al., dass PKA die *steady-state*-Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht, was mit der Dislozierung des FKBP 12.6 zusammenhängt.<sup>109</sup> Darüber hinaus zeigte diese Gruppe, dass der RyR während der Herzinsuffizienz hyperphosphoryliert ist, was zu einem „undichten“ Rezeptor führen könnte. In Konsequenz wäre der  $Ca^{2+}$ -Gehalt im SR chronisch reduziert und eine verminderte Kontraktion würde letztendlich in eine Insuffizienz münden.<sup>109</sup> Der Aspekt der lokalen Regulation durch PKA ist bei der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion ebenso von Relevanz. So besteht eine enge räumliche Nähe zwischen dem L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal, dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor,  $G_s$ , Adenylyl Cyclase, PKA und Phosphatase 2A.<sup>119</sup> Der RyR ist ein *Target* der PKA und gleichzeitig ein Gerüstprotein für sowohl PKA als auch Protein Phosphatase 1 und 2A, die über Ankerproteine dort binden.<sup>110</sup> Diese physikalische Nachbarschaft der Kinase und Phosphatase spielt für den Phosphorylierungsstatus des RyR eine entscheidende Rolle und kann funktionell essentiell sein.<sup>120</sup>



**Abb. 30 Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors und für EC-Kopplung relevante Phosphorylierungstargets.** AC, Adenylatcyclase; ACh, Acetylcholin; AKAP, A kinase anchoring protein;  $\beta$ -AR,  $\beta$ -adrenerge Rezeptor; M<sub>2</sub>-Rec, M<sub>2</sub>-muskariner Rezeptor; PLB, Phospholamban; Reg, PKA regulatorischen Untereinheit; SR, sarcoplasmatisches Reticulum. Adaptiert aus Bers et al.<sup>98</sup>

## 8.2 Protein Phosphatase 1 (PP1) und ihre Bedeutung für die myokardiale Funktion

Wie erwähnt, ist die Balance zwischen der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von verschiedenen Effektorproteinen der EC-Kopplung für die intakte Kontraktion des Kardiomyozyten essentiell. Während die Funktion der beteiligten Kinasen gut untersucht ist, bleibt die Rolle der Phosphatasen und ihrer Regulatoren noch relativ unerforscht. Im Folgenden wird die Funktion von PP1 und ihrer Inhibitoren näher beläuchtet.

### 8.2.1 Charakteristika der PP1

PP1 ist eines der am höchsten konservierten eukaryotischen Proteine. So kann beispielsweise der durch Mutagenese des PP1-Gens im *Aspergillus*-Pilz resultierende Phänotyp durch Expression von Säugtier-PP1 teilweise

kompensiert werden.<sup>121, 122</sup> Die Vertebraten haben 3 Gene, die für PP1-Isoformen kodieren, PP1 $\alpha$ , PP1 $\gamma$  mit den Splicevarianten PP1 $\gamma_1$  und PP1 $\gamma_2$  sowie PP1 $\beta/\delta$ . Alle Isoformen werden beim Vertebraten ubiquitär exprimiert und stellen die katalytische Untereinheit der PP1 dar. Die katalytische Untereinheit als solche ist in der eukaryotischen Zelle nicht frei vorhanden, aber durch ihre Assoziation mit verschiedenen regulatorischen Polypeptiden bildet sie eine Vielzahl von multimerischen Holoenzymen. Zu den primären Regulatoren von PP1 gehören Inhibitor-1 und -2 (I-1, I-2), NIPP1 und Sds22, welche eine PP1-Bindedomäne beinhalten. Es existiert eine Reihe von weiteren Regulatoren, die eine große funktionelle Homologie zu Proteinen haben, die kein Bindemotiv für PP1 besitzen. Die Antwort auf die Frage, warum das nur 35-38 kD große PP1-Protein mit so vielen strukturell unterschiedlichen regulatorischen Untereinheiten interagieren kann, wurde von mehreren Gruppen geliefert.<sup>123</sup> Diese Arbeiten zeigten, dass die meisten regulatorischen Polypeptide PP1 über sehr kurze (4-6 Aminosäuren), sequentiell degenerierte Motive binden. Die am besten untersuchte und am häufigsten vorkommende Domäne ist das „RVxF“-Motiv. Des Weiteren hat eine Vielzahl der regulatorischen Proteine multiple Interaktionsdomänen für PP1. Darüber hinaus können Untereinheiten der regulatorischen Proteine PP1-Interaktionsdomänen gemeinsam nutzen.

Die RVxF-Domäne scheint dabei eher als „Anker“ für Interaktionsproteine zu dienen, die PP1 an bestimmte subzelluläre Kompartimente positioniert. Die Aktivität und Substratspezifität von PP1 wird dann über weitere Interaktionsstellen reguliert.<sup>124</sup> Es wird vermutet, dass die Bindung an spezifische Substrate zu einer Konformationsänderung von PP1 führt, die den Zugang anderer Proteine an die katalytische Domäne von PP1 kontrolliert.<sup>123</sup> Eine weitere wichtige Interaktionsdomäne von PP1 stellt der  $\beta$ 12- $\beta$ 13-Loop dar. Über diese Andockstelle wirken Toxine und andere Proteine, insbesondere der Inhibitor 1 (I-1), auf PP1.<sup>125</sup>

### **8.2.2 PP1 und ihre Inhibitoren (I-1, I-2) im Herzen**

Die Funktion der Phosphatasen im Herzen ist essentiell, da sie einer unkontrollierten Proteinphosphorylierung entgegenwirken und somit eine

balancierte kardiale Funktion aufrechterhalten. Die PP1 ist neben der Proteinphosphatase 2A (PP2A) die am stärksten exprimierte Serin/Threonin Phosphatase im Herzen. Ihre Beteiligung bei der Regulation der  $\beta$ -adrenergen Antwort ist seit langem bekannt.<sup>126, 127</sup> PP1 ist durch eine nichtkatalytische Untereinheit  $R_{GL}$ , die die Substratspezifität und -verfügbarkeit reguliert, an der SR-Membran lokalisiert.<sup>128, 129 130</sup> Die *Targets* der Dephosphorylierung durch PP1 sind Proteine, die von entscheidender Bedeutung in der EC-Kopplung sind. Dazu gehören: Phospholamban, L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal, RyR, Troponin I und *myosin binding protein C*.

Die Aktivität der PP1 wird im Herzen durch zwei Hitze- und Säure-stabile Proteine, Inhibitor-1 und -2 (I-1, I-2), reguliert.<sup>131</sup> Während I-2 unphosphoryliert PP1 inhibiert, wird I-1 durch eine Threonin-35 Phosphorylierung durch PKA aktiviert. Die Inhibition von PP1 wirkt förderlich auf die Phosphorylierung von verschiedenen Effektorproteinen durch PKA und führt somit zur Amplifikation der  $\beta$ -adrenergen Antwort.<sup>132</sup> Die regulatorische Feinabstimmung der Kinasen- und Phosphatasenaktivität wird unter pathologischen Bedingungen besonders kritisch. Hier wird die adrenerge Aktivität zuerst kompensatorisch verstärkt und später abgeschwächt, was schließlich zu einer Insuffizienz führt. Während der Herzinsuffizienz kommt es zur Desensibilisierung der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion, was auch zur Reduktion der PKA-Aktivität führt, während die Aktivität der SR-assoziierten PP1 gesteigert ist. Dieses Ungleichgewicht zugunsten der PP1-Aktivität wirkt sich langfristig schädlich auf die kontraktile Funktion aus. Eine kausale Verbindung zwischen der Herzinsuffizienz und PP1 wird durch Studien an Tiermodellen gestärkt.

### 8.2.3 Überexpression von PP1 im Herzen (transgene Maus)

Die myokardiale Überexpression von PP1 in der Maus führt nach einer Untersuchung von Carr und Kollegen zu einer drastischen Verschlechterung der Pumpfunktion.<sup>133</sup> Biochemische Untersuchungen zeigten, dass der cAMP-Spiegel und der Phosphorylierungsgrad von Troponin-I sich nicht signifikant von Wildtyp-Tieren unterschieden. Die Autoren folgerten daraus, daß der  $\beta$ -adrenerge Signalweg in den PP1-transgenen Tieren ungestört war.<sup>133</sup> Als

Erklärung für die Verschlechterung der linksventrikulären Funktion (LV-Funktion) konnte eine signifikant geringere Phosphorylierung von Phospholamban an Ser-16 und somit eine verstärkte Inhibition von SERCA nachgewiesen werden.<sup>133</sup> Obgleich die echokardiographische Bestimmung der segmentalen Verkürzungsfraction (*fractional shortening*, FS) als Maß für die LV-Funktion im Alter von 3 Monaten bei den PP1-transgenen Tieren bereits deutlich eingeschränkt war, entwickelten die PP1-überexprimierenden Mäuse im weiteren Verlauf (nach 6 Monaten) eine deutliche LV-Dilatation einhergehend mit einer erhöhten Mortalität. Histologische Untersuchungen der transgenen Herzen wiesen die typischen Merkmale einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM), wie beispielsweise interstitielle Fibrose, auf.<sup>133</sup>

#### **8.2.4 Funktionelle Analyse von Inhibitor-1 und -2 im Herzen anhand von Tiermodellen**

Carr und Kollegen führten ebenso die Analyse der I-1 defizienten Maus durch. *In vivo*-Untersuchungen ergaben im Alter von 3 Monaten eine deutlich reduzierte kardiale Funktion bei KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.<sup>133</sup> Die I-1-Deletion führte zum moderaten Anstieg der PP1-Aktivität und die reduzierte Herzleistung war weder im Alter progredient noch war sie begleitet von morphologischen Veränderungen des Gewebes wie Hypertrophie oder Fibrose. Die kontraktile Antwort der I-1 defizienten Herzen auf eine Stimulation des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors mit Isoproterenol war deutlich reduziert.<sup>133</sup> Die Autoren begründeten die Abschwächung der  $\beta$ -adrenergen Antwort mit einem reduzierten Grad der PLB-Phosphorylierung am Ser-16.<sup>133</sup> Diese Daten verdeutlichen die Relevanz von I-1 bei der Regulation der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion im Herzen.

Kirchhefer et al. untersuchten anhand eines transgenen Modells die Rolle des Inhibitors-2 bei der kontraktile Funktion.<sup>134</sup> Die Überexpression eines C-terminal trunkierten I-2-Proteins resultierte in einer Reduktion der gesamten PP1-Aktivität und einer verstärkten Kontraktions- und Relaxationsrate *in vivo*. Die Messung der Leistung einzelner isolierter Kardiomyozyten bestätigte die *in vivo* Beobachtungen und zeigte eine Verstärkung der fraktionellen Verkürzung sowie eine beschleunigte Relaxation. Dies war begleitet von einer

erhöhten Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, die mit der erhöhten Phosphorylierung von PLB am Ser-16 assoziiert war. Diese Ergebnisse trugen maßgeblich zur Aufklärung der Rolle beider Inhibitoren bei der kardialen Funktion bei.

### **8.2.5 Implikation von PP1 und I-1 bei der kardialen Dysfunktion beim Menschen**

In Biopsien aus DCM-Herzen konnten Carr et al. im Vergleich zu Kontrollherzen bei unveränderten I-1-Proteinmengen eine um 40% verminderte I-1-Phosphorylierung feststellen.<sup>133</sup> Als Folge einer verminderten PP1-Inhibition fand man eine signifikant verminderte Phospholamban-Phosphorylierung an Position Ser-16 und Thr-17 bei unveränderter Phospholamban-Proteinmenge.<sup>133</sup> In einer weiteren Studie wurde bei Patienten im Endstadium der Herzinsuffizienz (Ejektionsfraktion 8% bis 26%, New York Heart Association, NYHA IV) neben einer erhöhten PP1-Aktivität auch eine Hochregulation der PP1-mRNA um 37% beobachtet.<sup>135</sup> El-Armouche et al. wies bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz eine Reduktion des I-1-Proteinlevels um 58% und der I-1-Phosphorylierung um 77% nach. Dieses Ergebnis korrelierte mit der verringerten Phosphorylierung von Phospholamban am Ser-16 bei unveränderter Proteinmenge.<sup>136</sup> Eine weitere Studie stellte den Zusammenhang zwischen humanem chronischen Vorhofflimmern und verändertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt her. Diese Gruppe von Patienten zeigte neben einer erhöhten PP1/PP2A-Aktivität auch eine reduzierte Phosphorylierung des kontraktilen Proteins *Myosin Binding Protein-C*. In dieser Analyse waren PLB wie auch I-1 verstärkt phosphoryliert.<sup>137</sup>

### **8.2.6 PKC-dependent Protein-Phosphatase 1 Inhibitor (KEPI) als ein neuer PP1-Inhibitor im Herzen**

Liu und Kollegen haben 2002 zum ersten Mal den neuen PP1-Inhibitor KEPI (PKC-dependent Protein-Phosphatase 1 Inhibitor) im zentralen Nervensystem und im Herzen identifiziert.<sup>138</sup> Das murine KEPI-Transkript hat eine Länge von

2600 bp, wobei die kodierende Region 495 bp groß ist. Beim Menschen umfasst das Gen 4 Exons, die sich über 100 kb genomischer Sequenz auf Chromosom 6q24-q25 verteilen. Das 17kD große KEPI-Protein weist Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung durch PKC, PKA und Casein Kinase 2 auf. Liu et al. wiesen nach, dass KEPI durch die Phosphorylierung mit PKC seine inhibitorische Potenz gegenüber PP1 $\alpha$  um das 600-fache steigert.<sup>138</sup> Dieser Befund wurde durch die Studie von Erdödi ergänzt, die eine Phosphorylierung von KEPI durch Interleukin Kinase (ILK) und PKA nachwies.<sup>139</sup> Die Phosphorylierung von KEPI aktiviert seine inhibitorische Potenz, welche die PP1 aber nicht PP2A beeinflusst.<sup>138</sup>

Eine weitere Arbeit charakterisiert KEPI in einer Mammakarzinom-Zelllinie (MCF7).<sup>140</sup> Hier wurde gezeigt, dass KEPI in Tumorzellen deutlich reduziert exprimiert wurde. Nach einer Transfektion der MCF7-Zellen mit KEPI cDNA, wurde eine Expression von 95 Genen induziert, u.a. der Tumorsuppressorgene EGR1 und PTEN.<sup>140</sup> Die Autoren konnten eine Beteiligung von KEPI bei der Regulation von EGR1 nachweisen, die auf einer Aktivierung des MEK-ERK MAPK Signalweges basiert.<sup>140</sup>

Bislang liegen keine Studien über die physiologische Funktion von KEPI vor. Eine klinische Fallstudie beschreibt eine junge Patientin mit einer 2,6Mb-Deletion im 6q24.3-25.1 Locus, die verschiedene Neuronaldefekte, postnatale Wachstumsstörungen und Septumdefekte der Atrien aufwies.<sup>141</sup> Die genannte Region kodiert für 22 Gene darunter für KEPI. Aufgrund der Korrelation zwischen dem neuronalen und kardialen Krankheitsbild einerseits und der selektiven Expression von KEPI im Herzen und im zentralen Nervensystem andererseits hielten die Autoren die KEPI-Deletion für eine wahrscheinliche Krankheitsursache.<sup>141</sup>

## 9 Zielsetzung der Studie II

Die kontraktile Funktion des Herzens wird durch eine fein justierte Balance zwischen reversibler Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen wie PLB, RyR, L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanal und anderen aufrechterhalten. Die Rolle der beteiligten Kinasen ist gut beschrieben, während der Relevanz der Phosphatasen und ihren Regulatoren relativ wenig Bedeutung beigemessen worden ist. Gleichzeitig ist bekannt, dass zahlreiche Formen der Kardiomyopathie mit einer verstärkten Expression und Aktivität der Protein Phosphatase 1 (PP1) assoziiert sind, so dass ihre Schlüsselrolle bei ihrer Pathogenese naheliegt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmalig die Funktion eines neu identifizierten PP1-Inhibitors genannt *PKC-enhanced Protein-Phosphatase 1 Inhibitor* (KEPI) im Herzen untersucht werden. Die Grundlage für diese Studien bildeten Affymetrix®-Gen-Chip-Analysen, die KEPIs Herunterregulation in einem Modell für dilatative Kardiomyopathie (ErbB2-Knockout-Maus) zeigten. Zuerst sollte die kardiale Expression von KEPI während der Embryonalentwicklung lokalisiert werden. Da bislang keine Bindungspartner von KEPI bekannt sind, sollten diese im Herzen identifiziert werden. Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung von KEPI sollte ein transgenes-Mausmodell sowie ein Zebrafisch mit einem Morpholino-Knock down generiert werden. Es sollte eine basale Charakterisierung der Pumpfunktion sowie der Elektrophysiologie des transgenen Herzens vorgenommen werden. Da KEPI potentiell die EC-Kopplung beeinflusst, sollten die Effekte der KEPI-Überexpression auf den Ca<sup>2+</sup>-Transienten analysiert werden. Des Weiteren stand die Untersuchung der kardialen Funktion des KEPI-knock down-Zebrafisches im Fokus dieser Studie. Im Rahmen der Arbeit sollten ebenso Grundlagen für eine zukünftige Erforschung der kardialen Funktion von KEPI gelegt werden. So war die Klonierung eines Targeting-Vektors zur Herstellung eines konditionellen Knockout-Maus-Modells ebenso ein Ziel.

Insgesamt sollte diese Studie zum weiteren Verständnis pathophysiologischer Mechanismen der Herzinsuffizienz beitragen. Insbesondere die Rolle der

PP1-Modulation sollte als ein potentieller Ansatz für eine pharmakologische Therapie validiert werden.

## 10 Ergebnisse II

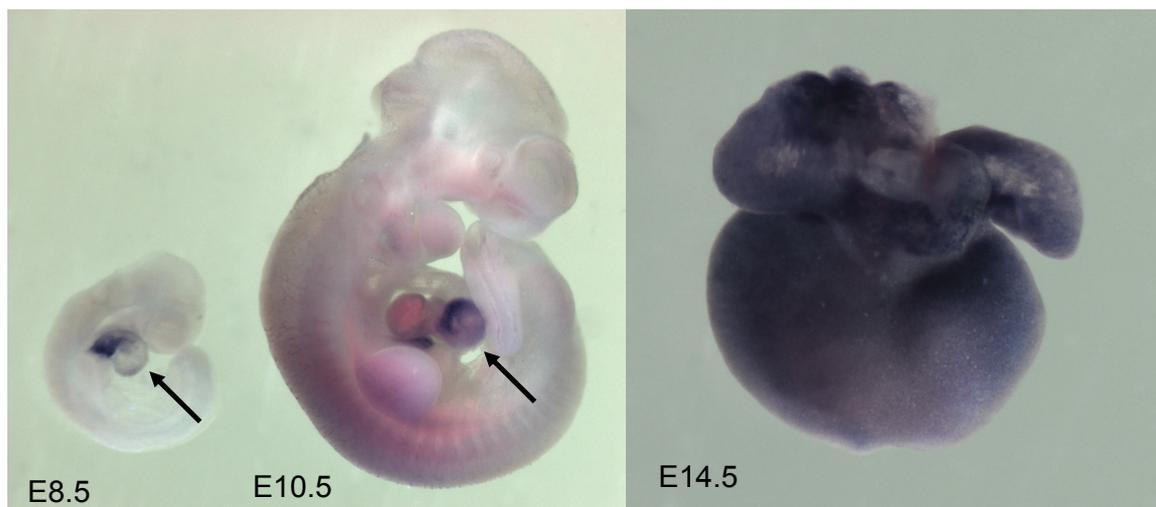
### 10.1 Genexpressionsanalyse des ErbB2 Knockout-Modells als Grundlage für die funktionellen Untersuchungen von KEPI

Der funktionellen Analyse von KEPI (*Kinase C-enhanced PP1 inhibitor*) liegen die bereits im Kapitel 5.1 erwähnten Affymetrix®-Genexpressionsanalysen an der ErbB2 KO-Maus zugrunde.<sup>84</sup> Die Analyse dieses Mausmodells für dilatative Kardiomyopathie relativ zum Wildtyp ergab eine differentielle Expression von zahlreichen annotierten Genen, aber auch von den sogenannten RIKEN-Sequenzen. Das bei dieser Untersuchung verwendete Chipmodell enthielt noch keine Annotation für das Gen KEPI. Im Zuge eines eingehenden Sequenzvergleiches der regulierten RIKEN-Sequenzen mit der NCBI-Genomdatenbank zeigte die RIKEN-Sequenz Nr. AF074960 eine 100%ige Übereinstimmung mit dem Gen „KEPI“. Die Sequenz zeigte eine Herunterregulation der Expression um 40% im ErbB2-KO im Vergleich zum Wildtyp. Die Tatsache, dass die Funktion von KEPI im Herzen bislang unerforscht blieb und dieses Protein einen Regulator der essentiellen kardialen Phosphatase (PP1) darstellt, veranlasste die vorliegende funktionelle Studie dieses Gens im Herzen.

### 10.2 Expression von KEPI in der murinen Embryonalentwicklung

Da bislang nur eine Analyse der KEPI-Expression in verschiedenen Geweben vorlag<sup>138</sup>, war es von Interesse sein Expressionsmuster im Herzen nachzuweisen. Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung mit einer KEPI-spezifischen *antisense*-Sonde wurde die mRNA-Expression am Tag 8.5, 10.5 und 14.5 der Embryonalentwicklung überprüft. Diese Art von Analyse erlaubt Aufschüsse über eine potentielle Rolle von KEPI bei der Embryonalentwicklung und möglicherweise auch bei Kardiomyopathien. Es gilt als etabliert, dass das Genexpressionsprofil im Verlauf einer Kardiomyopathie mit dem „Genprogramm“ der Embryonalentwicklung im Herzen weitgehend deckungsgleich ist.

Die *in-situ* Hybridisierungsuntersuchungen in Mäuseembryonen am Tag E8.0 zeigten eine starke Expression von KEPI im Ausflusstrakt des Herzens und nur eine sehr schwache KEPI-Expression im restlichen Herzen (Abb. 31 links). Im Stadium E10.5 dagegen, lässt sich eine starke Expression in den Herzventrikeln nachweisen, während die Vorhöfe und Gefäße weitestgehend ausgespart bleiben (Abb. 31 Mitte). Ab Tag E14.5 lassen sich KEPI-Transkripte in allen Herzhöhlen nachweisen (Abb. 31 rechts).



**Abb. 31** *In situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der KEPI-Expression während der murinen Embryonalentwicklung. Durch die Pfeile ist der Expressionsort von KEPI gekennzeichnet. Am Tag E8.5 wurde das KEPI-Transkript im Ausflusstrakt des Herzens detektiert (**links**). Am Tag E14.5 ist die Expression im Ventrikel sichtbar (**Mitte**), während sie am Tag 14.5 in allen Herzkompartimenten vorhanden ist (**rechts**).

### 10.3 Biochemische Analyse von KEPI

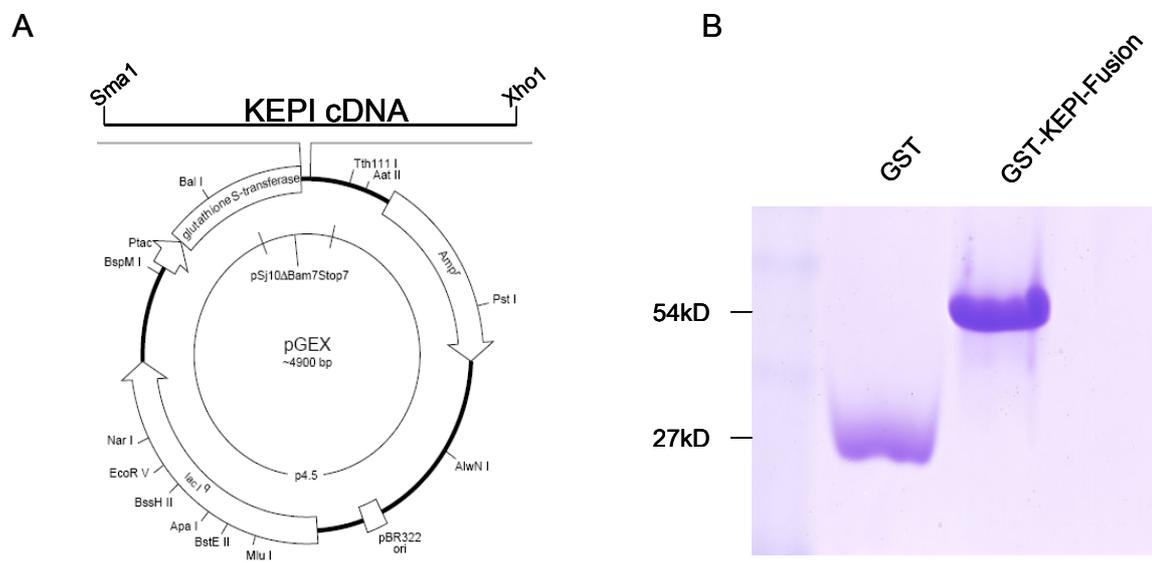
#### 10.3.1 Identifizierung neuer Bindungspartner von KEPI

Da bislang nur die Interaktion zwischen KEPI und der Proteinphosphatase 1 bekannt war, erschien eine Identifizierung von neuen Interaktionspartnern sinnvoll. Mit Hilfe eines rekombinanten KEPI-GST-Fusionsproteins konnten „Pull down“-Assays durchgeführt werden, welche weiter mittels Massenspektrometrie analysiert wurden.

### 10.3.1.1 Herstellung des rekombinanten KEPI-GST-Fusionsproteins

Um das KEPI-GST-Fusionsprotein (GST:Glutathion S-transferase) rekombinant in *E. coli* Bakterien herzustellen, wurden diese mit einem DNA-Konstrukt transformiert, welches KEPI und des N-terminal angeschlossene GST unter der Kontrolle eines prokaryotischen Promoters enthielt (pGEX-System) (Abb. 32A).

Die überexprimierenden Bakterien wurden lysiert und das Fusionsprotein wurde über eine Glutathion Sepharose-Säule gereinigt (Abb. 32B).



**Abb. 32 Herstellung des rekombinanten KEPI-GST-Fusionsproteins.** DNA-Konstrukt zur bakteriellen überexpression des Fusionsproteins. (A) Aufgereinigtes KEPI-GST-Fusionsprotein gefärbt im Coomassie-Gel. (B)

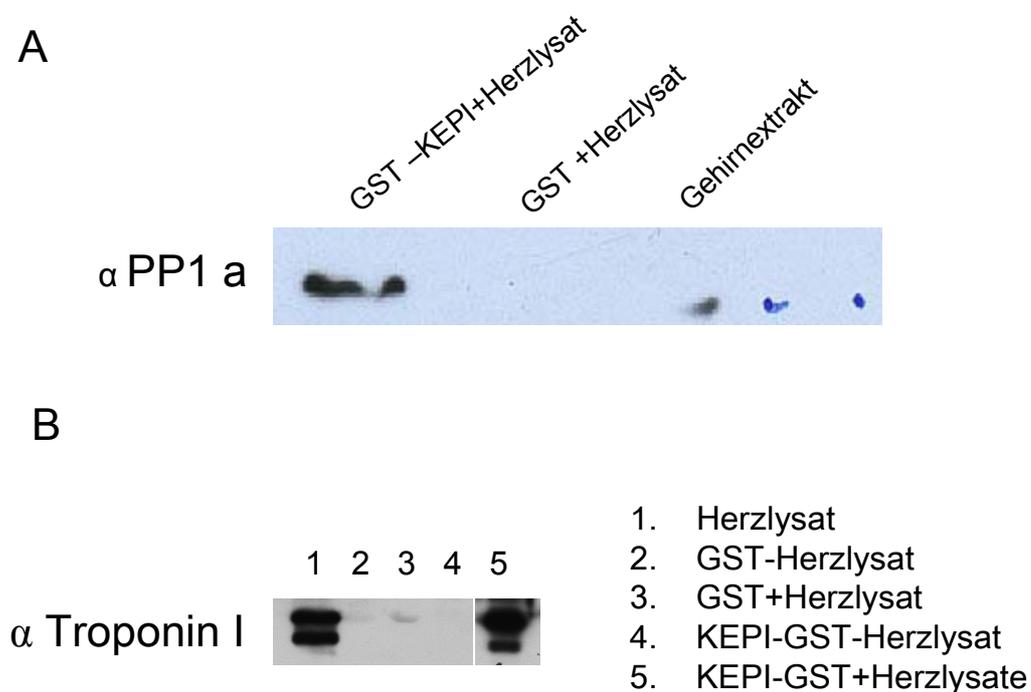
### 10.3.1.2 Pull-down-Assay zur Identifizierung von neuen KEPI-Bindungspartnern

Das an Agarosebeads fixierte KEPI-GST-Fusionsprotein wurde mit murinem Herzextrakt inkubiert und die an KEPI-GST gebundenen Proteine wurden denaturiert und in einer SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. Die im SDS-Gel fixierte pull-down-Proteinfraktion wurde massenspektrometrisch untersucht und potentielle Bindungsproteine wurden durch einen Sequenzvergleich ermittelt. Zur Verifizierung der Eignung dieses

Experiments für die Bestimmung neuer Bindungspartner von KEPI, wurde der bekannte Bindungspartner PP1  $\alpha$  in der pull-down-Fraktion mittels eines spezifischen PP1  $\alpha$  -Antikörpers nachgewiesen (Abb. 33A).

Die massenspektrometrische Analyse der KEPI-GST-pull-down-Fraktion zeigte dort eine Anwesenheit von Troponin I, welches in der GST-Kontrollfraktion nicht vorhanden war.

Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Pull-down-Assay mit spezifischer Detektion von Troponin-I bestätigt werden (Abb. 33B).

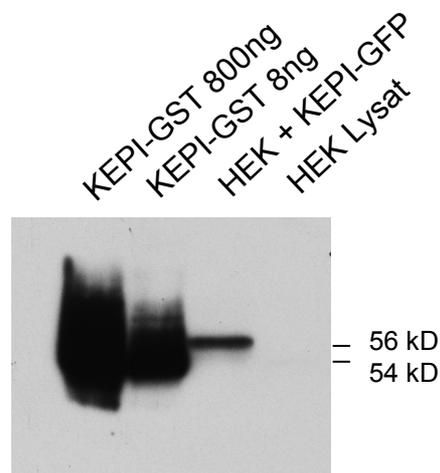


**Abb. 33 Pull down-Experiment zur Identifizierung neuer Bindungspartner von KEPI.** Spezifischer Nachweis von PP1 $\alpha$  in der KEPI-GST-pull down-Fraktion. (A) Spezifischer Nachweis von Troponin I in der KEPI-GST-pull down-Fraktion. Der Nachweis wurde auf einem Gel ausgeführt, wobei die Expositionszeit für die Spur 1-4 1min betrug, während die Spur 5 5sec exponiert wurde. (B)

### 10.3.2 Herstellung eines KEPI-spezifischen Antiserums

Da kommerziell bislang kein KEPI-spezifischer Antikörper erhältlich war, wurde das aufgereinigte KEPI-GST-Fusionsprotein für die Immunisierung von zwei Kaninchen genutzt. Die beiden nach 72 Tagen gewonnenen Seren

wurden mit Hilfe des in HEK293-Zellen überexprimierten KEPI-GFP-Fusionsproteins auf ihre Spezifität getestet (Abb. 34). Das  $\alpha$ KEPI-Serum detektierte spezifisch das KEPI-GFP im HEK293-Zellysat.



**Abb. 34 Test des KEPI-Antiserums.** Western Blot, durchgeführt mit rekombinanten KEPI-Fusionsproteinen überexprimiert in Bakterien (KEPI-GST) und in HEK293-Zellen (KEPI-GFP).

#### 10.4 Generierung der KEPI transgenen Maus

##### 10.4.1 Klonierung des DNA-Konstrukts zur Überexpression von KEPI im Mausherzen

Zur Herstellung einer Mauslinie mit herzspezifischer KEPI-Überexpression wurde ein DNA-Konstrukt kloniert, bei dem KEPI unter der Kontrolle des *Myosin light chain-2* (MLC) Promoters stand. In den pBluescript SK+ Vektor wurde die MLC-2-Promotersequenz kloniert, gefolgt vom Kaninchen- $\beta$ -Globin Intron-Exon-Sequenz zur Verstärkung der Expression des Transgens. Hinter das anschließende KEPI-cDNA-Fragment wurde die SV40 Polyadenylierungssequenz kloniert (Abb. 35). Die Anwendung dieses Promoters bewährte sich bereits bei der Herstellung der CTGF-transgenen-Maus. Durch den Verdau mit KpnI und XhoI wurde das Konstrukt aus dem pBluescript SK+ Vektor herausgeschnitten und nach Auftrennung im Agarosegel und Gelextraktion im Mikroinjektionspuffer aufgenommen. Danach erfolgte die Mikroinjektion in den männlichen Pronukleus einer Zygote des C57Bl/6-Maus-Inzuchtstamms, die nachfolgend in scheinchwangere Mäuse reimplantiert wurde.

Die Mikroinjektionen wurden in der Core-Facility am Max-Delbrück-Center, Berlin, Buch ausgeführt.

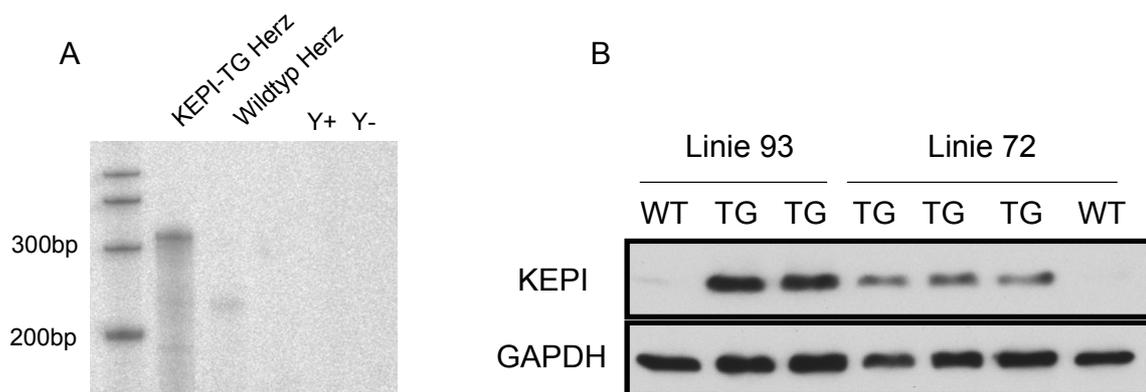
Mittels PCR wurden die Nachkommen auf die Integration des Transgens getestet. Für alle Experimente wurden heterozygote Tiere verwendet.



**Abb. 35 Konstrukt zur Herstellung der KEPI transgenen Maus.** Der MLC-2-Promoter wurde mit KpnI und HindIII in die *multiple cloning site* (MLC) des pBluescript SK+-Vektors einkloniert. Die Klonierung der KEPI-cDNA erfolgte durch die Restriktion mit PstI. Die Zahlen 1 und 2 symbolisieren die Primer, die für die Genotypisierungs-PCR verwendet wurden, und die Zahlen 3 und 4 zeigen die Lage der Primer, die für die Herstellung der Antisense-Sonde für den RNase-Protection-Assay verwendet wurden.

## 10.5 Expression des KEPI-Transgens im Herzen

Die erste Charakterisierung der Überexpression von KEPI im Herzen umfasste die Detektion der transgenen mRNA im *RNase Protection Assay* (RPA) und den Nachweis des Proteins im Western Blot.



**Abb. 36 Expressionsnachweis von KEPI im transgenen Mausmodell.** Die Präsenz der transgenen mRNA wurde mittels des RPA nachgewiesen. Bei dem Assay wurden 50µg RNA verwendet. **(A)** Im Western Blot wurde die Überexpression des KEPI-Proteins in zwei transgenen Mauslinien nachgewiesen. Es wurden 50mg Protein pro Spur aufgetragen. **(B)**

Die transgene Linie 93 zeigte eine deutliche Überexpression der KEPI-mRNA (Abb. 36A). Diese Linie sowie eine weitere (Linie 72) zeigte auch eine starke Überexpression des KEPI-Proteins wie im Western Blot detektiert werden konnte (Abb. 36B). Die basale Expression von KEPI schien im Herzen sehr niedrig zu sein, da sie kaum detektierbar war.

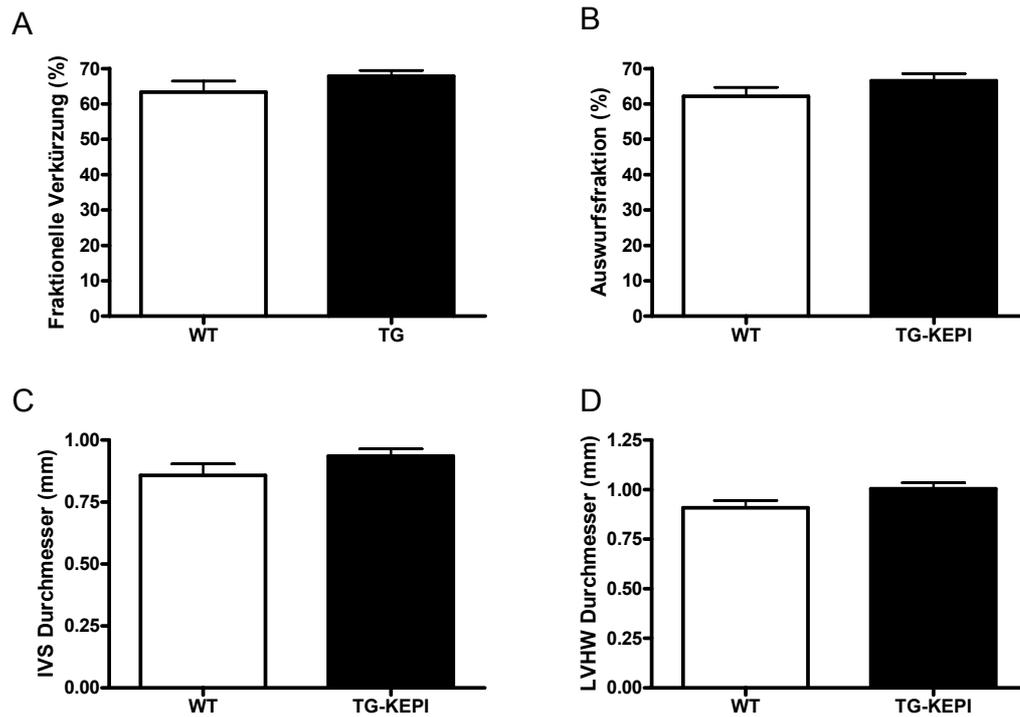
## **10.6 Kardiovaskuläre Charakterisierung der KEPI transgenen Mäuse unter Basalbedingungen**

Die KEPI-transgenen Mäuse zeigten keine erhöhte Mortalität innerhalb der ersten Lebensmonate, so dass eine kardiovaskuläre Charakterisierung vorgenommen werden konnte.

### **10.6.1 Echokardiographische Charakterisierung von KEPI-transgenen Mäusen unter Basalbedingungen.**

Da KEPI die Aktivität der PP1 moduliert und diese entscheidend die Kontraktion der Kardiomyozyten reguliert, war es von Interesse das Kontraktionsverhalten und die Herzgeometrie der KEPI-transgenen Tiere zu untersuchen. Wie bereits im Kapitel 5.5.1 beschrieben für derartige Diagnostik ist die Echokardiographie die Methode der Wahl.

Im Alter von 2 Monaten wurden die KEPI-transgenen Mäuse hinsichtlich ihrer linksventrikulären Dimensionen und Pumpfunktion echokardiographisch untersucht. Im Vergleich zu der Wildtypgruppe zeigten die KEPI-transgenen Mäuse keine signifikante Veränderung der linksventrikulären Leistung und keine Anzeichen für eine Hypertrophie. Die Bewertung der fraktionellen Verkürzung und der Auswurfsfraktion brachten keinen Anhalt für eine veränderte diastolische oder systolische Funktion im transgenen Tier im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 37A,B).



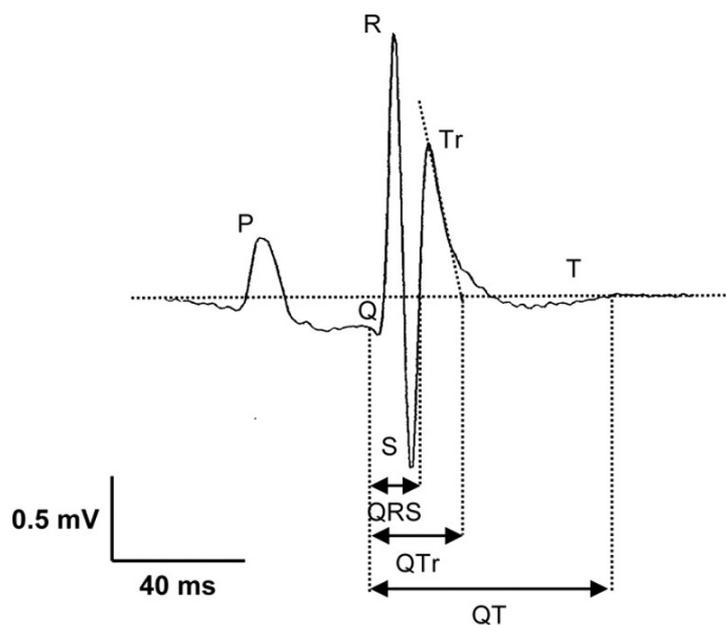
**Abb. 37 Echokardiographische Charakterisierung der KEPI-transgenen Mäuse (TG) im Vergleich zum Wildtyp (WT).** Bewertet wurde die fraktionelle Verkürzung (A) und die Auswurfsfraktion (B) als Parameter für die diastolische und systolische Funktion. Die Messung des intraventrikulären Septumdurchmessers (IVS) (C) und der posterioren Wand des linken Ventrikels (D) wurde zur Beurteilung der kardialen Hypertrophie erhoben. Alle genannten Parameter zeigen keine signifikanten Veränderungen in Wildtyp verglichen mit KEPI-transgenen Mäusen. Die Daten sind mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Gruppenumfang: WT n=6, TG n=5.

Die Messung des intraventrikulären Septumdurchmessers (IVS) zeigte keine signifikante Veränderung, so dass kein Indiz für eine Hypertrophie bestand (Abb. 37C). Ebenso war der Durchmesser der posterioren Wand des linken Ventrikels in beiden Gruppen unverändert, so dass auf eine Veränderung der Herzgeometrie im Sinne einer Hypertrophie nicht geschlossen werden konnte (Abb. 37D).

### 10.6.2 Elektrokardiographische Untersuchung (EKG) der KEPI-transgenen Mäuse

Wie eingangs beschrieben beeinflusst KEPI die Aktivität der PP1, die den Phosphorylierungsstatus von Proteinen wie Phospholamban und Ryanodin Rezeptor reguliert. Diese und andere Proteine sind in die Regelung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Kardiomyozyten involviert. Veränderungen ihres

Phosphorylierungsstatus können zu Störungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxes führen und somit die elektrische Aktivität der Kardiomyozyten und schließlich des gesamten Herzens beeinflussen. Um zu überprüfen, ob die Überexpression von KEPI einen Effekt auf die elektrische Aktivität des Herzens ausübt, wurde ein Elektrokardiogramm (EKG) der transgenen und Wildtypmäuse aufgezeichnet. Mit Hilfe dieser Diagnostikmethode können Aussagen über den Herzrhythmus und -frequenz sowie über Störungen der Erregungsbildung, -ausbreitung und -rückbildung in der Herzmuskulatur gemacht werden.<sup>142</sup> Bei jedem Herzschlag entsteht im Herzen ein schwacher Strom mit einer Spannung von etwa 1mVolt. Beim EKG werden diese elektrischen Aktivitäten des Herzens abgeleitet und in Form von Kurven aufgezeichnet. Eine typische EKG-Kurve besteht aus einer P-Welle, dem QRS-Komplex und einer T-Welle (Abb. 38).



**Abb. 38 Typischer Verlauf einer EKG-Kurve bei der Maus.** Vermerkt sind Bezeichnungen der einzelnen Wellen und ihre Intervalle. Adaptiert aus Royer et al.<sup>143</sup>

Die P-Welle reflektiert die Erregung, die vom SA-Knoten ausgeht und sich zwischen dem rechten und linken Atrium ausbreitet. Danach folgt der QRS-Komplex, der mit der Depolarisation der Ventrikel korrespondiert. Die Dauer, Amplitude und Morphologie des QRS-Komplexes kann für die Diagnose von Arrhythmien, Veränderungen der Erregungsleitung, ventrikulärer Hypertrophie und Myokardinfarkt von Nutzen sein. Der Bereich zwischen dem Beginn der

P-Welle bis zum Anfang des QRS-Komplexes wird als der PR-Intervall bezeichnet. Nach dem QRS-Komplex folgt die T-Welle, die die Repolarisation der Ventrikel charakterisiert.

Abnormale T-Wellen können ein Anzeichen für eine koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, linksventrikuläre Hypertrophie oder Störungen im zentralen Nervensystem sein. Das QT-Intervall wird vom Beginn des QRS-Komplexes bis zum Ende der T-Welle gemessen. Es entspricht der Gesamtzeit, welche die Ventrikel für die Depolarisation und Repolarisation brauchen. Das QT-Intervall variiert abhängig von der Herzfrequenz, so dass zahlreiche Korrekturfaktoren eingeführt wurden, um diesen Wert vergleichbar zu machen. Üblicherweise wird die Korrektur mit Hilfe der Bazettschen Formel vorgenommen.<sup>144</sup> Diese lautet:

$$QTc = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$$

Das QT-Intervall gibt Auskunft über das „verlängerte“ oder „verkürzte“-QT-Syndrom.

Die Messungen der elektrischen Aktivität des Herzens bei 2 Monate alten KEPI-transgenen im Vergleich zu Wildtypmäusen ergaben in beiden Gruppen gleichmäßige Kurvenverläufe. Dies lässt auf einen gleichmäßigen Herzschlag ohne Anzeichen für Arrhythmien schließen. Auch alle weiteren Parameter der Kurven waren in Wildtyp vs. KEPI-transgenen Mäusen unter Basalbedingungen unverändert und gaben somit keine Indikation für Herzrhythmusstörungen oder eine abnormale Ausbreitung der elektrischen Impulse im transgenen Herzen (Tab. 32).

Da feine Veränderungen des  $Ca^{2+}$ -Cyclings unter Basalbedingungen oft kompensiert werden und nicht zu einem auffälligen Phänotyp führen, wurde die elektrophysiologische Aktivität nach der  $\beta$ -adrenergen Stimulation mit Isoproterenol (ISO) bewertet. Eine einmalige Gabe von ISO bewirkte einen rapiden Anstieg der Herzschlagrate um  $63,1 \pm 20,5$  beim Wildtyp und um  $68,2 \pm 9,8$  bei KEPI-transgenen Mäusen. Ein solch extremer Anstieg der Herzfrequenz führt zu einer Beschleunigung des  $Ca^{2+}$ -Cyclings und fordert den fein balancierten Vorgang des  $Ca^{2+}$ -Transients heraus. Nach der ISO-

Applikation zeigten die Wildtyp und KEPI-transgenen Tiere eine vergleichbare Reaktion der P-Welle und des QRS-Komplexes, der die Depolarisation der Ventrikel beschreibt. Es konnten jedoch signifikante Unterschiede in der Repolarisation zwischen den beiden Tiergruppen beobachtet werden.

**Tab. 32 Messung der elektrischen Aktivität der Wildtyp vs. KEPI-transgenen Herzen unter Basalbedingungen mittels EKG.** Aus den Kurvenverläufen wurden folgende Parameter abgeleitet: HR (Herzschlagrate), P (Dauer der P-Welle), PQ (Dauer des PQ-Intervalls), QR (Dauer des QR-Intervalls), QRS (Dauer des QRS-Komplexes), QTp (Dauer zwischen dem Anfang der Q-Welle und der Spitze der T-Welle, QTend (Dauer zwischen dem Anfang der Q-Welle und dem Ende der T-Welle), Qtendc (Dauer zwischen dem Anfang der Q-Welle und dem Ende der T-Welle normalisiert auf 600 Schläge pro min mittels der Bazettschen Formel). Daten sind mit  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

<b>Parameter</b>	<b>Wildtyp n=5 (WT)</b>	<b>KEPI-Transgen n=5 (TG)</b>	<b>Signifikanz WT vs. TG</b>
HR (Herzschläge/min)	411,5 $\pm$ 26,4	406,4 $\pm$ 21,6	p > 0.05 n.s.
P (ms)	16,6 $\pm$ 1,1	16,2 $\pm$ 0,6	p > 0.05 n.s.
PQ (ms)	45,6 $\pm$ 2,6	45 $\pm$ 0,9	p > 0.05 n.s.
QR (ms)	6,8 $\pm$ 0,2	7,4 $\pm$ 0,4	p > 0.05 n.s.
QRS (ms)	13 $\pm$ 0,3	13,6 $\pm$ 0,4	p > 0.05 n.s.
QTp (ms)	14,6 $\pm$ 0,5	15,4 $\pm$ 0,6	p > 0.05 n.s.
Qtend (ms)	61,7 $\pm$ 3,5	63,8 $\pm$ 2,6	p > 0.05 n.s.
Qtendc (ms)	49,7 $\pm$ 1,1	52,3 $\pm$ 1,5	p > 0.05 n.s.

**Tab. 33 Messung der elektrischen Aktivität der Wildtyp vs. KEPI-transgenen Herzen nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol (ISO) mittels EKG.** Aus den Kurvenverläufen wurden folgende Parameter abgeleitet: HR (Herzschlagrate), P (Dauer der P-Welle), PQ (Dauer des PQ-Intervalls), QR (Dauer des QR-Intervalls), QRS (Dauer des QRS-Komplexes), QTp (Dauer zwischen dem Anfang der Q-Welle und der Spitze der T-Welle, QTend (Dauer zwischen dem Anfang der Q-Welle und dem Ende der T-Welle), Qtendc (Dauer zwischen dem Anfang der Q-Welle und dem Ende der T-Welle normalisiert auf 600 Schläge pro min mittels der Bazettschen Formel). Daten sind mit  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Tiere wurden mit 20  $\mu$ g ISO/ g Körpergewicht behandelt.

<b>Parameter</b>	<b>Wildtyp n=5 (WT)</b>	<b>KEPI-Transgen n=5 (TG)</b>	<b>Signifikanz WT vs. TG</b>
HR (Herzschläge/min)	474,6 $\pm$ 22,2	474,6 $\pm$ 21	p > 0.05 n.s.
Anstieg der Herzrate nach ISO-Gabe	63,1 $\pm$ 20,5	68,2 $\pm$ 9,8	p > 0.05 n.s.
P (ms)	16,6 $\pm$ 0,9	17,9 $\pm$ 0,8	p > 0.05 n.s.
PQ (ms)	56,8 $\pm$ 2,8	59,9 $\pm$ 7,5	p > 0.05 n.s.
QR (ms)	7,2 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 0,5	p > 0.05 n.s.

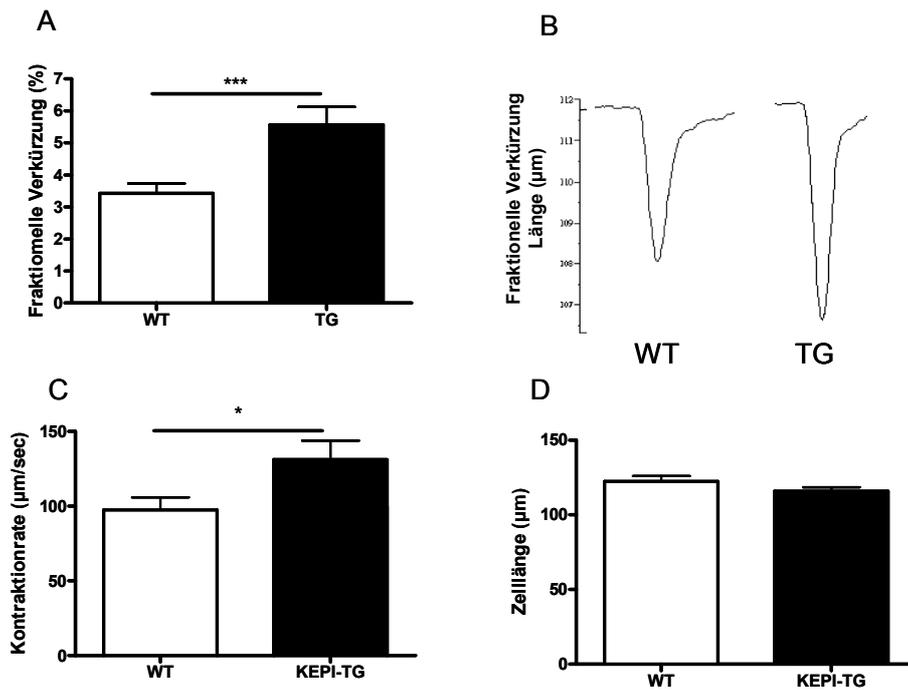
QRS (ms)	13,6 ± 0,2	13,7 ± 0,5	p> 0.05 n.s.
QTp (ms)	15,8 ± 0,2	16,9 ± 0,6	p> 0.05 n.s.
QTend (ms)	77,4 ± 3,4	66,6 ± 3,2	P< 0.05 *
QTendc (ms)	68,5 ± 1,6	59,0 ± 1,9	P <0,005 **

Die KEPI-transgenen Tiere wiesen eine signifikant verkürzte Dauer zwischen dem Anfang der Q- und dem Ende der T-Welle (normalisiert auf 600 Herzschläge/ min) auf (Tab. 33). Die Kurvenverläufe nach der Stimulation mit ISO behielten ihren gleichmäßigen Verlauf. Insgesamt scheint die  $\beta$ -adrenerge Stimulation keine Arrhythmien bei den transgenen Mäusen hervorzurufen, die Repolarisation des Herzens wird jedoch verkürzt.

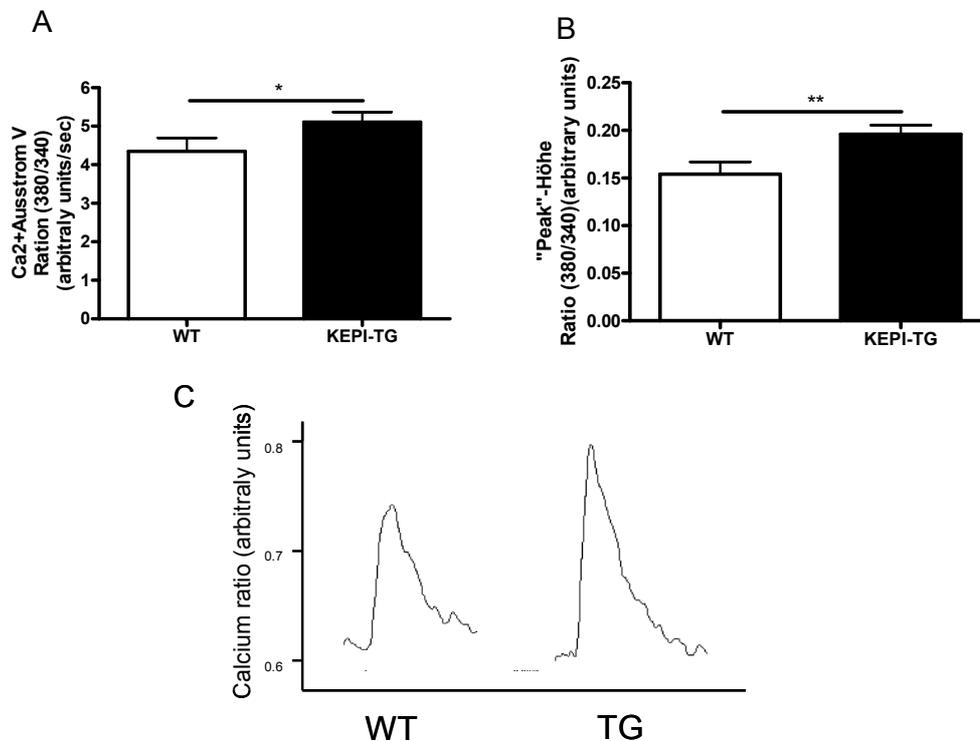
### 10.6.3 Untersuchung des $Ca^{2+}$ -Gradienten in KEPI-transgenen Kardiomyozyten

Der ubiquitäre *second messenger*  $Ca^{2+}$  ist essentiell für die elektrische Aktivität der Kardiomyozyten und ist ein direkter Aktivator der Myofibrillen, welche die Kontraktion ausführen. PP1 ist maßgeblich an der Regulation des Phosphorylationsstatus von verschiedenen Effektorproteinen des  $Ca^{2+}$  Cyclings beteiligt. Da KEPI die Funktion von PP1 moduliert, war es von entscheidendem Interesse den Calcium-Transienten sowie die Kontraktilität auf Einzelzellebene in KEPI-überexprimierenden Kardiomyozyten zu untersuchen. Hierfür wurden Kardiomyozyten mit Fura-2 beladen und anschließend elektrisch stimuliert (Bipolare Impulse 5 ms, 1 Hz).

Die Verkürzung der Kardiomyozyten und Fura-2-Signale wurden dabei simultan gemessen (Ionoptix-System). Als Maß der Kardiomyozyten-Kontraktilität wird die Zellverkürzung im Vergleich zur Ausgangslänge (Ruhezustand) herangezogen. Die Calcium-Transienten werden als Quotienten der Fluoreszenzemission bei 510 nm nach Erregung mit 340 nm und 380 nm registriert (340/380). Wie in der Abb. 39 sichtbar, zeigen die transgenen Kardiomyozyten eine deutlich verbesserte fraktionelle Verkürzung (Abb. 39A, B) bei gleicher basaler Zelllänge (Abb. 39D) im Vergleich zum Wildtyp-Kardiomyozyten. Ebenso ist in transgenen Kardiomyozyten die Geschwindigkeit der Kontraktion erhöht (Abb. 39C).



**Abb. 39 Messungen der kontraktile Leistung auf Einzelzellebene von transgenen und Wildtyp-Kardiomyozyten.** Messung der fraktionellen Verkürzung.(A) Representative Kurvenverläufe bei der Erhebung der Zellverkürzung. (B) Messung der Kontraktionsrate. (C) Messung der Zelllänge im Basalzustand.(D) Wildtypkardiomyozyten n=23; transgene Kardiomyozyten n=39. \*. P<0.05, \*\*\*. P<0.001.



**Abb. 40 Messungen des Ca<sup>2+</sup>-Transienten auf Einzelzellebene von KEPI-transgenen und Wildtyp-Kardiomyozyten.** Messung der Ca<sup>2+</sup>-Ausstromgeschwindigkeit aus dem SR ins Zytoplasma. (A) Messung der Peak-Höhe.(B) Representative Kurvenverläufe bei der Erhebung der Peakhöhe.(C) Wildtypkardiomyozyten n=23; transgene Kardiomyozyten n=39. \*. P<0.05, \*\*. P<0.01.

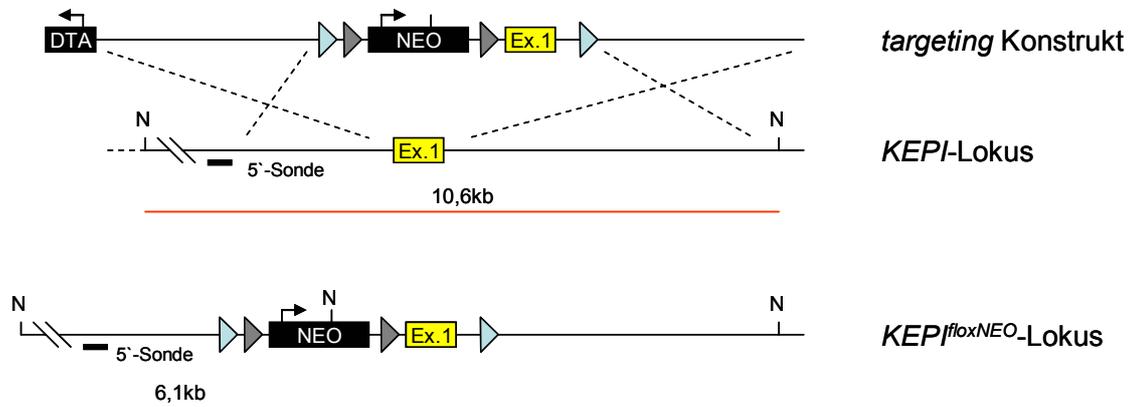
Diese Beobachtungen des kontraktile Verhaltens der Kardiomyozyten stehen im Einklang mit den Ergebnissen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient-Messung. Hier zeigen die transgenen Kardiomyozyten eine beschleunigte Freisetzung des  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR ins Zytosol (Abb. 40A) und einen deutlich erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak in der Systole (Abb. 40B, C). Der diastolische intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel scheint jedoch nicht verändert zu sein (Daten nicht gezeigt).

### **10.7 Klonierung des DNA-Konstruktes zur Herstellung der Kardiomyozyten-spezifischen KEPI-Knockout-Maus**

Ein sehr potentes Werkzeug zur *in vivo* Analyse der Funktion eines Proteins sind Tiere, die für dieses Protein defizient sind. In Mäusen wird so ein „*knockout*“ (KO) eines Gens durch die Einführung einer Mutation (z.B. in Form einer Antibiotikumresistenz) in den interessanten Genloкус via homologer Rekombination erzielt. Final wird dabei entweder die Transkription des Gens unterdrückt (KO der ATG-Startsequenz) oder das resultierende Transkript kodiert für eine modifizierte Aminosäuresequenz, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führt (KO eines Genabschnitts innerhalb der kodierenden Sequenz). Es besteht die Möglichkeit eines Gesamt-knockouts, bei dem in allen Geweben das Protein fehlt oder des sog. konditionellen KO, der zu einer gewebespezifischen Ablation eines Proteins dient. Hierbei wird der Genloкус von den sog. loxP-Sequenzen flankiert, die Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase darstellen. Die Cre-Rekombinase ist eine Topoisomerase die die DNA-Rekombination zwischen den loxP-Sequenzen katalysiert. Nach einer Kreuzung der loxP-Maus mit einer gewebespezifischen, transgenen Cre-Mauslinie, wird das Zielgen aus dem Genom der Nachkommen deletiert.

Für die zukünftige funktionelle Analyse von KEPI wurde ein konditionelles *knockout*-Mausmodell gewählt. Da KEPI nicht nur im Herzen, sondern auch im zentralen Nervensystem exprimiert wird, besteht die Möglichkeit einer frühen embryonalen Letalität. Dies würde eine kardiovaskuläre Analyse erschweren oder gar unmöglich machen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Konstrukt zur gezielten Mutagenese des KEPI-Lokus in murinen embryonalen Stammzellen hergestellt. Wie in der Abb. 41 dargestellt, wird das erste Exon

des KEPI-Gens von loxP-Sequenzen flankiert, die eine gewebespezifische Deletion des Locus erlauben. Nach einer Verpaarung des KEPI<sup>lox</sup>NEO-Mausstammes mit einem Cre-Rekombinase-transgenen Stamm wird die von den loxP-Sequenzen begrenzte Region deletiert.



**Abb. 41 Strategie zur Einführung einer gezielten Mutation in den KEPI-Lokus in ES-Zellen.** Schematisch dargestellt ist das "Targeting Konstrukt", der genomische Wildtyp-Lokus von KEPI, sowie das KEPI<sup>lox</sup>NEO-Allel, das durch homologe Rekombination in ES-Zellen erzeugt werden soll. Die DTA-Kassette zur Negativselektion und die Sequenz der NEO-Kassette sind als schwarze Rechtecke, die Sequenzen der loxP-Sites und der flip-sites sind als hellblaue bzw. graue Pfeilspitzen gezeigt. Gelb dargestellt ist Exon 1 des KEPI-Gens. Die Restriktionsstellen für NcoI sind mit (N) gekennzeichnet; die erwarteten Fragmentgrößen nach NcoI-Verdau sind als rote Linie (wt-Lokus, 10.6 kb) bzw. grüne Linie (mutierter Locus, 6.1 kb) dargestellt.

## 10.8 Der Zebrafisch als ein alternatives Tiermodell

Eine mutante Maus mit einer gezielten Deletion des KEPI-Gens wird in der Zukunft sicherlich Aufschluss über KEPI's entwicklungsbiologische und physiologische Funktion geben. Ihre Generierung ist jedoch mit einem erheblichen zeitlichen und materiellen Aufwand verbunden. Um innerhalb einer relativ kurzen Zeit einen Eindruck über die funktionelle Bedeutung von KEPI im Herzen zu gewinnen, wurde der Zebrafisch (*Brachydanio rerio*) als ein alternatives Tiermodell verwendet. Es bietet die Möglichkeit eines schnellen knock downs eines bestimmten Proteins sowie einer raschen und anschaulichen phänotypischen Analyse.

Der Zebrafisch ist in den tropischen Gewässern von Ostindien, Pakistan, Bangladesch und Nepal beheimatet, aber seine Kultur wurde in Japan und den USA gut etabliert. Er ist omnivor und ernährt sich von kleinen

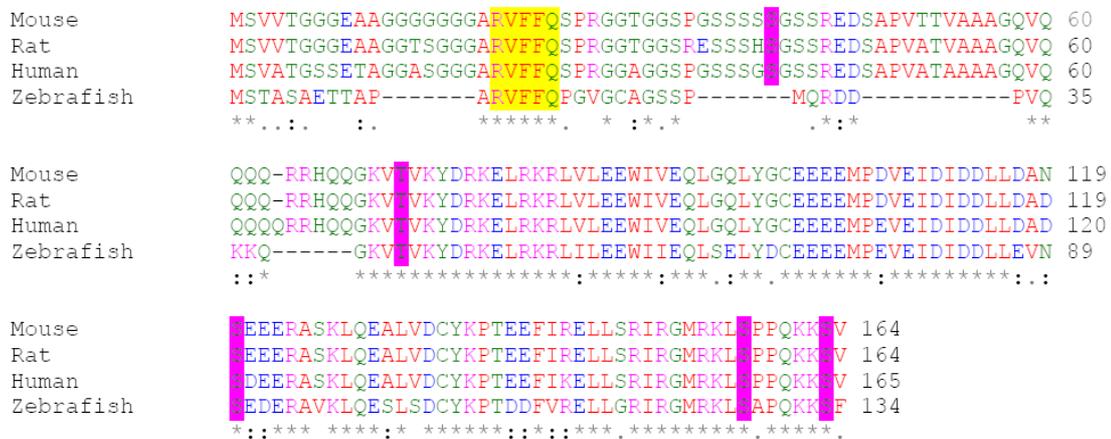
Wasserinsekten, Crustaceen, Würmern und Plankton. Der Fisch, dessen Name auf die charakteristische horizontale Streifung an den Körperseiten zurückzuführen ist, erreicht eine Körperlänge von 6 cm und eine Lebensdauer von 5 Jahren. Von großem Vorteil für den experimentellen Einsatz ist die große Anzahl der gelegten Eier während eines Laichereignisses (ca. 100 Eier). Ebenso macht seine schnelle und gut dokumentierte Embryonalentwicklung (von einer Einzelzelle zur Larvenstadium in weniger als 3 Tagen) den Zebrafisch zu einem beliebten Forschungstiermodell. Die einfache Manipulation der Eier eröffnet die Möglichkeit einen gezielten „*knock down*“ oder eine Überexpression eines Proteins im gesamten Embryo vorzunehmen. Der „*knock down*“ wird durch die Injektion von synthetischen *antisense* Oligonukleotiden erzielt, die nach der Art ihrer chemischen Modifikation als Morpholinos bezeichnet werden. Die behandelten Eier und die daraus entstehenden Embryos heißen Morphants. Aufgrund der oben aufgeführten Eigenschaften stellt der Zebrafisch ein exzellentes Modell für entwicklungsbiologische und funktionelle Studien dar und ist eine gute Ergänzung zu Analysen an Mäusen oder Ratten. Vorrausgesetzt, dass ein KEPI-Ortholog im Zebrafisch vorhanden ist, kann dieses Modell hilfreich für die Analyse der Funktion von KEPI im Herzen sein.

### **10.8.1 Identifizierung des KEPI-Orthologs im Zebrafisch**

Um einen KEPI-Ortholog im Zebrafisch zu identifizieren, wurde die gesamte Länge der murinen mRNA, die für KEPI kodiert (GeneID: 76142/ NCBI Acc.nr. NM\_133485) mit der Sanger Zv4.0 Datenbank der genomischen Sequenz von Zebrafisch abgeglichen ([http://www.ensembl.org/Danio rerio/bblastview](http://www.ensembl.org/Danio%20rerio/bblastview)). Der Abgleich ergab einen Locus auf dem Chromosom 23, der ein putatives KEPI-Ortholog (zfKEPI) darstellte. Die von dem Locus kodierte Aminosäuresequenz wurde weiter mit Hilfe des „Simple Modular Architecture Research tool“ (SMART; <http://smart.embl-heidelberg.de>) auf strukturelle und funktionelle Motive überprüft. Zwischen den Aminosäuren 39-134 wurde eine PP1-inhibitorische Domäne vorhergesagt, die im murinen KEPI ebenso in dieser Form vorkommt. Um den Grad der Konservierung dieses Proteins zu bestimmen, wurden mit Hilfe der „ClustalW“-Software die -Proteinsequenzen

von Mensch, Maus, Ratte und Zebrafisch miteinander verglichen (Ver 1.83; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). (Abb. 42) Der Vergleich ergab eine fast vollständige Konservierung zwischen Mensch, Maus und Ratte (95% identische Aminosäuresequenz), während der Vergleich der humanen und Zebrafisch-Sequenz 67% identischer Aminosäuren erbrachte. Die PP1-inhibitorische Domäne wies eine Übereinstimmung von 83% zwischen den beiden Spezies auf. Auch die Konsensussequenz des PP1-Bindemotivs war zwischen Mensch und Zebrafisch 100%ig konserviert.

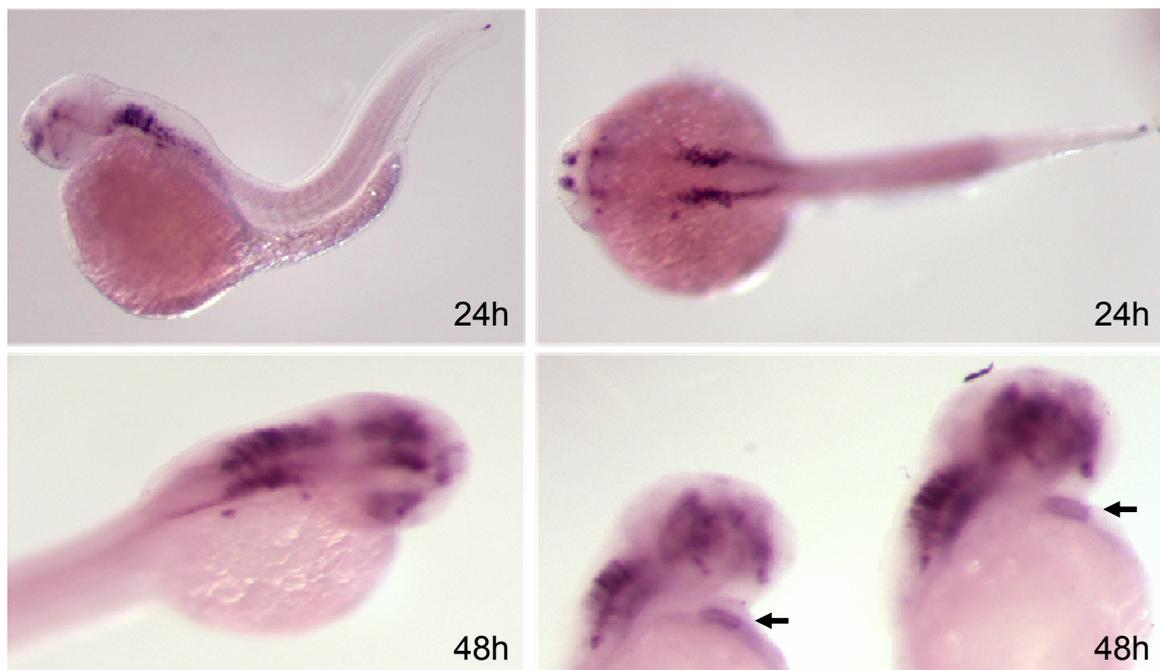
Der Zebrafisch gehört zu der Gruppe der Teleostei, die eine Duplikation des Genoms aufweisen.<sup>145</sup> Aus diesem Grund haben einige Gene mehrere Kopien (Isoformen), die teilweise unterschiedliche Funktionen übernehmen oder aber ihre Funktionalität verloren haben. Um weitere Kopien des zfKEPI zu identifizieren, wurde das "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) und das "Sequence Search and Alignment by Hashing Algorithm" (SSAHA) benutzt. Im Zuge dieser Analyse wurde keine weitere Kopie des zfKEPI gefunden.



**Abb. 42 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Mensch-, Maus- und Ratten- KEPI-Sequenz mit dem Zebrafisch-Ortholog.** Der Vergleich der humanen Sequenz mit dem Zebrafisch-Ortholog ergibt 67% identischer Aminosäuresequenz. Die Sterne kennzeichnen identische Aminosäuren, Doppelpunkte markieren eine hohe Similarität und Punkte stehen für einen niedrigen Grad der Similarität. Die Konsensussequenz für das PP1-Bindemotiv ist gelb markiert, während rosa die Phosphorylierungsstellen anzeigt.

### 10.8.2 Expressionsmuster der KEPI mRNA im Fisch

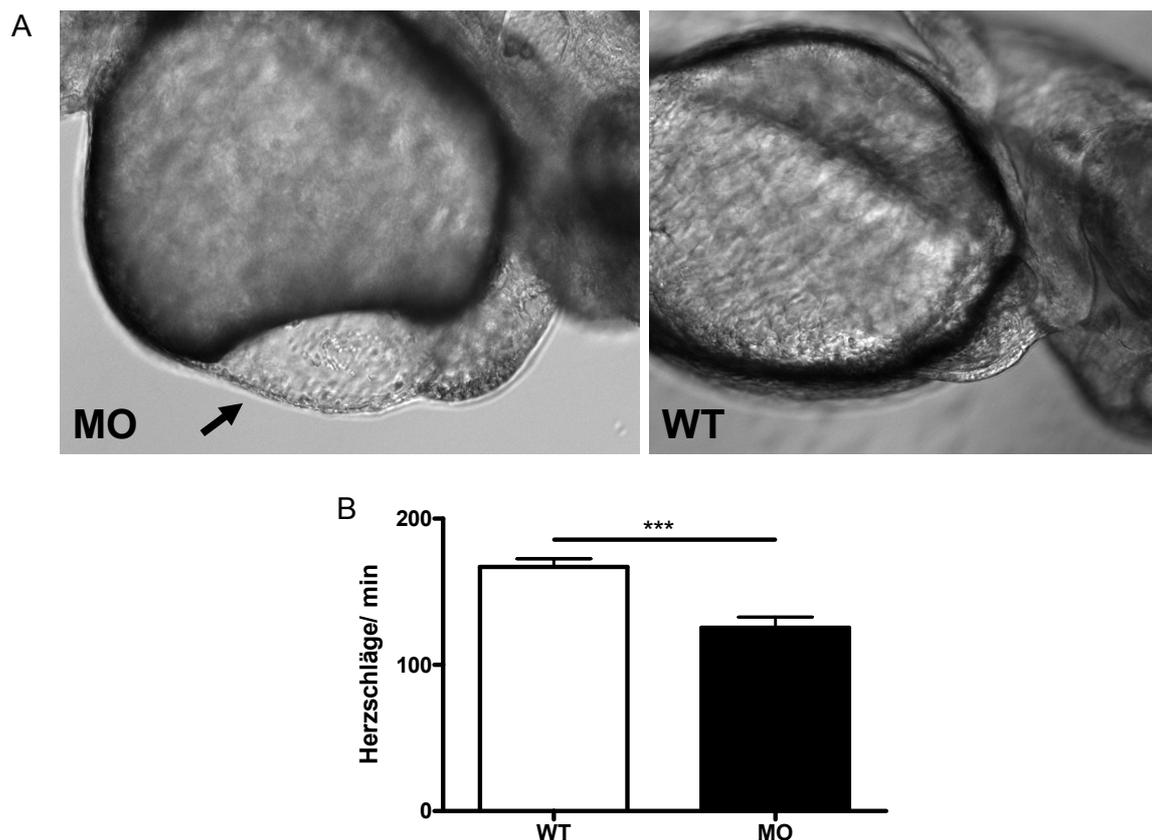
Um zu überprüfen, in welchen Geweben KEPI im Zebrafisch exprimiert wird, wurde die KEPI-mRNA mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung visualisiert. Die Expression wurde nach 24h und 48h der Embryonalentwicklung untersucht. Nach 24h war die KEPI-mRNA im Nervensystem, aber noch nicht im Herzen anwesend (Abb. 43 oben). Die genaue Beschreibung der Regionen des Nervensystems konnte nicht vorgenommen werden, da keine zusätzlichen, für bestimmte Regionen typischen Markergene getestet wurden. 48h nach der Befruchtung konnte KEPI in beiden Kammern des Herzens sowie im Nervensystem detektiert werden (Abb. 43 unten). Diese Befunde zeigen, dass die Expression von KEPI sowohl in der Maus als auch im Zebrafisch auf das zentrale Nervensystem und das Herz beschränkt ist.



**Abb. 43 Lokalisation der KEPI-mRNA-Expression im Zebrafisch mittels *in situ*-Hybridisierung.** Das rechte und linke obere Bild stellen das Expressionsmuster nach 24h Embryonalentwicklung dar. Die KEPI-Expression ist auf das zentrale Nervensystem begrenzt. Im Herzen ist keine Färbung sichtbar. Das rechte und linke untere Bild zeigt das KEPI-Expressionsmuster nach 48h der Embryonalentwicklung. Das KEPI-Transkript ist im Nervensystem, im Auge sowie im Herzen (durch Pfeile gekennzeichnet) detektierbar.

### 10.8.3 Funktioneller Knock down von KEPI im Zebrafisch

Um den Protein-„*knock down*“ zu erzielen, wurden befruchtete Oozyten mit Morpholinos injiziert. Morpholinos sind synthetische *antisense* DNA-Oligonukleotide, die durch „sterische Blockade“ der Splicing Donor/Acceptor Sequenzen ihr Splicing oder durch Hemmung der Ribosomen-Anlagerung ihre Transkription verhindern. Nach der Applikation sind Morpholinos bis zu 5 Tagen stabil, da sie gegen RNAsen resistent sind. Diese Resistenz ist auf die modifizierte Struktur ihres *Backbones* zurückzuführen. Morpholinos besitzen wie andere *antisense* Oligonukleotide die „Standard“-Nukleobasen, die aber nicht an Riboseringe (wie in der RNA), sondern an Morpholinoringe binden. Die Nukleotide eines Morpholinooligos sind durch Phosphordiamidat-Gruppen verbunden und nicht durch Phosphatgruppen wie in der RNA.



**Abb. 44 KEPI-knock down im Zebrafisch.** 48h alter Embryo mit perikardialem Ödem. (angezeigt durch Pfeil) (A) Herzschlagrate 48h nach der Morpholinoinjektion. (B) Die Daten sind mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Gruppenumfang: Morphanden (MO) n = 20, Wildtyp (WT) injiziert mit Danius-Puffer = 20. \*p<0.05 vs. Wildtyp.

Die hier verwendeten Morpholinos waren gegen die Region des Translationsstarts gerichtet. Der „*knock down*“ wurde in einer transgenen Fischlinie (cmlc2:GFP) durchgeführt, die GFP kardiomyozytenspezifisch überexprimierte. Diese Eigenschaft ist von großem Vorteil, da die Bewegung des Herzens *in vivo* unter einem Fluoreszenzbinokular problemlos verfolgt werden konnte. Die Injektion einer relativ kleinen Dosis des Morpholinos (2µl einer 100µM Morpholinolösung) resultierte in einer nach 48h sichtbaren Verlangsamung der Herzschlagrate (Abb. 44B). Dieser Phänotyp war mit der Zeit progredient und zeigte eine dosisabhängige Verstärkung. Darüber hinaus zeigten ca. 70% der Morphanden deutliche perikardiale Ödeme, die ein typisches Anzeichen für eine Herzinsuffizienz sind (Abb. 44A). Die Geschwindigkeit des zirkulierenden Blutes war bei diesen Tieren deutlich reduziert (siehe Film im Anhang). Darüber hinaus zeigten 15% der Morphanden eine Retardation der Embryonalentwicklung. Ca. 20 % der injizierten Embryonen starben vor Ablauf der ersten 24h.

## 11 Diskussion II

In dieser Studie wurde zum ersten Mal die Rolle von *PKC-enhanced Protein-Phosphatase 1 Inhibitor* (KEPI) im kardialen Gewebe untersucht. Die Anwesenheit der KEPI-mRNA im Herzen wurde zwar bereits in der Vergangenheit nachgewiesen, aber eine Charakterisierung auf physiologischer oder molekularer Ebene war im Herzen noch nicht (und in anderen Geweben kaum) vorgenommen worden.<sup>138</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehreren Aspekte der KEPI-Biologie wie die embryonale Expression, die Interaktionspartner und die *in vivo* Funktion von KEPI behandelt. Es wurden ebenso Grundlagen für eine weitergehende KEPI-Forschung geschaffen.

### 11.1 Identifizierung von KEPI im Herzen und seine Expression während der Embryonalentwicklung

Die Identifizierung der Expression des KEPI-Gens im Herzen erfolgte im Zuge einer Gen-Chip-Analyse an erbB2-Rezeptor defizienten Mäusen, die ein Modell für die dilatative Kardiomyopathie (DCM) darstellen. Die Suche nach neuen, im Herzen noch nicht beschriebenen Genen, die die Herzfunktion regulieren und potentiell während der Kardiomyopathie von Relevanz sind, veranlasste uns zur Analyse der sog. RIKEN-Sequenzen auf dem Affymetrix®-Gen-Chip. Der Sequenzvergleich erbrachte eine komplette Übereinstimmung der RIKEN-Sequenz Nr. AF074960 mit der mRNA des KEPI-Gens, welches zur damaligen Zeit auf dem Chip nicht annotiert war.

Die Expressionsanalyse im Alter von 12 Tagen, also vor Manifestation der DCM, ergab eine um 40% reduzierte Expression der zu KEPI homologen RIKEN-Sequenz in ErbB2-mutanten Mäuseherzen. Ähnlich wie in anderen Kardiomyopathiemodellen zeigte sich in den ErbB2-Knockout-Tieren eine Erhöhung der PP1-Expression um 31%. In der Analyse eines weiteren DCM-Modells (Dysferlin-defiziente Maus) konnte hingegen keine signifikante Veränderung der KEPI-Expression nachgewiesen werden.<sup>146</sup> Möglicherweise ist die in Dysferlin-mutanten Mäusen beobachtete geringgradige Veränderung

der KEPI-Expression auf die nur leichte kardiale Dysfunktion oder auf einen ErbB2-spezifischen *Pathway* zurückzuführen.

Die Analyse des Expressionsmusters während der Embryonalentwicklung des Herzens wies bereits am Tag E8,5 eine deutliche Präsenz der KEPI-mRNA im Ausflusstrakt des sich entwickelnden Herzens nach. Zu späteren Zeitpunkten war die mRNA in den Ventrikeln (E10,5) und anschließend in allen Kompartimenten des Herzens (E14,5) detektierbar. Dieser frühe Zeitpunkt sowie die kontinuierliche Expression von KEPI im Herzen weisen auf seine Relevanz für die Entwicklung und später für die Funktion des adulten Herzens hin.

## 11.2 Troponin I als ein neuer Bindungspartner von KEPI

Um neue Bindungspartner von KEPI zu identifizieren wurde ein GST-KEPI Pulldown-Assays entwickelt. Mit Hilfe dieses Assays wurde zuerst die Bindung an PP1, einem bereits bekannten Bindungspartner von KEPI, nachgewiesen. Die massenspektrometrische Analyse der Pulldown-Fraktion lieferte Troponin I (TnI) als einen Bindungspartner von KEPI. Dieses Ergebnis wurde in einem weiteren unabhängigen Pulldown-Assay mit Hilfe eines spezifischen  $\alpha$ Troponin I Antikörpers bestätigt. Der Troponin-Komplex ist eine Komponente der dünnen Filamente (zusammen mit Aktin und Tropomyosin) in Herz- und Skelettmuskel, die für die Bindung des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  und somit für die Induktion der Kontraktion verantwortlich ist. Dabei spielen die drei Untereinheiten des Troponinkomplexes unterschiedliche Rollen. Troponin C (TnC) bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und generiert eine Konformationsänderung von Troponin I. Troponin T (TnT) bindet an Tropomyosin und bildet so den Troponin-Tropomyosin-Komplex. Troponin I bindet an das Aktin der dünnen Myofilamente und reguliert ihre Verfügbarkeit für die Myosinköpfe. Bei hohen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration werden die Myosinbindestellen entlang der Filamente zugänglich gemacht und die Kontraktion geht vonstatten.

Die hier nachgewiesene Assoziation zwischen KEPI und Troponin I hat in Anbetracht der Regulation des Troponinkomplexes durch eine reversible Phosphorylierung einen funktionellen Sinn. Neben anderen myofibrillären

Proteinen wird das C-Protein im dicken und TnI und TnT im dünnen Filament durch eine reversible Phosphorylierung reguliert.<sup>147</sup> Die Phosphorylierung von TnI und/oder TnT durch PKC resultiert in einer Inhibition der  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulierten MgATPase des rekonstruierten Aktomyosinkomplexes.<sup>148, 149</sup> In nativen Myofibrillen-Präparationen kommt es nach der Phosphorylierung durch PKC zu veränderten Interaktionen zwischen den kontraktilen Proteinen.<sup>149, 150</sup> Jideama et al. berichteten darüber hinaus, dass TnT und TnI von PP1 effektiv dephosphoryliert werden.<sup>151</sup> Die hier gezeigte Interaktion zwischen KEPI und TnI könnte also eine Rolle bei der Regulation des Troponinkomplexes durch PP1 spielen.

Der Troponin-Komplex als Wirkungsort für KEPI erscheint sehr interessant, da es sich um die Regulation eines essentiellen kontraktilen Proteins handelt. Dennoch ist es notwendig weitere Bindungsstudien durchzuführen, um die Assoziation von KEPI mit diesem Komplex zu bestätigen. Der Einsatz von weiteren Bindungsassays ist notwendig, da TnI ein sehr stark exprimiertes fibrilläres Protein ist, so dass eine unspezifische Detektion ausgeschlossen werden muss.

### **11.3 Herzspezifische Überexpression von KEPI im transgenen Mausmodell**

Um die Rolle des neuen PP1 Inhibitors KEPI bei der Modulation der Kontraktilität des Herzens zu untersuchen, wurde ein KEPI-transgenes Mausmodell generiert. Zwei Mauslinien zeigten eine deutliche Überexpression des KEPI-Proteins. Dieses Modell stellt ein exzellentes Werkzeug für die Studie der PP1-abhängigen Regulation des Kontraktionsverhaltens dar.

#### **11.3.1 Effekte der KEPI-Überexpression auf die elektrophysiologische Aktivität des Herzens (EKG)**

Das Herz begegnet verschiedenen Stressstimuli mit einem strukturellen Remodeling (siehe Kapitel 2.1.2.1.) aber auch mit Modifikationen seiner elektrischen Aktivität (elektrisches Remodeling). Veränderungen der

elektrophysiologischen Aktivität des Herzens können strukturelle Ursachen haben (Hypertrophie, Fibrose), oder mit Störungen des Erregungsleitungsystems einhergehen. Einen weiteren Aspekt, der in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen hat, stellen die Veränderungen der Excitation-Contraction-Kopplung und somit der Ionenströme in Kardiomyozyten dar. Zum Beispiel ist es bekannt, dass das Vorhofflimmern mit Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms durch den L-Typ-Kanal assoziiert ist.<sup>152-</sup>

<sup>155</sup> Die funktionelle Regulation des L-Typ-Kanals und anderer Proteine, die an der Excitation-Contraction-Kopplung (ECK) beteiligt sind, wird durch ihre Phosphorylierung reguliert. Hierbei spielen die Kinasen PKA, PKC und CAMKII eine entscheidende Rolle, und die Phosphatasen PP1 und PP2A wirken ihren Effekten entgegen. Wie essentiell dieses Gleichgewicht ist, geht aus einer Arbeit hervor, die eine erhöhte Phosphataseaktivität am L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in Assoziation mit humanem chronischem Vorhofflimmern bringt.<sup>156</sup> Es ist anzunehmen, dass die KEPI-Überexpression die Aktivität von PP1 beeinflusst und somit die Balance zwischen der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ECK-relevanten Proteinen aufgehoben wird. Um die Bedeutung von KEPI für die elektrische Aktivität des Herzens zu überprüfen, wurden KEPI-transgenen Mäuse einem EKG unter Basalbedingungen und nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation unterworfen.

Das basale Elektrokardiogramm zeigte keine Unterschiede zwischen den Kurvenverläufen der transgenen und der Wildtypiere auf. Die elektrische Aktivität der Herzen scheint also unter Basalbedingungen von der KEPI-Überexpression nicht beeinflusst zu sein. Die Abwesenheit einer sichtbaren Modifikation unter Basalbedingungen kann mehrere Ursachen haben. Zum einen ist die relativ niedrige Anzahl der Versuchstiere in jeder Gruppe ( $n=5$ ) kritisch. Auch der frühe Messzeitpunkt (Alter: 8 Wochen) kann von Bedeutung sein, da ein abnormes elektrophysiologisches Verhalten des Herzens oft erst mit zunehmendem Alter manifest wird. Ein prominentes Beispiel für so eine altersabhängige Progression der elektrischen Dysfunktion stellen die *SCN5A* mutanten KO-Mäuse dar, die von der 3. bis 72. Lebenswoche progredient ihre EKG-Kinetik verändern.<sup>143</sup> *SCN5A* kodiert für den Haupt- $\text{Na}^+$ -Kanal im Herzen und seine Mutation ist auch für humane Erregungsdefekte (Lenègre's Krankheit) verantwortlich.<sup>157</sup> Ein weiterer Aspekt, der eine Symptomfreiheit

unter Basalbedingungen begründen könnte, ist die Fähigkeit der EC-Kopplung auf feine regulatorische Veränderungen kompensatorisch zu reagieren. Solche zuerst durch Kompensation ausgeblendeten Defekte können unter Bedingungen einer hohen kardialen Anforderung (z.B. starke  $\beta$ -adrenerge Stimulation) manifest werden. Tatsächlich zeigten die KEPI-transgenen Herzen nach einer einmaligen Stimulation mit Isoproterenol eine zwar gleichmäßige EKG-Kurve, aber die Repolarisationsphase des Herzens, die durch das korrigierte QT-Intervall charakterisiert wird, zeigte sich verkürzt. Eine solche Verkürzung der Repolarisationsphase wird auch bei Patienten mit dem „verkürzten“-QT-Syndrom beobachtet.<sup>158, 159</sup> Genetische Analysen dieser Patienten haben gezeigt, dass sie eine *gain-of-function* Mutationen im hERG-Gen (*human ether-a-go-go-related gene*) beherbergen, welches für die  $\alpha$ -Untereinheit eines Kalium-Kanals (*rapid delayed rectifier current* I(Kr)) kodiert.<sup>160, 161</sup> Dieses Protein ist durch seine Beteiligung an der Repolarisation des ventikulären Aktionspotentials bekannt. Mutationen in hERG führen zum dramatische Anstieg das I<sub>Kr</sub>-Stroms, was zu einer Verkürzung des Aktionspotentials und der Refraktärzeit führt.<sup>161</sup> Patienten, die die beschriebenen Mutationen tragen, haben ein hohes Risiko einen plötzlichen Herztod zu erleiden.<sup>160</sup> Inwiefern die Aktivität dieses Kanals durch die Dephosphorylierung durch PP1 reguliert wird, ist bislang nicht bekannt. Möglicherweise ist KEPI an der Regulation dieses und anderer Kanäle wie KCNE2, KCNQ1, KCNE1, SCN5A und KCNJ2, die die Repolarisation steuern, beteiligt.

In der Zukunft bleibt zu klären, ob KEPI den Phosphorylierungsstatus und somit die Aktivität dieser und anderer Ionenkanälen reguliert. Für diese Art von Analyse wären patch clamp-Experimente sicherlich aufschlussreich.

### **11.3.2 Effekte der KEPI-Überexpression auf den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Transienten und die Kontraktionskinetik in isolierten Kardiomyozyten**

Um den Einfluss von KEPI auf die EC-Kopplung näher zu charakterisieren, wurde sowohl der Ca<sup>2+</sup>-Transient als auch die Kontraktionskinetik der KEPI-

transgenen vs. Wildtyp-Kardiomyozyten untersucht. Diese Analyse zeigte, dass die KEPI-transgenen Kardiomyozyten eine signifikant verbesserte Kontraktilität und eine beschleunigte Kontraktionsrate bei gleicher basaler Zelllänge aufwiesen. Die Bewertung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten ergab eine Beschleunigung und Verstärkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstroms aus dem SR in KEPI-transgenen Kardiomyozyten vs. Wildtypkardiomyozyten. Die erhöhte Kontraktilität ist wahrscheinlich durch den verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten aus dem sarkoplasmatischen Reticulum begründet. Ein rapider Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol führt zu einer verbesserten Aktivierung des Myofilament-Proteins Troponin C und beschleunigt so die Kontraktion. Offen bleibt die Frage nach der Ursache dieses verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstroms. Naheliegend ist eine Modulation der Aktivität des Ryanodin Rezeptors, der für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem SR verantwortlich ist. Es ist bekannt, dass PP1 gemeinsam mit PKA, FKBP 12.6 und weiteren Proteinen am makromolekularen Komplex des RyR beteiligt ist.<sup>109</sup> In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch PKA die Aktivität des RyRs bis hin zu spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Freilassung steigert.<sup>109, 117</sup> Marx et al. berichteten, dass Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz eine Hyperphosphorylierung des Kanals durch PKA aufwiesen.<sup>109</sup> Es ist anzunehmen, dass sich die Aktivität des RyRs in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad förderlich oder pathogen auf die Kontraktilität auswirken kann. In zukünftigen Experimenten bleibt es zu klären, ob und inwiefern die Überexpression von KEPI den Phosphorylierungsstatus und die Aktivität des RyR beeinflusst. Eine weitere Erklärung für den verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bietet die Modulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins SR. Dies würde eine verstärkte Aktivität der SERCA-ATPase voraussetzen, deren Aktivität indirekt durch PP1 gesteuert wird. Wird der SERCA-Inhibitor Phospholamban (PLB) durch PKA phosphoryliert, so dissoziiert er von SERCA und cytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  kann ins SR zurückgepumpt werden. Eine potentielle Inhibition der PP1-Aktivität durch KEPI würde die Phosphorylierung von PLB begünstigen und dadurch die SERCA-Aktivität stärken. Um diese Hypothese zu prüfen, sollte der Phosphorylierungszustand von PLB am Ser-16 und Thr-17 getestet werden. Interessanterweise war die Verstärkung der Kontraktion und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in KEPI-transgenen Herzen übereinstimmend mit

dem Phänotyp der I-2-überexprimierenden Kardiomyozyten.<sup>134</sup> Als Ursache für eine verbesserte Kontraktilität der I-2-transgenen Herzen führte Kirchhefer et al. eine Hyperphosphorylierung von PLB am Ser-16 an.<sup>134</sup>

Die förderliche Wirkung der KEPI-Überexpression auf die Kontraktilität steht im Einklang mit zahlreichen Studien, die eine Reduktion der PP1 Aktivität mit einer verbesserten kardialen Leistung korrelieren.<sup>133, 136, 162-164</sup>

Ein wesentlicher Aspekt, der bei der Betrachtung des  $Ca^{2+}$ -Transienten berücksichtigt werden sollte, ist seine potentielle Auswirkung auf das EKG. Da unter KEPI-Überexpression der  $Ca^{2+}$ -Transient Veränderungen im systolischen Strom aufwies und das EKG Auffälligkeiten der Repolarisation zeigte, ist es schwierig eine Korrelation zwischen den beiden Messungen zu finden. Dies ist auch nur bedingt möglich, da das EKG die Gesamtaktivität aller Kanal- und Ionenarten reflektiert, während der  $Ca^{2+}$ -Transient nur über das zelluläre  $Ca^{2+}$  Aufschluss gibt.

Eine weitere interessante Frage stellt sich, wenn man die echokardiographischen Daten in Zusammenhang mit den Messungen der Kontraktionskinetik auf Einzelzellebene betrachtet. Die echokardiographischen Untersuchungen wiesen keine Veränderung der Pumpfunktion des Herzens auf, während die Einzelzellanalysen auf eine Verbesserung der kontraktilen Funktion hindeuten. Diese Diskrepanz könnte methodisch bedingt sein. Während die Kardiomyozyten im Herzgewebe einer sympathischen Steuerung obliegen und ihre Kontraktion dem metabolischen Bedarf des Körpers anpassen, sind isolierte Kardiomyozyten von dieser Regulation unabhängig. Es wäre denkbar, dass die positiv inotrope Wirkung der KEPI-Überexpression erst unter den Bedingungen einer stärkeren  $\beta$ -adrenenergen Anforderung zutage treten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wären Experimente mit einer  $\beta$ -adrenenergen Stimulation (z.B. durch ISO) der Tiere von Relevanz.

#### **11.4 Identifizierung des KEPI-Orthologs im Zebrafisch und sein funktioneller Knock-down**

Der hohe Konservierungsgrad des humanen, murinen und Zebrafisch-KEPI-Proteins deutet auf eine essentielle Funktion von KEPI in diesen Organismen hin. Ebenso weist das konservierte Expressionsmuster der mRNA im zentralen Nervensystem und im Herzen auf KEPIs funktionelle Relevanz in diesen Organen hin.<sup>138</sup> Die Identifizierung des KEPI-Orthologs ermöglichte die Durchführung eines funktionellen Knock-downs des KEPI-Proteins im Zebrafisch. Der Knock-down führte zu einer eingeschränkten kardialen Leistung, die sich in einer verlangsamten Herzschlagrate, perikardialen Ödemen und einem beeinträchtigten Blutkreislauf äußerte. Diese Befunde stehen im Einklang mit der fördernden Rolle der KEPI-Überexpression für die Kontraktion in der Maus (10.6.3). Gemeinsam unterstützen diese Daten die Rolle von KEPI bei der Regulation der kardialen Funktion. Allerdings sind zahlreiche weitere Experimente notwendig um die Effekte des Knock-downs verifizieren zu können. So ist eine quantitative Überprüfung der reduzierten KEPI-Proteinexpression von fundamentaler Bedeutung. Des Weiteren sollte ein Knock-down des KEPI-Proteins mit Hilfe von anderen Morpholinos, die das Splicing der mRNA inhibieren, getestet werden. Dies würde Auskunft über die Spezifität des beobachteten Phänotyps liefern. In diesem Zusammenhang sind auch Rescue-Experimente, die den Knock-down mit eingeführter KEPI-mRNA aufheben würden, von hoher Relevanz.

Bislang wurden die Morphanden ausschliesslich auf ihren kardialen Phänotyp untersucht. Eine Analyse von KEPI im zentralen Nervensystem würde das Verständnis seiner funktionellen Rolle sicherlich ergänzen.

#### **11.5 Ausblick**

Neben den hier vorgestellten Daten zur Funktion von KEPI im Herzen sind zahlreiche weitere Analysen notwendig, um ein fundiertes Verständnis der Rolle dieses Proteins zu gewinnen. So ist es von essentieller Bedeutung zu untersuchen, inwiefern die KEPI-Überexpression die Gesamtaktivität der PP1

im Kardiomyozyten beeinflusst. Denkbar ist, dass KEPI nur mit ganz spezifischen Effektorproteinen von PP1 assoziiert ist und lokal ihren Phosphorylierungsstatus reguliert. Deshalb sollten der Phosphorylierungsgrad der wichtigsten PP1 Effektorproteinen wie PLB, Troponin I, RyR und PP1 selbst bestimmt werden. Um möglichst gezielt nach neuen Effektoren von KEPI zu suchen, sollte die subzelluläre Lokalisation von KEPI aufgeklärt werden. Die in der vorliegenden Studie beschriebene Interaktion von KEPI und Troponin I sollte um neue Bindungspartner ergänzt werden. Zur Bestätigung der alten und Identifizierung von neuen KEPI-Interaktionspartnern bieten sich Yeast-2-Hybrid Analysen sowie weitere Pulldown-Experimente als Methoden an.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine breite Grundlage für weiterführende Untersuchungen von KEPI geschaffen. Das KEPI-Antiserum wird zukünftig die biochemische und histologische Analyse von KEPI vereinfachen.

Auch das konditionelle Knockout-Mausmodell wird sicherlich wesentlich zum Verständnis der Rolle von KEPI in einem 4-Kammer-Herzen beitragen. Da KEPI in der dilatativen Kardiomyopathie herunterreguliert war, stellt die KO-Maus ein Modell dar, welches diese Situation nachahmt.

Um Aufschluss über die Signalwege und Effektorproteine, die von KEPI reguliert werden, zu bekommen, sollten Genchip-Analysen an KEPI-transgenen und -Knockout-Herzen durchgeführt.

Die umfassende Datenlage, die eine erhöhte PP1-Aktivität mit der Herzinsuffizienz korreliert, lässt auf eine Schlüsselrolle von PP1 bei ihrer Pathogenese schließen. Deshalb könnte eine pharmakologische Inhibition der PP1-Aktivität einen therapeutischen Ansatz für die Behandlung von Kardiomyopathien darstellen. Zukünftig bleibt es zu evaluieren, inwiefern KEPI für die therapeutische Intervention an PP1 geeignet ist. Die hier vorgestellte Studie trug zur Identifizierung und Charakterisierung von KEPI als eines potenziellen *Targets* bei.

## 12 Zusammenfassung II

Die Funktion des Herzmuskels wird durch ein feines Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von verschiedenen Effektorproteinen reguliert. Dazu gehören Phospholamban, Ryanodin Rezeptor, L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal und Troponin I. Während die Rolle der Kinasen bei der Herzkontraktion relativ gut erforscht ist, ist die Bedeutung der Phosphatasen und ihrer regulatorischen Proteine nur unzureichend charakterisiert. Dies ist die erste Studie, welche die kardiale Funktion von KEPI (Protein Kinase C enhanced protein phosphatase type 1 inhibitor) erläutert. KEPI ist ein kürzlich identifiziertes Protein, welches inhibitorisch auf die essentielle kardiale Phosphatase, die Protein Phosphatase1 (PP1), wirkt. In Gen-Chip-Analysen eines Mausmodells für dilatative Kardiomyopathie (ErbB2-KO) zeigte KEPI eine signifikante Herunterregulation. Mittels der in situ-Hybridisierung wurde die embryonale Expression von KEPI charakterisiert. Um Bindungspartner von diesem Protein zu ermitteln wurden Pull down-Experimente und Massenspektrometrie durchgeführt. Die funktionelle Rolle von KEPI wurde in einem Mausmodell mit herzspezifischer KEPI-Überexpression sowie im Zebrafisch mit einem KEPI-knock down ermittelt. Die KEPI-mRNA war am Tag 8.5 im Ausflusstrakt, am Tag 10.5 in den Ventrikeln und schließlich am Tag 14.5 im gesamten Herzen detektierbar. Mittels der Pull down-Experimente und Massspektrometrie wurde Troponin I als ein neuer Bindungspartner von KEPI identifiziert. Die KEPI-transgenen Mäuse zeigten in der Echokardiographie keine Veränderung der Kontraktilität im Basalzustand, wiesen aber Modifikationen des EKG nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation (verkürztes QT-Interval) auf. Darüber hinaus entwickelten isolierte KEPI-transgene Kardiomyozyten eine gesteigerte kontraktile Funktion sowie einen verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Interessanterweise führte der knock down von KEPI im Zebrafisch zu einer verlangsamten Herzschlagrate und deutlichen perikardialen Ödemen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass KEPI ein neues modulatorisches Protein im Herzmuskel ist. Seine Interaktion mit Troponin I lässt auf seine entscheidende Rolle bei der kontraktile Funktion schließen. Der Phänotyp der transgenen Maus sowie des

Zebrafisches deuten auf eine große physiologische Relevanz von KEPI hin. Weiterführende Experimente an Knockout und transgenen-KEPI Mäusen werden in der Zukunft bei der Aufklärung der Rolle im Herzen behilflich sein.

## **Abstract II**

Cardiac muscle function is regulated by a tight balance between phosphorylation and dephosphorylation of different regulatory phosphoproteins like phospholamban, the ryanodine receptor, L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel and troponin I. The role of protein kinases in cardiac contractility has been well characterized, whereas the importance of phosphatases and their regulatory proteins is poorly understood. This is the first study elucidating the cardiac function of KEPI (Protein Kinase C enhanced protein phosphatase type 1 inhibitor), which is a recently identified protein with inhibitory properties on the crucial cardiac phosphatase called PP1 (Protein Phosphatase 1). KEPI was significantly down regulated in murine hearts with dilated cardiomyopathy as detected by Gene-Chip-Arrays. Using in situ hybridization the embryonic expression of KEPI was characterized in the heart. To assay for binding partners of KEPI pull down experiments were performed. The functional significance of KEPI in the heart was analyzed in a mouse model with heart specific KEPI-overexpression as well in zebra fish using the morpholino knock down technology. KEPI mRNA was detected at day 8.5 pf in the heart outflow tract and spread out at day 10.5 to the ventricles and finally at day 14 to the whole heart. Using pull down experiments and mass spectrometry the binding of KEPI to Troponin I was identified. The KEPI-overexpressing mice did not show altered cardiac function as assayed by echocardiography, but developed changes in ECG after  $\beta$ -adrenergic stimulation (shorter QT interval). Moreover, single isolated KEPI-transgenic cardiomyocytes displayed an increased contractile function and an enhanced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -transient. Interestingly, the knock down of KEPI in zebra fish led to a lower heart rate as well as pronounced edema in the heart region in morphants compared to wild type fish. Taken together, KEPI is a novel protein with modulatory function in cardiac muscle. Its association with troponin I suggests a crucial importance in cardiac contractile function. The observed phenotype in mouse and fish

indicates a large physiological significance of this protein. The ongoing experiments including knockout and transgenic mouse models will help to clarify the role of KEPI in the heart.

### 13 Literaturverzeichnis

1. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation*. Dec 10 2002;106(24):3068-3072.
2. Dominguez LJ, Parrinello G, Amato P, Licata G. Trends of congestive heart failure epidemiology: contrast with clinical trial results. *Cardiologia (Rome, Italy)*. Sep 1999;44(9):801-808.
3. Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch*. Vol 260. Auflage; 2004.
4. Herder. Lexikon der Biologie. *Lexikon der Biologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag; 1994.
5. J. Weil HS. *Clin Res Cardiol; Suppl 4*. Vol 95:1-17; 2006.
6. Klinke R. SS. Lehrbuch der Physiologie (4. Auflage). *Thieme Verlag*. 2003.
7. Klabunde R. *Cardiovascular Physiology Concepts*.
8. Jane-Lise S, Corda S, Chassagne C, Rappaport L. The extracellular matrix and the cytoskeleton in heart hypertrophy and failure. *Heart failure reviews*. Oct 2000;5(3):239-250.
9. Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Current opinion in cardiology*. Jul 2000;15(4):264-272.
10. Miner EC, Miller WL. A look between the cardiomyocytes: the extracellular matrix in heart failure. *Mayo Clinic proceedings*. Jan 2006;81(1):71-76.
11. Samuel JL, Bertier B, Bugaisky L, Marotte F, Swynghedauw B, Schwartz K, Rappaport L. Different distributions of microtubules, desmin filaments and isomyosins during the onset of cardiac hypertrophy in the rat. *European journal of cell biology*. Jul 1984;34(2):300-306.
12. Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. Feb 1991;83(2):504-514.
13. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. Jun 1991;83(6):1849-1865.
14. Farhadian F, Contard F, Corbier A, Barrieux A, Rappaport L, Samuel JL. Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Apr 1995;27(4):981-990.
15. Kane CJ, Hebda PA, Mansbridge JN, Hanawalt PC. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing. *Journal of cellular physiology*. Jul 1991;148(1):157-173.
16. LeRoy EC, Trojanowska MI, Smith EA. Cytokines and human fibrosis. *European cytokine network*. Oct-Nov 1990;1(4):215-219.
17. Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet*. Jan 3 2004;363(9402):62-64.
18. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac

- myocytes: a potential role in heart fibrosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Oct 2000;32(10):1805-1819.
19. Finckenberg P, Lassila M, Inkinen K, Pere AK, Krogerus L, Lindgren L, Mervaala E, Vapaatalo H, Nurminen ML, Ahonen J. Cyclosporine induces myocardial connective tissue growth factor in spontaneously hypertensive rats on high-sodium diet. *Transplantation*. Apr 15 2001;71(7):951-958.
  20. Oemar BS, Werner A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauck M, Marz W, Rupp J, Pech M, Luscher TF. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation*. Feb 18 1997;95(4):831-839.
  21. Ruperez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation*. Sep 23 2003;108(12):1499-1505.
  22. Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS letters*. Jul 26 1993;327(2):125-130.
  23. Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential extracellular signaling modulators emerge from the bunker. *Journal of cell science*. Dec 1 2006;119(Pt 23):4803-4810.
  24. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *The Journal of cell biology*. Sep 1991;114(6):1285-1294.
  25. Ryseck RP, Macdonald-Bravo H, Mattei MG, Bravo R. Structure, mapping, and expression of fisp-12, a growth factor-inducible gene encoding a secreted cysteine-rich protein. *Cell Growth Differ*. May 1991;2(5):225-233.
  26. Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocrine reviews*. Apr 1999;20(2):189-206.
  27. Rachfal AW, Brigstock DR. Structural and functional properties of CCN proteins. *Vitamins and hormones*. 2005;70:69-103.
  28. Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT, Jr., Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Nov 25 1997;94(24):12981-12986.
  29. Burren CP, Wilson EM, Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. Binding properties and distribution of insulin-like growth factor binding protein-related protein 3 (IGFBP-rP3/NovH), an additional member of the IGFBP Superfamily. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. Mar 1999;84(3):1096-1103.
  30. Holt GD, Pangburn MK, Ginsburg V. Properdin binds to sulfatide [Gal(3-SO<sub>4</sub>)beta 1-1 Cer] and has a sequence homology with other proteins that bind sulfated glycoconjugates. *The Journal of biological chemistry*. Feb 15 1990;265(5):2852-2855.

31. Gao R, Brigstock DR. Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a heparin-dependent adhesion receptor for connective tissue growth factor (CTGF) in rat activated hepatic stellate cells. *Hepatol Res.* Nov 2003;27(3):214-220.
32. Ball DK, Surveyor GA, Diehl JR, Steffen CL, Uzumcu M, Mirando MA, Brigstock DR. Characterization of 16- to 20-kilodalton (kDa) connective tissue growth factors (CTGFs) and demonstration of proteolytic activity for 38-kDa CTGF in pig uterine luminal flushings. *Biology of reproduction.* Oct 1998;59(4):828-835.
33. Surveyor GA, Brigstock DR. Immunohistochemical localization of connective tissue growth factor (CTGF) in the mouse embryo between days 7.5 and 14.5 of gestation. *Growth factors (Chur, Switzerland).* 1999;17(2):115-124.
34. Brigstock DR, Steffen CL, Kim GY, Vegunta RK, Diehl JR, Harding PA. Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor. *The Journal of biological chemistry.* Aug 8 1997;272(32):20275-20282.
35. Ball DK, Rachfal AW, Kemper SA, Brigstock DR. The heparin-binding 10 kDa fragment of connective tissue growth factor (CTGF) containing module 4 alone stimulates cell adhesion. *The Journal of endocrinology.* Feb 2003;176(2):R1-7.
36. Schober JM, Lau LF, Ugarova TP, Lam SC. Identification of a novel integrin alphaMbeta2 binding site in CCN1 (CYR61), a matricellular protein expressed in healing wounds and atherosclerotic lesions. *The Journal of biological chemistry.* Jul 11 2003;278(28):25808-25815.
37. Matsui Y, Sadoshima J. Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: implication for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology.* Aug 2004;37(2):477-481.
38. Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *The Journal of biological chemistry.* May 19 2000;275(20):15220-15225.
39. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *Faseb J.* Oct 1999;13(13):1774-1786.
40. Fu M, Zhang J, Zhu X, Myles DE, Willson TM, Liu X, Chen YE. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3. *The Journal of biological chemistry.* Dec 7 2001;276(49):45888-45894.
41. Way KJ, Isshiki K, Suzuma K, Yokota T, Zvagelsky D, Schoen FJ, Sandusky GE, Pechous PA, Vlahos CJ, Wakasaki H, King GL. Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase C beta2 activation and diabetes. *Diabetes.* Sep 2002;51(9):2709-2718.

42. Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Experimental cell research*. Apr 10 1999;248(1):44-57.
43. Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA. Integrins, cations and ligands: making the connection. *J Thromb Haemost*. Jul 2003;1(7):1642-1654.
44. Yamada KM, Pankov R, Cukierman E. Dimensions and dynamics in integrin function. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.* Aug 2003;36(8):959-966.
45. Babic AM, Chen CC, Lau LF. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Molecular and cellular biology*. Apr 1999;19(4):2958-2966.
46. Jedsadayamata A, Chen CC, Kireeva ML, Lau LF, Lam SC. Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). *The Journal of biological chemistry*. Aug 20 1999;274(34):24321-24327.
47. Schober JM, Chen N, Grzeszkiewicz TM, Jovanovic I, Emeson EE, Ugarova TP, Ye RD, Lau LF, Lam SC. Identification of integrin alpha(M)beta(2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. *Blood*. Jun 15 2002;99(12):4457-4465.
48. Nishida T, Kubota S, Fukunaga T, Kondo S, Yosimichi G, Nakanishi T, Takano-Yamamoto T, Takigawa M. CTGF/Hcs24, hypertrophic chondrocyte-specific gene product, interacts with perlecan in regulating the proliferation and differentiation of chondrocytes. *Journal of cellular physiology*. Aug 2003;196(2):265-275.
49. Segarini PR, Nesbitt JE, Li D, Hays LG, Yates JR, 3rd, Carmichael DF. The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor. *The Journal of biological chemistry*. Nov 2 2001;276(44):40659-40667.
50. Chen Y, Segarini P, Raoufi F, Bradham D, Leask A. Connective tissue growth factor is secreted through the Golgi and is degraded in the endosome. *Experimental cell research*. Nov 15 2001;271(1):109-117.
51. Mercurio S, Latinkic B, Itasaki N, Krumlauf R, Smith JC. Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex. *Development (Cambridge, England)*. May 2004;131(9):2137-2147.
52. Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine & growth factor reviews*. Sep 1997;8(3):171-179.
53. Leask A, Denton CP, Abraham DJ. Insights into the molecular mechanism of chronic fibrosis: the role of connective tissue growth factor in scleroderma. *The Journal of investigative dermatology*. Jan 2004;122(1):1-6.

54. Moussad EE, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Molecular genetics and metabolism*. Sep-Oct 2000;71(1-2):276-292.
55. Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ*. Apr 1996;7(4):469-480.
56. Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *The Journal of biological chemistry*. Apr 6 2001;276(14):10594-10601.
57. Leask A, Sa S, Holmes A, Shiwen X, Black CM, Abraham DJ. The control of *ccn2* (*ctgf*) gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *Mol Pathol*. Jun 2001;54(3):180-183.
58. Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ. Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. Apr 11 2003;278(15):13008-13015.
59. Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Current opinion in rheumatology*. Nov 2002;14(6):681-685.
60. Leask A, Holmes A, Abraham DJ. Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Current rheumatology reports*. Apr 2002;4(2):136-142.
61. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *Journal of cellular physiology*. Oct 1999;181(1):153-159.
62. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nature cell biology*. Aug 2002;4(8):599-604.
63. Wahab NA, Weston BS, Mason RM. Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Experimental cell research*. Jul 15 2005;307(2):305-314.
64. Li JH, Zhu HJ, Huang XR, Lai KN, Johnson RJ, Lan HY. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation. *J Am Soc Nephrol*. Jun 2002;13(6):1464-1472.
65. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Molecular cell*. Dec 2000;6(6):1365-1375.
66. Ohnishi H, Oka T, Kusachi S, Nakanishi T, Takeda K, Nakahama M, Doi M, Murakami T, Ninomiya Y, Takigawa M, Tsuji T. Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Nov 1998;30(11):2411-2422.
67. Chuva de Sousa Lopes SM, Feijen A, Korving J, Korchymskyi O, Larsson J, Karlsson S, ten Dijke P, Lyons KM, Goldschmeding R, Doevendans P, Mummery CL. Connective tissue growth factor

- expression and Smad signaling during mouse heart development and myocardial infarction. *Dev Dyn*. Nov 2004;231(3):542-550.
68. Candido R, Jandeleit-Dahm KA, Cao Z, Nesteroff SP, Burns WC, Twigg SM, Dilley RJ, Cooper ME, Allen TJ. Prevention of accelerated atherosclerosis by angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. Jul 9 2002;106(2):246-253.
69. Chen H, Huang XN, Stewart AF, Sepulveda JL. Gene expression changes associated with fibronectin-induced cardiac myocyte hypertrophy. *Physiological genomics*. Aug 11 2004;18(3):273-283.
70. Koitabashi N, Arai M, Kogure S, Niwano K, Watanabe A, Aoki Y, Maeno T, Nishida T, Kubota S, Takigawa M, Kurabayashi M. Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis. *Hypertension*. May 2007;49(5):1120-1127.
71. Kemp TJ, Aggeli IK, Sugden PH, Clerk A. Phenylephrine and endothelin-1 upregulate connective tissue growth factor in neonatal rat cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Aug 2004;37(2):603-606.
72. Abdel-Wahab N, Weston BS, Roberts T, Mason RM. Connective tissue growth factor and regulation of the mesangial cell cycle: role in cellular hypertrophy. *J Am Soc Nephrol*. Oct 2002;13(10):2437-2445.
73. Moritani NH, Kubota S, Eguchi T, Fukunaga T, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T, Tahara H, Ohyama K, Sugahara T, Takigawa M. Interaction of AP-1 and the ctgf gene: a possible driver of chondrocyte hypertrophy in growth cartilage. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2003;21(4):205-210.
74. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development (Cambridge, England)*. Jun 2003;130(12):2779-2791.
75. Denton CP BC, Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. . 2006;2(3):1(Mar):34-44.
76. Tan FK. Systemic sclerosis: the susceptible host (genetics and environment). *Rheumatic diseases clinics of North America*. May 2003;29(2):211-237.
77. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A, McCalmont TH, Brown PO, Botstein D, Connolly MK. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Oct 14 2003;100(21):12319-12324.
78. Gardner H, Shearstone JR, Bandaru R, Crowell T, Lynes M, Trojanowska M, Pannu J, Smith E, Jablonska S, Blaszczyk M, Tan FK, Mayes MD. Gene profiling of scleroderma skin reveals robust signatures of disease that are imperfectly reflected in the transcript profiles of explanted fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. Jun 2006;54(6):1961-1973.
79. Zhou X, Tan FK, Wang N, Xiong M, Maghidman S, Reveille JD, Milewicz DM, Chakraborty R, Arnett FC. Genome-wide association study for regions of systemic sclerosis susceptibility in a Choctaw

- Indian population with high disease prevalence. *Arthritis and rheumatism*. Sep 2003;48(9):2585-2592.
80. Fonseca C, Lindahl GE, Ponticos M, Sestini P, Renzoni EA, Holmes AM, Spagnolo P, Pantelidis P, Leoni P, McHugh N, Stock CJ, Shi-Wen X, Denton CP, Black CM, Welsh KI, du Bois RM, Abraham DJ. A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *The New England journal of medicine*. Sep 20 2007;357(12):1210-1220.
81. Holmes A, Abraham DJ, Chen Y, Denton C, Shi-wen X, Black CM, Leask A. Constitutive connective tissue growth factor expression in scleroderma fibroblasts is dependent on Sp1. *The Journal of biological chemistry*. Oct 24 2003;278(43):41728-41733.
82. Huang CJ, Tu C.T., Hsiao C.D., Tsai H.J. Germ-line transmission of a myocardium-specific GFP transgene reveals critical regulatory elements in the cardiac myosin light chain 2 promoter of zebrafish. *Dev Dyn*. 2003;228 (1)(Sept.):103-112.
83. Grupp IL, Subramaniam A, Hewett TE, Robbins J, Grupp G. Comparison of normal, hypodynamic, and hyperdynamic mouse hearts using isolated work-performing heart preparations. *The American journal of physiology*. Oct 1993;265(4 Pt 2):H1401-1410.
84. Ozcelik C, Erdmann B, Pilz B, Wettschureck N, Britsch S, Hubner N, Chien KR, Birchmeier C, Garratt AN. Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jun 25 2002;99(13):8880-8885.
85. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*. Jan 1 1995;91(1):161-170.
86. Kang N, Walther T, Tian XL, Bohlender J, Fukamizu A, Ganten D, Bader M. Reduced hypertension-induced end-organ damage in mice lacking cardiac and renal angiotensinogen synthesis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. Jun 2002;80(6):359-366.
87. Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR. Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney international*. Oct 2000;58(4):1389-1399.
88. Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, Hoyle GW, Corti M, Athas G, Lungarella G, Brody A, Friedman M. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *The American journal of physiology*. Aug 1998;275(2 Pt 1):L365-371.
89. Hayashi N, Kakimura T, Soma Y, Grotendorst GR, Tamaki K, Harada M, Igarashi A. Connective tissue growth factor is directly related to liver fibrosis. *Hepato-gastroenterology*. Jan-Feb 2002;49(43):133-135.
90. Yokoi H, Mukoyama M, Mori K, Kasahara M, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Sugawara A, Nakao K. Overexpression of connective tissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice. *Kidney international*. Feb 2008;73(4):446-455.

91. Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circulation research*. Dec 13 2002;91(12):1103-1113.
92. Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, Imaizumi T. Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. *Hypertens Res*. Jun 2005;28(6):483-490.
93. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Molecular biology of the cell*. Jun 1993;4(6):637-645.
94. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *The Journal of investigative dermatology*. Sep 1996;107(3):404-411.
95. Uzel MI, Kantarci A, Hong HH, Uygur C, Sheff MC, Firatli E, Trackman PC. Connective tissue growth factor in drug-induced gingival overgrowth. *Journal of periodontology*. Jul 2001;72(7):921-931.
96. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. Apr 4 1996;380(6573):439-442.
97. Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, Enomoto H, Nakamura H, Makino K, Ikeda E, Takata S, Kobayashi K, Okada Y. Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *Faseb J*. Feb 2002;16(2):219-221.
98. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. Jan 10 2002;415(6868):198-205.
99. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature medicine*. Aug 2007;13(8):952-961.
100. Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circulation research*. Jun 8 2001;88(11):1159-1167.
101. Cohn JN, Bristow MR, Chien KR, Colucci WS, Frazier OH, Leinwand LA, Lorell BH, Moss AJ, Sonnenblick EH, Walsh RA, Mockrin SC, Reinlib L. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Special Emphasis Panel on Heart Failure Research. *Circulation*. Feb 18 1997;95(4):766-770.
102. Bers DM. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac contractile force. *Kluwer Academic*. 2001.
103. Sandow A. Excitation-contraction coupling in muscular response. *The Yale journal of biology and medicine*. Dec 1952;25(3):176-201.
104. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *The Journal of physiology*. Apr 15 1994;476(2):279-293.

105. Hove-Madsen L, Bers DM. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake and thapsigargin sensitivity in permeabilized rabbit and rat ventricular myocytes. *Circulation research*. Nov 1993;73(5):820-828.
106. Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *The American journal of physiology*. Apr 1998;274(4 Pt 2):H1335-1347.
107. Brittsan AG, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractile function. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Dec 2000;32(12):2131-2139.
108. Fruen BR, Bardy JM, Byrem TM, Strasburg GM, Louis CF. Differential Ca(2+) sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin. *American journal of physiology*. Sep 2000;279(3):C724-733.
109. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. May 12 2000;101(4):365-376.
110. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, Rosemblyt N, Marks AR. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *The Journal of cell biology*. May 14 2001;153(4):699-708.
111. Meyers MB, Fischer A, Sun YJ, Lopes CM, Rohacs T, Nakamura TY, Zhou YY, Lee PC, Altschuld RA, McCune SA, Coetzee WA, Fishman GI. Sorcin regulates excitation-contraction coupling in the heart. *The Journal of biological chemistry*. Aug 1 2003;278(31):28865-28871.
112. Meyers MB, Puri TS, Chien AJ, Gao T, Hsu PH, Hosey MM, Fishman GI. Sorcin associates with the pore-forming subunit of voltage-dependent L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *The Journal of biological chemistry*. Jul 24 1998;273(30):18930-18935.
113. Sham JS, Song LS, Chen Y, Deng LH, Stern MD, Lakatta EG, Cheng H. Termination of Ca<sup>2+</sup> release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Dec 8 1998;95(25):15096-15101.
114. Fabiato A. Rapid ionic modifications during the aequorin-detected calcium transient in a skinned canine cardiac Purkinje cell. *The Journal of general physiology*. Feb 1985;85(2):189-246.
115. Schiefer A, Meissner G, Isenberg G. Ca<sup>2+</sup> activation and Ca<sup>2+</sup> inactivation of canine reconstituted cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channels. *The Journal of physiology*. Dec 1 1995;489 (Pt 2):337-348.
116. Sitsapesan R, Montgomery RA, Williams AJ. New insights into the gating mechanisms of cardiac ryanodine receptors revealed by rapid changes in ligand concentration. *Circulation research*. Oct 1995;77(4):765-772.
117. Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ. Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg<sup>2+</sup> and phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*. Mar 31 1995;267(5206):1997-2000.

118. Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Aug 2004;37(2):417-429.
119. Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW. A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.2. *Science (New York, N.Y.)*. Jul 6 2001;293(5527):98-101.
120. Bers DM, Ziolo MT. When is cAMP not cAMP? Effects of compartmentalization. *Circulation research*. Aug 31 2001;89(5):373-375.
121. Doonan JH, MacKintosh C, Osmani S, Cohen P, Bai G, Lee EY, Morris NR. A cDNA encoding rabbit muscle protein phosphatase 1 alpha complements the *Aspergillus* cell cycle mutation, bimG11. *The Journal of biological chemistry*. Oct 5 1991;266(28):18889-18894.
122. Sangrador A, Andres I, Eguiraun A, Lorenzo ML, Ortiz JM. Growth arrest of *Schizosaccharomyces pombe* following overexpression of mouse type 1 protein phosphatases. *Mol Gen Genet*. Sep 1998;259(5):449-456.
123. Ceulemans H, Bollen M. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev*. Jan 2004;84(1):1-39.
124. Wakula P, Beullens M, van Eynde A, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M. The translation initiation factor eIF2beta is an interactor of protein phosphatase-1. *Biochem J*. Dec 1 2006;400(2):377-383.
125. Connor JH, Weiser DC, Li S, Hallenbeck JM, Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol*. Oct 2001;21(20):6841-6850.
126. DePaoli-Roach AA, Park IK, Cerovsky V, Csontos C, Durbin SD, Kuntz MJ, Sitikov A, Tang PM, Verin A, Zolnierowicz S. Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Advances in enzyme regulation*. 1994;34:199-224.
127. Hubbard MJ, Cohen P. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends in biochemical sciences*. May 1993;18(5):172-177.
128. Suzuki Y, Lanner C, Kim JH, Vilardo PG, Zhang H, Yang J, Cooper LD, Steele M, Kennedy A, Bock CB, Scrimgeour A, Lawrence JC, Jr., DePaoli-Roach AA. Insulin control of glycogen metabolism in knockout mice lacking the muscle-specific protein phosphatase PP1G/RGL. *Molecular and cellular biology*. Apr 2001;21(8):2683-2694.
129. Tang PM, Bondor JA, Swiderek KM, DePaoli-Roach AA. Molecular cloning and expression of the regulatory (RG1) subunit of the glycogen-associated protein phosphatase. *The Journal of biological chemistry*. Aug 25 1991;266(24):15782-15789.
130. Hubbard MJ, Dent P, Smythe C, Cohen P. Targetting of protein phosphatase 1 to the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle by a protein that is very similar or identical to the G subunit that directs the enzyme to glycogen. *European journal of biochemistry / FEBS*. Apr 30 1990;189(2):243-249.

131. Huang FL, Glinsmann WH. Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *European journal of biochemistry / FEBS*. Nov 15 1976;70(2):419-426.
132. Ahmad Z, Green FJ, Subuhi HS, Watanabe AM. Autonomic regulation of type 1 protein phosphatase in cardiac muscle. *The Journal of biological chemistry*. Mar 5 1989;264(7):3859-3863.
133. Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing SL, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoli-Roach AA, Kranias EG. Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol*. Jun 2002;22(12):4124-4135.
134. Kirchhefer U, Baba HA, Boknik P, Breeden KM, Mavila N, Bruchert N, Justus I, Matus M, Schmitz W, Depaoli-Roach AA, Neumann J. Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2. *Cardiovascular research*. Oct 1 2005;68(1):98-108.
135. Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. Jan 1997;29(1):265-272.
136. El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T. Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res*. Jan 1 2004;61(1):87-93.
137. El-Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T, Carrier L, Knaut M, Ravens U, Dobrev D. Molecular determinants of altered Ca<sup>2+</sup> handling in human chronic atrial fibrillation. *Circulation*. Aug 15 2006;114(7):670-680.
138. Liu QR, Zhang PW, Zhen Q, Walther D, Wang XB, Uhl GR. KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine. *The Journal of biological chemistry*. Apr 12 2002;277(15):13312-13320.
139. Erdodi F, Kiss E, Walsh MP, Stefansson B, Deng JT, Eto M, Brautigam DL, Hartshorne DJ. Phosphorylation of protein phosphatase type-1 inhibitory proteins by integrin-linked kinase and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochemical and biophysical research communications*. Jun 27 2003;306(2):382-387.
140. Wenzel K, Daskalow K, Herse F, Seitz S, Zacharias U, Schenk JA, Schulz H, Hubner N, Micheel B, Schlag PM, Osterziel KJ, Ozcelik C, Scherneck S, Jandrig B. Expression of the protein phosphatase 1 inhibitor KEPI is downregulated in breast cancer cell lines and tissues and involved in the regulation of the tumor suppressor EGR1 via the MEK-ERK pathway. *Biological chemistry*. May 2007;388(5):489-495.
141. Caselli R, Mencarelli MA, Papa FT, Uliana V, Schiavone S, Strambi M, Pescucci C, Ariani F, Rossi V, Longo I, Meloni I, Renieri A, Mari F. A 2.6 Mb deletion of 6q24.3-25.1 in a patient with growth failure, cardiac septal defect, thin upperlip and asymmetric dysmorphic ears. *European journal of medical genetics*. Jul-Aug 2007;50(4):315-321.
142. Braunwald E. Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. 1997;Fifth Edition, :p. 108.

143. Royer A, van Veen TA, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbili V, Leoni AL, Steenman M, van Rijen HV, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JM, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenegre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation*. Apr 12 2005;111(14):1738-1746.
144. Bazett H. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* . . 1920;7(353-70).
145. Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho RK, Langeland J, Prince V, Wang YL, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait JH. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science (New York, N.Y.)* Nov 27 1998;282(5394):1711-1714.
146. Wenzel K, Geier C, Qadri F, Hubner N, Schulz H, Erdmann B, Gross V, Bauer D, Dechend R, Dietz R, Osterziel KJ, Spuler S, Özcelik C. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *J Mol Med*. 2007;(in press).
147. Venema RC, Kuo JF. Protein kinase C-mediated phosphorylation of troponin I and C-protein in isolated myocardial cells is associated with inhibition of myofibrillar actomyosin MgATPase. *The Journal of biological chemistry*. Feb 5 1993;268(4):2705-2711.
148. Noland TA, Jr., Kuo JF. Protein kinase C phosphorylation of cardiac troponin I or troponin T inhibits Ca<sup>2+</sup>-stimulated actomyosin MgATPase activity. *The Journal of biological chemistry*. Mar 15 1991;266(8):4974-4978.
149. Noland TA, Jr., Kuo JF. Protein kinase C phosphorylation of cardiac troponin I and troponin T inhibits Ca<sup>2+</sup>-stimulated MgATPase activity in reconstituted actomyosin and isolated myofibrils, and decreases actin-myosin interactions. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Jan 1993;25(1):53-65.
150. Noland TA, Jr., Kuo JF. Protein kinase C phosphorylation of cardiac troponin T decreases Ca<sup>2+</sup>-dependent actomyosin MgATPase activity and troponin T binding to tropomyosin-F-actin complex. *The Biochemical journal*. Nov 15 1992;288 ( Pt 1):123-129.
151. Jideama NM, Crawford BH, Hussain AK, Raynor RL. Dephosphorylation specificities of protein phosphatase for cardiac troponin I, troponin T, and sites within troponin T. *International journal of biological sciences*. 2006;2(1):1-9.
152. Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circulation research*. Oct 1997;81(4):512-525.
153. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovascular research*. Oct 1999;44(1):121-131.
154. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca<sup>2+</sup> currents and human atrial fibrillation. *Circulation research*. Sep 3 1999;85(5):428-436.
155. Bosch RF, Scherer CR, Rub N, Wohrl S, Steinmeyer K, Haase H, Busch AE, Seipel L, Kuhlkamp V. Molecular mechanisms of early electrical remodeling: transcriptional downregulation of ion channel subunits reduces I(Ca,L) and I(to) in rapid atrial pacing in rabbits.

- Journal of the American College of Cardiology*. Mar 5 2003;41(5):858-869.
- 156.** Christ T, Boknik P, Wohrl S, Wettwer E, Graf EM, Bosch RF, Knaut M, Schmitz W, Ravens U, Dobrev D. L-type Ca<sup>2+</sup> current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation*. Oct 26 2004;110(17):2651-2657.
- 157.** Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nature genetics*. Sep 1999;23(1):20-21.
- 158.** Schimpf R, Wolpert C, Gaita F, Giustetto C, Borggrefe M. Short QT syndrome. *Cardiovascular research*. Aug 15 2005;67(3):357-366.
- 159.** Gussak I, Brugada P, Brugada J, Wright RS, Kopecky SL, Chaitman BR, Bjerregaard P. Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology*. 2000;94(2):99-102.
- 160.** Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Wolpert C, Schimpf R, Riccardi R, Grossi S, Richiardi E, Borggrefe M. Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation*. Aug 26 2003;108(8):965-970.
- 161.** Brugada R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggrefe M, Menendez TM, Brugada J, Pollevick GD, Wolpert C, Burashnikov E, Matsuo K, Wu YS, Guerchicoff A, Bianchi F, Giustetto C, Schimpf R, Brugada P, Antzelevitch C. Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation*. Jan 6 2004;109(1):30-35.
- 162.** Neumann J, Maas R, Boknik P, Jones LR, Zimmermann N, Scholz H. Pharmacological characterization of protein phosphatase activities in preparations from failing human hearts. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. Apr 1999;289(1):188-193.
- 163.** El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh YH, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T, Carrier L. Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Aug 2007;43(2):223-229.
- 164.** El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jackel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J, Eschenhagen T. Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *Faseb J*. Mar 2003;17(3):437-439.

## 14 Abkürzungsverzeichnis

<b>Akronym</b>	<b>Bedeutung</b>
Ang II	Angiotensin II
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
C57Bl/6	Ein Mausinzuchtstamm
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	<i>desoxyribonuclease</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dP/dt <sub>max</sub>	Kontraktilität des linken Ventrikels
dP/dt <sub>min</sub>	Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels
ECL	Electrogenerated chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HEK293	<i>human embryonic kidney cell line</i>
HR	Herzrate
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
ICP <sub>dia</sub>	<i>intra cardiac pressure in diastole</i>
ICP <sub>sys</sub>	<i>intra cardiac pressure in systole</i>
ISO	Isoprottereol
IVS <sub>dia</sub>	<i>intra ventricular septum in diastole</i>
IVS <sub>sys</sub>	<i>intra ventricular septum in systole</i>
KEPI	<i>PKC-enhanced Protein-Phosphatase 1 Inhibitor</i>
KO	<i>knockout</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LVESP	<i>left ventricular end systolic pressure</i>
LVPW <sub>dia</sub>	<i>left venricular psterior wall in diastole</i>
LVPW <sub>sys</sub>	<i>left venricular psterior wall in systole</i>

mRNA	<i>messenger-RNA</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	<i>ribonuclease</i>
RPA	<i>ribonuclease protection assay</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamid
TG	transgen
UV	ultraviolett
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
Y <sup>-</sup>	yeast positive control
Y <sup>+</sup>	yeast negative control

## 15 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Mentoren Dr. C. Özcelik und Prof. Dr. M. Bader für eine hervorragende fachliche Betreuung. Dank ihrer konstruktiven Kritik, ihrer Anregungen und ihrer aufbauenden Persönlichkeiten war die Anfertigung dieser Arbeit erst möglich.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. U. Heinemann für die Betreuung meiner Arbeit an der Freien Universität Berlin bedanken.

Für die exzellente technische Assistenz und die Betreuung der Versuchstiere bedanke ich mich herzlich bei Tanja Schalow, Sabine Grüger, Astrid Schiche, Jutta Meisel, Susanne Wollenzin und Arianne Giese.

Prof. Dr. I. Morano und W.P. Schlegel danke ich für die sehr angenehme und konstruktive Kooperationsarbeit.

Eine große Hilfe bei wissenschaftlichen Fragestellungen waren für mich Dr. T. Reimer, Dr. K. Tenner und Dr. H. Wende.

Für ein stets offenes Ohr und eine großartige freundschaftliche Begleitung in der Doktorandenzeit danke ich meiner Freundin Katrin Moser.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Norbert gilt mein allergrößter Dank. Ihr habt mich auf all meinen Schritten bis hierher stets liebevoll unterstützt und motiviert.

## 16 Stipendien, Kongressbeiträge, Publikationen

### Stipendien

- 1.06.2005- 1.06.2007 Promotionsstipendium des Max-Delbrück-Centrums für molekulare Medizin;
- 01.09.99- 30.03.2000 ERASMUS-Stipendium;

### Publikationen

Panek AN, Bader M.; Matrix reloaded: the matrix metallo-proteinase paradox. Hypertension 2006 Apr;47(4):640-1

Özcelik C, Bit-Avragim N, Panek A, Gaio U, Geier C, Lange PE, Dietz R, Posch MG, Perrot A, Stiller B.; Mutations in the EGF-CFC gene cryptic are an infrequent cause of congenital heart disease. Pediatr Cardiol. 2006 Nov-Dec;27(6):695-8

### Kongressbeiträge

#### Poster

Panek AN, Bader M., Dietz R., Özcelik C.; Rolle von Kinase enhanced Phosphatase Inhibitor (KEPI) bei der Entwicklung und Funktion des Herzens; 72. Jahrestagung der deutschen Kardiologie Gesellschaft 2006, Mannheim

Panek AN, Bader M., Özcelik C.: Rolle von Kinase enhanced Phosphatase Inhibitor (KEPI) bei der Entwicklung und Funktion des Herzens; 73. Jahrestagung der deutschen Kardiologie Gesellschaft 2007, Mannheim

Panek AN, Bader M., Özcelik C.; Impact of KEPI on cardiac function and development; Keystone Symposia 2007, Breckenridge, Colorado, USA

Panek AN, Bader M., Morano I., Özcelik C.; Impact of KEPI on cardiac function and development; Keystone Symposia 2008 Copper Mountain, Colorado, USA

Panek AN, Bader M., Morano I., Özcelik C.; Impact of KEPI on cardiac function and development; Wintermeeting of the European heart failure Association 2008, Garmisch Partenkirchen

#### Vortrag

Panek AN, Bader M., Morano I., Özcelik C.; Neue kardioprotektive Rolle von Connective tissue growth factor (CTGF) im Angiotensin II

induzierten Hypertrophiemodell; 74. Jahrestagung der deutschen Kardiologie Gesellschaft 2008, Mannheim

## **17 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die genutzte Hilfe und die verwendeten Hilfsmittel und Quellen habe ich vollständig angegeben. Abbildungen, die anderen Quellen unverändert entnommen oder diesen entlehnt wurden, sind mit der Quellenangabe gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich mich nicht anderwärtig um einen Doktorgrad beworben habe oder einen entsprechenden Doktorgrad besitze. Diese Dissertation habe ich bei keinem anderen Fachbereich oder keiner anderen Universität vorgelegt. Die Bestimmungen der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin sind mir bekannt.

Berlin, April, 2008