

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums
Halle (Saale)
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. S. Frantz)

**Auswirkungen der transgenen Überexpression der
Phosphoprotein Phosphatase 2A im chronischen
Myokardinfarktmodell der Maus**

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

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

von Maximilian Höhn
geboren am 09. November 1982 in Karl-Marx-Stadt
Betreuer: Prof. Dr. med. habil. H. Ebelt

Gutachter:

Prof. Dr. med. habil. Henning Ebelt

Prof. Dr. med. habil. Joachim Neumann

PD Dr. Dr. Peter Boknik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

16.02.2016

12.09.2016

I. Referat

Herz-Kreislaufkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland. Eine erhöhte Aktivität der Proteinphosphatasen 1 und 2A wurde im Myokard von Patienten mit Herzversagen nachgewiesen. Hieraus ergibt sich die hohe Relevanz dieser Forschungsarbeit an transgenen Mäusen aus der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die in dieser Dissertation dargelegten Forschungsergebnisse zu den Auswirkungen der Überexpression der Phosphoprotein-Phosphatase 2A (PP2A) im chronischen Myokardinfarktmodell der Maus ergänzen das Wissen über die Pathomechanismen des chronischen Myokardinfarkts. Männliche CD-1 Mäuse, welche eine Überexpression der katalytischen Untereinheit von PP2A (α MHC-PP2A; TG) aufweisen, wurden einer LAD-Ligatur oder einer Schein-Operation unterzogen. Als Kontrollgruppe dienen Wildtyp-Mäuse (WT). Daten hinsichtlich der 28 Tage-Überlebensrate nach Myokardinfarkt sowie funktionelle Parameter zur Beurteilung der kardialen Funktion per Echokardiographie wurden erfasst und ausgewertet. 28 Tage nach Myokardinfarkt wurde das kardiale Remodeling in histologischen und biochemischen Untersuchungen (per Western Blot) quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass eine PP2A-Überexpression zur dilatativen Kardiomyopathie mit gesteigerter Hypertrophie der Kardiomyozyten und Fibrose nach Myokardinfarkt führt. In der subakuten Infarktphase wurde nachgewiesen, dass die transgenen Mäuse gegenüber den Wildtypen häufiger überlebten. Auf molekularer Ebene zeigt sich bei transgenen Tieren, sowohl unter basalen Bedingungen als auch 28 Tage nach MI, eine verminderte Expression von SERCA und CaMKII α . Der Akt/GSK3 β / β -Catenin-Signalweg scheint in der transgenen Gruppe unter Basalbedingungen gestört, wobei eine gesteigerte Aktivität von Akt bei gleichzeitiger Überaktivität von phosphoryliertem GSK3 β nachgewiesen wurde. Dies führte jedoch nicht zur Akkumulation von β -Catenin.

Höhn, Maximilian: Auswirkungen der transgenen Überexpression der Phosphoprotein Phosphatase 2A im chronischen Myokardinfarktmodell der Maus, Halle (Saale), Univ., Med. Fak; Diss., 80 Seiten, 2016

II.	Inhaltsverzeichnis	Seite
I.	Referat	II
II.	Inhaltsverzeichnis	III
III.	Abkürzungsverzeichnis	V
1	Einleitung	1
1.1	Der akute Myokardinfarkt	2
1.2	Kardiales Remodeling und kardiale Hypertrophie	2
1.2.1	Remodeling nach Myokardinfarkt	3
1.3	Die dilatative Kardiomyopathie des Menschen	6
1.4	Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung in der Herzmuskelzelle	7
1.4.1	Phosphoprotein-Phosphatase 2A	8
1.5	Überblick über die Wnt-Signalkaskade	11
1.6	Zusammenschau	13
2	Zielstellung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Versuchstiere	15
3.2	Echokardiographie	15
3.3	Myokardinfarktmodell	16
3.4	Schein-operierte Versuchstiere	17
3.5	Versuchsablauf	17
3.6	In-situ-Fixierung und Präparateherstellung	18
3.7	Gewebeproben für die Molekularbiologie	18
3.8	Schnittpräparatengewinnung	19
3.9	Infarktgrößenbestimmung mittels Trichrom-Färbung	20
3.10	Bestimmung der Myozyten-Querschnittsflächen (MCSA)	21
3.11	Messung der interstitiellen Kollagenfraktion	23
3.12	mRNA-Isolierung	24
3.13	Reverse Transkription und quantitative <i>real time</i> -Polymerasekettenreaktion	25
3.14	Protein-Isolierung	25
3.15	SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) und Western Blot	25
3.16	Proteinphosphataseansatz	26
3.17	Reagenzien	27
3.17.1	PBS-Lösung (phosphate buffered saline)	27
3.17.2	Paraformaldehyd-Lösung (PFA)	27
3.17.3	Mowiol	27
3.18	Verwendete Geräte und fertige Gebrauchslösungen	27
		III

3.19 Statistik	28
4 Ergebnisse	29
4.1 Morphometrie	29
4.2 Überlebens-Analyse	30
4.3 Echokardiographie	31
4.3.1 Echokardiographie – Herzfrequenz	32
4.3.2 Echokardiographie – Diameter und Wanddicken	32
4.3.3 Echokardiographie – Parameter der Pumpfunktion	34
4.4 Histologische Analyse des Infarktareals	35
4.4.1 Vergleich der histologischen Übersichtsaufnahmen	35
4.5 Infarktgrößen	37
4.6 Veränderungen des infarktfernen Myokards (<i>remote myocardium</i>)	38
4.6.1 Myozyten-Querschnittsfläche (<i>myocyte cross sectional area</i>)	38
4.6.2 Interstitielle Kollagenfraktion	39
4.7 Molekularbiologische Untersuchungen	40
4.7.1 Expression der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β	40
4.7.2 Expression von β -Catenin	41
4.7.3 Quantifizierung von Protein-Kinase B	41
5 Diskussion	43
5.1 Methodenkritik	43
5.1.1 Echokardiographie	43
5.1.2 Anfertigung der histologischen Präparate	43
5.1.3 Computer-gestützte Auswertung	43
5.2 Kardialer Phänotyp der PP2A-transgenen Mäuse unter basalen Bedingungen	44
5.3 PP2A-transgene Mäuse im chronischen Myokardinfarktmodell	46
5.3.1 Interpretation der morphometrischen Ergebnisse	46
5.3.2 Interpretation der echokardiographischen Daten	47
5.3.3 Überlebens-Analyse	48
5.4 Interpretation der histologischen Ergebnisse	49
5.5 Bedeutung der PP2A für die intrazelluläre Signaltransduktion	50
5.6 Implikationen aus der veränderten GSK3 β - und β -Catenin-Aktivität	53
5.7 Phosphatasenaktivität im chronischen Myokardinfarktmodell	57
5.8 Vergleich mit anderen Tiermodellen	57
5.9 Schwächen des Modells der myokardialen PP2A-Überexpression	60
6 Zusammenfassung	62
7 Literaturverzeichnis	63
8 Thesen	70

III. Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
A _{diast.}	Diastolische Fläche des linken Ventrikels
A _{syst.}	Systolische Fläche des linken Ventrikels
AC	Adenylatzyklase
ACE	angiotensin conversing enzyme
ACS	akutes Coronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Synonym für Proteinkinase B
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
AT1-R	Angiotensin 1-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
B-Mode	Brightness Mode
BNP	Brain natriuretic peptide
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	zyklische Desoxyribonukleinsäure
CIHK	chronische ischämische Herzkrankheit
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
d	Tag
d.h.	das heißt
DTT	Dithiothreitol
Echo	Echokardiographie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF2	eukaryoter Elongationsfaktor 2
eEF2-K	eukaryoter Elongationsfaktor 2-Kinase
EF	Ejektionsfraktion

evtl.	eventuell
FAC	fractional area change
FS	fractional shortening
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GSK3	Glykogensynthasekinase 3
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HW	Hinterwand
ICF	interstitielle Kollagenfraktion
IE	Internationale Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
kg	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LAD	left anterior descendend
LDL	low density lipoproteins
LEF	lymphoid enhancer binding factor
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Innendurchmesser
LVIDD	linksventrikulärer diastolischer Innendurchmesser
LVIDS	linksventrikulärer systolischer Innendurchmesser
µg	Mikrogramm
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol

M-Mode	Motion Mode
MCSA	myocyte cross sectional area
MHz	Megahertz
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl n
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NSTEMI	non ST-elevation myocardial infarction
p	Signifikanzniveau
P	energiereicher Phosphatrest
PBS	phosphate buffered saline-Lösung
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PK	Proteinkinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PP2A	PP2A-transgene Mäuse
RE	regulatorische Einheit
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subcutan

SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SER	Sarcoendoplasmatisches Retikulum
SERCA	Sarcoendoplasmatisches Retikulum Kalzium-ATPase
SPT	Septum
STEMI	ST-elevation myocardial infarction
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TnI	Troponin Inhibitor
TTE	transthorakale Echokardiographie
U	Unit, Einheit für Enzymaktivität
vs.	versus (lateinisch „gegenüber gestellt“)
VW	Vorderwand
Wnt	wingless-Kaskade
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkern

1 Einleitung

Herz-Kreislauf- und Gefäßkrankheiten sind in der Bundesrepublik Deutschland nach wie vor die häufigsten Todesursachen. Im Jahr 2012 waren in Deutschland laut Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes die drei häufigsten Todesursachen: 1. Chronische ischämische Herzkrankheit, CIHK, (71.655 Fälle), 2. Akuter Myokardinfarkt (52.516 Fälle) und 3. Herzinsuffizienz (46.410 Fälle) [1].

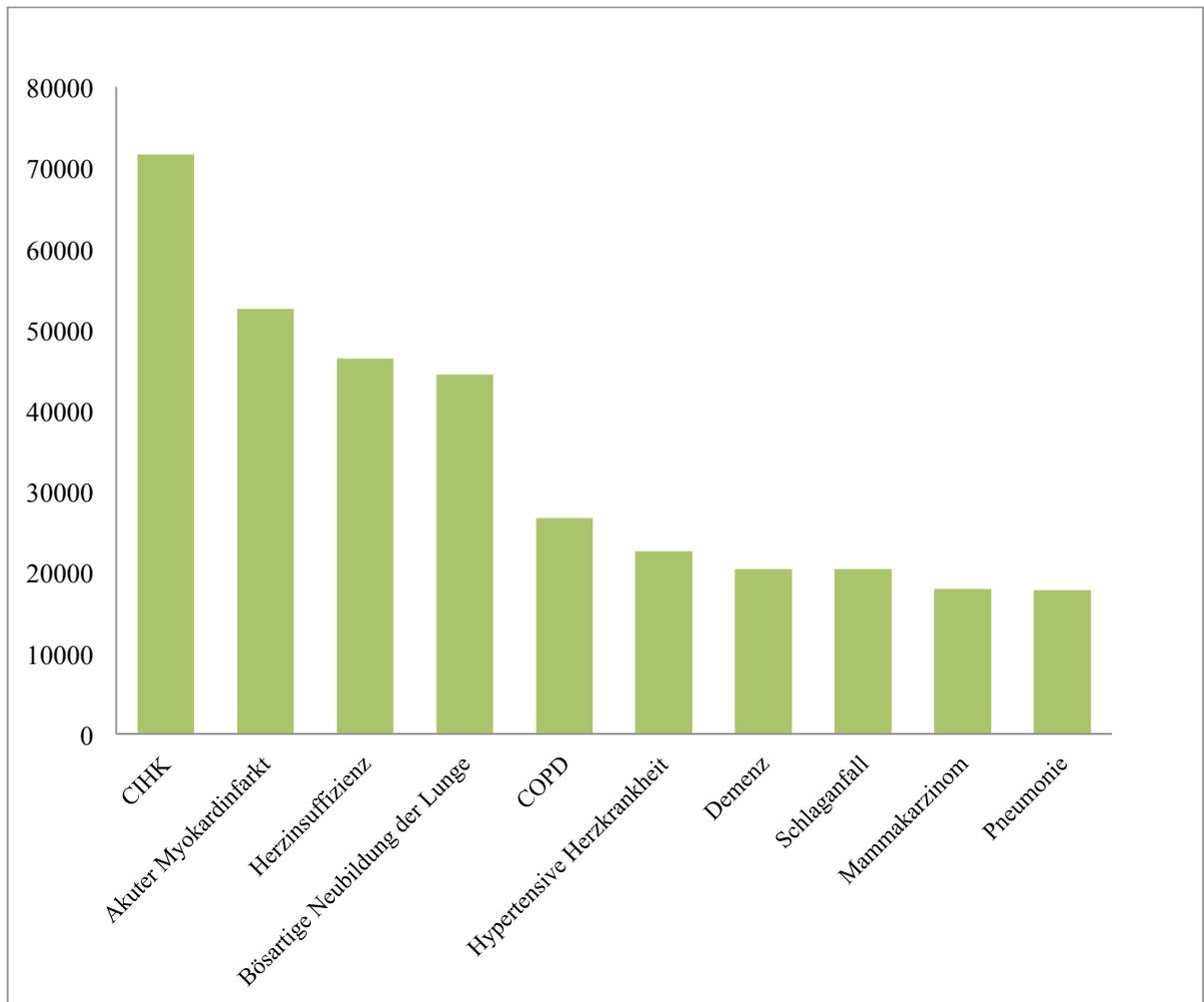


Abbildung 1 Anzahl der häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 2012 (nach [1]). **CIHK** – chronisch ischämische Herzkrankheit. **COPD** – chronisch obstruktive Lungenerkrankung.

Auf diese drei Entitäten entfielen mehr als 19 % aller Todesfälle in Deutschland im Jahr 2012. Der Stellenwert der Erforschung der Pathomechanismen im chronisch erkrankten Myokard kann ist daher unbestreitbar hoch. Verbesserte Therapiekonzepte kämen allein in Deutschland jährlich mehreren Hunderttausend Patienten zu Gute.

Die hier dargelegten Forschungen zu den Auswirkungen der Überexpression der Phosphoprotein-Phosphatase 2A (PP2A) im chronischen Myokardinfarktmodell der Maus

sollen den Wissensstand über die Pathomechanismen des chronischen Myokardinfarkts erweitern.

1.1 Der akute Myokardinfarkt

Drei Entitäten, die *instabile Angina Pectoris*, der Myokardinfarkt ohne ST-Strecken-Hebung im Elektrokardiogramm (*Non ST-segment Elevation Myocardial Infarction, NSTEMI*) sowie der Myokardinfarkt mit ST-Strecken-Hebung (*ST-segment Elevation Myocardial Infarction, STEMI*) werden in der klinischen Medizin als Akutes Koronarsyndrom (*ACS*) zusammengefasst. Sie sind durch eine Ischämie des Herzmuskelgewebes charakterisiert [2, 3]. Rein mechanistisch betrachtet sind instabile Angina pectoris, NSTEMI und STEMI unterschiedliche Schweregrade der Koronaren Herzkrankheit. Die Risikofaktoren aller drei Krankheitsbilder sind mit Diabetes mellitus, arteriellem Hypertonus, Rauchen, Übergewicht, hohem LDL-Cholesterinspiegel etc. [3, 4] ebenso identisch wie das grundsätzliche pathophysiologische Geschehen. Der Myokardinfarkt ist meist das Ergebnis eines Monate bis Jahre andauernden Prozesses der progressiven Atherosklerose einer oder mehrerer Koronararterien. Die durch einen akuten Koronarverschluss bedingte Ischämie hat den Untergang von Muskelgewebe zur Folge, welches durch eine bindegewebige Narbe ersetzt wird [5]. Die kardiale Hämodynamik verändert sich durch den Verlust von funktionellem Gewebe. Dies führt zu einer stärkeren muskulären Belastung des nicht infarzierten Areals, des sogenannten *remote myocardiums*. Im weiteren Verlauf über Wochen und Monate kommt es zum kardialen *Remodeling*. Die Festigkeit des Narbengewebes, die veränderte Hämodynamik und gestiegene Anforderungen an das verbliebene kontraktile Gewebe bewirken Veränderungen in der Form und Architektur des infarzierten Ventrikels [5].

1.2 Kardiales Remodeling und kardiale Hypertrophie

Die Anforderungen an die Pumpleistung des Herzens variieren ständig. Eine Reihe von Parametern, wie die Herzfrequenz und das Schlagvolumen werden normalerweise den aktuellen Bedürfnissen angepasst. Bei körperlicher Beanspruchung kann das Herz ein Vielfaches des Blutvolumens pro Zeiteinheit bereitstellen, als dies unter Ruhebedingungen zur Aufrechterhaltung der Versorgung aller Organe notwendig ist. Neben dieser kurzfristigen Regulation der Funktionsparameter sind durch häufig oder dauernd auftretende erhöhte Belastungen auch Anpassungsmechanismen des Herzmuskelgewebes selbst zu beobachten. Wie die Skelettmuskulatur ist auch die Herzmuskulatur mittelfristig in der Lage zu hypertrophieren, d.h. in erster Linie die Anzahl der funktionellen Einheiten (*Sarkomere*) pro Muskelfaser zu steigern [6]. Der Begriff des *kardialen Remodeling* beschreibt Veränderungen in der Genexpression sowie auf molekularer, zellulärer und interstitieller Ebene, die sich klinisch als

Veränderungen der Größe, der Form und der Funktion des Herzens manifestieren. Daran beteiligt sind neben den Kardiomyozyten, das Bindegewebe (Fibroblasten und Kollagene) aber auch die koronare Blutversorgung [7]. Kommt es über lange Zeiträume zu einer Überlastung der linken Herzkammer, z.B. durch arteriellen Hypertonus oder eine Aortenklappenstenose, führt dies zur *konzentrischen Hypertrophie*, die mit einer übermäßigen Verdickung der Muskulatur und Fibrosierung einhergeht. Auf diese Weise sinkt unter Umständen das Ventrikelvolumen und die Compliance der Ventrikelwand verringert sich [6].

Akut auftretende Linksherzbelastungen, wie sie etwa beim MI auftreten, können zur Dilatation des linken Ventrikels führen. Während das Ventrikelvolumen ansteigt, kommt es langfristig zu einer starken interstitiellen Fibrose und zu extensiver Verlängerung der Kardiomyozyten [6]. Eine Übersicht über die Formen kardialer Hypertrophie gibt Tabelle 1.

Tabelle 1 Formen kardialer Hypertrophie. Symbolik: -- stark verringert, - verringert, = unverändert, + erhöht, ++ stark erhöht, >/< größer als/kleiner als.; (nach [6])

	Physiologische Hypertrophie	Pathologische Hypertrophie	Kardiale Dilatation
Ventrikelvolumen	+	=/-	++
Kardiomyozytenhypertrophie Länge (L) : Diameter (D)	L > D	L < D	L >> D
Interstitielle Fibrose	=	+	++
Kardiale Leistung	+	=/-	--

1.2.1 Remodeling nach Myokardinfarkt

Der nach einem Myokardinfarkt auftretende Prozess des Remodeling kann in eine Früh- und eine Spätphase eingeteilt werden.

Die *Frühphase* (innerhalb der ersten 72 Stunden) betrifft dabei in erster Linie das infarzierte Myokard. Charakteristisch ist die sogenannte *Infarktexpansion*, die aus einer Destruktion des kollagenen Bindegewebes zwischen den Kardiomyozyten, getriggert durch neutrophile Granulozyten, resultiert [5]. Die Infarktexpansion geht mit einer Erhöhung der Wandspannung einher, welche ein klassischer Hypertrophie-induzierender Stimulus ist. Infolge der erhöhten Wandspannung sind Ventrikelruptur sowie die Ausbildung eines linksventrikulären Aneurysmas gefürchtete Komplikationen [5].

In der *Spätphase* des Remodeling, die nach 72 Stunden beginnt und Monate andauern kann, ändert sich sowohl die makroskopische als auch mikroskopische Architektur des gesamten Ventrikels, mit dem Ziel, eine ausreichende Stabilität der Infarktnarbe gegenüber der Wandspannung zu erreichen. Dabei spielen vor allem folgende Faktoren eine Rolle [5]:

- der Anteil nekrotischen Muskelgewebes
- die beteiligten Wandschichten (transmural vs. nicht transmural)
- die Lokalisation des Infarkts (z.B. Beteiligung des Apex-Bereichs oder der Papillarmuskeln)
- der Blutfluss (z.B. Reperfusion) durch das betroffene Koronargefäß
- Dysfunktion des angrenzenden Myokards (*myocardial stunning*) und die Möglichkeit der Reaktivierung (*hibernating myocardium*).

Auf mikroskopischer Ebene kommt es zur Hypertrophie der verbleibenden Kardiomyozyten und zu extensiven Umbauvorgängen des kollagenen Bindegewebes (Fibrosierung) [5]. Makroskopisch zeigen sich eine Dilatation und eine Formveränderung des linken Ventrikels von der eher elliptischen hin zur mehr kugeligen Gestalt [7]. An dieser Stelle spielt das sogenannte *adjacent myocardium* eine wichtige Rolle. Es bezeichnet die Gewebeanteile, die unmittelbar an das infarzierte Areal angrenzen. Der mechanische Stress ist im Bereich zwischen intakter Muskulatur und praktisch unbeweglicher Infarktscar besonders groß. Außerdem ist das „Orchester der Mediatoren“ [8] an der Schnittstelle zwischen Infarktreal und *remote myocardium* am lautesten. Aus diesem Grund ist die Grenzzone einerseits von Hypertrophie und andererseits von Apoptose gekennzeichnet. Bis ein neues Gleichgewicht mit einer stabilen Infarktscar entstanden ist, beobachtet man in der Grenzzone häufig eine sekundäre (nicht-ischämische) Infarktausdehnung [8].

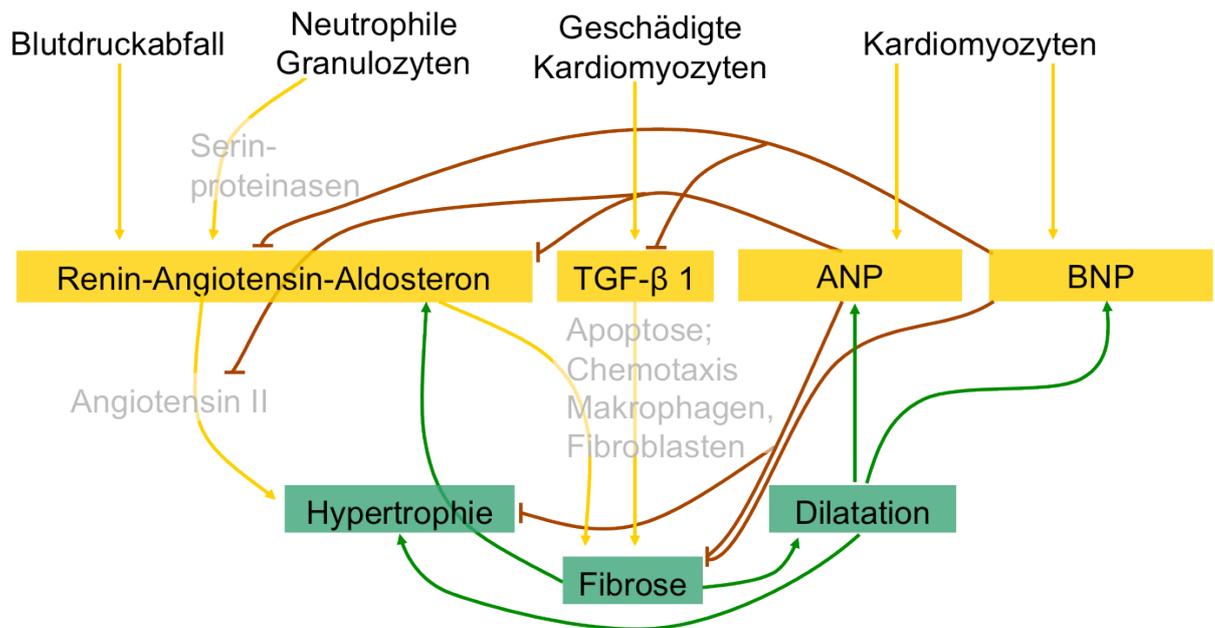


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Zusammenspiels und der Effekte wichtiger Mediatoren im Remodeling nach MI; **oben** – Ursachen, **Mitte** – Mediatoren (gelb), **unten** – Effekte (grün); **gelbe Pfeile** – stimulierende Wirkung, **rote Pfeile** – hemmende Wirkung; ANP – atrial natriuretic peptide; BNP – brain natriuretic peptide; TGF – transforming growth factor. (nach [5, 9-11])

Durch arteriellen Blutdruckabfall wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System systemisch aktiviert. Zusätzlich aktivieren Serinproteinasen aus neutrophilen Granulozyten die lokale Angiotensin/Angiotensin II-Freisetzung. Angiotensin II ist ein hypertrophischer Stimulus [5, 12]. Aldosteron stimuliert die Kollagensynthese der Fibroblasten, weiterhin besteht eine positive Rückkopplung über Myofibroblasten, die ihrerseits Aldosteron synthetisieren [5, 13]. TGF-β 1, der von geschädigten Kardiomyozyten freigesetzt wird, kann Apoptose in Ischämiegeschädigten Kardiomyozyten induzieren und ist gleichzeitig ein chemotaktisches Signal für Phagozyten und Fibroblasten. Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) wird im adulten Herzen normalerweise nur in den Vorhöfen synthetisiert, kann aber nach einem Myokardinfarkt auch in den Ventrikeln nachgewiesen werden. Durch seine inhibitorischen Wirkungen auf Angiotensin II, Aldosteron und Katecholamine wird der systemische Gefäßwiderstand (Nachlast) ebenso reduziert wie der intrakardiale Füllungsdruck (Vorlast) [9]. Außerdem wirkt ANP wachstumshemmend auf kardiale Fibroblasten [9, 14]. BNP wird hauptsächlich im linken Ventrikel synthetisiert; sein Plasmaspiegel korreliert mit erhöhter linksventrikulärer Wandspannung bei herzinsuffizienten Patienten [15]. BNP hat inhibierende Wirkung auf das Renin-Aldosteron-Angiotensin-System und wirkt antifibrotisch durch Inhibition von TGF-β1 (über die Desensitivierung von Fibroblasten) [16].

Neben der klinisch begründbaren Einteilung in Früh- und Spätphase des Remodeling nach MI ist es unabhängig vom chronologischen Ablauf wichtig, sich die Unterschiede zwischen dem

von Ischämie und Nekrose betroffenen infarzierten Areal und dem remote myocardium zu vergegenwärtigen. Eine erste lokale Reaktion auf den Zelluntergang von Kardiomyozyten nach MI ist die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (*MMPs*), die die vorhandene extrazelluläre Matrix abbauen. Der Abbau der stabilisierenden Matrix begünstigt die Infarktexpansion [10]. Zirkulierende Leukozyten wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen beteiligen sich ebenfalls sehr schnell am Abbau des infarzierten Gewebes. Sie werden chemotaktisch über Mediatoren aus dem nekrotischen Gefäßendothel und durch die proteolytische Aktivität der *MMPs* angelockt. Beim Menschen sind die ersten beiden Wochen nach MI bestimmt von der proteolytischen Aktivität; etwa in der dritten bis vierten Woche nach dem Infarkt ereignis verschwinden die Entzündungszellen aus dem Infarktareal. Nun kann ein Neuaufbau der Bindegewebsmatrix begonnen werden. Der transforming growth factor- β 1 (*TNF- β 1*) ist der wichtigste Mediator der Fibrogenese und induziert die ab der ersten Woche nach MI nachweisbare Synthese von fibrillärem Kollagen Typ I und III [10]. Die Entzündungsreaktion nach MI geht mit der verstärkten Expression von Renin, Angiotensin-Konversionsenzym (*ACE*) und Angiotensin-1 Rezeptor (*AT1-Rezeptor*) einher. Im Infarktareal wurden erhöhte Angiotensin II-Spiegel festgestellt [10]. Makrophagen und Myofibroblasten, die wichtig für die Organisation des sich bildenden Narbengewebes sind, tragen sowohl *ACE* als auch *AT1-Rezeptoren*, weshalb Angiotensin II wichtige Funktionen in der Bindegewebsregulation zugeschrieben werden [10].

Auch im nicht-infarzierten Myokard sind interstitielle fibrosierende Prozesse nachweisbar, die hauptsächlich durch interstitielle Fibroblasten unterhalten werden. Daneben wurde eine perivaskuläre Fibrose der intramyokardialen Koronararterien beobachtet [10].

1.3 Die dilatative Kardiomyopathie des Menschen

Beim Menschen werden grundsätzlich drei Formen der Kardiomyopathien unterschieden: die hypertrophische, die restriktive und die dilatative [17]. Bei der erstgenannten handelt es sich um eine angeborene Herzmuskelhypertrophie, die in der Regel mehr den Septumbereich als die freien Wände des linken Ventrikels betrifft, ohne dass eine offensichtliche Ursache wie ein arterieller Hypertonus oder ein Klappenvitium zu finden wäre. Die restriktive Kardiomyopathie zeichnet sich in erster Linie durch eine Störung der diastolischen Funktion aus, bei der die Füllung der Herzkammern durch die unelastischen Herzwände behindert wird. Die dilatative Kardiomyopathie schließlich ist gekennzeichnet von einer Vergrößerung des Ventrikelvolumens bei verringerter Pumpleistung [17, 18].

Wenn eine ischämische Herzerkrankung ausgeschlossen werden kann, bleibt die Ursache der dilatativen Kardiomyopathie oft unklar. Infrage kommen verschiedene toxische Einflüsse,

metabolische Störungen bzw. infektiöse Ursachen. Die Erkrankungshäufigkeit korreliert unter anderem mit Alkohol- und Drogenabusus, der (hochdosierten) Einnahme bestimmter Medikamente (z.B. Doxorubicin oder Cyclophosphamid), aber auch mit Adipositas. Sie kann Spätfolge einer viralen Myokarditis oder aber erblich bedingt sein. So ist auch bei verschiedenen neuromuskulären Erkrankungen, wie der Muskeldystrophie *Duchenne*, eine kardiale Manifestation nicht selten [17].

Die dilatative Kardiomyopathie wird in der Regel erst nach Monaten oder Jahren ihres Bestehens als Linksherzinsuffizienz symptomatisch. Bei einigen Formen, wie z.B. der Alkoholbedingten oder durch Schilddrüsenüberfunktion verursachten dilatativen Kardiomyopathie, ist eine Ausheilung möglich, wenn die Grunderkrankung beseitigt wird; bei genetischen Ursachen ist hingegen kaum mit einer spontanen Besserung der Symptome zu rechnen. Gerade ältere Patienten (über 55 Jahren) haben insgesamt eine schlechte Prognose mit einer mittleren Überlebenschance von weniger als drei Jahren nach Diagnosestellung [17]. In etwa 20 bis 30 % der Fälle ist die Ursache einer dilatativen Kardiomyopathie genetisch bedingt, meistens liegt ein autosomal-dominanter Erbgang zu Grunde [19]. Häufigste Ursachen sind Mutationen in wichtigen funktionellen Proteinen des Sarkomers, wie z.B. Troponin T, β -myosin heavy chain oder Actin und Mutationen in Proteinen, die an der elektrischen bzw. Calciumabhängigen Reizleitung beteiligt sind [19].

1.4 Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung in der Herzmuskelzelle

Sowohl an der kurzfristigen Regulation und Modulation der Herzfunktion, als auch am kardialen Remodeling sind eine Vielzahl von Signalkaskaden beteiligt. Einen Überblick über die an kardialer Hypertrophie beteiligten Signalwege findet man z.B. bei Heineke et al., 2006 [6] oder Gottshall et al., 1996 [6, 20]. Ein wesentliches und wiederkehrendes Regulationsprinzip in der Biochemie der Zellen beruht auf reversibler Proteinphosphorylierung. Durch die enzymatische Aktivität von *Kinasen*, die die Übertragung von Phosphatresten an Zielproteine katalysieren, bzw. *Phosphatasen*, die Katalysatoren für das Abspalten dieser Phosphatreste sind, kann die Aktivität verschiedener Proteine reguliert werden [6, 21].

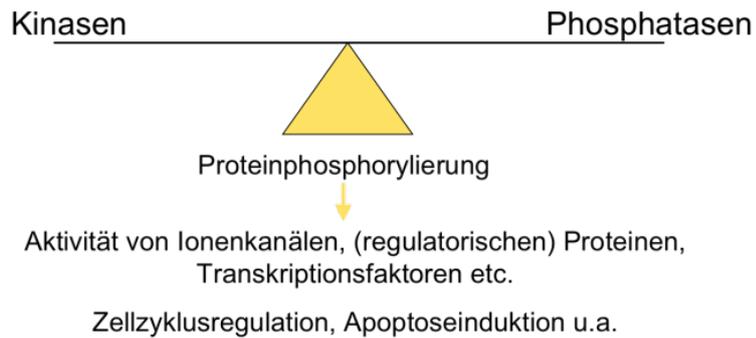


Abbildung 3 Die Aktivitäten von Kinasen und Phosphatasen befinden sich in einem fein regulierten homöostatischen Gleichgewicht. Der Phosphorylierungsgrad hat Einfluss auf die biologische Aktivität verschiedener Proteine, wodurch viele zelluläre Funktionen gesteuert werden.

Das Wechselspiel von Phosphorylierung und Dephosphorylierung ist auch an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptoseinduktion beteiligt. Schätzungen zufolge unterliegt mindestens ein Drittel aller zytosolischen Proteine reversibler Phosphorylierung [22].

Während die Rolle der Proteinkinasen bei der Regulation verschiedener zellbiologischer Prozesse vergleichsweise gut erforscht ist, existieren bislang deutlich weniger Erkenntnisse über die den Stellenwert der (funktionell antagonistischen) Protein-Phosphatasen. In Herzmuskelzellen wurden die Phosphoprotein-Phosphatasen (PP) 1, 2A, 2B und 2C nachgewiesen, wobei die Aktivitäten der PP1 und PP2A im gesunden Individuum quantitativ überwiegen. [23]. Aus der Analyse menschlicher Herzen nach Herzversagen ist bekannt, dass die allgemeine Phosphatasen-Aktivität in den Zellen dieser Herzen gesteigert ist [24-26].

1.4.1 Phosphoprotein-Phosphatase 2A

Die Phosphoprotein-Phosphatase 2A (PP2A) ist eine Serin-Threonin-Phosphatase, die in den verschiedensten intrazellulären Signaltransduktionswegen mitwirkt. Es sind gewebespezifische Isoformen der PP2A beschrieben worden, deren Gemeinsamkeit die katalytische Untereinheit PP2A/C (36 kDa) ist und die sich in ihren regulatorischen Untereinheiten unterscheiden. Die katalytische Untereinheit bildet ein hochaktives Dimer mit der 65 kDa schweren Untereinheit A (PR65), an welche wiederum ein regulatorisches Protein B (B56) binden kann, das die Substratspezifität des trimeren Holoenzymkomplexes vermittelt [23, 27]. Die PP2A gehört zusammen mit anderen Phosphoprotein-Phosphatasen (PP1, PP2B, PP2C und weiteren) zu einer Familie von Serin-Threonin-Phosphatasen, die in allen Säugetieren vorkommen und Homologien in der Aminosäuresequenz sowie der Kristallstruktur aufweisen [22]. In Herzmuskelzellen kommt die katalytische Untereinheit der PP2A in zwei Isoformen vor: PP2A/C α und PP2A/C β [23].

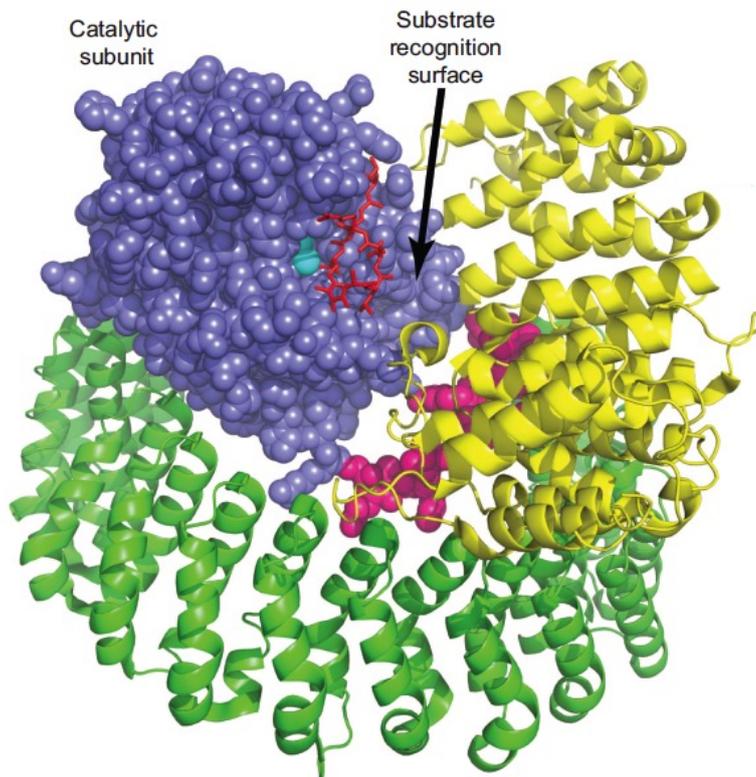


Abbildung 4 PP2A heterotrimerer Holoenzymkomplex mit katalytischer Untereinheit (blau) und den regulatorischen Proteinen A (grün) und B (gelb) (aus [27]).

Target-Proteine der *Protein-Phosphatase 2A (PP2A)* in der Herzmuskelzelle sind z.B. L-Typ Kalzium-Kanäle [22], Phospholamban oder auch der eukaryote Elongationsfaktor 2 im Zellkern [23].

Um die Bedeutung der PP2A im Herzmuskelgewebe *in vivo* zu studieren, erzeugte die Arbeitsgruppe um Prof. Neumann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) transgene Mäuse. Diese Tiere überexprimieren das korrespondierende Gen der katalytischen Untereinheit PP2A/C α im Herzmuskel unter der Kontrolle des α -myosin-heavy-chain-Promotors [23]. Sie weisen sowohl verringerte end-systolische linksventrikuläre Drücke in der Herzkatheteruntersuchung (im Sinne reduzierter linksventrikulärer Auswurfleistung) als auch eine echokardiographisch nachweisbare linksventrikuläre Dilatation auf. Im Myokard zeigen sich histologisch Nekroseinseln und eine verstärkte Fibrosierung. Der Phosphorylierungsgrad der regulatorischen Proteine Phospholamban (PLB) und Troponin-Inhibitor (TnI) sowie des eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (eEF2) ist erniedrigt. Es gab jedoch keinen Hinweis auf eine erhöhte Sterblichkeit der PP2A-überexprimierenden Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (WT).

Proteinphosphorylierung bzw. -dephosphorylierung ist, wie bereits erwähnt, ein zelluläres Regulationsprinzip, das sehr schnell die Änderung der Aktivität von Proteinen ermöglicht. Als Beispiel sei die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Phospholamban (PLB, siehe Abbildung 5) angeführt: PLB ist ein Regulator der sarcoendoplasmatischen Retikulum Kalzium ATPase 2 (SERCA2), die zytosolisches freies Kalzium in das sarcoendoplasmatische Retikulum pumpt. Dephosphorylierung von PLB verringert die Aktivität der SERCA2, was negativ-inotrope und negativ-chronotrope Effekte zur Folge hat [28].

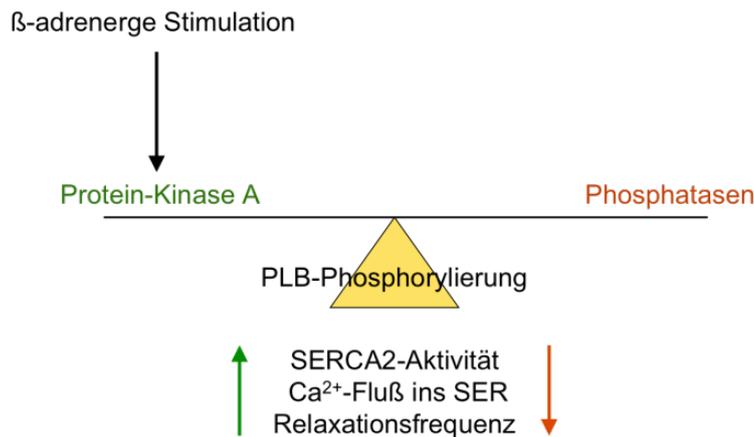


Abbildung 5 Wirkung der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Phospholamban. **PLB** – Phospholamban, **SER** – Sarcoendoplasmatisches Retikulum, **SERCA2** – Sarcoendoplasmatisches Retikulum Kalzium ATPase 2 (nach [28])

Abbildung 6 hingegen zeigt exemplarisch einen längerfristigen Effekt der Phosphatasen-Aktivität im Zellkern: Die Dephosphorylierung des eukaryoten Elongationsfaktors 2 aktiviert die Translation am Ribosom, den zweiten Schritt der Proteinbiosynthese [23].

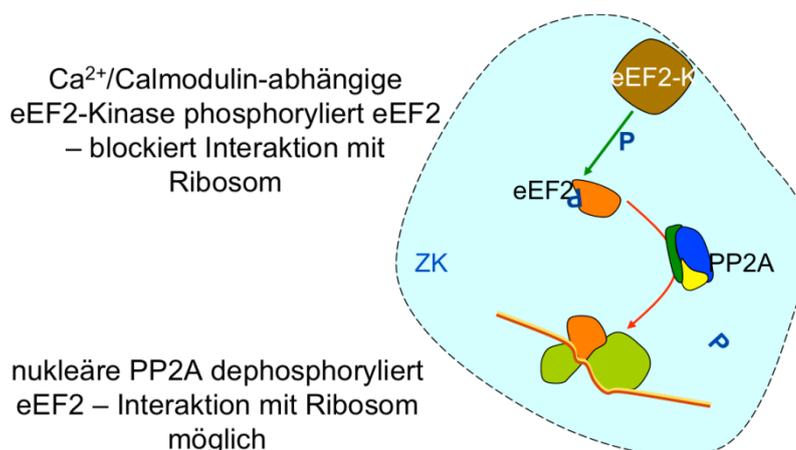


Abbildung 6 PP2A katalysiert die Dephosphorylierung des eukaryoten Elongationsfaktors 2, wodurch die Translation am Ribosom aktiviert wird. **eEF2** – eukaryoter Elongationsfaktor 2, **eEF2-K** – eEF2-Kinase, **P** – energiereiche Phosphate, **ZK** – Zellkern (nach [23]).

1.5 Überblick über die Wnt-Signalkaskade

Die Bedeutung der Wnt-Signalkaskade wurde zunächst im Rahmen entwicklungsbiologischer Prozesse erkannt [29]. Bei *Drosophila melanogaster* spielt die Wnt-Kaskade eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Flügel. Der Begriff “*Wnt*” ist ein Konstrukt aus den Abkürzungen *Wg* (“wingless”, einem Gen in *Drosophila melanogaster*) und *Int* (einem Onkogen, das in Mäusen identifiziert wurde) und wird verwendet, seit festgestellt wurde, dass beide Gene weitgehend homolog sind [30].

Die Proteine der Wnt-Signalkaskade sind evolutionär stark konserviert und spielen sowohl bei Mäusen [30] als auch beim Menschen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung verschiedener Organsysteme während der Embryogenese [29, 31].

Bis vor einigen Jahren war nur ein Teil der Wnt-Kaskade bekannt. Dieser wird mittlerweile in der Literatur als der “traditionelle” Wnt-Signalweg bezeichnet [31]. Diese Signalkaskade wird durch Bindung eines Wnt-Proteins an den sogenannten *Frizzled*-Transmembran-Rezeptor gestartet (siehe Abbildung 7). In Anwesenheit von Wnt wird die *glycogen synthase kinase 3* (GSK3) inaktiviert. Andernfalls phosphoryliert GSK3 das Protein β -Catenin, welches infolgedessen schnell gespalten und abgebaut wird [32].

In Anwesenheit von Wnt akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma und im Nukleus [29]. Nukleäres β -Catenin bildet einen Komplex mit lymphoid enhancer binding factor (LEF)/T cell specific transcription factor (TCF), der im Sinne eines Transkriptionsverstärkers wirkt [29, 31].

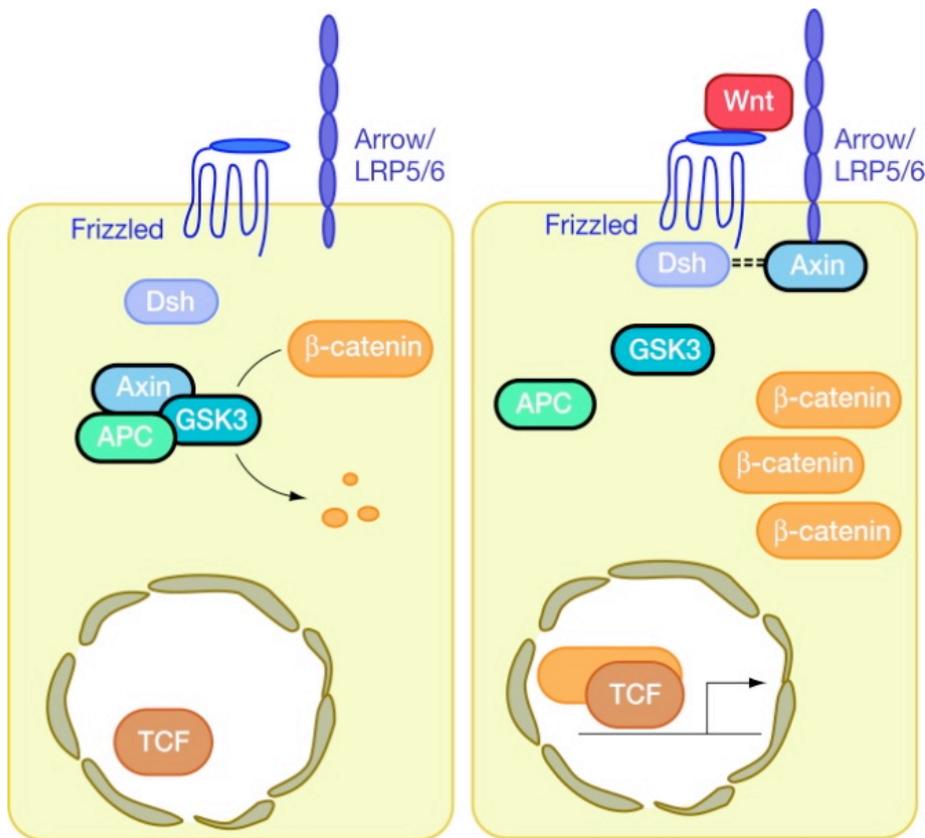


Abbildung 7 Schematische Darstellung des “traditionellen” Wnt-Signalwegs (aus [29]). **Wnt** – Wnt-Ligand. **Dsh** – Dishevelled. **GSK3** – glykogen synthase kinase 3. **APC** – adenomatosis poliposis coli. **TCF** – transcription factor

Neben den Elementen des klassischen oder “traditionellen” Wnt-Signalwegs sind mittlerweile viele weitere Proteine bekannt, die mit der Signalkaskade interferieren. Dazu gehören u.a. Phospholipase C, Proteinkinase C, Calcium-Calmodulin-Protein-Kinase und PP2A [29, 31, 33].

β-Catenin ist ein Protein, das neben seiner Bedeutung in der Wnt-Signalkaskade auch an der Bildung der *zonulae adhaerentes* beteiligt ist. Es ist auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert und an der Verankerung der Aktinfilamente im Zytoskelett beteiligt [34, 35].

Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) ist eine Serin/Threonin-Protein-Kinase. Im Myokard existiert sie in zwei Isoformen, gennant GSK3 α und GSK3 β . Die Funktion der GSK3 α -Isoform bleibt unklar [36]. GSK3 β inhibiert die meisten seiner Substrate, darunter β-Catenin und *Nuclear factor of activated T-cells (NFAT)*, einen Transkriptionsfaktor [37-39]. Im Tierversuch mit erhöhter GSK3 β -Aktivität zeigte sich eine verringerte hypertrophische Potenz des Myokards von Mäusen [40].

Ein weiterer Modulator der Wnt-Kaskade ist die Proteinkinase B (PKB; Synonym: Akt). Beim PKB/Akt Signalweg handelt es sich um eine eigenständige Signalkaskade, die unabhängig von

Wnt entdeckt und beschrieben wurde und im Myokard eng mit Hypertrophie sowie der Induktion fetaler Gene verbunden ist [41]. Darüber hinaus ist PKB/Akt in der Lage, GSK3 β zu inhibieren und interferiert auf diesem Weg auch mit dem Wnt-Signalweg [41, 42].

1.6 Zusammenschau

Rein funktionell betrachtet, sind die Parallelen zwischen der dilatativen Kardiomyopathie des Menschen und den Ergebnissen, die an PP2A-überexprimierenden Mäusen gesammelt wurden, bemerkenswert. Charakteristisch ist die drastisch reduzierte Auswurfleistung eines dilatierten und strukturell veränderten linken Ventrikels mit hypokinetischen Wänden. Dass allerdings, entgegen der Erwartung, in der Arbeit von Gergs und Neumann 2004 [23] keine erhöhte Sterblichkeit der PP2A-transgenen Mäuse festgestellt wurde, wirft die Frage auf, ob durch die erhöhte PP2A-Aktivität auch kardioprotektive, und möglicherweise bis dato unbekannte, Mechanismen aktiviert werden. Weiterhin ist unklar, ob eine erhöhte Phosphoprotein-Phosphatasenaktivität im Myokard als Ursache oder Symptom für Herzversagen gesehen werden kann. So kam es zu der Überlegung, kardioprotektive Effekte der PP2A-Überexpression zu prüfen. Diese sollten sich im Myokardinfarktmodell besser nachweisen lassen.

2 Zielstellung

Diese Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen der transgenen Überexpression der PP2A im chronischen Myokardinfarktmodell der Maus hinsichtlich der 28 Tage-Überlebensrate nach Myokardinfarkt, funktioneller Parameter und mikroskopischer sowie biochemischer Analysen. In diesem Zusammenhang interessieren konkret folgende Fragestellungen:

1. Beeinflusst die kardiale Überexpression von PP2A die Überlebensrate nach Myokardinfarkt im Mausmodell?
2. Welchen Einfluss hat die kardiale PP2A-Überexpression auf die linksventrikuläre Funktion der transgenen Mäuse?
3. Welche histologischen und molekularbiologischen Veränderungen resultieren aus der kardialen PP2A-Überexpression?
4. Welche Übereinstimmungen weist das vorgestellte Tiermodell zu weiteren transgenen Tiermodellen und zu Krankheitsbildern beim Menschen auf?

3 Material und Methoden

Die Tierversuche wurden unter Beachtung der Richtlinien und der Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt. Die Studie wurde über den Tierschutzbeauftragten bei der Aufsichtsbehörde angezeigt und von dieser genehmigt.

3.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich ausschließlich um adulte männliche ICR-Mäuse mit einem Mindestgewicht von 35 g. Neben den PP2A-transgenen Tieren [23] wurden Wildtyp-Mäuse als Kontrollgruppe verwendet. Im Folgenden werden die Gruppen als **PP2A (= TG)** und **WT** bezeichnet. Alle Tiere wurden vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität zur Verfügung gestellt, nachdem eine Genotypisierung und Verblindung durchgeführt wurde. Alle weiterführenden Untersuchungen erfolgen dann in unserer Arbeitsgruppe in Unkenntnis des Genotyps.

Die Versuchstiere haben ungehinderten Zugang zu Nahrung nach Altromin 1320 Standard-Diät und Wasser. In den Haltungsräumen wird von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr automatisch das Licht eingeschaltet; gefolgt von einer zwölfstündigen Dunkelphase. Zur Identifizierung erhielten die Mäuse unter Narkose Ohrmarkierungen.

3.2 Echokardiographie

Um eine Echokardiographie bei den Versuchsmäusen durchzuführen, werden die Tiere in eine leichte Isofluran-Inhalationsnarkose (mit 1,5 % Isofluran) versetzt, so dass die Spontanatmung erhalten bleibt. Zum Einsatz kommt ein Ultraschallgerät (Toshiba Power Vision), das mit einem Sektorschallkopf mit einer maximalen Frequenz von 10 MHz ausgerüstet ist. Alle Untersuchungen werden transthorakal in der parasternalen kurzen Achse ausgeführt. Vor der Ligatur der LAD (*präoperativ*) und vor Versuchsende (28 Tage *postoperativ*) wurden auf diese Weise folgende Parameter ermittelt:

- Im *Brightness-Mode (B-Mode)* die systolische bzw. diastolische endokardiale Querschnittsfläche. Aus diesen Werten lässt sich die systolische Verkleinerung der linksventrikulären Fläche (*fraction of area change, FAC*) aus nachfolgender Formel berechnen:

$$FAC = \frac{A_{diast} - A_{syst}}{A_{diast}}$$

A_{diast} diastolische Fläche des linken Ventrikels;
 A_{syst} systolische Fläche des linken Ventrikels

- Im *Motion-Mode (M-Mode)* die *Herzfrequenz* und die *Wanddicke der Vorderwand* des linken Ventrikels und *des interventrikulären Septums* sowie zwei Parameter der linksventrikulären Pumpfunktion: Die *fraktionelle systolische Ventrikeldurchmesserverkürzung (shortening fraction, FS)*. FS wird folgendermaßen berechnet:

$$FS = \frac{LVIDD - LVIDS}{LVIDD}$$

LVIDD diastolischer linksventrikulärer Innendurchmesser;
 LVIDS systolischer linksventrikulärer Innendurchmesser

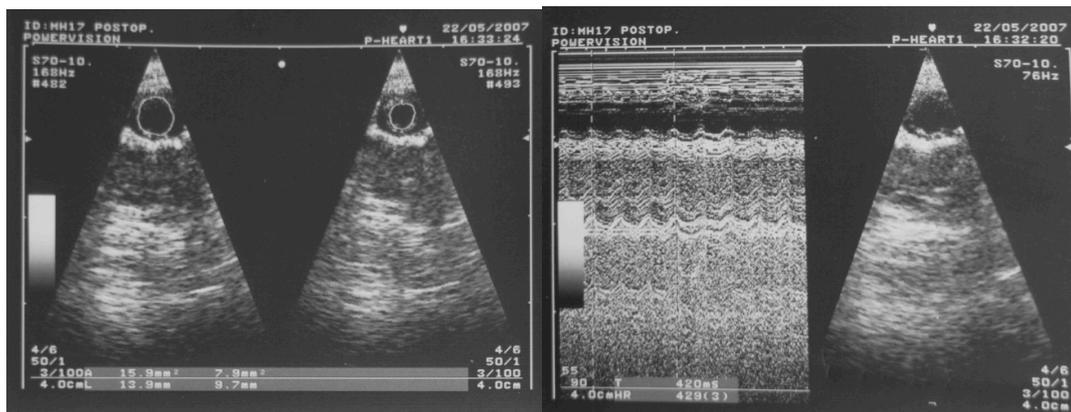


Abbildung 8 Echokardiographieausdrucke (Beispiel); **links** Messung der endokardialen Ventrikelschnittflächen in Diastole und Systole im B-Mode-Bild, **rechts** M-Mode-Darstellung.

3.3 Myokardinfarktmodell

Die Induktion des Myokardinfarkts ist ein operativer Eingriff, der unter Narkose durchgeführt wird. Das Versuchstier wird für kurze Zeit in eine Kammer gesetzt, in der es einem Gemisch aus Sauerstoff und 5 % Isofluran ausgesetzt ist. Nach etwa einer Minute wird eine ausreichende Narkosetiefe erreicht, so dass die Maus außerhalb der Kammer intubiert und an ein automatisches Beatmungsgerät (Mini-Vent, Hugo Sachs Elektronik) angeschlossen werden kann. Die Beatmung erfolgt volumenkontrolliert unter positivem Beatmungsdruck mit einem Gemisch aus Sauerstoff und 2 % Isofluran. Zur Analgesie wurde Rimadyl 5 µg/g Körpergewicht s.c. gespritzt.

Das operative Vorgehen zur Induktion eines Myokardinfarktes durch Verschluss der LAD ist bereits zuvor angewendet und publiziert worden [43]. Hierbei werden die Mäuse links-thorakal rasiert und desinfiziert. Der Hautschnitt verläuft parallel zu den Rippen im Interkostalraum zwischen der vierten und fünften Rippe. Die Mm. pectoralis major et minor werden vorsichtig freigelegt und mit 5-0 Faden unter leichtem Zug auseinandergespreizt. Der Thorax wird eröffnet, indem vorsichtig die Interkostalmuskulatur im vierten Rippenzwischenraum

durchtrennt wird. Ein weiterer Schnitt eröffnet das Perikard. Am schlagenden freigelegten Herz kann nun unter Zuhilfenahme eines Mikroskops eine Ligatur mit nicht resorbierbarem 6-0 Faden um die linke Herzkranzarterie (*left anterior descending, LAD*) proximal ihrer Hauptaufzweigung gelegt werden. Sitzt die Ligatur korrekt, blasst die anteriore Wand des linken Ventrikels innerhalb kürzester Zeit ab. Seine Kontraktilität lässt sichtbar nach und die LAD verfärbt sich distal der Ligatur livide. Die Ligatur wird nicht wieder eröffnet, d.h. keine Reperfusion wiederhergestellt.

Der Wundverschluss erfolgt in drei Schichten: Adaptation der Rippen, Fixierung der Brustmuskulatur und Hautnaht. Danach kann das Versuchstier extubiert werden. Nach erfolgreicher Operation wachen die Mäuse nach einigen Minuten auf, können in den Käfig zurückgesetzt werden und nehmen kurz darauf wieder Nahrung auf.

Zur postoperativen Analgesie wird dem Trinkwasser für die ersten drei Tage nach dem Eingriff Rimadyl 50 mg/l Wasser zugesetzt.

3.4 Schein-operierte Versuchstiere

Das Vorgehen für die schein-operierten (*sham*) Mäuse ist weitestgehend identisch mit dem in 3.3 beschriebenen Prozedere; allerdings erfolgt nach Freilegen der Herzens und Eröffnung der Perikards keine Ligatur der LAD.

Entsprechend werden im Folgenden vier Gruppen von Mäusen betrachtet: **WT sham**, **WT MI** und **PP2A sham** (= **TG sham**) sowie **PP2A MI** (= **TG MI**).

3.5 Versuchsablauf

Im zeitlichen Ablauf des Versuchs steht an erster Stelle eine Echokardiographie, auf die die Induktion des MIs durch Ligatur der LAD folgt. Anschließend stehen die Versuchstiere 28 Tage lang unter Beobachtung, bevor kurz vor Versuchsende erneut eine Echokardiographie erfolgt. Der Versuch endet mit der Entnahme des Herzens und in-situ-Fixierung.

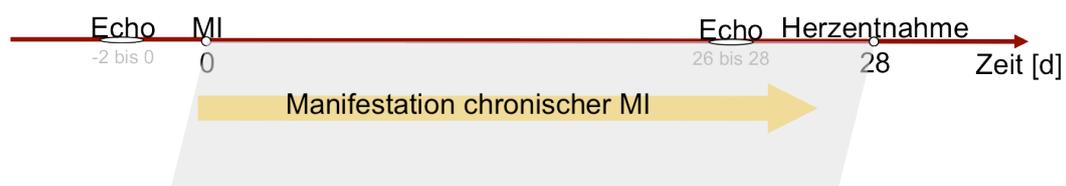


Abbildung 9 Zeitlicher Verlauf des Tierversuchs in Tagen. **Echo** - Echokardiographie, **MI** - Myokardinfarkt.

3.6 In-situ-Fixierung und Präparateherstellung

Die Organentnahme findet am 28. Tag nach LAD-Verschluss statt. Um in den histomorphologischen Untersuchungen verlässliche Ergebnisse zu erhalten, ist es besonders bedeutsam, alle Herzen im gleichen Kontraktionszustand zu fixieren. Aus diesem Grund werden die Versuchstiere erneut, wie in 3.3 beschrieben, narkotisiert, intubiert und maschinell beatmet. Zur Analgesie wird Rimadyl 5 µg/g Körpergewicht s.c. verabreicht. Danach erfolgt der Hautschnitt zur Eröffnung der Bauchhöhle entlang der Mittellinie. Zuerst wird das Zwerchfell dargestellt und vorsichtig links parasternal eröffnet. Unter Sicht eröffnet man nun, ohne das Herz oder die Lunge zu verletzen, die Brusthöhle, indem die Rippen parasternal durchtrennt werden. Anschließend wird der Apex des linken Ventrikels kanüliert. Die in-situ-Fixierung in der Diastole erfolgt dann in zwei Schritten: Zuerst wird eine *kardioplege KCl-Heparin-Lösung* (50 mM KCl und 10.000 IE Heparin auf 500 ml PBS) infundiert. Bei Eintritt des Herzstillstands wird anschließend mit der Infusion einer 4 %igen *Paraformaldehyd-Lösung* begonnen. Mit der kardioplegen Lösung ist ein Stehenbleiben des Herzens in der Diastole garantiert; Paraformaldehyd dient als Fixiermittel. Um den Abfluss der überschüssigen Flüssigkeit zu gewährleisten, wird das rechte Herzohr reseziert.

Das Herz, die Lungen und die Leber werden anschließend entnommen und gewogen, die Tibialänge notiert und die Schwanzspitze der Maus für die eventuelle Kontrolle der Genotypisierung konserviert.

Das Herz wird dann über Nacht zur Entwässerung bei 4 °C in einer 30 %igen Saccharoselösung inkubiert. Am Folgetag kann es in *PolyfreezeTM* Tissue Freezing Medium (Polyscience, Inc.) eingebettet werden. Derartig behandelte Herzen können bei -20 °C sicher aufbewahrt werden, bis sie im Gefrierschnittkryotom aufgearbeitet werden.

3.7 Gewebeproben für die Molekularbiologie

Das Material für die molekularbiologischen Untersuchungen wird analog dem in Abschnitt 3.6 beschriebenen Procedere der in-situ-Fixierung gewonnen. Es schließt sich jedoch nicht die Infusion von Paraformaldehyd an, stattdessen werden die Gewebeproben unmittelbar nach Entnahme in Eppendorf-Gefäßen in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

3.8 Schnittpräparatengewinnung

Es werden vorbeschichtete Objektträger der Marke SuperFrost® Plus (Menzel Gläser GmbH) verwendet. Auf jeden Objektträger werden vier Gewebeschnitte eines Gefrierschnittkryotoms (Microm Kryostat, Typ HM 500 OM) aufgezogen.

Die Anzahl der Schnitte mit ihrer jeweiligen Schnittdicke wird zur Berechnung der Größe des linken Ventrikels und des Anteils des infarzierten Areals herangezogen. Deswegen bedarf es einer hohen Ausbeute guter Gefrierschnitte und Fehlschnitte müssen notiert werden. Der linke Ventrikel aller Herzen wird vom Apex bis zur Klappenebene aufgearbeitet, wobei nach einem definierten Schema abwechselnd dickere und dünnere Schnitte angefertigt werden (siehe Abbildung 10).

Jeder Gewebeschnitt wird sofort auf einen Objektträger übertragen und bei Raumtemperatur einige Zeit getrocknet. Nach Aufarbeitung des gesamten Herzens werden die gesammelten Objektträger über Nacht bei 37 °C inkubiert, was ein hervorragendes Haften des Gewebes am Objektträger garantiert. Gelagert werden die Schnittserien anschließend bei -20 °C.

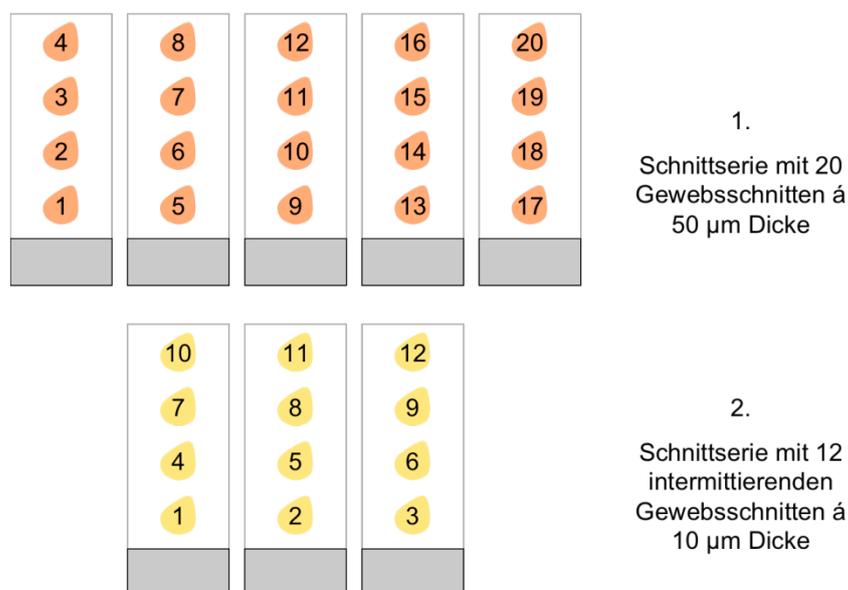


Abbildung 10 Serien 50 µm dicker und 10 µm dicker Gewebeschnitte werden abwechselnd hergestellt. Ein Block aus insgesamt acht Objektträgern umfasst 1,2 mm der Höhe des linken Ventrikels.

3.9 Infarktgrößenbestimmung mittels Trichrom-Färbung

Die Trichrom-Färbung erlaubt eine sehr gute Unterscheidung von Muskel- und Bindegewebe im Lichtmikroskop, so dass in der Schnittebene hervorragend zwischen Infarkt Narbe und intakter Muskulatur unterschieden werden kann.

Die 50 µm dicken Gewebeschnitte werden mit dem Färbe-Kit der Firma Sigma-Aldrich® nach folgendem Protokoll gefärbt: Zunächst werden die Objektträger zwei Mal für 15 Minuten in 10 %iger PBS-Lösung gewaschen. Es folgen eine 15 minütige Fixierung in Bouin's Solution bei 56 °C, Abspülen der gelben Lösung unter laufendem Wasser und erneutes Waschen mit deionisiertem Wasser. Im nächsten Schritt werden die Objektträger für fünf Minuten mit Bieberich Scarlet-Acid-Fuchsin gefärbt. Es schließen sich Waschen in deionisiertem Wasser und Färbung über fünf Minuten mit Phosphomolybdic-Acid-Solution an. Nun werden die Objektträger für fünf Minuten in ein Bad mit Aniline-Blue-Solution und direkt anschließend für zwei Minuten in 1 %ige Essigsäure getaucht. Diesem Schritt folgt die sukzessive Entwässerung in ansteigender Alkoholkonzentration und schließlich in Xylol, womit die Färbung beendet ist, und die Präparate mit Entellan und einem Deckgläschen fixiert werden.

Die Bestimmung der Infarktgröße erfolgt mit Hilfe der Anzahl der Gewebeschnitte, die zwischen Apex und Mitralklappe hergestellt wurden. Es werden die vier Schnittebenen ausgewählt und untersucht, die den linken Ventrikel in vertikaler Richtung in fünf gleichgroße Abschnitte unterteilen (Abbildung 11) [44].

An einem Durchlichtmikroskop mit Digitalkamera werden nun die Schnitte in einer Übersichtsvergrößerung fotografiert, in der die gesamte Zirkumferenz des linken Ventrikels sichtbar ist. Zum Ausmessen der Parameter in den erzeugten Bilddateien wird die frei verfügbare Software ImageJ (National Institute for Health, USA) verwendet. Dieses Programm erlaubt unter anderem das Ausmessen von per Mauszeiger ins Bild gezeichneten Strecken. In den horizontalen Schnittebenen werden die perikardiale und endokardiale Infarktausdehnung gemessen und ins Verhältnis zur Gesamtzirkumferenz des Perikards/Endokards des linken Ventrikels gesetzt. Die Auswertung des Zahlenmaterials erfolgt in Microsoft™ Excel™ 2003.

Die Infarktgröße wird nach folgender Formel errechnet (nach [44]):

$$\text{Infarktgröße} = \frac{\sum \text{Infarkt, endokardial} + \sum \text{Infarkt, perikardial}}{\sum \text{Zirkumferenz LV, endokardial} + \sum \text{Zirkumferenz LV, perikardial}}$$

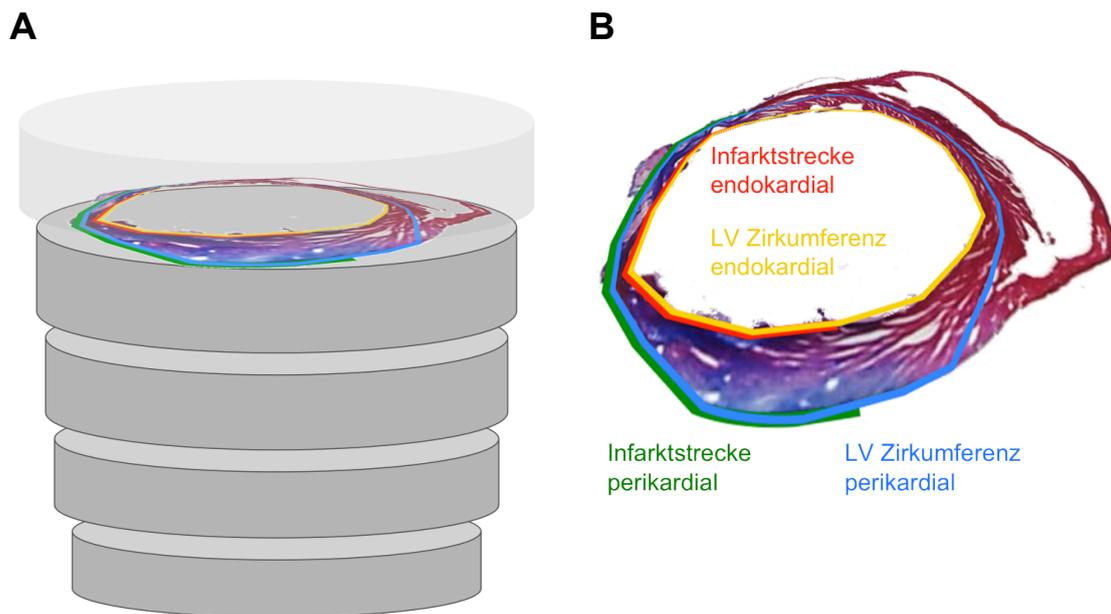


Abbildung 11 A - Definition von vier Schnittebenen zur Berechnung der vertikalen Infarktausdehnung; **B** - Das Infarktareal jeder der vier Schnittebenen wird am Computer perikardial und endokardial vermessen

3.10 Bestimmung der Myozyten-Querschnittsflächen (MCSA)

Die Querschnittsfläche der Myozyten (*myocyte cross sectional area*) hat sich in vielen Studien als Marker der Hypertrophie von Kardiomyozyten bewährt [43, 45-48]. Um sie zu messen, werden pro Herz zwei Objektträger mit 10 µm-Gewebeschnitten verwendet, die mit *Fluorescein-markiertem Peanut Agglutinin* (Vector[®] Laboratories) nach folgendem Prozedere gefärbt werden [43, 49, 50]:

Die gefrorenen Objektträger werden zwei Mal fünf Minuten in PBS pH = 7,4 und anschließend einmal fünf Minuten in PBS pH = 5 gewaschen. Danach werden auf jeden Objektträger 100 µl Neuraminidase (3,3 U/ml in PBS, pH = 5) aufgetragen und die so behandelten Objektträger eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend ist zwei Mal fünf Minuten mit PBS pH = 7,4 zu spülen. Im nächsten Schritt wird der Fluoreszenz-Farbstoff *Fluorescein Peanut Agglutinin* in einer Konzentration von 20 µl/ml PBS (pH = 7,4) aufgetragen. Die Objektträger werden damit zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert und drei Mal fünf Minuten mit PBS pH = 7,4 gewaschen. Zur Darstellung der Zellkerne wird als zweiter Fluoreszenz-Farbstoff *HoechstTM 33258* (Molecular Probes, Inc.; 5 µl/ml PBS; pH = 7,4) verwendet. Mit diesem Farbstoff wird für zehn Minuten bei Raumtemperatur ebenfalls unter Lichtabschluß gegengefärbt. Schließlich werden die Objektträger nochmals drei Mal fünf Minuten in PBS pH = 7,4 gewaschen und danach mit Mowiol (siehe Abschnitt 3.17) eingedeckelt.

Die Fluoreszenz-markierten Gewebeschnitte werden am Konfokalmikroskop (Leica TCS STED), das direkt an einen PC angeschlossen ist, untersucht. Peanut Agglutinin bindet an alle Kollagenstrukturen und markiert dadurch die Umrisse der Kardiomyozyten, während der Hoechst-Farbstoff alle Zellkerne markiert. Für die Messung der MCSA werden Bilder des interventrikulären Septums bei 400facher Vergrößerung erstellt. Die Software (Leica Application Suite) erzeugt sequentiell deckungsgleiche Bilder mit verschiedenen Filtern, in denen der grüne Farbkanal für die Kollagenanteile im Bild und der blaue Kanal für Kernstrukturen stehen. Zur Auswertung dieser Bilder kommt wieder das Programm ImageJ zum Einsatz. In die Auswertung gehen alle senkrecht in der Schnittebene liegenden Kardiomyozyten ein. Sie werden mit der Maus umfahren und markiert, die Software berechnet dann den Flächeninhalt des markierten Areal.

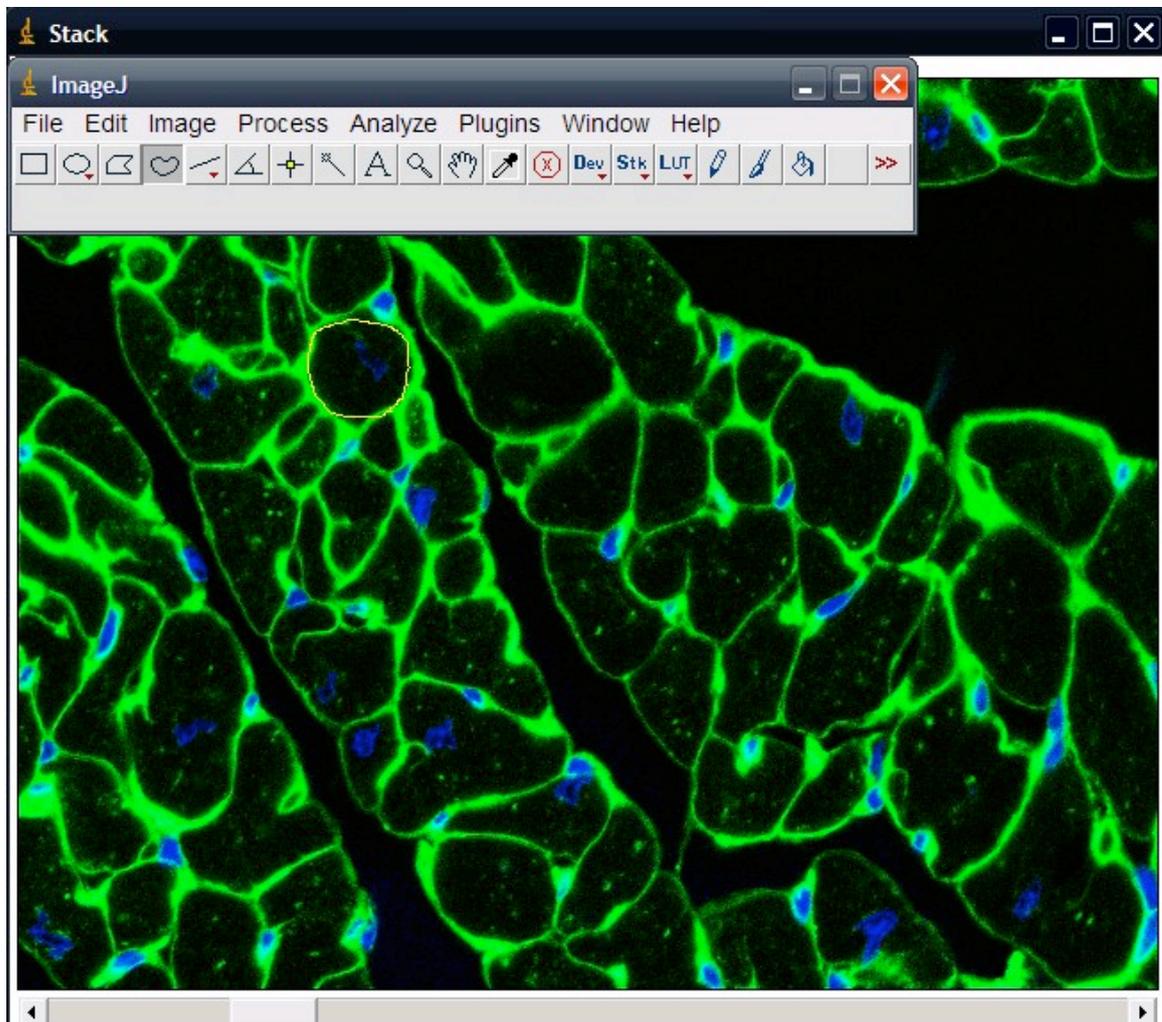


Abbildung 12 Bildschirmfoto eines in ImageJ bearbeiteten Bildausschnitts. **grün** – Kollagenanteile, **blau** – Kernstrukturen, **gelbe Markierung**– per Maus markierter Kardiomyozyt im Querschnitt.

3.11 Messung der interstitiellen Kollagenfraktion

Zur Bestimmung der interstitiellen Kollagenfraktion (ICF) wird auf die in Abschnitt 3.10 beschriebene Fluorescein Peanut Agglutinin-Färbung zurückgegriffen. Der Farbstoff markiert wie erwähnt alle Kollagene und somit auch die intramyokardialen Gefäßwände, die in die Messung des interstitiellen Kollagens jedoch nicht mit eingehen sollen [43, 49]. Deshalb wird mit einem weiteren Fluoreszenz-Farbstoff gefärbt, Rhodamin-markiertem Lectin I der Wasserpflanze Griffonia (*Bandeiraea*) *simplicifolia* (GSL I, BSL I; Vector[®] Laboratories), der selektiv die Blutgefäße markiert, um diesen Anteil später vom Gesamtkollagen subtrahieren zu können.

Analog zum Vorgehen, das in Abschnitt 3.10 beschrieben wird, werden die gefrorenen Objektträger drei Mal fünf Minuten in PBS pH = 7,4 gewaschen. Danach kann der Fluoreszenz-Farbstoff in einer Konzentration von 1:400 aufgetragen werden. So behandelt werden die Objektträger für zwei Stunden bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und anschließend erneut drei Mal in PBS pH = 7,4 gespült, bevor sie mit Mowiol gedeckelt werden können.

Für die Fluoreszenz-Mikroskopie kommt erneut das Leica-Konfokalmikroskop zum Einsatz. Pro Gewebeschnitt werden mehrere Ausschnitte des Ventrikelseptums gespeichert; die markierten Blutgefäße in der Lectin I-Färbung zeigen eine rote Fluoreszenz. Die Auswertung der Fotos zur Quantifizierung des Gefäß-Gehaltes erfolgt semi-automatisiert mittels der Software ImageJ. Die gespeicherten Bilder werden mit der Funktion *Images to stack* als sogenannter Bilderstapel in ImageJ importiert. Danach wird mit der Funktion *RGB split* der rote Farbkanal isoliert, und es entsteht eine 256 Graustufen-Darstellung. Mit der Funktion *Threshold* kann nun ein Schwellenwert definiert werden, oberhalb dessen ein Pixel in die Wertung eingeht (Anmerkungen hierzu in Abschnitt 5.1.3, Seite 43). Das Programm ImageJ berechnet dann den Anteil der gewerteten Pixel am Gesamtbild (das aus 1024 x 1024 Pixeln besteht).

Analog wird mit den Bildern verfahren, die aus der Fluorescein Peanut Agglutinin-Färbung stammen; für diese Bilder wird der grüne Farbkanal isoliert und vermessen.

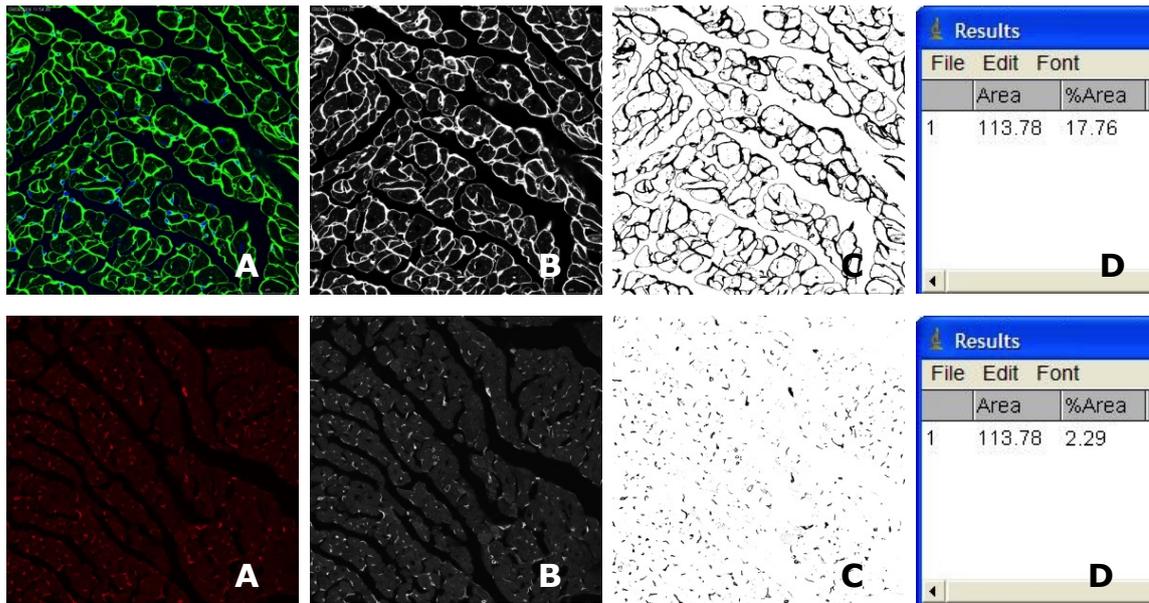


Abbildung 13 Bildauswertung mit ImageJ zur Ermittlung des Gesamtkollagens (**oben**) bzw. der Blutgefäße (**unten**). **A** – RGB-Bild mit allen drei Farbkanälen, **B** – 256 Graustufen nach Aufspaltung der Farbkanäle (oben grüner Kanal, unten roter Kanal), **C** – der über dem vorgegebenen Schwellenwert liegende Bildanteil wird schwarz markiert und in **D** als Prozentsatz der Gesamtfläche ausgegeben.

Für die Berechnung des interstitiellen Kollagens wird jeweils der Mittelwert der Fluorescein- bzw. Rhodamin-markierten Schnittbilder herangezogen:

$$ICF = \%_{Gesamtkollagen} - \%_{Gefäßwandkollagen} \quad (ICF - \text{interstitial collagen fraction})$$

3.12 mRNA-Isolierung

Zur mRNA-Isolierung wird TRIzol® (Invitrogen Inc.) verwendet und nach den Empfehlungen des Herstellers verfahren. Den zuvor bei -80 °C gelagerten Gewebeproben wird jeweils 1 ml TRIzol zugesetzt und das Gewebe mechanisch homogenisiert. Anschließend werden 200 µl Chloroform hinzugefügt und das Homogenisat zunächst für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach bei 12.000 /min für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wird in einem neuen Eppendorf-Gefäß mit 500 µl Isopropanol versetzt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut bei 4 °C mit 12.000 /min für 15 Minuten zentrifugiert. Nun wird der Überstand verworfen und das Pellet zwei Mal mit 75 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Das getrocknete Pellet wird in 25 µl Wasser, das zuvor mittels Diethylcarbonat (Sigma-Aldrich) von RNAsen befreit wurde, aufgelöst und für zehn Minuten bei 60 °C inkubiert. Die RNA-Konzentration kann nun durch Messung der Extinktion bei 260/280 nm Wellenlänge bestimmt werden.

3.13 Reverse Transkription und quantitative *real time*-Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe des SuperScript® *First-Strand Synthesis System* (Invitrogen Inc.) werden RNA-Ketten in Einzelstrang-cDNA-Ketten übersetzt. 2 µl Oligo dT-*primer* werden zu je 10 µg mRNA hinzugegeben und anschließend mit *aqua bidest* auf 21 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Proben werden kurz zentrifugiert und für zehn Minuten bei 65 °C inkubiert. Daraufhin wird die Reverse Transkription durch Zugabe von

- 8 µl Transkriptionspuffer
- 4 µl DTT
- 4 µl 10 mM dephosphoryliertem Nukleosidtriphosphat
- 1 µl Ribonukleaseinhibitor
- 1 µl Reverse Transkriptase (alle invitrogen)

initiiert und der Ansatz für 90 Minuten bei 42 °C inkubiert. Abschließend wird auf 400 µl Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt und die Mixtur bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Polymerase-Kettenreaktion werden pro Ansatz 10 µl cDNA, 0,3 U Taq-Polymerase, je 5 nmol Forwärts- und Rückwärtsprimer, 10 µmol dephosphorylierte Nukleosidtriphosphate, 0,25 µl Fluorescein und 0,5 µl *SybrGreen I* (alle Invitrogen) verwendet. Es folgen

- Denaturierung und Enzymaktivierung bei 95 °C für acht Minuten und
- 45 Zyklen Denaturierung/Primerhybridisierung/Elongation.

Die relative Expression eines Gens wird im Folgenden angegeben als Verhältnis zur Expression von GAPDH (Kopien pro 100 Kopien GAPDH; [51]).

3.14 Protein-Isolierung

Zur Protein-Isolierung werden bei -80 °C gelagerte Gewebeprouben verwendet, die in 400 µl RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH = 7,4, 1 % Triton X-100, 0,2 % Natrium-Desoxycholsäure, 0,2 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 1 mM EDTA) gelöst werden. Die Lösung enthält außerdem 1 mM Phenylmethylsulfonylflurid (PMSF), 5 µg/ml Aprotinin und 5 µg/ml Leupetin. Das Homogenisat wird bei 4 °C für 30 Minuten mit 12.000 /min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Protein-Konzentration im Ansatz wird per BCA Protein Assay (Thermo Scientific Inc.) überprüft und für die Gelelektrophorese verwendet.

3.15 SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) und Western Blot

Die Gewebeprouben werden zunächst mittels Ultraschall homogenisiert und danach für eine Minute auf 99 °C erhitzt. Für den Nachweis von Calsequestrin, Phospholamban, SERCA, N-Cadherin, CaMKII und Calcineurin A werden dann Aliquote von 100 µg Protein für die

Gelelektrophorese in 10 % SDS-Polyacrylamid-Gels geladen und anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus des Ryanodine-Rezeptors wird mit Aliquoten von 200 µg Protein in 5 % SDS-Polyacrylamid-Gels gearbeitet. Es wird der loading buffer (Thermo Scientific Inc.) hinzugegeben und für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert, anschließend kurz zentrifugiert. Das vorbereitete Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gel wird nun mit dem Protein-Lysaten beimpft und eine konstante Stromstärke von 20 mA angelegt. Nachdem das Bromophenolblau das untere Ende des Gels erreicht hat, wird die Elektrophorese beendet und das Gel in den blotting buffer (Thermo Scientific Inc.) eingelegt. Die Nitrocellulosemembran, Filterpapier und Schaumstoff werden ebenso eingetaucht und die Nitrocellulosemembran an der Kathodenseite des Gels platziert. Zum Blotting werden 360 mA für eine Stunde angelegt; im Anschluss wird die Membran für fünf Minuten in TBT-Pufferlösung (50 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween) gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit blocking solution (Thermo Scientific Inc.) behandelt. Bei 4 °C werden die Membranen über zwölf Stunden mit den spezifischen primären Antikörpern inkubiert. Die Detektion der gebundenen primären Antikörper erfolgt mit einem korrespondierenden, an Meerrettichperoxidase-gekoppelten, Antikörper auf Bio light-Film mittels Super Signal West Femto®-Lösung (Thermo Scientific Inc.). Die Blots werden mit einem handelsüblichen Scanner digitalisiert und in ImageJ ausgewertet.

3.16 Proteinphosphataseansatz

Die Proteinphosphataseaktivität wird mit [³²P]-Phosphorylase als Substrat ermittelt [52]. Gewebestückchen des zuvor bei -80 °C eingefrorenen linken Ventrikels werden bei 4 °C mit einer Pufferlösung aus 4 mmol/l EDTA und 15 mmol/l β-Mercaptoethanol (pH 7,4) homogenisiert. Die Lösung wird dann für 20 Minuten bei 14000 /min zentrifugiert.

Die Inkubationslösung enthält 20 mmol/l Tris/HCl (pH 7,0), 5 mmol/l Koffein, 0,1 mmol/l EDTA, und 0,1% β-Mercaptoethanol. Die Reaktion startet mit dem Hinzufügen von Aliquoten des Überstands aus der Zentrifugierung. 3 nmol/l Okadainsäure werden zugegeben, um zwischen PP1- und PP2A-Aktivität zu unterscheiden. Um die Reaktion zu stoppen, wird 50 %ige Essigsäure hinzugegeben.

3.17 Reagenzien

3.17.1 PBS-Lösung (phosphate buffered saline)

Zehnfach konzentrierte PBS-Lösung enthält 80 g NaCl, 2,0 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ und 2,0 g KH₂PO₄, die in einem sterilen Gefäß mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt werden. Der pH-Wert wird auf 7,2 – 7,4 eingestellt.

3.17.2 Paraformaldehyd-Lösung (PFA)

4 %ige PFA-Lösung enthält 40 g PFA, das unter dem Abzug in 800 ml deionisiertem Wasser unter Rühren auf 60 °C erhitzt wird. Die Lösung wird durch Zugabe einiger Tropfen NaOH klar. Danach werden 100 ml zehnfach PBS zugegeben und mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Nun wird die Lösung filtriert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt.

3.17.3 Mowiol

Mowiol-Lösung enthält 0,05 M Trispuffer, 1 % (w/v) Mowiol und 2,4 % (w/v) Glycerol. Zur Herstellung werden auf je 6 ml deionisiertes Wasser 2,4 g Mowiol und 6,0 g Glycerol gegeben. Die Lösung anschließend kräftig durchmischen und vier Stunden stehen lassen. Danach unter ständigem Rühren und Zugabe von 12 ml 0,2 M Trispuffer (pH = 8,5) auf 50 °C erhitzen. Nach ca. zehn Minuten sollte sich die Lösung klären und kann dann bei -20 °C gelagert werden.

3.18 Verwendete Geräte und fertige Gebrauchslösungen

Tabelle 2 verwendete Geräte, fertige Lösungen und jeweiliger Hersteller

Material	Hersteller
Accustain [®] Bouin's Solution	Sigma-Aldrich [®] Chemie GmbH
Altromin Standard-Diät 1320	Altromin Gesellschaft für Tierernährung GmbH
BD Matrigel [™] Matrix Basement	BD Bioscience
DEPC-Lösung	Sigma-Aldrich [®] Chemie GmbH
Fluorescein Peanut Agglutinin	Vector Laboratories Inc.
Forane [®] /Forene [®] (Isofluran)	Drägerwerk AG Lübeck, Abbott GmbH & Co. KG
Hoechst 33528	Molecular Probes, Inc.

Konfokalmikroskop Leica TCS STED	Leica Microsystems Heidelberg GmbH
Kryostat™ HM 500 OM	Microm GmbH, 69190 Wallendorf
Leica Application Suite	Leica Microsystems Heidelberg GmbH
LEJ Fluoreszenzlichtquelle	Leistungselektronik Jena GmbH
Mouse Ventilator MiniVent 845	Hugo Sachs Elektronik, Havard Apparatus GmbH
Polyfreeze™ Tissue Freezing Medium	Polyscience Inc., Warrington, USA
Rhodamin Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia Lectin I (GSL I, BSL I)	Vector Laboratories Inc.
Rimadyl	Pfizer GmbH, Direktionsbereich Tiergesundheit, 76139 Karlsruhe
SuperScript® III FirstStrand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen – LifeTechnologies Inc.
Triton X100 Pufferlösung	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH
TRIzol®	Invitrogen – LifeTechnologies Inc.
Western Blot Kit	Thermo Scientific Inc.
Western Blot Substrates	Thermo Scientific Inc.

3.19 Statistik

In allen Abbildungen werden, sofern nicht anders angegeben, die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Signifikanztests wurden mit dem t-Test für gepaarte oder ungepaarte Stichproben durchgeführt. Eine Überlebenszeitanalyse der Mäuse wurde mittels Kaplan-Meier-Blot durchgeführt und mittels Log-Rank-Test die Gruppen WT und TG verglichen. Es zeigte sich, dass sich die Überlebenskurven von WT und TG am Tag zwei nach Myokardinfarkt überschneiden, sodass die frühe Phase nach MI (Tag 0-2) und späte Phase (Tag 2-28) getrennt ausgewertet wurden. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wird als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Morphometrie

Zu Versuchsbeginn und am Versuchsende wird das Körpergewicht (KG) der Versuchstiere bestimmt. Die am Versuchsende entnommenen Organe Herz, Lunge und Leber werden gewogen und die Tibiallänge notiert.

Tabelle 3 listet die Mittelwerte der morphometrischen Parameter. Neben den absoluten Organgewichten sind auch die relativen Organgewichte bezogen auf das Körpergewicht der Versuchstiere am Tag der Organentnahme angegeben.

Tabelle 3 Morphometrische Daten; * $p < 0,05$ vs. WT sham, # $p < 0,05$ vs. PP2A sham, § $p < 0,05$ vs. WT MI; KG – Körpergewicht, Herz/KG – relatives Herzgewicht am Tag 28, Lunge/KG – relatives Lungengewicht am Tag 28, Leber/KG – relatives Lebergewicht am Tag 28.

	WT sham	PP2A sham	WT MI	PP2A MI
Anzahl Versuchstiere	n = 5	n = 8	n = 11	n = 11
KG Tag 0 [g]			42,3 ± 0,9	43,6 ± 0,9
KG Tag 28 [g]	43 ± 1	46 ± 1 *	41 ± 1	43 ± 1 #
Herzgewicht [mg]	198 ± 24	230 ± 14	291 ± 19*	400 ± 35 #,§
Herz/KG [mg/g]	4,8 ± 0,4	5,1 ± 0,3	6,7 ± 0,5 *	9,4 ± 0,9 #,§
Lungengewicht [mg]	350 ± 20	322 ± 36	453 ± 45 *	623 ± 29 #,§
Lunge/KG [mg/g]	8,3 ± 0,7	7,1 ± 0,9	10,9 ± 1,3	14,7 ± 0,8 #,§
Lebergewicht [mg]	2187 ± 185	2256 ± 200	2040 ± 132	2058 ± 83
Leber/KG [mg/g]	51,0 ± 3,1	49,1 ± 3,3	48,2 ± 2,6	48,2 ± 1,6
Tibiallänge [mm]	12,6 ± 0,4	11,8 ± 0,4	11,8 ± 0,4	12,1 ± 0,5

Bezüglich des Körpergewichts der Versuchstiere bestehen zu Versuchsbeginn keine Unterschiede. Am Tag der Organentnahme, d.h. 28 Tage nach LAD-Verschluss, ist sowohl in WT als auch in PP2A ein Anstieg des Herzgewichts durch den MI zu beobachten. Dieser Anstieg ist innerhalb der WT-Gruppen nicht signifikant, innerhalb der PP2A-Gruppen ist er jedoch ausgeprägter und statistisch signifikant. Das relative Herzgewicht ist sowohl bei WT als

auch bei PP2A in den MI-Gruppen gegenüber den jeweiligen Kontrollen der schein-operierten Tiere (sham) gesteigert.

Auch das Lungengewicht der Versuchstiere steigt in den Infarkt-Gruppen, verglichen mit den jeweiligen sham-Kontrollen, statistisch signifikant an. Eindrücklich ist der Anstieg erneut in der PP2A-MI-Gruppe, die das Lungengewicht der PP2A sham-Gruppe um 93 % und das der WT MI-Gruppe um 37 % übertrifft.

Die Messungen des Lebergewichts und der Tibiallänge ergaben keine relevanten Unterschiede.

4.2 Überlebens-Analyse

Das Überleben der Versuchstiere wurde über 28 Tage nach akutem LAD-Verschluss dokumentiert. Innerhalb der sham-Gruppen überlebten jeweils 100 % der Versuchstiere. Die Mehrzahl der Todesfälle ereignete sich innerhalb der ersten drei Tage nach MI.

In der WT MI-Gruppe sind 7 von 18 operierten Tieren mit LAD-Verschluss vor Versuchsende verstorben. Davon starben zwei an Tag 1, zwei an Tag 2, und jeweils eines am 3., 7. und 11. Tag *post operationem*.

In der PP2A MI-Gruppe ereigneten sich 6 Todesfälle bei insgesamt 23 operierten Tieren. Davon verstarben vier Versuchstiere sofort nach MI und jeweils eines am Tag 1 bzw. am Tag 3 *post operationem*.

Tabelle 4 Anzahl der Versuchstiere in den einzelnen Untergruppen und absolute Überlebensrate innerhalb von 28 Tagen.

	WT sham	PP2A sham	WT MI	PP2A MI
Anzahl Tag 0	n = 5	n = 8	n = 18	n = 23
Anzahl Tag 28	n = 5	n = 8	n = 11	n = 17
Überlebensrate [%]	100	100	61,1 ± 11,5	73,9 ± 9,1

Nach Myokardinfarkt ergeben sich hier keine relevanten Unterschiede zwischen WT und PP2A. Es besteht ein Trend hin zum besseren Überleben nach Myokardinfarkt zugunsten der PP2A-transgenen Tiere.

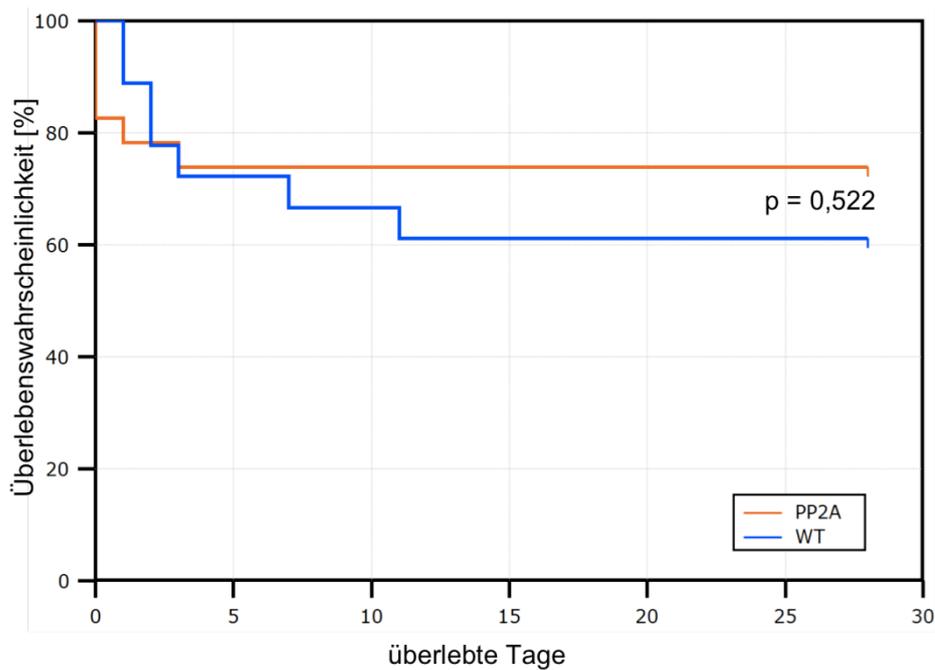


Abbildung 14 Kaplan-Meier-Darstellung, Überlebenskurven der Versuchsgruppen nach LAD-Verschluss (schein-operierte Gruppen nicht dargestellt; Überleben hier jeweils 100%; siehe Text).

In der Kaplan-Meier-Darstellung (Abbildung 14) fällt der unterschiedliche Verlauf der Überlebenskurven auf: in der WT-MI-Gruppe verstirbt keines der Versuchstiere innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem akuten Infarkt ereignis, während bei den PP2A-MI zwei Drittel der Todesfälle unmittelbar nach der OP auftreten. Diejenigen Mäuse aus der PP2A MI-Gruppe, die die ersten 24 Stunden nach LAD-Verschluss überleben, haben dann eine sehr große Chance, das Ende des Beobachtungszeitraums zu erreichen. Bei den WT-Tieren hingegen treten die Todesfälle gleichmäßiger verteilt innerhalb der ersten elf Tage *post operationem* auf. Die Kaplan-Meier Kurve wurde zudem separat für die frühe Phase (Tag 0-2) und die späte Phase (Tag 2-28) ausgewertet. Hierbei zeigte sich in der Frühphase (perioperativ bis Tag 2) ein tendenziell besseres Überleben der Wildtypen, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt wurde. In der späten Phase (Tag 2-28) hingegen wurde ein verbessertes Überleben für TG nachgewiesen ($p=0,05$).

4.3 Echokardiographie

Die Versuchstiere werden vor Induktion des MIs und am Versuchsende vor Herzentnahme echokardiographisch untersucht. Bei der ersten Untersuchung (vor MI) konnten somit nur WT und PP2A unterschieden werden. Für die zweite Untersuchung (vor Versuchsende) wurden die vier Gruppen WT sham, WT MI, PP2A sham und PP2A MI betrachtet.

4.3.1 Echokardiographie – Herzfrequenz

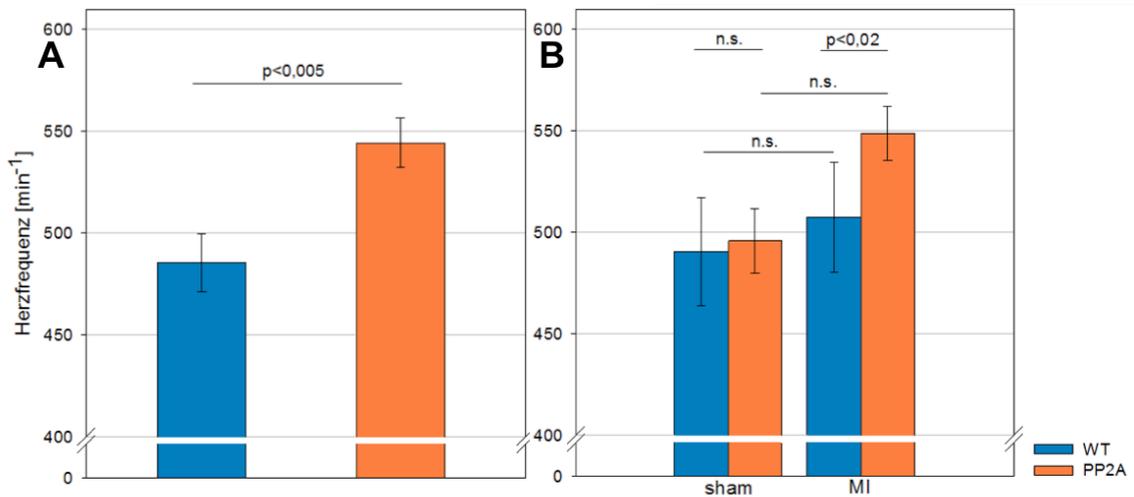


Abbildung 15 Echokardiografische Bestimmung der Herzfrequenz bei adulten Mäusen im Myokardinfarktmodell. **A** Am Versuchsbeginn (vor Infarkt). **B** 28 Tage nach operativem LAD-Verschluss. **WT** – Wildtyp. **PP2A** – PP2A-transgen. **sham** – schein-operierte Versuchstiere. **MI** – Tiere nach Myokardinfarkt.

Zu Versuchsbeginn war die Herzfrequenz der PP2A-transgenen Mäuse signifikant höher als die der WT-Kontrollen.

Am Versuchsende vor der Herzentnahme wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den scheinoperierten Mäusen der WT- bzw. PP2A-Gruppe nachgewiesen. Jedoch ist innerhalb der Gruppen mit chronischem LAD-Verschluss die Herzfrequenz von PP2A-transgenen Tieren gegenüber der der WT-Kontrollen gesteigert.

4.3.2 Echokardiographie – Diameter und Wanddicken

Im Rahmen der Echokardiographie im M-Mode wurden der enddiastolische sowie der endsystolische Innendurchmesser des linken Ventrikels sowie die Wanddicken von Vorder- und Hinterwand ermittelt.

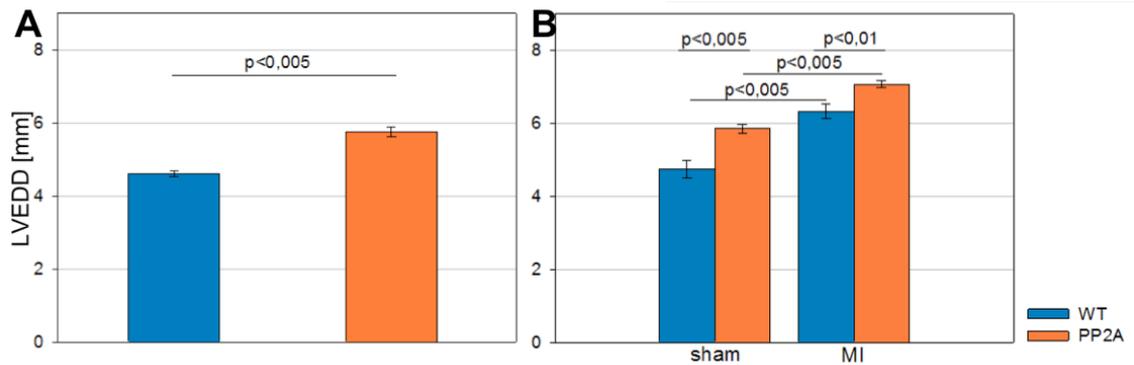


Abbildung 16 Echokardiografische Bestimmung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVEDD) bei adulten Mäusen im Myokardinfarktmodell. **A** Am Versuchsbeginn (vor Infarkt). **B** 28 Tage nach operativem LAD-Verschluss. **WT** – Wildtyp. **PP2A** – PP2A-transgen. **sham** – schein-operierte Versuchstiere. **MI** – Tiere nach Myokardinfarkt.

Bereits zu Versuchsbeginn weisen die Mäuse der PP2A-Gruppe eine Dilatation des linken Ventrikels auf. Der Vergleich der schein-operierten Gruppen am Versuchsende bestätigt diese Tatsache. Innerhalb der MI-Gruppen kommt es sowohl bei WT als auch bei PP2A-transgenen Tieren zu einer Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVEDD) als Ausdruck der infarktbedingten linksventrikulären Dilatation, die PP2A-Transgenen erreichen hierbei signifikant höhere Werte als WT-MI.

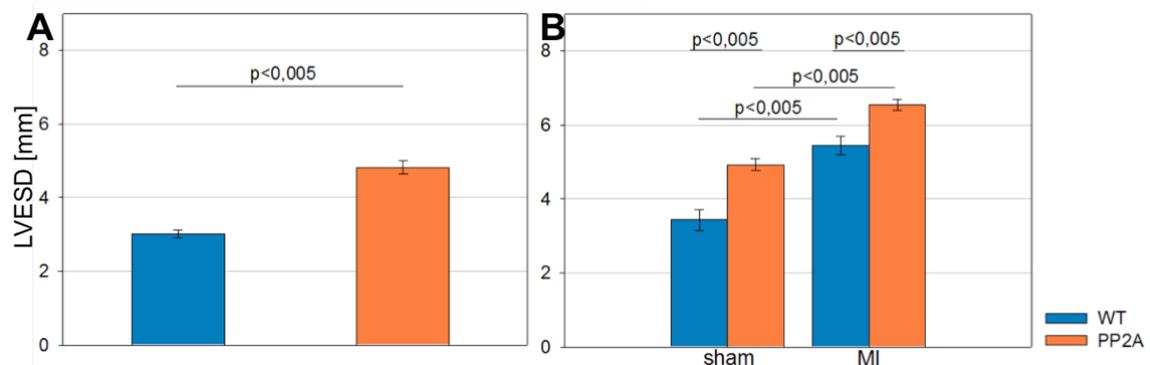


Abbildung 17 Echokardiografische Bestimmung des linksventrikulären endsystolischen Durchmessers (LVESD) bei adulten Mäusen im Myokardinfarktmodell. **A** Am Versuchsbeginn (vor Infarkt). **B** 28 Tage nach operativem LAD-Verschluss. **WT** – Wildtyp. **PP2A** – PP2A-transgen. **sham** – schein-operierte Versuchstiere. **MI** – Tiere nach Myokardinfarkt.

Für die Messung des linksventrikulären endsystolischen Innendurchmessers (LVESD) finden sich in qualitativer Hinsicht identische Ergebnisse wie soeben für den LVEDD geschildert: zu Versuchsbeginn und innerhalb der sham-Gruppen war auch der endsystolische Innendurchmesser des linken Ventrikels in der PP2A-Gruppe vergrößert. Es zeigte sich eine Ventrikeldilatation nach Myokardinfarkt in beiden Gruppen (WT und PP2A), innerhalb der PP2A-Gruppen fiel die Diameter-Zunahme stärker aus als in den Kontrollen (WT-Gruppen).

Tabelle 5 Mittlere enddiastolische Wanddicken des linken Ventrikels bei Versuchsbeginn und -ende; * $p < 0,05$ vs. WT (sham), # $p < 0,05$ vs. PP2A sham; **SPT** – Septumdicke, **HW** – Hinterwanddicke.

	Versuchsbeginn		Versuchsende			
	WT	PP2A	WT sham	PP2A sham	WT MI	PP2A MI
SPT [mm]	0,76 ± 0,03	0,66 ± 0,03 *	0,84 ± 0,07	0,64 ± 0,04 *	0,74 ± 0,04 *	0,64 ± 0,03
HW [mm]	0,73 ± 0,03	0,63 ± 0,03 *	0,70 ± 0,05	0,61 ± 0,08	0,47 ± 0,04 *	0,40 ± 0,04 #

Echokardiographisch wurden bereits zu Versuchsbeginn (d.h. vor Infarkt-Induktion) deutlich geringere Wanddicken in der PP2A-Gruppe verglichen mit WT gemessen. Am Versuchsende bestätigt sich dies bei Betrachtung der sham-Gruppen.

Der operative LAD-Verschluss führt innerhalb der WT-Gruppe zu einer Abnahme der Dicke der linksventrikulären Vorderwand. In beiden Gruppen hat der Myokardinfarkt eine Verringerung der linksventrikulären Hinterwanddicken zur Folge.

4.3.3 Echokardiographie – Parameter der Pumpfunktion

Als Parameter der Pumpfunktion wird im M-Mode die shortening fraction [53] bestimmt. Ergänzend wird die fraction of area change (FAC) als zweidimensionaler Parameter im B-Mode berechnet.

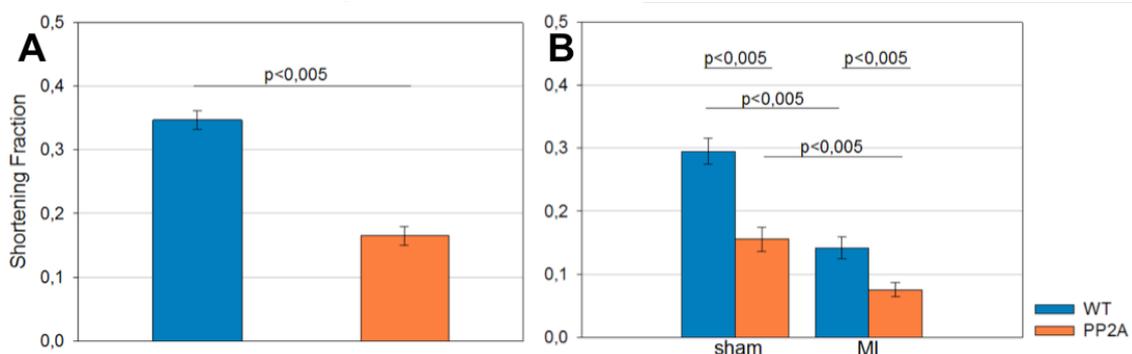


Abbildung 18 Echokardiografische Bestimmung der shortening fraction (FS) bei adulten Mäusen im Myokardinfarktmodell. **A** Am Versuchsbeginn (vor Infarkt). **B** 28 Tage nach operativem LAD-Verschluss. **WT** – Wildtyp. **PP2A** – PP2A-transgen. **sham** – schein-operierte Versuchstiere. **MI** – Tiere nach Myokardinfarkt.

Beide dargestellten Parameter der Pumpfunktion zeigen ein weitestgehend einheitliches Bild. Bereits zu Versuchsbeginn erreichten die PP2A-transgenen Mäuse nur etwa die Hälfte der

Werte, die für die Wildtypen aufgezeichnet wurden. Dies bestätigt sich jeweils bei den Messungen am Versuchsende beim Vergleich der schein-operierten Gruppen. Nach Myokardinfarkt findet sich sowohl bei WT als auch bei PP2A eine deutliche Einschränkung der systolischen LV-Funktion. Bei der Betrachtung der Messwerte fällt auf, dass sich nach LAD-Verschluss in der Kontrollgruppe eine Einschränkung der LV-Funktion entwickelt, die in etwa dem Ausgangswert der PP2A sham-Tiere (ohne Infarkt) entspricht.

Bezogen auf die FAC ergibt sich für die WT MI-Gruppe ein prozentualer Abfall der LV-Pumpleistung um 43,7 % gegenüber dem Ausgangswert; für die PP2A MI analog ein Abfall der LV-Pumpleistung um 31,2 %.

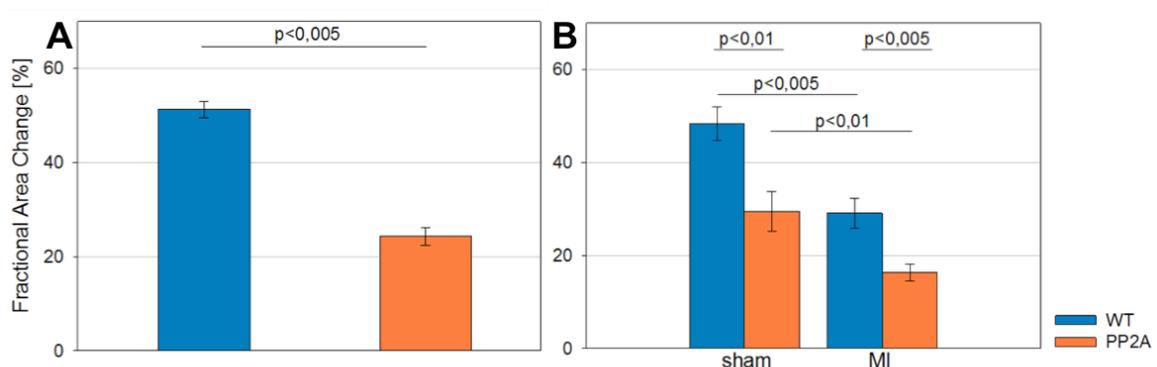


Abbildung 19 Echokardiografische Bestimmung der fraction of area change (FAC) bei adulten Mäusen im Myokardinfarktmodell. **A** Am Versuchsbeginn (vor Infarkt). **B** 28 Tage nach operativem LAD-Verschluss. **WT** – Wildtyp. **PP2A** – PP2A-transgen. **sham** – schein-operierte Versuchstiere. **MI** – Tiere nach Myokardinfarkt.

4.4 Histologische Analyse des Infarktareals

4.4.1 Vergleich der histologischen Übersichtsaufnahmen

Die Trichromfärbung ist sehr gut zur Differenzierung zwischen Bindegewebe und Muskulatur geeignet. Muskelgewebe wird rötlich, Bindegewebe hingegen blau angefärbt (vgl. Abbildung 20). Zu erkennen sind jeweils die muskelstarken linken Ventrikel mit ihrem großen Lumen und die rechten Ventrikel mit einer im Vergleich zarten muskulären Wand (deren Kontur unterliegt teilweise Präparationsartefakten).

WT sham in Abbildung 20 repräsentiert den physiologischen Normalfall (Wildtypmaus ohne Myokardinfarkt). Der linke Ventrikel ist annähernd rund, seine muskelstarke (rot angefärbte) freie Wand weist eine gleichbleibende Dicke auf. Im Bild sind die Anschnitte der Papillarmuskeln erkennbar. Zwischen den beiden Herzkammern liegt das *Septum interventrikulare*. Der rechte Ventrikel erscheint viel kleiner und folgt der Kontur des linken Ventrikels, seine Wandstärke ist deutlich geringer als die der linken Herzkammer.

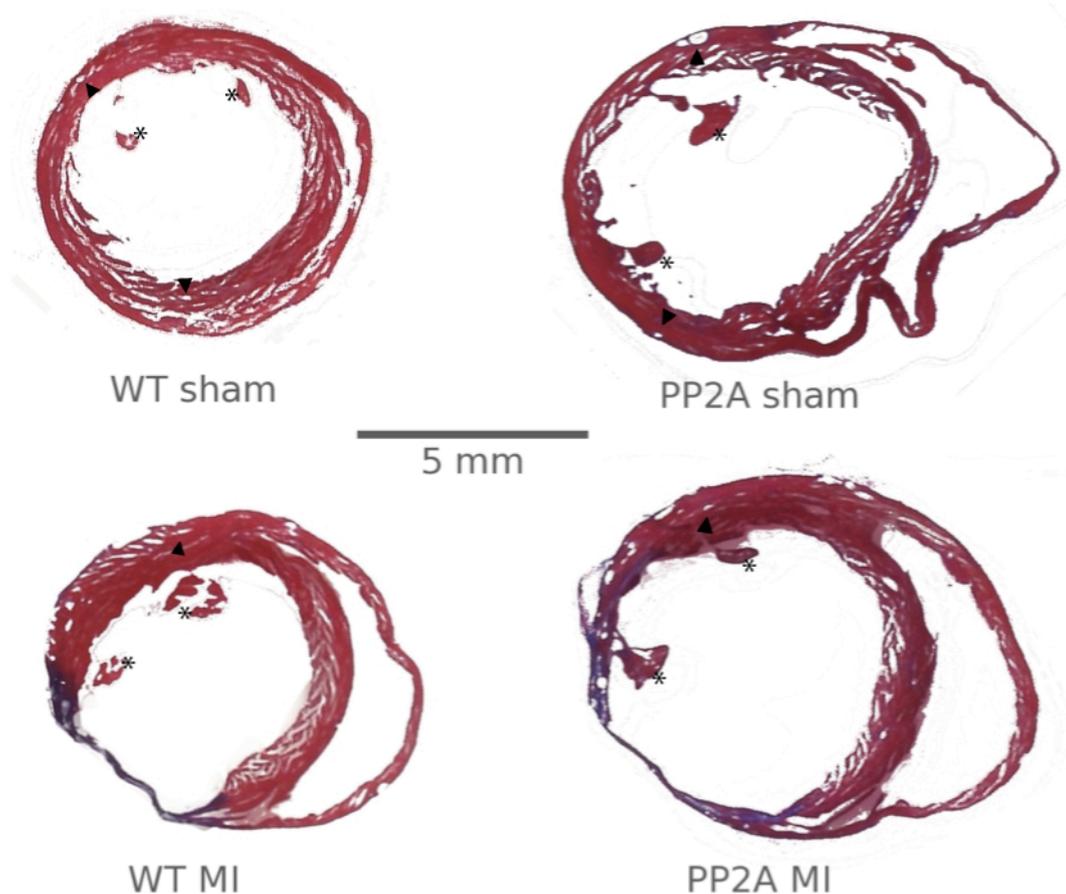


Abbildung 20 Beispiele von Trichrom-gefärbten Schnitten (50 μm Schnittdicke) der Herzen mit gleichem Maßstab und vergleichbaren Schnittebenen (Anschnitte der Papillarmuskeln in den Präparaten) nach 28 Tagen Versuchszeitraum; * – Papillarmuskelanschnitte, **Pfeilspitzen** – Anschnitte der Koronargefäße. **WT** – Wildtyp. **PP2A** – PP2A-transgen. **sham** – scheinoperierte Versuchstiere. **MI** – Tiere nach Myokardinfarkt.

Vergleicht man diese Befunde mit nicht-infarzierten PP2A-Tieren (PP2A sham), so fällt auf, dass bei PP2A-Mäusen der linke Ventrikel insgesamt dilatiert ist. Die muskuläre Wand des linken Ventrikels ist ungleichmäßig dick, an der freien Wand (auf etwa 9 Uhr) und direkt gegenüber im Bereich des *Septum interventrikulare* (auf 3 Uhr) erscheint sie besonders dünn. Auffällig sind auch architektonische Veränderungen des Myokards, das zum einen in beiden Ventrikeln blau angefärbte bindegewebige Inseln enthält und zum anderen aufgelockerter wirkt. Bei den beiden Bildern aus den Infarktgruppen (MI) imponiert deutlich die blaue Infarkt Narbe (kollagenes Bindegewebe) in der Vorderwand des linken Ventrikels. Das Narbengewebe ist erheblich dünner als die verbliebene intakte Muskulatur der linken Herzkammern. Sowohl bei WT MI als auch PP2A MI ist innerhalb der Infarktzone die Muskulatur vollständig von Bindegewebe ersetzt worden, wobei sich jeweils eine Übergangszone am *Septum interventrikulare* bzw. in der freien Wand des linken Ventrikels entwickelt hat, die blau gefärbte bindegewebige und rot gefärbte muskuläre Anteile enthält. Die stärkere Dilatation des linken

Ventrikels der PP2A MI im Vergleich zu WT MI ist unschwer zu erkennen. Und ebenso wie schon beim Vergleich der sham-Gruppen scheint auch in PP2A MI verglichen mit WT MI die Struktur des verbliebenen Myokards gestört und aufgelockert.

Bei der Betrachtung des primär nicht von der Ischämie betroffenen Myokards (*remote myocardium*) fällt auf, dass die Muskulatur des *Septum interventrikulare* eine Hypertrophie entwickelt. Während bei WT-Mäusen dieser Effekt nur in geringem Umfang zu erkennen ist, wurde eine deutliche Zunahme der Septumdicke bei PP2A-Tieren nach MI ermittelt.

4.5 Infarktgrößen

Die Ausdehnung des Myokardinfarkts wird anhand der Trichromfärbung in histologischen Übersichtsaufnahmen des linken Ventrikels im Querschnitt quantitativ bestimmt (vgl. Abschnitt 3.9.).

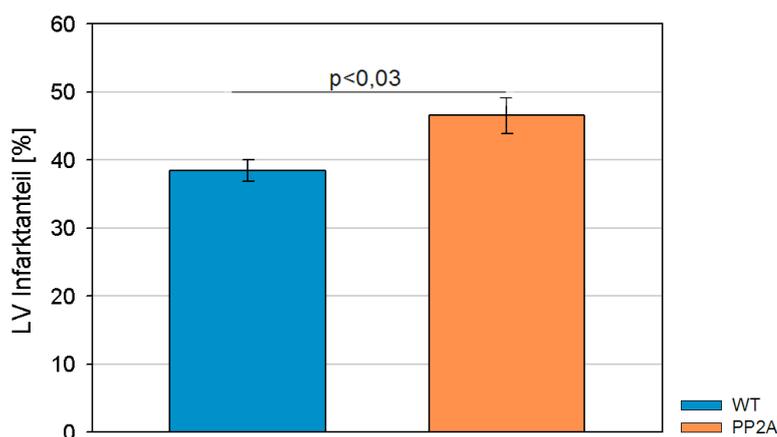


Abbildung 21 prozentualer Anteil infarzierten Myokards in den Versuchsgruppen WT MI und PP2A MI 28 Tage nach LAD-Ligatur. **LV** – linksventrikulärer. **WT** – Wildtyp. **PP2A** – PP2A-transgen.

Der mittlere Anteil infarzierten Myokards lag bei den Wildtypen bei $38,4 \pm 1,5$ %. In der Gruppe der transgenen Mäuse hingegen im Mittel $46,5 \pm 2,6$ % ($p < 0,03$).

4.6 Veränderungen des infarktfernen Myokards (*remote myocardium*)

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fluoreszenzfärbungen verwendet, um Aussagen über Hypertrophie der Kardiomyozyten und fibrotische Veränderungen des *remote myocardiums* im *Septum interventriculare* treffen zu können.

4.6.1 Myozyten-Querschnittsfläche (*myocyte cross sectional area*)

Die Bestimmung der mittleren Querschnittsfläche der Kardiomyozyten erfolgte, wie in Kapitel 3.10 beschrieben, anhand konfokalmikroskopischer Aufnahmen nach Anfärbung des interstitiellen Kollagens zur Visualisierung der Zellgrenzen.

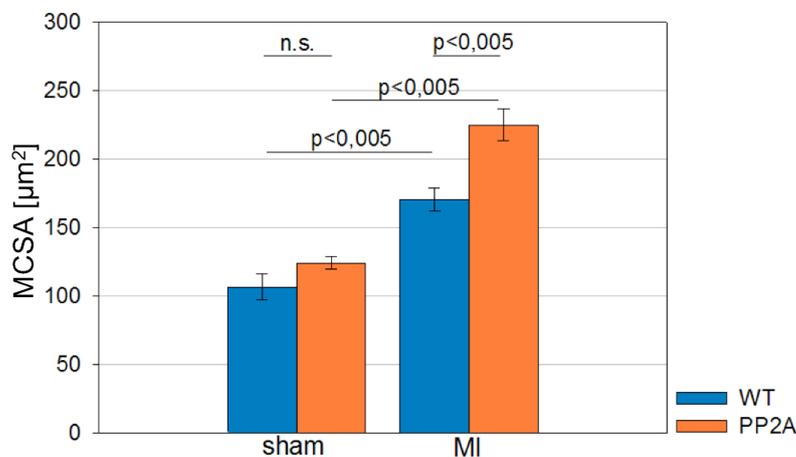


Abbildung 22 Myozyten-Querschnittsfläche (*myocyte cross sectional area*), im Septum interventriculare 28 Tage nach LAD-Verschluss. **WT** – Wildtyp. **PP2A** – PP2A-transgen. **sham** – schein-operierte Versuchstiere. **MI** – Tiere nach Myokardinfarkt.

Im Vergleich der Gruppen ohne Myokardinfarkt weisen PP2A-Transgene tendenziell größere Kardiomyozyten-Querschnittsflächen auf als Wildtypen. Die Induktion des Myokardinfarktes führt bei beiden Genotypen jeweils zu einer signifikanten Hypertrophie: In WT steigt die MCSA um 60% in der MI-Gruppe (WT sham: $106 \pm 9 \mu\text{m}^2$, WT MI: $170 \pm 8 \mu\text{m}^2$), in PP2A findet sich ein Anstieg um 81 % (PP2A sham: $124 \pm 4 \mu\text{m}^2$, PP2A MI: $225 \pm 11 \mu\text{m}^2$). Für den Vergleich WT MI vs. PP2A MI zeigt sich ebenfalls ein signifikant höherer Kardiomyozyten-Querschnitt in der transgenen Gruppe.

4.6.2 Interstitielle Kollagenfraktion

Neben der Hypertrophie der Muskulatur ist die Zunahme des interstitiellen Bindegewebes ein weiterer wichtiger Gradmesser für die Umbauprozesse im Myokard nach Infarkt.

Die Färbung mit Fluorescein-markiertem Peanut-Agglutinin, die auch für die Bestimmung der MCSA herangezogen wurde, ist die Grundlage für die computergestützte Berechnung der interstitiellen Kollagenfraktion (ICF). Das Ergebnis dieser Färbung wird in einem zweiten Schritt mit dem Anteil der im Myokard enthaltenen Blutgefäße (Fluoreszenzfärbung mit Rhodamin-markiertem Lectin 1) verrechnet, um einer Verfälschung der Ergebnisse durch Gefäßwandkollagen entgegenzuwirken. (siehe Abschnitt 3.11).

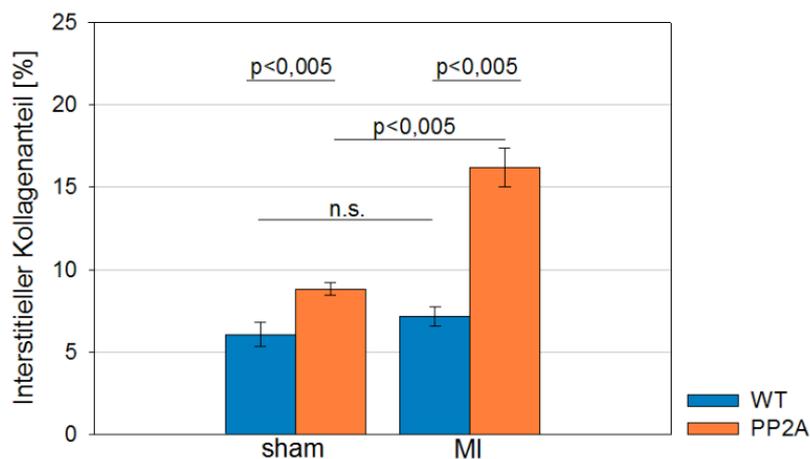


Abbildung 23 Interstitieller Kollagenanteil im Septum interventriculare 28 Tage nach LAD-Verschluss. **WT** – Wildtyp. **PP2A** – PP2A-transgen. **sham** – schein-operierte Versuchstiere. **MI** – Tiere nach Myokardinfarkt.

Auch diese Untersuchungen zeigen große Unterschiede zwischen WT und PP2A auf. Gemessen wurde der Flächenanteil in Prozent der konfokalmikroskopischen Schnittbilder.

Bereits unter Basalbedingungen (d.h. ohne Myokardinfarkt) zeigt sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des interstitiellen Kollagenanteils in der Gruppe WT sham und PP2A sham. Für die WT sham-Gruppe wurde eine ICF von $6,1 \pm 0,7$ % ermittelt. In der WT MI-Gruppe ergibt sich mit $7,2 \pm 0,6$ % kein signifikanter Unterschied hierzu. PP2A sham hingegen liegen mit $8,8 \pm 0,4$ % signifikant über dem Wert der WT sham-Gruppe.

Während nach dem LAD-Verschluss in der WT-Gruppe der Fibrosegrad nur minimal zunimmt, erhöht sich der interstitielle Kollagenanteil in PP2A MI verglichen mit PP2A sham um rund 84 % und übertrifft WT MI um 125 % (WT MI $7,2 \pm 0,6$ %, PP2A MI $16,2 \pm 1,2$ %). Innerhalb der Transgenen Gruppen PP2A sham vs. PP2A MI ergibt sich somit ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Fibrose nach Induktion des Myokardinfarkts.

4.7 Molekularbiologische Untersuchungen

4.7.1 Expression der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β

Innerhalb der Wnt-Signalkaskade spielt die Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) eine wichtige Rolle (siehe auch Abschnitt 1.5.). Um zu überprüfen, ob die Aktivität dieses Enzyms durch die Überexpression von PP2A im Myokard beeinflusst wird, wurde der Gehalt an phosphorylierter GSK3 β per Western-Blot erfasst.

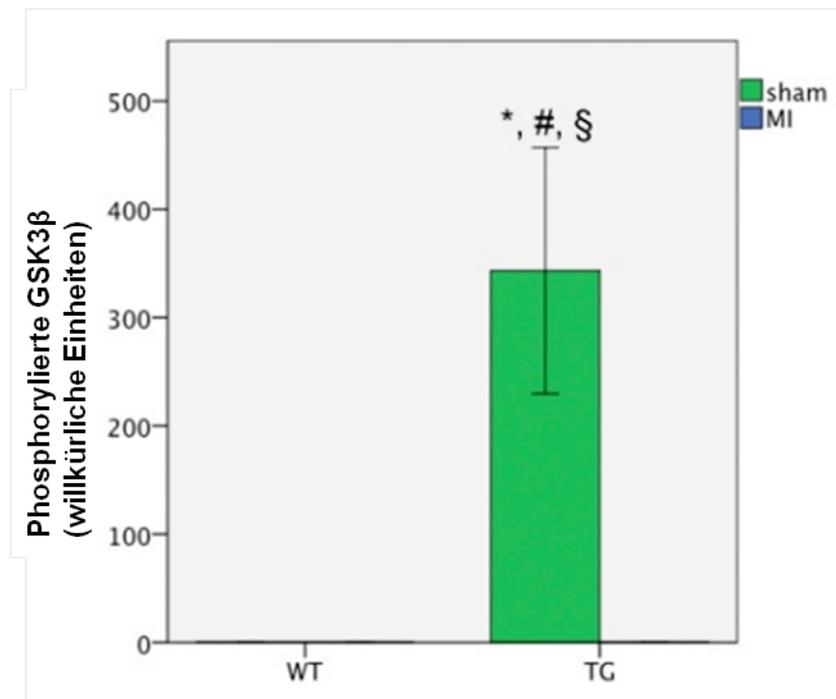


Abbildung 24 Western Blot-Analyse: Quantifizierung an Serin 9 phosphorylierter Glykogen Synthase Kinase 3 β . * signifikanter Unterschied vs. WT sham. # signifikanter Unterschied vs. WT MI. § signifikanter Unterschied vs. TG MI. **WT** – Wildtyp. **TG** – PP2A-transgen. **sham** – schein-operierte Versuchstiere. **MI** – Tiere nach Myokardinfarkt.

Hierbei zeigt sich für WT sham, WT MI und PP2A MI nahezu kein Signal. In der PP2A sham-Gruppe ist demgegenüber ein starkes Signal bezüglich phosphorylierter GSK3 β detektierbar.

Im Hinblick auf den Einfluss des chronischen Myokardinfarkts lässt sich somit bei Betrachtung der Wildtyp-Tiere (WT sham und WT MI) kein Unterschied feststellen. Interessanterweise sinkt der Gehalt an phosphorylierter GSK3 β in der PP2A-Gruppe durch den chronischen LAD-Verschluss jedoch auf vergleichbar niedrige Werte wie in den WT-Gruppen.

4.7.2 Expression von β -Catenin

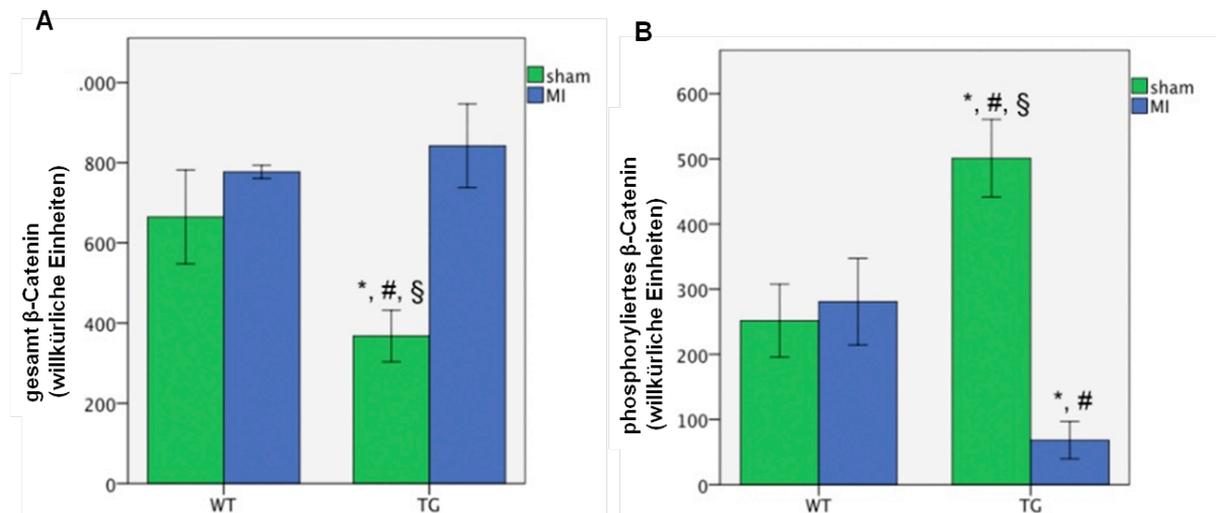


Abbildung 25 Western Blot-Analyse: **A** globale β -Catenin-Quantifizierung. **B** an Serin 552 phosphoryliertes β -Catenin. * signifikanter Unterschied vs. WT sham. # signifikanter Unterschied vs. WT MI. § signifikanter Unterschied vs. TG MI. **WT** – Wildtyp. **TG** – PP2A-transgen. **sham** – schein-operierte Versuchstiere. **MI** – Tiere nach Myokardinfarkt.

Die Analyse der β -Catenin-Expression mittels Western Blot zeigt unter Basalbedingungen (ohne LAD-Verschluss) eine signifikant geringere β -Catenin-Expression bei PP2A-Tieren im Vergleich zu WT-Kontrollen. Im chronischen Myokardinfarkt kommt es bei WT zu einer allenfalls geringen Steigerung der β -Catenin-Expression, wohingegen sich bei PP2A-Tieren eine signifikante Zunahme verzeichnen lässt, die das Niveau der WT-Tiere erreicht.

Betrachtet man nur an Serin 552 phosphoryliertes β -Catenin, so zeigt sich in den Wildtypen nach Myokardinfarkt kein signifikanter Unterschied; die Transgenen weisen im Vergleich WT sham vs. TG sham eine gesteigerte Expression von an Serin 552 phosphoryliertem β -Catenin auf; nach Myokardinfarkt wurde eine deutlich erniedrigte Expression von an Serin 552 phosphoryliertem β -Catenin detektiert.

4.7.3 Quantifizierung von Protein-Kinase B

Auch die Protein-Kinase B interferiert mit dem Wnt-Signalweg (siehe Abschnitt 1.5.). PKB (Synonym Akt) existiert in drei Isoformen, die weitgehend homolog sind. Per Western Blot wurde der Gehalt aller drei Isoformen des Enzyms quantifiziert.

Zwischen den verschiedenen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Weder der Genotyp der eingesetzten Tiere noch der chronische Myokardinfarkt führen zu einer relevanten Änderung der Protein-Expression von PKB.

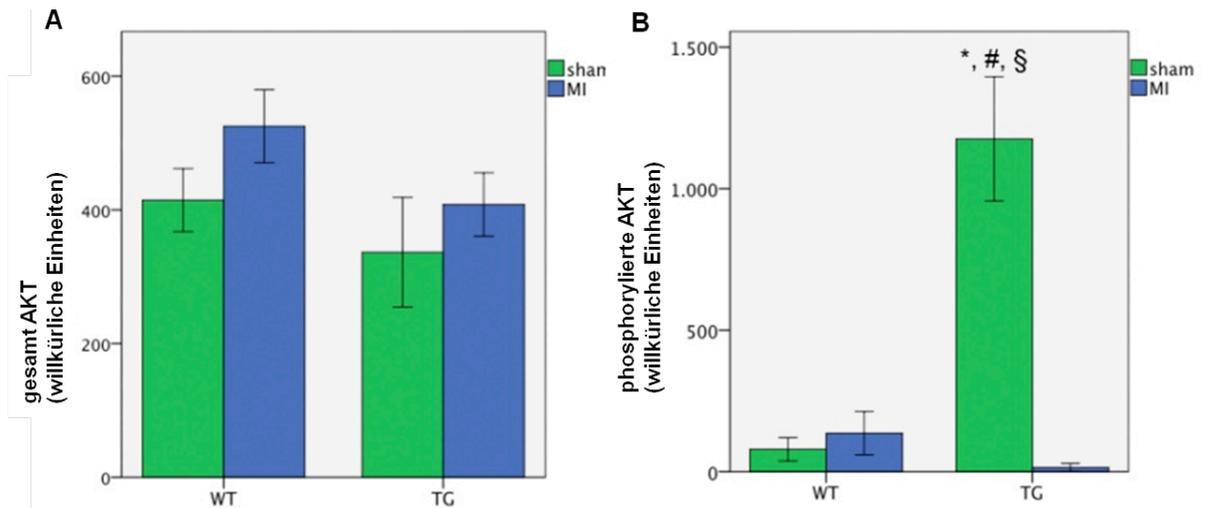


Abbildung 26 Western Blot-Analyse: **A** globale Akt-Quantifizierung. **B** phosphorylierte Akt. * signifikanter Unterschied vs. WT sham. # signifikanter Unterschied vs. WT MI. § signifikanter Unterschied vs. TG MI. **WT** – Wildtyp. **TG** – PP2A-transgen. **sham** – schein-operierte Versuchstiere. **MI** – Tiere nach Myokardinfarkt.

Hinsichtlich des Phosphorylierungsgrades von Akt konnte eine erhöhte Expression bei den Transgenen in der sham-Gruppe gezeigt werden, welche nach LAD-Ligatur nicht nachweisbar war.

5 Diskussion

5.1 Methodenkritik

Jede Methode und jedes Verfahren unterliegt einer gewissen Stör- und Fehleranfälligkeit, die es zu minimieren gilt. In der vorliegenden Arbeit sind insbesondere folgende Aspekte im Hinblick auf die Ultraschall-basierten und histologischen Untersuchungen erwähnenswert.

5.1.1 Echokardiographie

Die transthorakale Echokardiographie bei Mäusen ist ein mittlerweile gut etabliertes Verfahren [44]. In den eigenen Untersuchungen wurde ein handelsübliches Ultraschallgerät verwendet. Der eingesetzte Schallkopf wurde primär für die Echokardiographie in der Kinderkardiologie entwickelt. Da die notwendige Eindringtiefe ins Gewebe aufgrund der anatomischen Gegebenheiten bei der Maus sehr gering ist, kann die Ultraschallfrequenz erhöht werden, so dass eine entsprechend höhere Orts- und Zeitauflösung erreicht wird. Dies wurde im Rahmen der vorgestellten Untersuchungen beachtet (gewählte Frequenz des Schallkopfes: 10 MHz).

Sämtliche Parameter wurden bei jedem Untersuchungsgang in drei unabhängigen Anlotungen nacheinander aufgezeichnet. Hierbei zeigte sich eine adäquate Wiederholungsgenauigkeit. In alle Berechnungen ging der Mittelwert aus den Messwiederholungen ein.

Um systematische Fehler zu vermeiden, wurden sämtliche Ultraschall-gestützten Untersuchungen vom selben Untersucher und verblindet durchgeführt.

5.1.2 Anfertigung der histologischen Präparate

Die Fluoreszenzfärbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen unterliegen einem Alterungsprozess, d.h. die emittierte Lichtintensität auf Grund einer konstanten Anregungsenergie sinkt mit der Zeit. Deshalb ist es wichtig, die frisch gefärbten Präparate innerhalb einer kurzen Zeitspanne auszuwerten und zu dokumentieren. Während des Mikroskopierens wurde für die Auswahl der entsprechenden Anregungsenergie am Laser-Scanning-Mikroskop die automatische Funktion der Steuerungs-Software verwendet, um eine einheitliche Quantifizierung zu ermöglichen.

5.1.3 Computer-gestützte Auswertung

Zur Messung des Kardiomyozyten-Querschnitts wurden ausgewählte Anschnitte von Kardiomyozyten im *remote myocardium* des *Septum interventriculare* per Mauszeiger umfahren und so in ihrer Fläche vermessen. Die Auswahl der entsprechenden Zellen, die in die Messung eingehen sollten, lag beim Untersucher, weswegen alle Messungen verblindet vom selben Untersucher durchgeführt und jeweils alle kreisförmig angeschnittenen Kardiomyozyten

in den entsprechenden mikroskopischen Aufnahmen analysiert wurden. Die gewonnenen Ergebnisse stimmen für die Wildtyp-Studienpopulationen sehr gut mit den Werten überein, die sich in der Literatur finden [49, 54, 55], so dass die Messungen als verlässlich gelten können.

Abbildung 13 (siehe Seite 24) zeigt die Vorgehensweise zur computer-gestützten Ermittlung des Gesamtkollagenanteils pro Flächeneinheit. Die einzelnen Schritte laufen als sogenanntes „Makro“ (*macroinstructions*; automatisierte Befehlsabfolge) im Programm ImageJ ab. In Abschnitt 5.1.2. wird erläutert, dass in den gespeicherten Fluoreszenzaufnahmen zum Teil unterschiedliche Kontrastverhältnisse vorlagen. Deswegen musste der Schwellenwert (*threshold*) von Serie zu Serie neu definiert werden. Dies wurde von Hand wiederum verblindet durchgeführt, sodass offensichtliche Artefakte nicht mit in die Messung eingingen. Um systematische Fehler zu minimieren, wurden pro Versuchstier und Fluoreszenzkanal mindestens 20 Bildausschnitte automatisch ausgewertet. Im Sinne einer Plausibilitätskontrolle wurden außerdem automatisch offensichtliche Fehlmessungen eliminiert, indem nur Ergebnisse innerhalb eines bestimmten Intervalls gewertet wurden (z.B. 2...20 % des Flächeninhalts).

5.2 Kardialer Phänotyp der PP2A-transgenen Mäuse unter basalen Bedingungen

In der Arbeitsgruppe um Prof. Neumann und Dr. Gergs (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, MLU Halle-Wittenberg) wurde der PP2A-transgene Mausstamm initial charakterisiert [23]. Dabei wurde ein erhöhtes absolutes und relatives Herzgewicht (kardialer Index) gegenüber den Kontrollen bereits im Alter von zehn Wochen festgestellt. Weiterhin konnte eine Zunahme des Querschnitts der Kardiomyozyten im Sinne kardialer Hypertrophie nachgewiesen werden. Die Hämodynamik während der Herzkatheteruntersuchung ergab eine Reduktion des linksventrikulären systolischen und eine Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks. Nach Infusion von Dobutamin wurde gezeigt, dass der maximal erreichbare linksventrikuläre Druckanstieg im Vergleich zu den Kontrollen vermindert war. In der Echokardiographie erfolgte der Nachweis erhöhter linksventrikulärer endsystolischer und enddiastolischer Innendurchmesser (linksventrikuläre Dilatation) und einer eingeschränkten linksventrikulären Pumpfunktion. Die linksventrikuläre Dilatation war schon in acht Wochen alten Individuen nachweisbar, linksventrikuläre Kontraktilitätseinschränkungen wurden jedoch erst im späteren Verlauf nach 16 Wochen manifest. In ersten histologischen Untersuchungen fielen Nekroseinseln und Anzeichen von Fibrose im Myokard auf [23].

Diese Charakteristika bestätigen sich für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an sham-Tieren bzw. in vor Induktion des Myokardinfarkts erhobenen Daten. Innerhalb der sham-Gruppen erreichten die Versuchstiere in etwa ein Alter von 28 bis 29 Wochen (WT sham 27,6 ±

1,8 Wochen; PP2A sham $28,8 \pm 5,0$ Wochen). Über den Untersuchungszeitraum wurden in beiden sham-Gruppen keine Todesfälle aufgezeichnet.

Die dilatative Kardiomyopathie beim Menschen zeichnet sich durch Vergrößerung des linken Ventrikels und erhöhte linksventrikuläre Füllungsdrücke aus [17, 18]. In Analogie hierzu kann man die kardialen Veränderungen bereits in der PP2A sham-Gruppe als dilatative Kardiomyopathie auffassen. Häufig wird die dilatative Kardiomyopathie beim Menschen durch Ödeme, Gewichtszunahme und Dyspnoe bei eingeschränkter körperlicher Belastbarkeit symptomatisch; die Sterblichkeit ist erhöht [17, 18]. Die vorliegenden Ergebnisse geben keinen Hinweis auf eine Flüssigkeitsretention innerhalb der PP2A sham-Gruppe. Untersuchungen zur körperlichen Leistungsfähigkeit der Mäuse waren nicht Gegenstand dieser Arbeit. Eine erhöhte Mortalität über den Untersuchungszeitraum wurde nicht festgestellt, wobei eine Überlebens-Analyse hinsichtlich des Spontanverlaufs nicht Ziel der Untersuchung war und keinen fixen zeitlichen Endpunkt (hier 28 Tage post sham-OP) haben dürfte.

Die vorangegangene Arbeit von Gergs und Neumann [23] ergab, dass im PP2A-transgenen Mausstamm der Phosphorylierungsstatus von Phospholamban (PLB), Troponin Inhibitor (TnI) und des eukaryoten Elongationsfaktors 2 (eEF2) reduziert waren. PLB hat eine regulatorische Funktion sowohl auf die Kontraktilität (Inotropie) als auch auf die Herzfrequenz (Chronotropie), indem es die Aktivität der Sarkoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase 2 (SERCA2), die den pulsatilen Ca^{2+} -Fluß aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum kontrolliert, beeinflusst. Die Aktivität von PLB ist abhängig vom Phosphorylierungsgrad; es ist Substrat der Proteinkinasen A und C (PKA und PKC) und Ca^{2+} /Calmodulin abhängigen Protein Kinase (CaMK) sowie PP2A [56, 57]. In einem transgenen Mausmodell mit cardiospezifischer Überexpression der Calmodulin Kinase $\text{II}\delta_{\text{B}}$ (CaMKII δ_{B}) entwickelten sich myokardiale Hypertrophie und dilatative Kardiomyopathie. Die Induktion fetaler Gene wie dem Atrialen Natriuretischen Peptid (ANP) und β -myosin heavy chain (β -MHC) ging ebenfalls damit einher. Interessanterweise wiesen die Autoren ebenfalls einen reduzierten Phosphorylierungsgrad von PLB und gesteigerte PP2A Proteinkonzentrationen nach. Sie konnten zeigen, dass CaMKII δ_{B} und PP2A in vivo einen Komplex bilden. Auf RNA-Ebene zeigte sich kein Unterschied in der PP2A-Expression [58].

Diese Ergebnisse legen einen gemeinsamen Mechanismus für die Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie nahe, wobei dem verringerten Phosphorylierungsgrad von PLB eine zentrale Rolle zukommt. In diesem Kontext muss auch eEF2 beachtet werden: Die Gabe von Angiotensin II hat eine durch PP2A-Aktivität vermittelte eEF2-Aktivierung und eine globale Steigerung der Translation in neonatalen Zellen von Ratten zur Folge [59]. Die Aktivität von eEF2 wird nach Phosphorylierung durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige EF2 Kinase inhibiert,

und durch korrespondierende Dephosphorylierung durch PP2A gesteigert [56, 57]. Wie bereits erwähnt, war der Phosphorylierungsgrad von eEF2 im hier verwendeten PP2A-transgenen Stamm um 62 % gegenüber WT reduziert [23]. Eine Aktivierung von eEF2 durch PP1 ist nicht nachgewiesen worden [57], jedoch entwickeln auch PP1-überexprimierende Mäuse eine dilatative Kardiomyopathie [60, 61]. Die totale Aktivität myokardialer Serin/Threoninphosphatasen ist eine Funktion der Aktivität der PP1 und PP2A [25, 62]. PP1-transgene Mäusen wiesen außerdem eine erhöhte Sterblichkeit auf [60], die für PP2A-überexprimierende Mäuse nicht bestätigt werden kann. Es ergeben sich also phänotypisch auch Unterschiede in Folge der Überexpression der beiden Proteinphosphatasen PP1 bzw. PP2A. Es ist daher anzunehmen, dass PP1 und PP2A einerseits jeweils exklusive Substrate im Myokard dephosphorylieren, und andererseits auch gemeinsame Substrate haben.

TnI als nächstes myokardiales Protein, das durch die PP2A-Überexpression vermehrt dephosphoryliert vorkommt [23], ist ein regulatorisches Protein. Im Zusammenspiel mit Troponin C, Troponin T und Tropomyosin steuert es die Freigabe der Bindungsstellen für Aktin an Myosin in Gegenwart von Ca^{2+} in Herz- und Skelettmuskulatur [63]. In Übereinstimmung mit dem hier vorgestellten PP2A-Modell wurde bei herzinsuffizienten Menschen eine verstärkte Dephosphorylierung von TnI nachgewiesen, die eine gesteigerte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente nach sich zog [64, 65].

Die Expression der calciumsteuernden myokardialen Proteine SERCA, PLB und CSQ lag in dieser Arbeit in Übereinstimmung zu vorangegangenen Veröffentlichungen. Gergs et al. (2004) [23] wiesen im PP2A-Modell eine Tendenz zu erniedrigter Expression von SERCA nach, Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch eine statistische Signifikanz auf.

5.3 PP2A-transgene Mäuse im chronischen Myokardinfarktmodell

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Auswirkung der transgenen Überexpression von PP2A nach Myokardinfarkt durch Ligatur der LAD.

5.3.1 Interpretation der morphometrischen Ergebnisse

In den morphometrischen Analysen zeigte sich eine Steigerung des absoluten wie auch des relativen Herzgewichts von PP2A MI im Vergleich zu WT MI. Hypertrophie des Myokards und Dilatation des linken Ventrikels verursachen eine Zunahme des Herzgewichts. Insofern ist die Zunahme des Herzgewichts von WT sham zu WT MI vorhersehbar gewesen. Der Effekt fällt in der PP2A MI-Gruppe noch weit drastischer aus. Dieser Befund deckt sich mit den

histologischen und echokardiografischen Befunden. Ebenso stieg das Lungengewicht in PP2A MI gegenüber WT MI signifikant an. Zeichen der Herzinsuffizienz, wie ein pulmonales Ödem können durch die direkten inhibitorischen Effekte von PP2A auf PLB, TnI und L-Typ Ca²⁺-Kanal in den transgenen Mäusen erklärt werden [23]. In der PP2A MI-Versuchsgruppe liegt das relative und das absolute Lungengewicht über den für die PP2A sham- und WT MI-Gruppe ermittelten Werten. In der WT MI-Population liegt vermutlich ein Lungenödem dem gesteigerten Lungengewicht zu Grunde, welches in der PP2A MI-Gruppe in Folge der massiven Linksherzinsuffizienz mit interstitieller Flüssigkeitsbelastung signifikant stärker ausgeprägt ist [18].

- Das relative Herzgewicht in der WT MI-Gruppe ist gegenüber der WT sham-Population signifikant erhöht.
- Relatives und absolutes Herzgewicht der PP2A MI-Gruppe liegen signifikant über PP2A sham und WT MI.

Ein Anstieg des kardialen Index (d.h. des relativen Herzgewichts bezogen auf das Gesamtgewicht) ist typisch bei Herzinsuffizienz. In keiner der Gruppen kommt es zur Stauungsleber. Das im Vergleich zu PP2A sham verminderte Körpergewicht der PP2A MI-Gruppe ist vereinbar mit einer kardiale Kachexie.

5.3.2 Interpretation der echokardiographischen Daten

In der Echokardiographie erweist sich die Ruheherzfrequenz in der PP2A MI-Gruppe gegenüber der WT MI-Vergleichsgruppe als gesteigert. Die linksventrikuläre Funktion (gemessen durch fractional shortening und als fractional area change) in der Gruppe der PP2A MI ist verglichen mit WT MI deutlich herabgesetzt. Die linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Innendurchmesser sind in PP2A MI im Sinne einer linksventrikulären Dilatation in gegenüber PP2A sham und WT MI gesteigert.

Bezogen auf die linksventrikuläre Pumpfunktion kann ein schlechteres Outcome, verglichen mit WT MI, nach MI nachgewiesen werden. Die linksventrikuläre Dilatation gegenüber PP2A sham ist im Rahmen des Myokardinfarkts zu deuten und zeigt sich auch innerhalb der WT-Gruppen. Jedoch fällt die LV-Dilatation in PP2A MI stärker aus als in WT MI. Übereinstimmend hierzu erweist sich die Infarktgröße in PP2A gegenüber WT gesteigert.

5.3.3 Überlebens-Analyse

In vorangegangenen Untersuchungen verschiedener transgener Tiermodelle, die zur Ausprägung einer dilatativen Kardiomyopathie führen, wurde immer auch eine erhöhte Mortalität in den transgenen Gruppen festgestellt [60, 66-70]. Wie erwähnt, ist die Prognose auch beim Menschen nach Diagnosestellung einer dilatativen Kardiomyopathie schlecht [17, 18]. Interessanterweise wurde in dieser Studie keine erhöhte Mortalität nach MI innerhalb des Beobachtungszeitraums von vier Wochen festgestellt. Das unerwartet gute Überleben innerhalb der PP2A-Gruppe wirft die Frage nach kardioprotektiven Effekten infolge der PP2A-Überexpression im Rahmen chronischer Ischämie auf. Diesbezüglich kommen zwei grundsätzliche Überlegungen in Frage:

- Chronische β -adrenerge Stimulation, bekannt als negativer Stressor, geht mit erhöhten PP2A- und PP1-Aktivitäten in Tierexperimenten einher [52, 60, 71]. Die Überexpression der myokardialen PP2A limitiert die β -adrenerge Stimulierbarkeit in den verwendeten transgenen Mäusen [23]. Abschnitt 5.5 gibt einen entsprechenden Überblick.
- Abschnitt 5.6 erläutert die Effekte der in dieser Arbeit nachgewiesenen verstärkten Expression phosphorylierter Glykogen-Synthase-Kinase 3β . Diese zeigte in vorangegangenen Untersuchungen protektive Effekte gegen pathologisches kardiales Remodeling [40].

Des Weiteren konnte bei den transgenen Tieren eine veränderte Verteilung der Todesfälle im zeitlichen Verlauf beobachtet werden: In den ersten zwölf Tagen nach LAD-Ligatur, mit einem Maximum am dritten Tag, zeigte sich eine erhöhte Mortalitätsrate in der WT-Gruppe. Demgegenüber fiel in der transgenen Gruppe eine kritische Phase innerhalb der ersten 24 Stunden postoperativ auf (vier Todesfälle). In den folgenden 48 Stunden ereigneten sich zwei weitere Todesfälle. Nach Tag drei überlebten in der PP2A MI-Gruppe alle 17 verbliebenen von 23 Individuen. Somit stellt sich auch die Frage nach PP2A-induzierten Veränderungen bezüglich der Infarktexpansion und -extension.

- Infarktexpansion bezeichnet die im von Hypoxie unmittelbar betroffenen Myokard ablaufende flächenmäßige Ausdehnung auf Kosten verringerter Wandstärke innerhalb der ersten Stunden nach Myokardinfarkt [72] aufgrund einer nicht ausreichenden mechanischen Festigkeit. Ihre Folge ist zwangsläufig die Volumenzunahme des Ventrikels und eine Umverteilung der mechanischen Beanspruchung.
- Demgegenüber bezeichnet die Infarktextension eine über den initial abgelaufenen Myokardinfarkt hinausgehende Vergrößerung des Infarktgebiets im zeitlichen Verlauf einiger Tage bis Wochen, entweder

- ischämisch bedingt aufgrund eines weiteren Infarkts im angrenzenden Stromgebiet bzw. einer relativen Minderperfusion des angrenzenden Myokards, das nun einer größeren Wandspannung ausgesetzt ist, bei vorbestehender koronarer Herzkrankheit [73], oder
- nicht-ischämisch bedingt auf Grund der veränderten Wandspannung und mechanischen Belastungen im sog. *borderzone myocardium* mit Hypokinesie, induzierter Apoptose und fibrotischem Remodeling [8, 74, 75].

Der folgende Abschnitt 5.4 widmet sich diesem Thema ausführlich, da in dieser Arbeit eine größere Infarktausdehnung in der PP2A MI-Gruppe gegenüber WT MI nachgewiesen wurde.

5.4 Interpretation der histologischen Ergebnisse

Die Erklärung für die Steigerung der Infarktgröße in PP2A liegt weder in einem technisch unterschiedlichen Vorgehen begründet, noch in einer veränderten Gefäßversorgung bei den PP2A-transgenen Tieren. Die Operationen wurden durch denselben Untersucher verblindet bezüglich des Genotyps der Versuchstiere durchgeführt. Unterschiede bezüglich der Anatomie der Koronarien wurden nicht festgestellt. Letztlich wurde einerseits ein großer Infarktanteil und andererseits ein vergleichbar gutes Überleben der PP2A-transgenen dokumentiert, was systematische Fehler sehr unwahrscheinlich erscheinen lässt. Aufgrund des standardisierten Vorgehens bei der Durchführung der LAD-Ligatur ist davon auszugehen, dass das ischämische Myokard-Areal unmittelbar nach Ligatur des Koronargefäßes in beiden Gruppen gleich war. Doch in den folgenden Phasen der Infarktexpansion sowie der nicht-ischämischen Infarkttextension [8] kommen die Unterschiede zwischen PP2A und WT zum Tragen. Bei PP2A-Mäusen wurde im Vergleich zur WT-Gruppe eine signifikant größere LV-Infarktgröße nachgewiesen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten, welche eine signifikant reduzierte Infarktgröße bei pharmakologischer Inhibierung von PP2A am kardialen Ischämie/Reperfusion-Hasenmodell aufzeigten [76].

Vieles spricht dafür, dass in der vorliegenden Arbeit die ischämische Infarkttextension keine wesentliche Rolle spielte: Erstens ist im Experiment keine eigentliche Gefäßerkrankung Ursache des Infarkts, eine relative Minderperfusion im angrenzenden Myokard ist insbesondere bei der Maus, die keine wesentliche Kollateralisierung des Myokards aufweist [77], nicht zu erwarten. Zweitens wurde in einem Myokardinfarktmodell der Maus analog zum Vorgehen in der vorliegenden Arbeit die LAD-Ligatur durchgeführt; anschließend wurde die LV-Infarktausdehnung nach einer, zwei, drei, vier und fünf Wochen gemessen. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert [78]. Dies unterstreicht die Konstanz der Ausdehnung des Myokardinfarkts nach LAD-Ligatur in der Maus in der chronischen

Infarktphase. Somit muss die größere Infarktausdehnung in der transgenen Gruppe im Wesentlichen auf eine verstärkte Infarktexpansion zurückgeführt werden. Sie hängt stark davon ab, inwiefern das geschädigte akinetische Myokard den Scherkräften der Kontraktion des Ventrikels noch widerstehen kann [5, 8].

Im an den Infarkt angrenzenden Myokard (*borderzone myocardium* [74] oder *adjacent myocardium* [8]) ist die mechanische Belastung nach MI am größten, bzw. sie steigt mit progredienter Infarktexpansion weiter an. Erschwerend kommt für diese Grenzzone hinzu, dass die Belastung für die Kardiomyozyten inhomogen verteilt ist: Nur auf einer „Seite“ sind sie im Verbund mit ebenfalls aktiven Myokard verankert, so dass ein unphysiologisches Stressmuster [8, 74] entsteht. Vermutlich spielt die nicht-ischämische Infarkttextension in PP2A eine gewichtigere Rolle, weil die kontraktile und mechanische Reserven der Kardiomyozyten verringert sind.

In der Summe unterlag das Myokard der PP2A-transgenen Versuchstiere nach MI einer sehr viel stärkeren Hypertrophie des *remote myocardium* sowie einer ausgeprägteren linksventrikulären Dilatation als es in der WT MI-Vergleichsgruppe der Fall war. Die Zunahme des Herzgewichts von WT sham zu WT MI ist Ausdruck der Hypertrophie nach MI. Der Effekt fällt in der PP2A MI-Gruppe jedoch noch weit drastischer aus. Bereits unter basalen Bedingungen zeigte sich ein pathologisches Remodeling des interventrikulären Septums; nach MI schreitet dieses weiter fort. Im *remote myocardium* wurde ein erhöhter Anteil interstitieller Kollagene als Marker eines fibrotischen Umbaus nachgewiesen. Erneut zeigte sich der negative Effekt bereits in der PP2A sham-Gruppe, und nochmals stärker in PP2A MI. Auch die Myozytenhypertrophie nach LAD-Ligatur fällt bei PP2A-transgenen Mäusen schwerwiegender aus. Diese Resultate können Ausdruck der Unterbrechung der β -Catenin/GSK3 β -Balance und der nachgeschalteten Effekte der Wnt-Signalkaskade sein.

5.5 Bedeutung der PP2A für die intrazelluläre Signaltransduktion

Ein vollständiger Überblick über sämtliche Signalwege, in denen die PP2A involviert ist, kann derzeit noch nicht gegeben werden. Zweifelsfrei ist jedoch, dass PP2A in viele essenzielle Regulationsmechanismen der Kardiomyozyten involviert ist [79].

Die β -adrenerge Aktivierung ist ein wesentliches Merkmal der chronischen Herzinsuffizienz beim Menschen [23]. Die Aktivierung β -adrenerger G-Proteine durch Katecholamine führt zur Bildung von cAMP und zur nachfolgenden Stimulation cAMP-abhängiger Proteinkinasen [23]. Somit verändert sich das Kräfteverhältnis zwischen Kinasen und Phosphatasen, die z.B. das regulatorische Protein Phospholamban (PLB) in seiner Aktivität steuern. Der

Phosphorylierungsgrad von PLB hat direkten Einfluss auf die Aktivität der SERCA, die den rhythmischen Kalziumaustausch zwischen Sarkoendoplasmatischem Retikulum und Zellplasma steuert. Die Phospholierung von PLB erhöht die Aktivität von SERCA mit erhöhtem Calcium-Fluß ins SER mit positiv-inotroper und positiv-chronotroper Wirkung. PLB wird von PKA, PKC und CaMK reguliert, ebenso wie PP2A [80, 81].

In *in vitro*-Versuchen an Kardiomyozyten von Mäusen zeigte sich, dass durch Stimulation mit Isoproterenol nicht nur – wie bis dahin bekannt – die Proteinkinase A (PKA) in ihrer Aktivität gesteigert wird, sondern dass gleichzeitig auch die PP2A-Aktivität zunimmt [82]. Die Autoren gingen davon aus, dass PKA und PP2A sogar einen Komplex bilden. Durch die Aktivierung stimulierender und inhibierender Elemente werde eine “supermaximale” Kontraktionsantwort auf die β -adrenerge Stimulation verhindert [82]. Dies deckt sich mit der klinischen Erfahrung, dass β -Blockade ein Fortschreiten der Herzinsuffizienz beim Menschen zumindest verlangsamen kann und das Risiko des plötzlichen Herztodes verringert. Sollte dies auch der kardioprotektive Mechanismus der PP2A-Überexpression sein? Diesbezüglich sind die Untersuchungen an transgenen Mäusen, die β 1-Rezeptoren überexprimieren [68], wertvoll. Es wurde (damals überraschend) beobachtet, dass nicht nur die Herzfrequenz und die Kontraktilität gesteigert waren, sondern dass es zur Hypertrophie und Fibrose des Myokards kam und sich mit der Zeit eine Kardiomyopathie manifestierte. Der kardiale Phänotyp der transgenen Mäuse mit myokardialer β 1-Rezeptor-Überexpression und der PP2A-überexprimierenden Transgenen aus dieser Arbeit zeigt frappierende Ähnlichkeiten in Bezug auf eingeschränkte LV-Funktion und die Entwicklung von pathologischem Remodeling mit linksventrikulärer Dilatation, Fibrose und Kardiomyozytenhypertrophie. In verschiedenen Arbeiten wurde eine Hyperphosphorylierung des myokardialen Ryanodine-Rezeptors 2 in Folge einer chronischen β 1-Überstimulation mit nachfolgender Störung der Ca^{2+} -Homöostase für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz auf zellulärer Ebene verantwortlich gemacht [83-85]. Der myokardiale RyR-Rezeptor liegt im Komplex mit PP1 und PP2A vor, die an unterschiedlichen Serin-Resten desphosphorylieren [84, 86]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass in den PP2A-transgenen Gruppen der Gehalt von an Serin2808-phosphoryliertem RyR2 signifikant reduziert ist. Dennoch lag der bekannte Phänotyp mit dilatativer Kardiomyopathie und pathologischem LV-Remodeling vor. Somit müssen andere Substrate der myokardialen Überaktivität der PP2A diesen eigentlich protektiven Effekt überkompensieren.

In vivo-Versuche an Ratten, denen Isoproterenol über 48 Stunden per Pumpe infundiert wurde [52], ergaben, dass die ANF-Expression, verwendet als Marker für den Switch hin zur Expression eines fetalen Genmusters, gesteigert, und der Phosphorylierungsgrad der SERCA sowie von Phospholamban signifikant reduziert waren. Als verantwortlich für die Dephosphorylierung dieser beiden regulatorischen Proteine konnten sowohl die PP1 wie auch

PP2A identifiziert werden; die Aktivität beider Phosphatasen war in der mit Isoproteronol behandelten Gruppe erhöht. Gergs et al. (2004) zeigten eine reduzierte SERCA-Aktivität für PP2A überexprimierende Mäuse auf, jedoch ohne statistische Signifikanz. In dieser Arbeit konnte eine statistische Signifikanz der reduzierte SERCA-Aktivität in TG nachgewiesen werden.

Eine andere Gruppe suchte in Zellkulturexperimenten nach Substraten der B56-Untereinheit der PP2A [87]. Hierbei konnten neben der SERCA2a und Calmodulin eine ganze Reihe verschiedener nukleärer Proteine wie *alternative splicing factor 2* (ASF/SF2) und *Y-Box-Proteine* identifiziert werden, woraus die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass eine wichtige Funktion der PP2A in der Aktivierung/Inhibierung der Transkription liege. Außerdem zeigte sich die bevorzugte räumliche Lokalisation der B56-Untereinheit im Zellkern [87], was die Funktion der PP2A als Modulator der Transkription unterstreicht.

In einem vielbeachteten Übersichtsartikel aus dem Jahr 2006 beschäftigten sich Heineke und Molkentin mit den zum Publikationsstand bekannten Signalwegen, die zur myokardialen Hypertrophie beitragen. Zwar erwähnen sie die Protein-Phosphatasen 1 und 2A nur am Rande, doch lassen sich mittlerweile Verknüpfungen der PP2A mit zwei Signalwegen zeigen, die detailliert betrachtet wurden [6]:

- Calcineurin/PP2B beschreiben sie als zentralen prohypertrophischen Molekülkomplex. Calcineurin dephosphoryliert und aktiviert den Transkriptionsfaktor NFAT [88]. GSK3 β ist der Gegenspieler zu Calcineurin; sie phosphoryliert NFAT, was eine deaktivierende Konformationsänderung nach sich zieht [89]. Wie in der eigenen Arbeit gezeigt werden konnte, hat die PP2A-Überexpression im Myokardinfarktmodell einen signifikanten Einfluss auf die Menge an phosphorylierter GSK3 β . Infolge der drastischen Steigerung des Gehalts an phosphorylierter GSK3 β in TG sham, ist die Inhibition der NFAT-vermittelten Transkription aufgehoben. Im Mausmodell mit Überexpression von Calcineurin ist die Folge die Entwicklung einer myokardialen Fibrose, Hypertrophie der Kardiomyozyten und längerfristig die Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie durch Aktivierung fetaler Gene wie BNP und ANF [90]. Der Phänotyp der Calcineurin-überexprimierenden Mäuse ist deckungsgleich zum PP2A-Modell, was ein indirektes Überwiegen der Calcineurin-Aktivität durch Hemmung der GSK3 β wahrscheinlich macht.
- Im Akt/PKB-Signalweg spielt GSK3 β ebenfalls eine prominente Rolle. Akt inhibiert GSK3 β , das seinerseits NFAT sowie β -Catenin zu inhibieren vermag. In den vorliegenden Experimenten war PKB von der PP2A-Überexpression nicht beeinflusst, aber über den Phosphorylierungsgrad von GSK3 β inhibiert die PP2A die β -Catenin-

vermittelte Transkription im Zellkern. Der folgende Abschnitt 5.6 beschäftigt sich ausführlich mit GSK3 β und β -Catenin im Myokardinfarktmodell der Maus.

Nachdem viele Jahre lang die Funktionen der Proteinkinasen für die Signaltransduktion im Fokus standen, erkennt man nun zunehmend die große Bedeutung der Proteinphosphatasen [91]. Der aktuelle Wissenstand lässt bereits den Schluss zu, dass der PP2A im Myokard eine prominente Rolle in vielen verschiedenen Signalwegen zukommt. PP2A scheint einen modulierenden Einfluss zu haben, hierin liegt vermutlich auch der teilweise kardioprotektive Effekt der PP2A-Überexpression begründet, jedoch kann anhand der vorliegenden Arbeit keine einfache kausale Beziehung aufgestellt werden.

5.6 Implikationen aus der veränderten GSK3 β - und β -Catenin-Aktivität

Die eigenen Untersuchungen belegen, dass sich bei PP2A-überexprimierenden Mäusen unter basalen Bedingungen ein signifikant erhöhter Gehalt an phosphorylierter GSK3 β einstellt. Dieses Ergebnis führte zu der Hypothese, dass β -Catenin in TG Mäusen unter basalen Bedingungen erhöht sein müsste. Die Messungen ergaben jedoch in TG sham eine verminderte globale β -Catenin-Expression im Vergleich zu WT-Kontrollen. Jedoch wiesen die Transgenen im Vergleich WT sham vs. TG sham eine gesteigerte Expression von an Serin 552 phosphoryliertem β -Catenin auf; nach Myokardinfarkt kehrte sich dieses Verhältnis um und es wurde eine deutlich erniedrigte Expression von an Serin 552 phosphoryliertem β -Catenin in TG MI detektiert. β

Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Akt die Phosphorylierung von GSK3 β hemmt, sodass β -Catenin nicht länger phosphoryliert vorliegt und dadurch vor dem Abbau geschützt wird [92, 93]. Die Homöostase von β -Catenin wird durch einen Komplex aus GSK3 β , Adenomatosis Polyposis Coli (APC) und Axin kontrolliert [94]. GSK3 β ist an einer Vielzahl von Signalkaskaden beteiligt. Die Phosphorylierung von GSK3 β blockiert das katalytische Zentrum des Enzyms und greift in den Insulin-getriggerten IP3 Signalweg von Akt ein [95]. In Anwesenheit von Wnt akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma und im Nukleus [29]. Nukleäres β -Catenin bildet einen Komplex mit lymphoid enhancer binding factor (LEF)/T cell specific transcription factor (TCF), der im Sinne eines Transkriptionsverstärkers wirkt [29, 31, 96]. Bekannte Target-Gene für diesen Signalweg sind Connexin-43 und Cyclin D1 [97]. Es konnte jedoch eine signifikant niedrigere Konzentration von β -Catenin bei PP2A-überexprimierenden Mäusen ohne MI gezeigt werden. Überraschend konnte in der TG sham-Gruppe eine erhöhte Konzentration von an Serin 552 phosphoryliertem β -Catenin nachgewiesen werden. Dies liegt in der komplexen Regulierung der Aktivität von β -Catenin begründet: Phosphorylierung an

Serin 45 durch Casein Kinase I führt zur β -Catenin-Degradation [98]. Phosphorylierung an Serin 33/Serin 37/Threonin 41 durch GSK3 β führt ebenso zum verstärkten Abbau von β -Catenin [99]. Jedoch bewirkt die Phosphorylierung an Serin 552 durch PKA, Akt/PKB oder die cAMP abhängige Proteinkinase erhöhte β -Catenin-vermittelte Transkriptionsaktivität [100, 101]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der TG sham-Gruppe eine erhöhte Konzentration von phosphorylierter Akt/PKB. Dies ist offenbar die Ursache (i) einer erhöhten Konzentration von phosphorylierter GSK3 β , (ii) einer verringerten Gesamtkonzentration von β -Catenin, und (iii) gleichzeitig erhöhter Konzentration von β -Catenin, das an Serin 552 phosphoryliert ist.

β -Catenin findet sich zum einen membranständig als Teil von Zell-Zell-Adhäsionskomplexen in Verbindung mit Cadherin und zum anderen in seiner Cadherin-freien Form als eines der Elemente der Wnt-Signalkaskade [102] (siehe auch 1.5). Abbildung 27 veranschaulicht die Überlegungen zur Inhibierung von GSK3 β und Aktivierung von Akt (PKB) durch PP2A mit weitreichenden Auswirkungen auf die komplexe β -Catenin-Signaltransduktion.

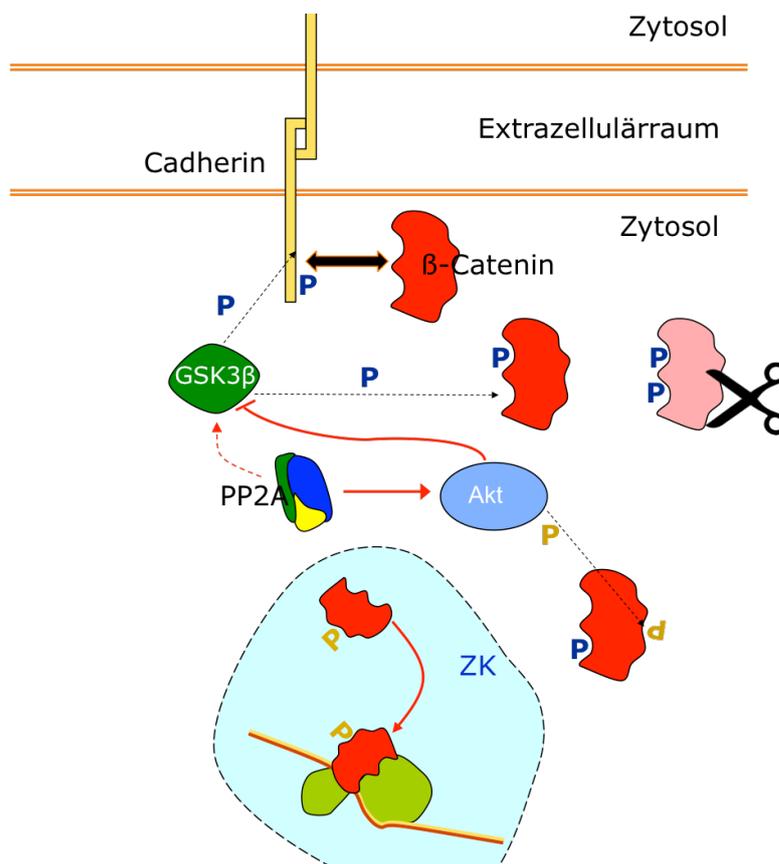


Abbildung 27 Zusammenspiel von β -Catenin, GSK3 β und PP2A; Schema, basierend auf [100, 102-105]. **P** – energiereicher Phosphatrest. **GSK3 β** – glykogen synthase kinase 3 β . **Akt** – Protein-Kinase B. **PP2A** – Phosphoprotein-Phosphatase 2A. **ZK** - Zellkern

In der Literatur wird auch eine direkte Dephosphorylierung und damit Aktivierung der GSK3 β durch PP2A in Skelettmuskulatur beschrieben [104], jedoch zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung eine Deaktivierung infolge Phosphorylierung an Serin 9, sodass der Effekt der

PP2A-vermittelten Dephosphorylierung/Aktivierung von Akt/PKB durch PP2A bei weitem zu überwiegen scheint. Durch Inhibierung der GSK3 β wird die Degradation von β -Catenin verhindert; die Aktivierung von Akt führt zur Phosphorylierung von β -Catenin an Serin 552. Hiernach wird die Translation gesteigert. Es konnte interessanterweise gezeigt werden, dass die Herunterregulierung von β -Catenin zur Adaptation für kardiales Remodeling die Angiotensin-II Stimulation bei Mäusen erfordert [106]. In anderen murinen Herzinfarktmodellen wurde für transgene Mäuse mit α MHC-abhängiger *loss-of-function*-Mutation von β -Catenin ein höheres Überleben und ein abgemildertes kardiales Remodeling nachgewiesen [107]. Dies deckt sich mit dem Ergebnis dieser Arbeit in der Gruppe der PP2A MI-Mäuse.

Auch die Befunde aus der Histologie lassen sich möglicherweise durch die Veränderungen in der β -Catenin-Homöostase erklären. Im Myokard der transgenen Versuchstiere ist die Feinarchitektur gestört. Dem Untersucher präsentiert sich eine gewisse Unordnung und Auflockerung der Kardiomyozyten, die begleitet wird von fibrotischem Umbau. Dies steht in großer Übereinstimmung mit den Befunden bei PP1-überexprimierenden Mäusen [60].

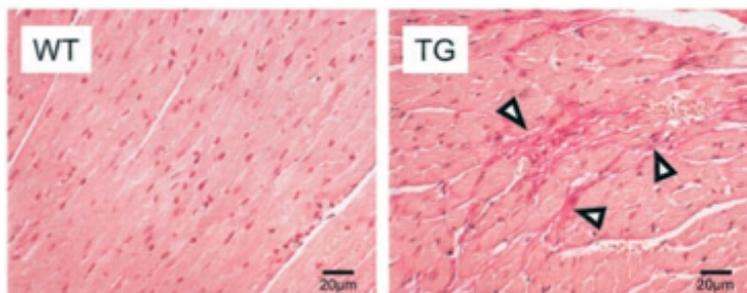


Abbildung 28 Mikroskopie des Myokards, Elastica von Gieson-Färbung. **WT** – Wildtyp, **TG** – PP2A-transgen, Pfeilspitzen markieren fibrotische Bezirke, aus [23]

Wie bereits erwähnt, liegt β -Catenin auch membranständig als Teil des Ankerkomplexes der Desmosomen vor [108]. In einer vorangegangenen Arbeit wurde die Funktion und Zusammensetzung der *adherens junctions* in transgenen Mäusen mit induzierbarem β -Catenin-Knockout untersucht. Hierbei zeigten sich letztlich keine funktionellen Einschränkungen, da γ -Catenin den Verlust von β -Catenin kompensiert [109]. Gleichwohl sind Mäuse mit vollständigem β -Catenin-Knockout avital [110]. In einer Arbeit, in der transgene Mäuse mit nicht degradierbarem β -Catenin verwendet wurden, zeigte sich eine Akkumulation von β -Catenin im Bereich der Glanzstreifen, nicht jedoch im Nucleus, begleitet von einem Phänotyp der dilatativen Kardiomyopathie und früher Sterblichkeit [97]. Zusammenfassend besteht die Möglichkeit, dass durch Veränderungen der β -Catenin-Konzentration auch eine Schwächung der myokardialen Zell-Zell-Adhäsion bewirkt wird; allerdings ist die bisherige Datenlage zu dieser Frage spärlich und das in dieser Arbeit verwendete *in vivo*-Modell ungeeignet, um die mechanische Belastbarkeit des myokardialen Synzytiums zu messen.

Im chronischen Myokardinfarkt nach LAD-Verschluss sind in der PP2A-Gruppe keine Unterschiede in der Proteinexpression von an Serin 9 phosphorylierter GSK3 β und β -Catenin im Vergleich zur Wildtyp-Situation mehr nachweisbar. Die Homöostase von GSK3 β und β -Catenin muss demnach noch von weiteren Modulatoren abhängig sein, deren Einfluss im chronischen Myokardinfarkt dominiert und die Effekte der transgenen PP2A-Überexpression überspielt. GSK3 β selbst wird in den letzten Jahren eine zentrale Bedeutung für die Entwicklung bzw. Suppression kardialer Hypertrophie im Sinne von pathologischem Remodeling zugesprochen [36, 38-40]. Im transgenen Mausmodell mit induzierbarem GSK3 β -Knockout zeigte sich im *remote myocardium* der transgenen Tiere nach MI ein erhöhter Kardiomyozyten-Querschnitt bei geringerer linksventrikuläre Dilatation und gleichzeitig besserer Pumpfunktion als in der Kontrollgruppe [36]. Eine weitere Veröffentlichung beschreibt einen doppelt transgenen Mausstamm mit myokardialer Überexpression von Calcineurin und Expression einer der überaktivierten GSK3 β (Serin 9 zu Alanin-Mutation) [40]. Die alleinige Überexpression von Calcineurin erzeugte einen Phänotyp von schwerer myokardialer Hypertrophie, Herzinsuffizienz und frühzeitiger Letalität. Die Coexpression der überaktiven GSK3 β -S9A konnte die Überlebensrate der doppelt-transgenen Tiere signifikant steigern und die Entwicklung spontaner kardialer Hypertrophie war deutlich reduziert. Diese Befunde unterstreichen den kardioprotektiven Effekt einer Aktivierung der GSK3 β bzw. die negativen Folgen der Deaktivierung durch Phosphorylierung an Serin 9. Dies deckt sich mit dem Phänotyp einer dilatativen Kardiomyopathie der PP2A sham-Gruppe, für die ja eine stark gesteigerte Phosphorylierung der GSK3 β an Serin 9 gezeigt wurde. Es verbleibt die Frage, wie GSK3 β - und β -Catenin-Konzentrationen in der PP2A MI-Gruppe wiederhergestellt werden. Diesbezüglich wird der Vergleich zu Ischämie/Reperfusionen-Modellen offenbar: Die gemeinsame Endstrecke der Präkonditionierung in diesen Modellen liegt in der Phosphorylierung der GSK3 β an Serin 9 begründet [111, 112]. In diesem Sinne besteht in den PP2A-transgenen (entsprechend der PP2A sham-Gruppe) eine Präkonditionierung vor Induktion des Myokardinfarkts. Dies erklärt möglicherweise auch das gute Überleben, das angesichts des vorbestehenden Phänotyps einer dilatativen Kardiomyopathie nicht zu erwarten war. Die Restauration der GSK3 β - und β -Catenin-Homöostase kann in der vorliegenden Arbeit nicht zufriedenstellend erklärt werden. Ursächlich kommen diverse Signalkaskaden in Folge des Myokardinfarkts in Frage. So hat z.B. die Aktivierung von β -Adrenorezeptoren durch Isoproterenol im Rattenmodell die Dephosphorylierung von GSK3 β zur Folge [113].

5.7 Phosphatasenaktivität im chronischen Myokardinfarktmodell

Anschließend an die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit erfolgten ergänzend in unserer Arbeitsgruppe weitere molekularbiologische Untersuchungen. In der schein-operierten PP2A-Population zeigte sich eine erhöhte globale Phosphatasenaktivität. Um die myokardiale PP2A-Überexpression in TG sham zu verifizieren, folgte die Differenzierung nach PP1 und PP2A in TG sham vs. WT sham: die Aktivität der PP2A, nicht aber der PP1, war erhöht [114].

Interessanterweise war in WT MI im Vergleich zu WT sham sowohl die Aktivität der PP1 als auch der PP2A erhöht. Für PP2A MI wurde eine Erhöhung der PP1-Aktivität vs. PP2A sham gezeigt; darüber hinaus eine Überaktivierung der PP2A vs. PP2A sham und WT MI [114].

Letztlich bestätigen diese Befunde erstens die Effektivität des Transgens mit einem Anstieg der PP2A-Aktivität in beiden transgenen Gruppen gegenüber den Wildtypen, und zweitens die bereits bekannte Überaktivierung myokardialer Phosphatasen in Folge von Herzinsuffizienz [52].

5.8 Vergleich mit anderen Tiermodellen

Der Ausgangspunkt für die Generierung des PP2A-überexprimierenden Mausstamms war die Erkenntnis, dass bei Herzinsuffizienz das Kräfteverhältnis von Kinasen/Phosphatasen im Myokard zugunsten der Phosphatasen verschoben ist [25, 62]. Mehrere Forschungsgruppen etablierten deshalb Tiermodelle mit experimentell gesteigerter Phosphatasenaktivität im Herzen.

Untersuchungen am in dieser Arbeit verwendeten Modell transgener PP2A-überexprimierender Mäuse wurden zuerst 2004 veröffentlicht [23]. Obwohl die Tiere keine erhöhte Letalität aufwiesen, konnte eindeutig belegt werden, dass die myokardiale Funktion in diesem Tiermodell stark eingeschränkt ist und es bereits nach kurzer Lebenszeit zur linksventrikulären Dilatation und Hypertrophie kam [23]. In der vorliegenden Arbeit können diese Befunde bestätigt werden. Die PP2A-transgenen Versuchstiere besitzen – schon vor Induktion des MIs – eine verringerte myokardiale Pumpfunktion.

In den folgenden Jahren konzentrierten sich mehrere Arbeitsgruppen auf die PP1. Eine Veröffentlichung befasst sich mit transgenen Mäusen, die analog dem in dieser Arbeit verwendeten Modell, die katalytische Untereinheit der PP1 überexprimieren [60]. Die transgenen Versuchsmäuse erreichten in der Echokardiographie sowohl in Ruhe als auch nach β -adrenerger Stimulation signifikant verringerte Parameter der linksventrikulären Pumpfunktion (fractional shortening in Ruhe WT $39,1 \pm 4,2$ % vs. TG $26,5 \pm 2,1$ %; FS nach Isoproterenol-Stimulation WT $69,5 \pm 0,6$ % vs. TG $52,9 \pm 3,2$ %). Bei der molekularbiologischen

Untersuchung der Ventrikel nach sechs Monaten Lebenszeit, konnte eine verstärkte Expression von ANF und β -MHC nachgewiesen werden; histologisch zeigten sich eine Dilatation beider Ventrikel sowie eine Fibrose des Myokards. Anders als im in dieser Arbeit vorgestellten PP2A-Modell verzeichneten die Autoren unter den PP1-überexprimierenden Versuchstieren eine massiv erhöhte Mortalität mit einer medianen Überlebenszeit von nur etwa 6,5 Monaten.

In derselben Veröffentlichung [60] charakterisieren die Autoren ein weiteres Mausmodell, in dem der Inhibitor 1 der PP1 ausgeschaltet ist (I1-knock out). Funktionell führte der I1-knock out in Untersuchungen am isolierten perfundierten Herzen bei unveränderter Herzfrequenzreserve unter Stimulation mit Isoproterenol zu verringerten Druckänderungen pro Zeiteinheit sowohl in Kontraktion als auch in Relaxation. Die β -adrenerge Stimulierbarkeit lag somit zwischen den stark reduzierten Werten der PP1-Gruppe und den Wildtyp-Kontrollen. Im I1-knock out-Modell wurde allerdings keine erhöhte Mortalität nachgewiesen, ebenso wenig wurden pathologisches Remodeling oder verstärkte Fibrosierung beobachtet. Dieses Paradoxon erklären die Autoren in erster Linie mit der vergleichsweise geringen Steigerung der PP1-Aktivität von nur 23 % gegenüber WT, im Vergleich zu ca. 300 % für PP1 Transgene vs. WT.

Um die Theorie zu überprüfen, dass eine Inhibition der PP1 protektive Effekte auf die Entwicklung einer Kardiomyopathie unter Risiko haben müsste, wurden transgene Mäuse mit einer moderaten Inhibition der PP1 generiert [70]. Die Untersuchungen erfolgten in einem Modell mit Drucküberlastung durch Abschnüren der Aorta (Modell der Aortenstenose). Es zeigte sich, dass die transgenen Tiere tatsächlich im Vergleich zu WT eine geringere Dilatation des linken Ventrikels, keine pathologische Hypertrophie/Fibrose und kein Lungenödem entwickelten.

In derselben Veröffentlichung [70] berichten die Autoren über die Transfektion von Ratten, die ebenfalls durch Abschnüren der Aorta einer chronischen Drucküberlastung mit Zeichen der dekompensierten Kardiomyopathie ausgesetzt waren, mit einem Adenovirus als Vektor für Inhibitor 1 im Sinne einer Gentherapie. Dieser Eingriff bewirkte eine Verbesserung der Druckgradienten in der Herzkatheteruntersuchung sowie der systolischen und diastolischen Funktionsparameter. Der Phosphorylierungsgrad von Phospholamban an Serin 16 war nach Expression von I1 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht [70].

Auch Calcineurin als weitere wichtige Serin/Threonin Phosphatase im Myokard wurde ausgiebig erforscht [67]. Transgene Mäuse, die die katalytische Untereinheit von Calcineurin überexprimieren, zeigen eine ausgeprägte frühzeitige Dilatation beider Ventrikel, plötzliche Todesfälle sowie Lungenödem als Zeichen der dekompensierten Herzinsuffizienz. Histologisch weisen sie Zeichen der Kardiomyozyten-Hypertrophie sowie eine deutliche Fibrose auf [90].

Ergänzend dazu wurde ein weiteres Modell transgener Mäuse generiert, genannt „ Δ Cain“, in dem die *Calcineurin inhibitory domain of Cain* (*Calcineurin Inhibitor*) im Myokard überexprimiert wird [67]. Durch vierzehntägige pumpengesteuerte Infusion von Isoproterenol kam es zwar bei Kontrolltieren, nicht jedoch bei den transgenen Tieren, zu einer Hypertrophie des Myokards, und es ließ sich bei den Transgenen keine erhöhte Aktivität von Calcineurin nachweisen. Weiterhin wurde eine linksventrikuläre Drucküberlastung durch Abschnüren der Aorta induziert, auf die auch die transgenen Tiere mit Zeichen der Hypertrophie reagierten, allerdings mit einem weit geringeren Anstieg des Herzgewicht/Körpergewicht-Quotienten als die Kontrollgruppe. Auch in diesem Fall war keine Zunahme der Calcineurin-Aktivität nachweisbar [67].

Calcineurin A β -negative transgene Mäuse, deren Calcineurin-Gesamtaktivität um etwa 80% verringert ist, wurden ebenfalls untersucht [66]. Die Mäuse wurden verschiedenen bekannten Stimuli für myokardiale Hypertrophie ausgesetzt. Analog zu den bereits zuvor geschilderten Modellen ließ sich auch hier durch Infusion von Angiotensin II und Isoproterenol keine Myokardhypertrophie induzieren; die experimentelle Aortenstenose erzeugte wie im vorgenannten Modell [67] eine geringere hypertrophische Antwort als in Wildtypen. Die Autoren folgerten aus ihren Untersuchungen, dass der Verlust der A β -Untereinheit von Calcineurin die Potenz, auf Stress mit myofibrillärer Hypertrophie zu antworten, reduziert [66].

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die in diesem Abschnitt beschriebenen Tiermodelle. Im Modell der PP2A-Überexpression ergeben sich Kongruenzen zu den anderen Modellen mit Überaktivierung myokardialer Phosphatasen, mit einer wichtigen Ausnahme: einzig im PP2A-Modell ist die Sterblichkeit nicht erhöht. Die funktionellen Übereinstimmungen legen den Schluss nahe, dass die untersuchten Protein-Phosphatasen, PP1, PP2A und Calcineurin (PP2B) dieselben Endstrecken aktivieren bzw. inhibieren. Der Unterschied in der Sterblichkeit könnte durch eine Präkonditionierung im PP2A-Modell vergleichbar mit dem Modell der GSK3 β -Inhibierung entstehen.

Eine länger dauernde β -Stimulation führt zur Aktivierung von PP1 *und* PP2A [52], mit den entsprechenden Folgen. Übereinstimmend hierzu beschreiben Publikationen, die sich mit der Inhibition der jeweiligen Phosphatasen befasst haben, jeweils eine Verbesserung der Symptome der Kardiomyopathie bzw. gänzlich protektive Effekte [66, 67, 70].

Tabelle 6 Überblick über verschiedene Tiermodelle, nach [23, 40, 52, 60, 66-70, 90, 115].
 – vermindert; = unverändert; + erhöht. **Dekomp** – Dekompensation; **Protekt** – Protektion.

	PP2A +	β +	PP1 +	II KO	PP1 -	Calci- neurin +	Calci- neurin -	GSK3 β +	GSK3 β -
Vorzeitige Mortalität	=	+	+	=	-	+	-	+	=
Myokardiale Pumpleistung	-	+, später -	-	-	+	-	+	-	+
Pathologisches Remodeling	+	+	+	=	=	+	-	=	=
LV-Dilatation	+	+	+	=	-	+	-	=	=
Reaktion auf Stress	Dekomp	Dekomp	Dekomp	=	Protekt	?	Protekt	?	Protekt
Modell	Maus [23]	Maus [52, 68]	Maus [60]	Maus [60]	Maus [70]	Maus [90]	Maus [66, 67]	Maus [40, 116]	Maus [115]

5.9 Schwächen des Modells der myokardialen PP2A-Überexpression

Vieles deutet darauf hin, dass eine erhöhte Phosphatasenaktivität im erkrankten menschlichen Myokard eine Adaptation an die Erkrankung darstellt und ähnlich wie die verringerte Expression von β -Rezeptoren bei herzinsuffizienten Menschen einen Schutzmechanismus bedeutet [117, 118]. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die hier untersuchten transgenen Mäuse einer spontanen, sich früh manifestierenden dilatativen Kardiomyopathie unterliegen. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zur ischämischen Herzkrankheit oder hypertensiven Kardiomyopathie beim Menschen.

In weiterführenden Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe wurde die Konzentration weiterer regulatorischer Proteine in den PP2A-transgenen Mäusen untersucht. Hierbei zeigte sich bereits für PP2A sham eine verminderte Expression der SERCA und Calcium-Calmodulin-Kinase II α (jeweils ohne Veränderung nach Myokardinfarkt) [114]. Während eine verminderte SERCA-Aktivität mit Herzinsuffizienz vergesellschaftet ist [119], wurden für eine Inhibition der Calcium-Calmodulin-Kinasen im Myokardinfarktmodell deutliche kardioprotektive Effekte beobachtet [120]. Dieser Befund zeigt erneut auf, dass die myokardiale PP2A-Überexpression verschiedene und teilweise gegensinnige Effekte hat und Veränderungen in mehreren wichtigen Signalwegen nach sich zieht. Um besser zwischen pathogenen und protektiven Auswirkungen unterscheiden zu können, sollte nach Möglichkeit für zukünftige Untersuchungen ein Modell mit induzierbarer PP2A-Überexpression etabliert werden, in dem die PP2A-Überexpression erst

nach Induktion eines Stressors, z.B. Myokardinfarkt oder induzierter Aortenstenose, aktiviert wird. Weiterhin zeigt die vorliegende Arbeit die sehr breitgefächerten Effekte der myokardialen PP2A-Überexpression auf, die den Phosphorylierungsgrad multipler nachgeschalteter Enzyme beeinflusst. Auf der Suche nach möglichen therapeutischen Agentien bei Herzinsuffizienz wäre eine größere Substratspezifität also wünschenswert.

6 Zusammenfassung

Die PP2A-Überexpression im Myokard bereits der schein-operierten Versuchstiere führt zu einer signifikanten Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion bei dilatativer Kardiomyopathie, die mittels Echokardiografie nachgewiesen werden kann. Histologisch gelingt der Nachweis einer pathologischen Fibrosierung des linksventrikulären Myokards sowie von Nekroseinseln und myokardialer Hypertrophie im *remote myocardium*.

Nach der Induktion des Myokardinfarkts zeigen sich sowohl in der PP2A MI-Gruppe als auch in WT MI funktionell, histologisch und morphologisch Zeichen der Herzinsuffizienz im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die linksventrikuläre Pumpfunktion in PP2A MI ist jedoch erheblich stärker reduziert als die der WT MI- oder PP2A sham-Gruppe und die Ruheherzfrequenz signifikant erhöht. In der Echokardiographie zeigt sich eine Dilatation der linken Ventrikel, was durch die morphometrischen und histologischen Ergebnisse bestätigt wird. Histologisch zeigen sich mit einer noch weitaus stärkeren Fibrosierung des *remote myocardiums* als in der WT MI- und PP2A sham-Population und einer Vergrößerung des Querschnitts der Kardiomyozyten des *remote myocardiums* als typische Zeichen einer pathologischen Hypertrophie. Die Infarktausdehnung in der PP2A MI-Gruppe erweist sich gegenüber den Wildtyp-Kontrollen als signifikant gesteigert. Trotzdem ist die Sterblichkeit der PP2A MI-Gruppe gegenüber den Wildtypen nach MI nicht erhöht.

In der Molekularbiologie ergibt sich ein sprunghafter Anstieg von an Serin 9 phosphorylierter Glykogen Synthase Kinase β in der PP2A sham-Population verglichen mit der WT sham-Gruppe sowie eine Erniedrigung des β -Catenin-Gehalts der Kardiomyozyten. GSK3 β und die Wnt-Kaskade stellen die zentralen Vermittler der PP2A-Funktion sowie -Überfunktion dar. Die myokardiale PP2A-Überexpression ist mit einer Störung in der Akt/GSK3 β / β -Catenin-Kaskade assoziiert. Die Konzentrationen von GSK3 β und β -Catenin waren in der PP2A MI-Gruppe verglichen mit den Wildtyp-Gruppen nicht verändert, d.h. gegenüber PP2A sham wiederhergestellt, wofür in der an diese Dissertation anknüpfende Veröffentlichung aus unserer Arbeitsgruppe eine Aktivierung von Akt in der PP2A MI-Gruppe als ursächlich identifiziert werden konnte [114].

Abweichend von anderen Tiermodellen mit erhöhter Phosphatasenaktivität innerhalb des Myokards geht die Überexpression der PP2A nicht mit einer erhöhten Mortalität einher. Ein kardioprotektiver Effekt der PP2A-Überexpression ist am ehesten durch eine Inhibition des Calcineurin/GSK3 β /NFAT-Signalwegs auf Ebene der GSK3 β im Sinne eines Primings vor Induktion des Myokardinfarkts gegeben.

- [1] Todesursachen. Statistisches Bundesamt Deutschland 2012.
- [2] Cannon, C.P., Braunwald, E.: Unstable Angina and non-ST-Elevation Myocardial Infarction. Harrison's Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill. 2008. pp 1527-1532
- [3] Antman, E.M., Braunwald, E.: ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17. Mc Graw Hill. 2008. pp 1532-1544
- [4] Antman, E.M., Braunwald, E., Selwyn, A. P., Loscalzo, J.: Ischemic Heart Disease. Harrison's Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill. 2008. pp 1514-1527
- [5] Auer, J., Berent, R., Eber, B.: [Pathophysiology and therapeutic aspects of left ventricular "remodeling" in the post-infarct phase]. Acta Med Austriaca 2001; 28: pp. 117-122.
- [6] Heineke, J., Molkentin, J. D.: Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7: pp. 589-600.
- [7] Cohn, J. N., Ferrari, R., Sharpe, N.: Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol 2000; 35: pp. 569-582.
- [8] French, B. A., Kramer, C. M.: Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling. Drug Discov Today Dis Mech 2007; 4: pp. 185-196.
- [9] Levin, E. R., Gardner, D. G., Samson, W. K.: Natriuretic peptides. N Engl J Med 1998; 339: pp. 321-328.
- [10] Sun, Y.: Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. Cardiovasc Res 2008; 81: pp. 482-490.
- [11] Nishikimi, T., Maeda, N., Matsuoka, H.: The role of natriuretic peptides in cardioprotection. Cardiovasc Res 2006; 69: pp. 318-328.
- [12] Lindpaintner K., Lu W., Neidermajer N., Schieffer B., Just H., Ganten D., Drexler H.: Selective activation of cardiac angiotensinogen gene expression in post-infarction ventricular remodeling in the rat. J Mol Cell Cardiol 1993; 25: pp. 133-143.
- [13] Sun, Y., Cleutjens, J. P., Diaz-Arias, A. A., Weber, K. T.: Cardiac angiotensin converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat. Cardiovasc Res 1994; 28: pp. 1423-1432.
- [14] Cao, L., Gardner, D. G.: Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. Hypertension 1995; 25: pp. 227-234.
- [15] Yasue, H., Yoshimura, M., Sumida, H., Kikuta, K., Kugiyama, K., Jougasaki, M., Ogawa, H., Okumura, K., Mukoyama, M., Nakao, K.: Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. Circulation 1994; 90: pp. 195-203.
- [16] Reichert, S., Ignaszewski, A.: Molecular and physiological effects of nesiritide. Can J Cardiol 2008; 24 Suppl B: pp. 15B-18B.
- [17] Wynne J., Braunwald E.: Cardiomyopathies and Myocarditis. Harrison's Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill. 2008. pp 1481-1488
- [18] Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF): Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung. 2010.
- [19] Schönberger, J., Seidman, C. E.: Many roads lead to a broken heart: the genetics of dilated cardiomyopathy. Am J Hum Genet 2001; 69: pp. 249-260.
- [20] Gottshall, K. R., Becker, K. D., Hunter, J. J., Chien, K. R.: A genetic based model of cardiac hypertrophy in MLC-ras mice. J Card Fail 1996; 2: pp. S28-34.
- [21] Hunter, J. J., Chien, K. R.: Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. N Engl J Med 1999; 341: pp. 1276-1283.

- [22] Herzig, S., Neumann, J.: Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 2000; 80: pp. 173-210.
- [23] Gergs, U., Boknik, P., Buchwalow, I., Fabritz, L., Matus, M., Justus, I., Hanske, G., Schmitz, W., Neumann, J.: Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem* 2004; 279: pp. 40827-40834.
- [24] Neumann, J., Eschenhagen, T., Jones, L. R., Linck, B., Schmitz, W., Scholz, H., Zimmermann, N.: Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: pp. 265-272.
- [25] Neumann, J., Maas, R., Boknik, P., Jones, L. R., Zimmermann, N., Scholz, H.: Pharmacological characterization of protein phosphatase activities in preparations from failing human hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: pp. 188-193.
- [26] Schwinger, R. H., Munch, G., Bolck, B., Karczewski, P., Krause, E. G., Erdmann, E.: Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: pp. 479-491.
- [27] Mumby, M.: The 3D structure of protein phosphatase 2A: new insights into a ubiquitous regulator of cell signaling. *ACS Chem Biol* 2007; 2: pp. 99-103.
- [28] Deshmukh, P. A., Blunt, B. C., Hofmann, P. A.: Acute modulation of PP2a and troponin I phosphorylation in ventricular myocytes: studies with a novel PP2a peptide inhibitor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: pp. H792-799.
- [29] Logan CY, Nusse R: The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: pp. 781-810.
- [30] Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R: The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 1987; 50: pp. 649-657.
- [31] Eisenberg LM, Eisenberg CA: Evaluating the role of Wnt signal transduction in promoting the development of the heart. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: pp. 161-176.
- [32] Liu X, Rubin JS, Kimmel AR: Rapid, Wnt-induced changes in GSK3beta associations that regulate beta-catenin stabilization are mediated by Galpha proteins. *Curr Biol* 2005; 15: pp. 1989-1997.
- [33] Janssens, V., Goris, J.: Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 2001; 353: pp. 417-439.
- [34] Takeichi, M: The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 1988; 102: pp. 639-655.
- [35] Wheelock MJ, Johnson KR: Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: pp. 509-514.
- [36] Woulfe, K. C., Gao, E., Lal, H., Harris, D., Fan, Q., Vagnozzi, R., DeCaul, M., Shang, X., Patel, S., Woodgett, J. R., Force, T., Zhou, J.: Glycogen synthase kinase-3beta regulates post-myocardial infarction remodeling and stress-induced cardiomyocyte proliferation in vivo. *Circ Res* 2010; 106: pp. 1635-1645.
- [37] Ali A, Hoeflich KP, Woodgett JR: Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem Rev* 2001; 101: pp. 2527-2540.
- [38] Dorn, G. W., 2nd, Force, T.: Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 2005; 115: pp. 527-537.
- [39] Haq, S., Choukroun, G., Kang, Z. B., Ranu, H., Matsui, T., Rosenzweig, A., Molkentin, J. D., Alessandrini, A., Woodgett, J., Hajjar, R., Michael, A., Force, T.: Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol* 2000; 151: pp. 117-130.

- [40] Antos, C. L., McKinsey, T. A., Frey, N., Kutschke, W., McAnally, J., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Hill, J. A., Olson, E. N.: Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: pp. 907-912.
- [41] Shiojima, I., Walsh, K.: Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev* 2006; 20: pp. 3347-3365.
- [42] Fukumoto, S., Hsieh, C. M., Maemura, K., Layne, M. D., Yet, S. F., Lee, K. H., Matsui, T., Rosenzweig, A., Taylor, W. G., Rubin, J. S., Perrella, M. A., Lee, M. E.: Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *J Biol Chem* 2001; 276: pp. 17479-17483.
- [43] Ebelt, H., Jungblut, M., Zhang, Y., Kubin, T., Kostin, S., Technau, A., Oustanina, S., Niebrugge, S., Lehmann, J., Werdan, K., Braun, T.: Cellular cardiomyoplasty: improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines. *Stem Cells* 2007; 25: pp. 236-244.
- [44] Liu, Y. H., Yang, X. P., Nass, O., Sabbah, H. N., Peterson, E., Carretero, O. A.: Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol* 1997; 272: pp. H722-727.
- [45] Asai, K., Yang, G. P., Geng, Y. J., Takagi, G., Bishop, S., Ishikawa, Y., Shannon, R. P., Wagner, T. E., Vatner, D. E., Homcy, C. J., Vatner, S. F.: Beta-adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic G(salpa) mouse. *J Clin Invest* 1999; 104: pp. 551-558.
- [46] Campbell, S. E., Rakusan, K., Gerdes, A. M.: Change in cardiac myocyte size distribution in aortic-constricted neonatal rats. *Basic Res Cardiol* 1989; 84: pp. 247-258.
- [47] Campbell, S. E., Korecky, B., Rakusan, K.: Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic rat hearts. *Circ Res* 1991; 68: pp. 984-996.
- [48] Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P.: Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003; 92: pp. 139-150.
- [49] Liu, Y. H., Xu, J., Yang, X. P., Yang, F., Shesely, E., Carretero, O. A.: Effect of ACE inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists on endothelial NO synthase knockout mice with heart failure. *Hypertension* 2002; 39: pp. 375-381.
- [50] Kubin, T., Ando, H., Scholz, D., Bramlage, P., Kostin, S., van Veen, A., Heling, A., Hein, S., Fischer, S., Breier, A., Schaper, J., Schaper, W.: Microvascular endothelial cells remodel cultured adult cardiomyocytes and increase their survival. *Am J Physiol* 1999; 276: pp. H2179-2187.
- [51] Ebelt, H., Zhang, Y., Kampke, A., Xu, J., Schlitt, A., Buerke, M., Müller-Werdan, U., Werdan, K., Braun, T.: E2F2 expression induces proliferation of terminally differentiated cardiomyocytes in vivo. *Cardiovasc Res* 2008; 80: pp. 219-226.
- [52] Boknik, P., Fockenbrock, M., Herzig, S., Knapp, J., Linck, B., Luss, H., Müller, F. U., Müller, T., Schmitz, W., Schroder, F., Neumann, J.: Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362: pp. 222-231.
- [53] Wei, Z., Baggerman, G., R, J. Nachman, Goldsworthy, G., Verhaert, P., De Loof, A., Schoofs, L.: Sulfakinins reduce food intake in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J Insect Physiol* 2000; 46: pp. 1259-1265.
- [54] Milano, C. A., Dolber, P. C., Rockman, H. A., Bond, R. A., Venable, M. E., Allen, L. F., Lefkowitz, R. J.: Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: pp. 10109-10113.
- [55] Okumura, S., Fujita, T., Cai, W., Jin, M., Namekata, I., Mototani, Y., Jin, H., Ohnuki, Y., Tsuneoka, Y., Kurotani, R., Suita, K., Kawakami, Y., Hamaguchi, S., Abe, T., Kiyonari, H., Tsunematsu, T., Bai, Y., Suzuki, S., Hidaka, Y., Umemura, M., Ichikawa, Y., Yokoyama, U., Sato, M., Ishikawa, F., Izumi-Nakaseko, H., Adachi-Akahane, S., Tanaka, H., Ishikawa, Y.:

- Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *J Clin Invest* 2014; 124: pp. 2785-2801.
- [56] Nairn, A. C., Palfrey, H. C.: Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *J Biol Chem* 1987; 262: pp. 17299-17303.
- [57] Redpath, N. T., Proud, C. G.: Activity of protein phosphatases against initiation factor-2 and elongation factor-2. *Biochem J* 1990; 272: pp. 175-180.
- [58] Zhang, T., Johnson, E. N., Gu, Y., Morissette, M. R., Sah, V. P., Gigena, M. S., Belke, D. D., Dillmann, W. H., Rogers, T. B., Schulman, H., Ross, J., Jr., Brown, J. H.: The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 2002; 277: pp. 1261-1267.
- [59] Everett, A. D., Stoops, T. D., Nairn, A. C., Brautigan, D.: Angiotensin II regulates phosphorylation of translation elongation factor-2 in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: pp. H161-167.
- [60] Carr, A. N., Schmidt, A. G., Suzuki, Y., del Monte, F., Sato, Y., Lanner, C., Breeden, K., Jing, S. L., Allen, P. B., Greengard, P., Yatani, A., Hoit, B. D., Grupp, I. L., Hajjar, R. J., DePaoli-Roach, A. A., Kranias, E. G.: Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 2002; 22: pp. 4124-4135.
- [61] Nicolaou, P., Hajjar, R. J., Kranias, E. G.: Role of protein phosphatase-1 inhibitor-1 in cardiac physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47: pp. 365-371.
- [62] Neumann, J.: Altered phosphatase activity in heart failure, influence on Ca²⁺ movement. *Basic Res Cardiol* 2002; 97 Suppl 1: pp. 191-95.
- [63] Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K., Maeda, Y.: Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form. *Nature* 2003; 424: pp. 35-41.
- [64] Zakhary, D. R., Moravec, C. S., Stewart, R. W., Bond, M.: Protein kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 99: pp. 505-510.
- [65] Bodor, G. S., Oakeley, A. E., Allen, P. D., Crimmins, D. L., Ladenson, J. H., Anderson, P. A.: Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 1997; 96: pp. 1495-1500.
- [66] Bueno, O. F., Wilkins, B. J., Tymitz, K. M., Glascock, B. J., Kimball, T. F., Lorenz, J. N., Molkentin, J. D.: Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: pp. 4586-4591.
- [67] De Windt, L. J., Lim, H. W., Bueno, O. F., Liang, Q., Delling, U., Braz, J. C., Glascock, B. J., Kimball, T. F., del Monte, F., Hajjar, R. J., Molkentin, J. D.: Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: pp. 3322-3327.
- [68] Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F., Lohse, M. J.: Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: pp. 7059-7064.
- [69] Kirchhefer, U., Baba, H. A., Boknik, P., Breeden, K. M., Mavila, N., Bruchert, N., Justus, I., Matus, M., Schmitz, W., Depaoli-Roach, A. A., Neumann, J.: Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2. *Cardiovasc Res* 2005; 68: pp. 98-108.
- [70] Pathak, A., del Monte, F., Zhao, W., Schultz, J. E., Lorenz, J. N., Bodi, I., Weiser, D., Hahn, H., Carr, A. N., Syed, F., Mavila, N., Jha, L., Qian, J., Marreez, Y., Chen, G., McGraw, D. W., Heist, E. K., Guerrero, J. L., DePaoli-Roach, A. A., Hajjar, R. J., Kranias, E. G.: Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ Res* 2005; 96: pp. 756-766.

- [71] Brewis, N., Ohst, K., Fields, K., Rapacciuolo, A., Chou, D., Bloor, C., Dillmann, W., Rockman, H., Walter, G.: Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a mutant A subunit of protein phosphatase 2A. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: pp. H1307-1318.
- [72] Pfeffer, M. A., Braunwald, E.: Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81: pp. 1161-1172.
- [73] Weisman, H. F., Healy, B.: Myocardial infarct expansion, infarct extension, and reinfarction: pathophysiologic concepts. *Prog Cardiovasc Dis* 1987; 30: pp. 73-110.
- [74] Jackson, B. M., Gorman, J. H., Moainie, S. L., Guy, T. S., Narula, N., Narula, J., John-Sutton, M. G., Edmunds, L. H., Jr., Gorman, R. C.: Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: pp. 1160-1167; discussion 1168-1171.
- [75] Jugdutt, B. I.: The dog model of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail* 2002; 8: pp. S472-475.
- [76] Weinbrenner, C., Baines, C. P., Liu, G. S., Armstrong, S. C., Ganote, C. E., Walsh, A. H., Honkanen, R. E., Cohen, M. V., Downey, J. M.: Fostriecin, an inhibitor of protein phosphatase 2A, limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Circulation* 1998; 98: pp. 899-905.
- [77] Klocke, R., Tian, W., Kuhlmann, M. T., Nikol, S.: Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res* 2007; 74: pp. 29-38.
- [78] Lutgens, E., Daemen, M. J., de Muinck, E. D., Debets, J., Leenders, P., Smits, J. F.: Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res* 1999; 41: pp. 586-593.
- [79] Shi, Y.: Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 2009; 139: pp. 468-484.
- [80] Koss, K. L., Kranias, E. G.: Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* 1996; 79: pp. 1059-1063.
- [81] Boknik, P., Unkel, C., Kirchhefer, U., Kleideiter, U., Klein-Wiele, O., Knapp, J., Linck, B., Luss, H., Muller, F. U., Schmitz, W., Vahlensieck, U., Zimmermann, N., Jones, L. R., Neumann, J.: Regional expression of phospholamban in the human heart. *Cardiovasc Res* 1999; 43: pp. 67-76.
- [82] De Arcangelis, V., Soto, D., Xiang, Y.: Phosphodiesterase 4 and phosphatase 2A differentially regulate cAMP/protein kinase a signaling for cardiac myocyte contraction under stimulation of beta1 adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 2008; 74: pp. 1453-1462.
- [83] Marks, A. R.: Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: pp. 615-624.
- [84] Marx, S. O., Gaburjakova, J., Gaburjakova, M., Henrikson, C., Ondrias, K., Marks, A. R.: Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circ Res* 2001; 88: pp. 1151-1158.
- [85] Reiken, S., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., He Kl, K. L., Prieto, A., Becker, E., Yi Gh, G. H., Wang, J., Burkhoff, D., Marks, A. R.: beta-adrenergic receptor blockers restore cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) structure and function in heart failure. *Circulation* 2001; 104: pp. 2843-2848.
- [86] Huke, S., Bers, D. M.: Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376: pp. 80-85.
- [87] Zhou, X. W., Mudannayake, M., Green, M., Gigena, M. S., Wang, G., Shen, R. F., Rogers, T. B.: Proteomic studies of PP2A-B56gamma1 phosphatase complexes reveal phosphorylation-regulated partners in cardiac local signaling. *J Proteome Res* 2007; 6: pp. 3433-3442.

- [88] Crabtree, G. R., Olson, E. N.: NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 2002; 109 Suppl: pp. S67-79.
- [89] Masuda, E. S., Imamura, R., Amasaki, Y., Arai, K., Arai, N.: Signalling into the T-cell nucleus: NFAT regulation. *Cell Signal* 1998; 10: pp. 599-611.
- [90] Molkenkin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R., Olson, E. N.: A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998; 93: pp. 215-228.
- [91] Neumann, J.: New pathophysiological function of protein phosphatase 2A? *Cardiovasc Res* 2008; 80: pp. 7-8.
- [92] Haq, S., Michael, A., Andreucci, M., Bhattacharya, K., Dotto, P., Walters, B., Woodgett, J., Kilter, H., Force, T.: Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: pp. 4610-4615.
- [93] Cohen, P., Frame, S.: The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: pp. 769-776.
- [94] Clevers, H.: Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; 127: pp. 469-480.
- [95] Takahashi-Yanaga, F., Sasaguri, T.: Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta)-mediated signal transduction pathway: inhibitors of the Wnt/beta-catenin signaling pathway as novel anticancer drugs. *J Pharmacol Sci* 2009; 109: pp. 179-183.
- [96] Huber, A. H., Weis, W. I.: The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 2001; 105: pp. 391-402.
- [97] Hirschy, A., Croquelois, A., Perriard, E., Schoenauer, R., Agarkova, I., Hoerstrup, S. P., Taketo, M. M., Pedrazzini, T., Perriard, J. C., Ehler, E.: Stabilised beta-catenin in postnatal ventricular myocardium leads to dilated cardiomyopathy and premature death. *Basic Res Cardiol* 2010; 105: pp. 597-608.
- [98] Gao, Z. H., Seeling, J. M., Hill, V., Yochum, A., Virshup, D. M.: Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: pp. 1182-1187.
- [99] Zhao, J., Yue, W., Zhu, M. J., Sreejayan, N., Du, M.: AMP-activated protein kinase (AMPK) cross-talks with canonical Wnt signaling via phosphorylation of beta-catenin at Ser 552. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 395: pp. 146-151.
- [100] Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G. B., Kobayashi, R., Hunter, T., Lu, Z.: Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 2007; 282: pp. 11221-11229.
- [101] Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D., Dulin, N. O.: Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2006; 281: pp. 9971-9976.
- [102] Daugherty, R. L., Gottardi, C. J.: Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* 2007; 22: pp. 303-309.
- [103] Taurin, S., Sandbo, N., Yau, D. M., Sethakorn, N., Dulin, N. O.: Phosphorylation of beta-catenin by PKA promotes ATP-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: pp. C1169-1174.
- [104] Sutherland, C., Cohen, P.: The alpha-isoform of glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle is inactivated by p70 S6 kinase or MAP kinase-activated protein kinase-1 in vitro. *FEBS Lett* 1994; 338: pp. 37-42.
- [105] Sugden, P. H., Fuller, S. J., Weiss, S. C., Clerk, A.: Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis. *Br J Pharmacol* 2008; 153 Suppl 1: pp. S137-153.

- [106] Baurand, A., Zelarayan, L., Betney, R., Gehrke, C., Dunger, S., Noack, C., Busjahn, A., Huelsken, J., Taketo, M. M., Birchmeier, W., Dietz, R., Bergmann, M. W.: Beta-catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling. *Circ Res* 2007; 100: pp. 1353-1362.
- [107] Zelarayan, L. C., Noack, C., Sekkali, B., Kmecova, J., Gehrke, C., Renger, A., Zafiriou, M. P., van der Nagel, R., Dietz, R., de Windt, L. J., Balligand, J. L., Bergmann, M. W.: Beta-Catenin downregulation attenuates ischemic cardiac remodeling through enhanced resident precursor cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: pp. 19762-19767.
- [108] Nelson, W. J.: Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans* 2008; 36: pp. 149-155.
- [109] Zhou, J., Qu, J., Yi, X. P., Graber, K., Huber, L., Wang, X., Gerdes, A. M., Li, F.: Upregulation of gamma-catenin compensates for the loss of beta-catenin in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: pp. H270-276.
- [110] Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., Kemler, R.: Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* 1995; 121: pp. 3529-3537.
- [111] Tong, H., Imahashi, K., Steenbergen, C., Murphy, E.: Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res* 2002; 90: pp. 377-379.
- [112] Gross, E. R., Hsu, A. K., Gross, G. J.: Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res* 2004; 94: pp. 960-966.
- [113] Menon, B., Johnson, J. N., Ross, R. S., Singh, M., Singh, K.: Glycogen synthase kinase-3beta plays a pro-apoptotic role in beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes: Role of beta1 integrins. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: pp. 653-661.
- [114] Hoehn, M., Zhang, Y., Xu, J., Gergs, U., Boknik, P., Werdan, K., Neumann, J., Ebel, H.: Overexpression of protein phosphatase 2A in a murine model of chronic myocardial infarction leads to increased adverse remodeling but restores the regulation of beta-catenin by glycogen synthase kinase 3beta. *Int J Cardiol* 2015; 183: pp. 39-46.
- [115] Hirotani, S., Zhai, P., Tomita, H., Galeotti, J., Marquez, J. P., Gao, S., Hong, C., Yatani, A., Avila, J., Sadoshima, J.: Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta during heart failure is protective. *Circ Res* 2007; 101: pp. 1164-1174.
- [116] Michael, A., Haq, S., Chen, X., Hsieh, E., Cui, L., Walters, B., Shao, Z., Bhattacharya, K., Kilter, H., Huggins, G., Andreucci, M., Periasamy, M., Solomon, R. N., Liao, R., Patten, R., Molkentin, J. D., Force, T.: Glycogen synthase kinase-3beta regulates growth, calcium homeostasis, and diastolic function in the heart. *J Biol Chem* 2004; 279: pp. 21383-21393.
- [117] Eschenhagen, T.: Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nat Med* 2008; 14: pp. 485-487.
- [118] Lohse, M. J., Engelhardt, S., Eschenhagen, T.: What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 2003; 93: pp. 896-906.
- [119] Bers, D. M., Eisner, D. A., Valdivia, H. H.: Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ and heart failure: roles of diastolic leak and Ca²⁺ transport. *Circ Res* 2003; 93: pp. 487-490.
- [120] Zhang, R., Khoo, M. S., Wu, Y., Yang, Y., Grueter, C. E., Ni, G., Price, E. E., Jr., Thiel, W., Guatimosim, S., Song, L. S., Madu, E. C., Shah, A. N., Vishnivetskaya, T. A., Atkinson, J. B., Gurevich, V. V., Salama, G., Lederer, W. J., Colbran, R. J., Anderson, M. E.: Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* 2005; 11: pp. 409-417.

8 Thesen

1. Die myokardiale PP2A-Überexpression im Mausmodell führt zu einem Phänotyp mit deutlich eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion und zur linksventrikulären Dilatation.
2. Nach Induktion eines Myokardinfarkts kommt es im Vergleich zum Wildtyp nach Myokardinfarkt zu einer nochmals drastisch reduzierten linksventrikulären Pumpfunktion (Fraction of area change nach Myokardinfarkt: WT $29,1 \pm 3,2$ %. PP2A $16,3 \pm 1,8$ %), linksventrikulärer Dilatation (Linksventrikulärer innerer diastolischer Diameter nach Myokardinfarkt: WT MI $6,3 \pm 0,2$ mm. PP2A MI $7,1 \pm 0,1$ mm. Linksventrikulärer innerer systolischer Diameter nach Myokardinfarkt: WT MI $5,5 \pm 0,3$ mm. PP2A $6,5 \pm 0,1$ mm).
3. Bei den Transgenen Tieren liegt eine prozentual größere Infarktausdehnung (WT $38,4 \pm 1,5$ %. PP2A $46,5 \pm 2,6$ %) vor. Ursächlich hierfür ist in erster Linie eine nicht-ischämische Infarktexpansion.
4. Die myokardiale PP2A-Überexpression hat ein pathologisches linksventrikuläres Remodeling mit einer Steigerung des Querschnitts der Kardiomyozyten (Myocyte cross sectional area nach Myokardinfarkt: WT 170 ± 8 μm^2 . PP2A 225 ± 11 μm^2) und einer vermehrten Fibrosierung (Interstitial collagen fraction nach Myokardinfarkt: WT $7,2 \pm 0,6$ %. PP2A $16,2 \pm 1,2$ %) des remote myocardium zur Folge.
5. Abweichend von anderen Tiermodellen mit erhöhter Phosphoprotein-Phosphatasenaktivität geht die myokardiale PP2A-Überexpression weder unter basalen Bedingungen noch nach Myokardinfarkt mit einer erhöhten Sterblichkeit der Versuchstiere einher.
6. Während in der Wildtyp-Kontrollgruppe nach Induktion des Myokardinfarkts innerhalb der ersten zwölf Tage Todesfälle auftraten, wurde in der transgenen Gruppe nach Tag drei kein weiterer Todesfall mehr registriert. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben, jedoch besteht in der subakuten Phase des Myokardinfarkts nach Tag zwei ein Vorteil für die transgenen Tiere.
7. Die myokardiale PP2A-Überexpression verändert die Balance der Akt/GSK3 β / β -Catenin-Kaskade: In transgenen Tieren ohne Myokardinfarkt zeigt sich eine vermehrte Phosphorylierung der GSK3 β an Serin 9 und eine Hyperphosphorylierung von β -Catenin an Serin 552 mit konsekutiver Verminderung der Gesamtkonzentration von β -Catenin.
8. Nach Myokardinfarkt besteht in der transgenen Gruppe hinsichtlich der Phosphorylierung der GSK3 β an Serin 9 und der Gesamtkonzentration von β -Catenin kein Unterschied zu Wildtypen; an Serin 552 phosphoryliertes β -Catenin ist in den Transgenen nach Myokardinfarkt signifikant erniedrigt.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	09. November 1982
Geburtsort	Karl-Marx-Stadt
Familienstand	ledig, eine Tochter

Schulbildung

1989-1993	Grundschule in Karl-Marx-Stadt (Chemnitz)
1993-2001	Gymnasium Hohe Strasse, Chemnitz
Schulabschluss	Abitur

Weiterer Werdegang und Studium

2001-2002	Grundwehrdienst im 5. Lazarettregiment in Feldkirchen, Oberbayern
10/2002-09/2003	Diplomstudiengang Medizinische Physik an der Martin-Luther-Universität, Halle
ab 10/2003	Humanmedizin, weiterhin MLU Halle
09/2005	1. Staatsexamen „Physikum“
02/2009-01/2010	Praktisches Jahr
05/2010	2. Staatsexamen
06/2010	Approbation

Beruflicher Werdegang

09/2010-08/2012	Assistenzarzt Medizinische Klinik I, St. Elisabeth Krankenhaus Halle
11/2012-10/2013	Assistenzarzt Zentrum für Innere Medizin, Klinikum St. Georg Leipzig
11/2013-heute	Assistenzarzt Klinik für Pneumologie, evangelisches Diakonissenkrankenhaus Leipzig
02/2015-07/2015	Assistenzarzt Internistische Intensivmedizin, Uniklinikum Leipzig

Leipzig, den 20.09.2016

Maximilian Höhn

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Leipzig, den 20.09.2016

Maximilian Höhn

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Leipzig, den 20.09.2016

Maximilian Höhn