

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Medizinische Klinik und Poliklinik C  
Kardiologie und Angiologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt

Doppler-echokardiographische Verlaufsuntersuchungen von Herzdilatation  
und Herzhypertrophie an zwei Beispielen transgener Mausmodelle mit  
einer herzspezifischen Überexpression von Proteinphosphatase 2A  
und Guanylyl Cyklase-A Knockout

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Veltrup, Ilka

aus Münster

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-  
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Paulus Kirchhof

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Peter Boknik

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Medizinische Klinik und Poliklinik C -Kardiologie und Angiologie-  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Paulus Kirchhof  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Peter Boknik

### ZUSAMMENFASSUNG

Doppler-echokardiographische Verlaufsuntersuchungen von Herzdilatation und Herzhypertrophie  
an zwei Beispielen transgener Mausmodelle mit einer herzspezifischen Überexpression von  
Proteinphosphatase 2A und Guanylyl Cyclase-A Knockout

Veltrup, Ilka

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen ist ein essentieller Regulationsmechanismus für viele Zellfunktionen. Die Aufgaben und Regulierung von Proteinphosphatasen bleiben bislang weitgehend unklar. In Myokardbiopsien von Patienten mit End-stage-Herzinsuffizienz wurden erhöhte Aktivitätsstufen von Proteinphosphatasen festgestellt. Zur Analyse der spezifischen Bedeutung von PP2A für die Ausprägung von Herzerkrankungen führten wir serielle *in vivo* Doppler-echokardiographische Untersuchungen an einem transgenen Mausmodell mit einer herzspezifischen Überexpression der katalytischen Untereinheit  $\alpha$  der PP2A (PP2A $\alpha$ ) durch.

PP2A transgene Mäuse entwickelten im Zeitverlauf eine kardiale Dilatation und eine eingeschränkte Herzkontraktilität. Eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. In einem sechswöchigen freiwilligen Lauftraining waren die absolut gelaufenen Distanzen der PP2A-transgenen Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus deutlich reduziert. Der Verlauf der genetisch bestimmten Herzinsuffizienz konnte durch das Training zwar nicht gemindert werden, es zeigte sich aber auch keine Exazerbation.

Die Ergebnisse weisen auf eine fundamentale Rolle von PP2A in Bezug auf die kardiale Funktion hin. Sie zeigen, dass Störungen in der Proteinphosphataseexpression und -aktivität Herzdilatation und Herzinsuffizienz auslösen, bzw. ihren Verlauf unterstützen.

Die Entwicklung einer Herzhypertrophie bzw. Herzinsuffizienz wird durch Botenstoffe und Mediatoren gesteuert. Die Gruppe der antidiuretischen Hormone nimmt hier aufgrund ihrer natriuretischen, diuretischen und relaxierenden Wirkungen eine kardioprotektive Rolle ein. Bei herzinsuffizienten Patienten finden sich zwar erhöhte Plasmaspiegel von atrialem natriuretischem Peptid (ANP), jedoch liegen eingeschränkte Wirkeigenschaften des Peptids im Sinne einer Hormonresistenz z.B. durch pathologische Veränderungen des ANP-Rezeptors und konsekutiv ausbleibender Aktivierung von nachgeschalteten Mediatoren vor. Die membranständige Guanylyl Cyclase-A (GC-A) wird physiologisch durch Bindung des ANP-Rezeptors aktiviert, sie initiiert über die Bildung eines second messengers (cGMP) auf Zellebene die kardioprotektiven Wirkungen von ANP. Eine Inaktivierung von GC-A könnte zur Ausbildung einer Herzpathologie beitragen.

Zur Veranschaulichung der Bedeutung von GC-A für die Ausbildung von Herzerkrankungen führten wir serielle *in vivo* Doppler-echokardiographische Untersuchungen an transgenen GC-A Knockout-Mäusen durch. GC-A KO Mäuse wiesen in allen Altersklassen eine funktionell kompensierte Herzhypertrophie und Herzdilatation auf. Erst im Alter von 12 Monaten zeigte sich eine reduzierte diastolische Herzfunktion im Sinne einer hypertrophen Kardiomyopathie. Im Gegensatz dazu stand beim PP2A-transgenen Mausmodell eine dilatative Kardiomyopathie im Vordergrund.

Die Versuchsvorhaben wurden von der Bezirksregierung Münster unter den Nummern G 61/99 und G 82/02 genehmigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1	Herzinsuffizienz.....	6
1.2	Proteinphosphatase 2A (PP2A) .....	7
1.2.1	Reversible Phosphorylierung als Regulationsprinzip .....	7
1.2.2	Proteinphosphatasen .....	11
1.2.2.1	Serin/Threonin-Proteinphosphatasen .....	11
1.2.2.2	Struktur der PP2A.....	13
1.2.2.3	Pathophysiologische Bedeutung der Proteinphosphatasen .....	14
1.3	Rezeptorguanlyl Cyclase-A (GC-A).....	15
1.3.1	Atriales natriuretisches Peptid und ANP/GC-A Signaltransduktions- System.....	15
1.3.2	Pathophysiologische Bedeutung der GC-A .....	16
1.4	Zielsetzung .....	17
<b>2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.1	Mausmodell PP2A.....	21
2.1.1	Mausmodell mit Überexpression von PP2A.....	21
2.1.2	Versuchsablauf und Tierversuchsgruppen.....	21
2.1.3	Genehmigung.....	23
2.2	Mausmodell GC-A Knockout.....	23
2.2.1	Mausmodell mit einer systemischen Deletion von GC-A .....	23
2.2.2	Versuchsablauf und Tierversuchsgruppen.....	23
2.2.3	Genehmigung.....	24
2.3	Transthorakale Echokardiographie und Doppleruntersuchung .....	24
2.3.1	Vorbereitungen und Anästhesie.....	24
2.3.2	Echokardiographie .....	25
2.3.2.1	Sonos 5500 Doppler-Echokardiographiesystem .....	25
2.3.2.2	2D-Echtzeitmodus .....	26
2.3.2.3	M-Mode.....	27
2.3.3	Doppler-Untersuchung.....	28
2.3.4	β-adrenerge Stimulation mit Isoprenalin beim PP2A-Mausmodell.....	30
2.3.5	Auswertung der Echokardiographiedaten.....	30

2.4	Freiwilliges Laufradtraining der PP2A-Maus .....	32
2.5	Statistik .....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1	Untersuchungen der PP2A-Maus .....	35
3.1.1	Basale Untersuchungen.....	35
3.1.1.1	PP2A vs. Wildtyp im Alter von 16 Wochen .....	35
3.1.1.2	Vergleich linksventrikulärer Parameter im Zeitverlauf .....	38
3.1.2	Isoprenalin-Belastung .....	43
3.1.3	Auswirkung von Ausdauertraining .....	46
3.2	Untersuchungen der GC-A KO Maus.....	56
3.2.1	GC-A KO vs. WT im Alter von 4 Monaten .....	56
3.2.2	GC-A KO im Zeitverlauf .....	59
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>64</b>
4.1	Methodik.....	64
4.1.1	Doppler-Echokardiographie bei der Maus.....	64
4.1.2	Mausmodell PP2A im Zeitverlauf .....	65
4.1.3	Vergleich von zwei verschiedenen Mausmodellen - PP2A vs. GC-A KO . .....	67
4.1.4	$\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin.....	68
4.1.5	Freiwilliges Laufradtraining .....	69
4.1.6	Einfluss der Ketamin/Xylazin-Narkose .....	72
4.2	Ausblicke .....	74
	<b>Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit.....</b>	<b>76</b>
	<b>Literatur .....</b>	<b>77</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>102</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Herzinsuffizienz

Der Begriff Herzinsuffizienz beschreibt ein progressives klinisches Syndrom, das durch Dyspnoe und Erschöpfung während körperlicher Belastung oder in Ruhe gekennzeichnet ist und auf eine strukturelle oder funktionelle Herzerkrankung zurückgeführt werden kann. Die klinische Definition der Herzinsuffizienz umschreibt einen Zustand, bei dem das Herz nicht in der Lage ist, die peripheren Organe – in Ruhe oder unter Belastung – ausreichend mit Blut und somit mit Sauerstoff zu versorgen (1).

Prinzipiell kann jede Herzerkrankung zur Herzinsuffizienz führen. Die häufigsten Ursachen in Europa und den USA sind die koronare Herzkrankheit mit ihrer Hauptfolge, dem Herzinfarkt, oft in Kombination mit einer langfristigen Überlastung des Herzmuskels durch Bluthochdruck und/oder Erkrankungen der Herzklappen (1), sowie primäre Erkrankungen des Herzmuskels, sogenannte Kardiomyopathien (2;3). Es wird derzeit davon ausgegangen, dass bei den Kardiomyopathien, aber auch bei anderen Formen der Herzinsuffizienz, eine initiale Myokardschädigung die Entwicklung einer Herzinsuffizienz einleitet.

Bei der chronischen Herzinsuffizienz werden zwei Formen unterschieden. Die diastolische Herzinsuffizienz ist durch ein hypertrophiertes Myokard mit eingeschränkter Relaxation und erhaltener systolischer Funktion gekennzeichnet. Bei der systolischen Herzinsuffizienz finden sich eine verminderte Ejektionsfraktion und eine dilatierte Herzkammer (4).

Die Einschränkung der kardialen Pumpfunktion wird zum einen durch adaptive Prozesse des Myokards in Form von Hypertrophie und Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix kompensiert; hier spricht man vom kardialen Remodeling. Zum anderen führt die eingeschränkte kardiale Funktion zur Aktivierung verschiedener neurohumoraler Systeme wie dem Renin-Angiotensin-System (RAAS), dem sympathischen Nervensystem, dem Endothelinsystem und dem natriuretischen Peptidsystem (5).

Die Aktivierung dieser neurohumoralen Systeme ermöglicht in der Frühphase eine Aufrechterhaltung des Herzzeitvolumens und die Perfusion lebenswichtiger Organe; bei chronischer Aktivierung jedoch kommt es zum Überwiegen vasokonstriktorischer Effekte.

Die hiermit verbundene Zunahme von Vor- und Nachlast des vorgeschädigten Myokards bedeutet eine weitere Verschlechterung der kardialen Situation.

Bei vielen Patienten mit Herzinsuffizienz wird eine genetisch angelegte Neigung zur Ausbildung einer Herzmuskelschwäche vermutet; in einigen Fällen lassen sich sogar sogenannte „genetische Kardiomyopathien“ nachweisen. Um die funktionelle Bedeutung genetischer Veränderungen zu untersuchen, können Gendefekte gezielt in transgenen Modellen, in der Regel an Mäusen, erzeugt werden. Die vorliegende Arbeit berichtet über eine phänotypische *in vivo*-Charakterisierung zweier transgener Mausmodelle, deren Gendefekte für die Ausbildung einer Herzinsuffizienz bedeutsam sein könnten.

## **1.2 Proteinphosphatase 2A (PP2A)**

### **1.2.1 Reversible Phosphorylierung als Regulationsprinzip**

Eine Zelle hat im Laufe ihres Lebens vielfältige Aufgaben zu erfüllen. Voraussetzung für das Funktionieren der zellulären Abläufe ist eine genaue Regulation aller beteiligten Prozesse. Dabei gehört die reversible Phosphorylierung von Proteinen zu einem der wichtigsten zellulären Kontrollmechanismen. Diese Modifikation der Proteine ermöglicht es den Zellen auf eine Vielzahl von veränderten Umweltbedingungen, wie z.B. auf osmotischen und oxidativen Stress (6), UV-Strahlung (7) und Wachstumsfaktoren (8) adäquat zu reagieren. Gut untersuchte Beispiele, bei denen die reversible Phosphorylierung von Proteinen zelluläre Ereignisse reguliert, sind u.a. Metabolismus (9), Ionenfluss durch Ionenkanäle (10), Kontraktilität (11) sowie Transkription und Translation von Genen (12;13). Ein abnormer Phosphorylierungsgrad ist eine der Ursachen bzw. das Resultat häufiger Krankheiten wie Krebs, Alzheimer, Diabetes mellitus oder rheumatische Arthritis (14).

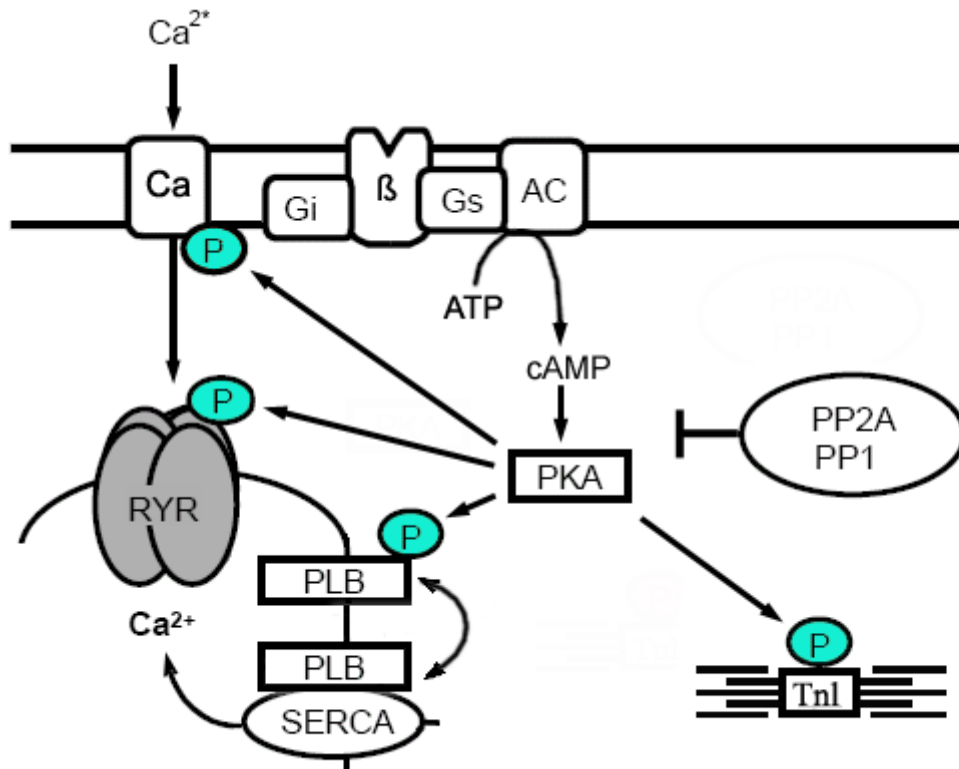
Phosphorylierungen verschiedener kardialer Proteine spielen eine wichtige Rolle für die Anpassung der Herzarbeit an körperliche Belastung. Durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation wird über ein G-Protein die Adenylatcyclase aktiviert, welche die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert (s. Abbildung 1). Dieser Vorgang aktiviert wiederum die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), welche die Phosphorylierung regulatorischer Proteine der Herzmuskelzelle katalysiert.



Mehrere physiologische Prozesse sorgen für die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit der darauf folgenden Auslösung der Herzmuskelkontraktion.

Die Phosphorylierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (15) führt zum vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und  $\text{Ca}^{2+}$  wird aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt. Der Phosphorylierungszustand von Phospholamban (PLB) reguliert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR und die damit einhergehende diastolische Relaxation. Liegt PLB im unphosphorylierten Zustand vor, hemmt es die sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Adenosintriphosphatase (SERCA), die die Aufnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das SR steuert.

Die PKA und die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II heben über eine Phosphorylierung den hemmenden Einfluss der SERCA wieder auf (16). Durch diesen Vorgang steigt die Affinität der SERCA gegenüber freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und es wird vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR transportiert (17). Das aufgenommene  $\text{Ca}^{2+}$  wird überwiegend an Calsequestrin (CSQ) gebunden (18;19).  $\text{Ca}^{2+}$  wird im Verlauf der nächsten Herzkontraktion wieder durch den Ryanodin-Rezeptor (RyR) aus dem SR freigesetzt und bindet an regulatorische Proteine der Myofilamente. Zu diesen regulatorischen Proteinen gehört der Troponin-Komplex, der sich aus dem  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Troponin (TnC), aus Troponin T und dem Troponin-Inhibitor (TnI) zusammensetzt. TnI wird ebenfalls durch die PKA phosphoryliert. Dies führt zu einer verminderten Sensitivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle am Troponin C mit konsekutiver Beschleunigung der Relaxation (20).



**Abbildung 1: Vereinfachtes Schema zur kardialen Ca<sup>2+</sup>-Homöostase in Anlehnung an Gergs (2004).**

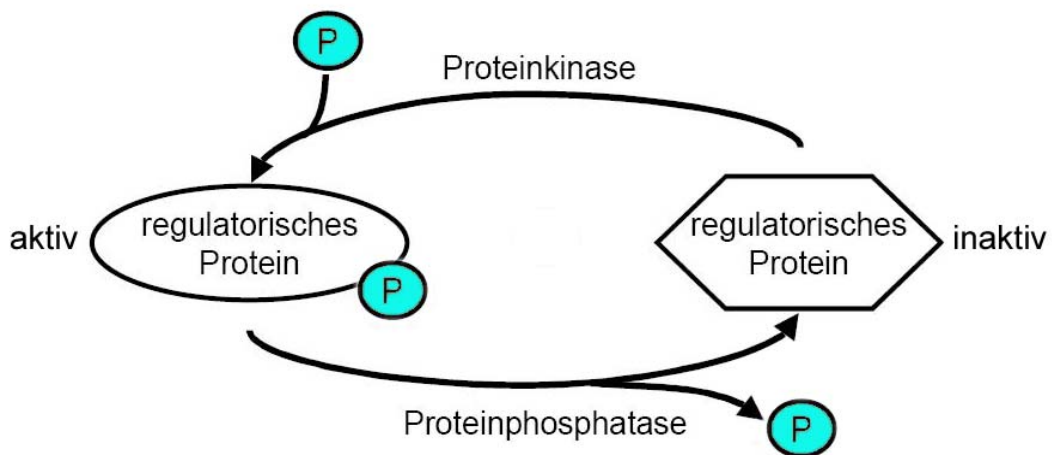
**AC:** Adenylylzyklase, **β:** β-Adrenorezeptor, **cAMP:** zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat, **Gi:** Inhibitorisches G-Protein, **G<sub>s</sub>:** stimulierendes G-Protein, **Ca:** Ca<sup>2+</sup>-Kanal, **P:** Phosphat-Rest, **PKA:** Proteinkinase A, **PLB:** Phospholamban, **PP1** und **PP2A:** Proteinphosphatase vom Typ 1 und 2, **RYR:** Ryanodin-Rezeptor, **SERCA:** SR- Ca<sup>2+</sup>-ATPase.

Im gesunden Herzen führt eine β-adrenerge Stimulation zur Phosphorylierung von PLB und damit auch zur Aktivierung der SERCA mit einer schnelleren Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme ins SR. Systolisch kann so durch den erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Gehalt im SR vermehrt Ca<sup>2+</sup> freigesetzt werden, dieser Vorgang resultiert in einer positiven Inotropie.

Im Gegensatz zum gesunden Herzen beobachtet man bei der Herzinsuffizienz und der kardialen Hypertrophie eine vermehrte Expression und Aktivität von Proteinphosphatasen, die die reversible Phosphorylierung von Proteinen wieder aufheben (siehe folgender Abschnitt). Somit kommt es zu einer verminderten PLB- und Tnl-Phosphorylierung (21-23). Die oben genannten Veränderungen in der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase führen insgesamt zu einer Abnahme des Ca<sup>2+</sup>-Gehaltes im SR (24). Somit wird die Kontraktionskraft des

Herzens eingeschränkt, die Relaxationszeit verlängert und die z.B. durch Katecholamine gesteigerte Kontraktionskraft wieder auf das normale Maß reduziert.

Bei dem Vorgang der reversiblen Phosphorylierung übernehmen Enzyme aus der Gruppe der Kinasen und Phosphatasen eine Schlüsselfunktion. Die Enzyme wechseln zwischen aktiven und inaktiven Formen, indem Phosphat-Gruppen kovalent an Aminosäuren gebunden und wieder abgetrennt werden (s. Abb. 2).



**Abbildung 2: Die reversible Phosphorylierung von Proteinen reguliert die Proteinfunktion.** Kinasen und Phosphatasen modifizieren andere Proteine, indem sie bestimmte Aminosäuren auf deren Oberfläche mit einer Phosphatgruppe modifizieren. Proteine können durch Proteinkinasen phosphoryliert und durch Proteinphosphatasen dephosphoryliert werden. Auf diese Weise wird die biologische Eigenschaft der Proteine verändert. P: Phosphat-Rest.

Diese Phosphat-Gruppen wirken so wie ein Schalter (25), der die enzymatische Aktivität eines Proteins bzw. die Bindung an andere Proteine oder an DNS verändern kann (13;26;27). Damit diese Konformationsänderungen auch tatsächlich als Schalter funktionieren können, muss die Phosphat-Gruppe reversibel gebunden werden (28;29). Wie bei vielen zellulären Kontrollmechanismen sind auch hier verschiedene Enzyme beteiligt. Kinasen binden das  $\gamma$ -Phosphat von ATP oder GTP an das Protein, während ihre Gegenspieler, die Phosphatasen, die Phosphatgruppe durch Hydrolyse wieder entfernen. Die Bedeutung dieser Steuerungsmechanismen lässt sich daran erkennen, dass etwa die

Hälfte aller in der Zelle vorkommenden Proteine eine oder sogar mehrere Phosphat-Gruppen tragen (30). Oft liegt das Protein in einer inaktiven Form vor, die durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung in eine aktive Form überführt wird. Somit entfällt bei zellulärem Bedarf des Proteins eine zeit- und energieaufwändige Neusynthese (31).

Ähnlich wie bei funktionell veränderten Proteinkinasen können auch Abnormalitäten in der Funktion von Proteinphosphatasen menschliche Krankheiten auslösen oder den Krankheitsverlauf beeinflussen (32).

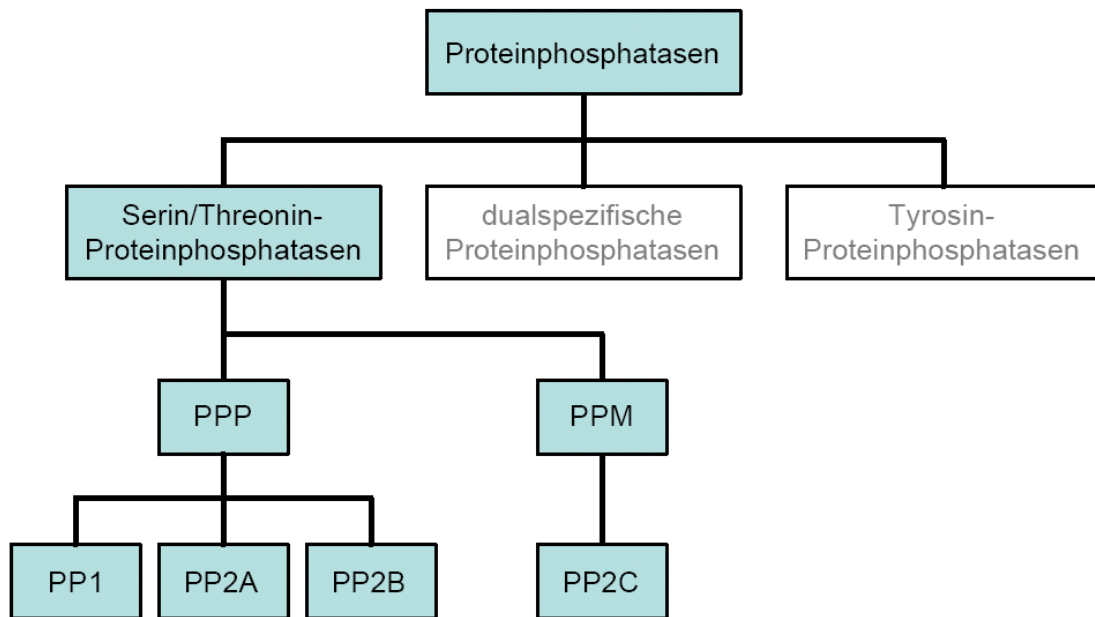
Diese Arbeit untersucht die Auswirkungen einer Überexpression der Proteinphosphatase 2A auf die Herzfunktion an einem transgenen Mausmodell.

### **1.2.2 Proteinphosphatasen**

#### **1.2.2.1 Serin/Threonin-Proteinphosphatasen**

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen sind wichtige Mechanismen zur Regulation der Zellfunktion.

Dephosphorylisierende Proteinphosphatasen sind Enzyme, die in der Lage sind Phosphorsäureester-Bindungen zu hydrolysieren. Sie werden in Tyrosin-Proteinphosphatasen, dualspezifische Proteinphosphatasen und Serin/Threonin-Proteinphosphatasen unterteilt (s. Abb. 3 (33)). Serin/Threonin-Phosphatasen dephosphorylieren die Aminosäuren Serin und Threonin.



**Abbildung 3: Gliederung der Proteinphosphatasen nach Cohen (1989).**

**PPP:** PPP-Genfamilie, **PPM:** PPM-Genfamilie, **PP1:** Proteinphosphatase 1, **PP2A:** Proteinphosphatase 2A, **PP2B:** Proteinphosphatase 2B (Calcineurin), **PP2C:** Proteinphosphatase 2C.

Die Hauptphosphatasen im menschlichen Herzen sind Serin/Threonin-Phosphatasen (34). Sie gliedern sich anhand ihrer Stimulierbarkeit durch spezifische Substrate, durch ihre Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Inhibitoren und durch Vorhandensein verschiedener Co-Faktoren in die Untergruppen PP1, 2A, 2B und 2C (34-37). Große Bedeutung haben sie insbesondere für die myokardiale Kontraktionskraft (38-42). PP2B (Calcineurin) ist unmittelbar an der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie beteiligt (43). Die katalytischen Untereinheiten PP1 und PP2A machen mit ca. 90% den größten Teil der Phosphataseaktivität des Herzens aus (33;44-46). Zusätzlich sind in den vergangenen Jahren weitere Serin/Threonin-Proteinphosphatasen vom Typ 3, 4, 5, 6 und 7 beschrieben worden (34;47). Diese sind bisher entweder nicht im Herzen nachgewiesen worden oder sie weisen nur wenig Aktivität im Herzen auf.

### 1.2.2.2 Struktur der PP2A

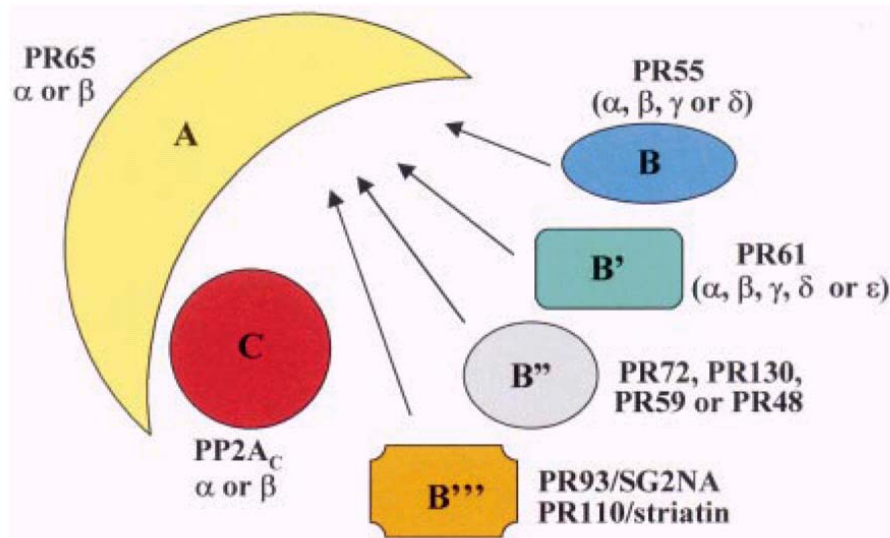
Proteinphosphatasen sind aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt (s. Abb. 4). Die regulatorischen Untereinheiten sind in der Lage, mit den katalytischen Untereinheiten zu assoziieren. Sie können so indirekt Aktivität und Substratspezifität beeinflussen und steuern ihre subzelluläre Lokalisation (34;48;49). Die Abspaltung des Phosphatrestes vom Substrat erfolgt ebenfalls durch die katalytischen Untereinheiten.

Die PP2A ist ein heterotrimeres Enzym mit vielfältigen zellulären Funktionen (32;50-55). Das PP2A-Holoenzym besteht aus einer katalytischen Untereinheit (PP2Ac) mit einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa. Die katalytische Untereinheit ist relativ fest mit einer strukturellen Untereinheit (A-Untereinheit oder PR65) mit einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa assoziiert.

In Säugetieren wurden zwei Isoformen der strukturellen Untereinheit mit einer Sequenzidentität von annähernd 87% gefunden (56). Molekulares Klonen bewies die Existenz von zwei in Säugetieren vorkommenden PP2Ac Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$ , diese weisen eine 97%ige Übereinstimmung in ihrer Primärsequenz auf (51;52;57). Beide Isoformen werden auf hohem Niveau in allen Geweben, so auch im Herzen exprimiert. Allerdings liegt die PP2Ac $\alpha$  Form 10mal häufiger als die PP2Ac $\beta$  Form vor (58). Möglicherweise ist dieses Phänomen mit einem aktiveren Genpromotor zu begründen (32). Die Isoformen werden auf verschiedenen Genen verschlüsselt.

PP2A blieb während der Evolution bemerkenswert konstant, es könnte sogar das besterhaltene Protein aller bekannten Proteine sein (59).

Eine dritte Untereinheit B ist mit der Kernstruktur assoziiert (54). Zur Zeit sind vier verschiedene Typen von B-Untereinheiten namens B, B', B'' und B''' bekannt (32), die untereinander keine Sequenzhomologie aufweisen. Wahrscheinlich dienen sie der Interaktion mit anderen Proteinen (60;61).



**Abbildung 4: Zusammensetzung der PP2A Holoenzyme nach Jannsens und Goris (2001).** Griechische Buchstaben zeigen verschiedene Isoformen an, eine Nummerierung bedeutet die Existenz mehrerer Spleißvarianten eines Gens. **C** ist die katalytische Untereinheit, **A** ist die strukturelle Untereinheit und **B/B'/B''/B'''** sind die regulatorischen Untereinheiten, die für die Struktur nicht von Bedeutung sind.

### 1.2.2.3 Pathophysiologische Bedeutung der Proteinphosphatasen

Zahlreiche Studienergebnisse deuten auf einen pathophysiologischen Einfluss von Proteinphosphatasen für die Ausbildung von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz hin.

Eine gesteigerte mRNA Expression und Aktivität von Proteinphosphatase 1 (PP1) wurde in Myokardbiopsien von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz (NYHA IV) im Vergleich zu Biopsien aus nicht insuffizienten Herzen bemerkt (23;62). Des Weiteren wurde eine verminderte Effektivität positiv inotrop wirkender Substanzen in terminal insuffizienten Herzen beobachtet (63). Auch in Tiermodellen wurde bei Tieren mit vorliegender Herzinsuffizienz und nach chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation eine Erhöhung der Proteinphosphatase-Aktivität registriert (22;64).

PP1 könnte für die Regulation der Herzkontraktion von zentraler Bedeutung sein: durch Hemmung der PP1 mittels Überexpression eines konstitutiv aktiven Inhibitors konnte die kontraktile Antwort von Kardiomyozyten auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation in terminal insuffizienten Herzen wiederhergestellt werden (65). Somit stellt diese Studie ein klinisch relevantes Modell einer kardialen Dysfunktion dar, denn eine chronisch gesteiger-

te  $\beta$ -adrenerge Stimulierung ist ein pathophysiologisches Kennzeichen des insuffizienten Herzens. Darüber hinaus könnten viele herzinsuffiziente Patienten mit  $\beta$ -adrenorezeptor-blockierenden Substraten erfolgreich therapiert werden.

Eine gesteigerte Phosphataseaktivität sollte demnach zu einer Dephosphorylierung von Regulatorproteinen führen. Diese Annahme wurde auch von mehreren unabhängigen Labors berichtet: die kardialen Proteine PLB (21;66) und TnI (67;68) lagen in Ventrikeln von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz im dephosphorylierten Zustand vor.

Die kardiospezifische Überexpression der katalytischen Untereinheit von PP1 in der Maus führte zu einer eingeschränkten Herzfunktion, zur dilatativen Kardiomyopathie und schließlich zum verfrühten Tod durch Herzversagen (65). Diese Veränderungen ähnelten phänotypisch denen der menschlichen Herzinsuffizienz (65).

Durch in mehreren Tierstudien angewendete Proteinphosphatase-Hemmstoffe kam es funktionell zu einer Zunahme der kardialen Kontraktionskraft (69;70) und zu einer Verkürzung der Relaxationszeit (71). Nicht nur eine gesteigerte Aktivität der PP1, sondern auch eine erhöhte Expression und Aktivität der PP2A könnte die Herzfunktion negativ beeinflussen.

### **1.3 Rezeptorguanylyl Cyclase-A (GC-A)**

#### **1.3.1 Atriales natriuretisches Peptid und ANP/GC-A Signaltransduktions-System**

Die Entwicklung einer Herzhypertrophie bzw. Herzinsuffizienz wird durch Botenstoffe und Mediatoren gesteuert. Bei herzinsuffizienten Patienten wurden erhöhte Plasmaspiegel von Noradrenalin, Endothelin-1 (ET-1), Renin und Angiotensin II und antidiuretischem Hormon (ADH) gefunden. Sie haben vasokonstriktorische, antidiuretische sowie prohypertrophe Eigenschaften gemeinsam und fördern so im Falle einer abgeschwächten kardialen Pumpfunktion die Aufrechterhaltung des Blutdrucks und damit die notwendige Perfusion lebenswichtiger Organe (72-74).

Ihr chronischer Einfluss verursacht allerdings eine kardiale Mehrbelastung im Sinne eines *Circulus vitiosus*, es kommt zur weiteren Einschränkung der Herzfunktion.

Die Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide sind bei manifester Herzinsuffizienz um ein Vielfaches erhöht (75;76), sie stellen aufgrund ihrer kardioprotektiven Eigenschaften



wichtige biologische Gegenspieler des oben beschriebenen Systems dar (76;77). Insbesondere die Plasmaspiegel von ANP und BNP korrelieren mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz und lassen sich so diagnostisch einsetzen (78).

Die Familie der natriuretischen Peptide besteht aus den Peptidhormonen atriales natriuretisches Peptid (ANP), B-Typ natriuretisches Peptid (BNP), C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) und dendroaspis natriuretisches Peptid (DNP). ANP wird hauptsächlich in den Vorhöfen synthetisiert, in geringeren Mengen aber auch in den Ventrikeln (79). Die atriale und die ventrikuläre Expression von ANP wird durch vermehrte Volumenbelastung oder Druckbelastung des Herzens hochreguliert (80). Die Dehnung des atrialen Myokards stellt für ANP den adäquaten Stimulus zur Freisetzung dar (81).

Den natriuretischen Peptiden ist eine natriuretische, diuretische und auf glatte Muskelzellen relaxierende Wirkung gemeinsam, sie wirken demnach kardioprotektiv und nehmen bei der Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz eine bedeutende Rolle ein.

Spezifischer Rezeptor von ANP ist der natriuretische Peptidrezeptor-A (NPR-A), der bei seiner Bindung die membranständige Guanylyl Cyclase-A (GC-A) aktiviert. Dies führt zur Bildung des second messengers cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) und es folgt eine Aktivierung der Proteinkinase G (82;83).

GC-A wird in verschiedenen Gewebezellen, u.a. in Blutgefäßen, in den Nieren, Nebennieren und im Herzen (hier auf Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasen) exprimiert (75;84;85).

### **1.3.2 Pathophysiologische Bedeutung der GC-A**

Wichtige Gegenspieler der vasokonstriktorisch wirkenden Mediatoren sind das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das brain natriuretische Peptid (BNP), deren Plasmaskonzentrationen bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz erhöht vorliegen (5).

Natriuretische Peptide wirken über natriuretische, diuretische und vasodilatierende Effekte kardioprotektiv. Sie könnten so einen kompensatorischen Mechanismus zur Senkung von Vor- und Nachlast bei manifester Herzinsuffizienz darstellen. Klinisch-pharmakologische Studien zeigten jedoch, dass die kardioprotektiven Eigenschaften von ANP bei herzinsuffizienten Patienten trotz erhöht vorliegender Plasmaspiegel stark

vermindert sind. Dieses Phänomen deutet auf eine möglicherweise vorliegende pathologische Veränderung des ANP-Rezeptors hin. Das Resultat wäre eine ausbleibende Aktivierung von nachgeschalteten Mediatoren wie der GC-A. Eventuell führen diese Veränderungen zur Wirkungsabschwächung von ANP im Sinne einer Hormonresistenz (82;86). Eine im Vergleich zum Gesunden reduzierte Aktivierung der GC-A würde im Herzen die wachstumshemmenden Effekte von ANP abschwächen. Dies könnte ein erhöhtes Zellwachstum zur Folge haben und somit möglicherweise zur Pathogenese und Progression der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz beitragen.

Weitere kardioprotektive Eigenschaften von ANP sind die Antagonisierung der antidiuretischen Wirkung von ADH (87) und der vasokonstriktorischen Wirkung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems durch Hemmung der Freisetzung von Aldosteron und Renin (88). Diese Prozesse führen zur Senkung des arteriellen Blutdrucks. Mäuse, die nicht über ein ANP-Gen verfügten, entwickelten eine chronische Hypertonie (77).

In dieser Arbeit führten wir zum ersten Mal eine Doppler-echokardiographische *in-vivo*-Charakterisierung einer neuen GC-A Knockout Mauslinie mit einer globalen systemischen GC-A Deletion durch. An diesem Mausmodell die Analyse der kardialen Auswirkungen einer simulierten ANP / GC-A Dysfunktion und ihre Bedeutung für die Ausbildung einer Herzpathologie erfolgen.

### **1.4 Zielsetzung**

Die kardiale Untersuchung sogenannter transgener Tiermodelle, die einen gezielt erzeugten, bekannten genetischen Defekt aufweisen, ermöglicht eine Analyse der funktionellen Bedeutung einzelner Proteine für die Ausbildung von Herz- und Kreislauferkrankungen.

1. Wie schon vorher berichtet, wurde beim herzinsuffizienten menschlichen Patienten eine gesteigerte Aktivität von Proteinphosphatasen beobachtet. Frühere Studien fanden heraus, dass Mäuse mit einer herzspezifischen Überexpression von Proteinphosphatase 1 (PP1) eine Herzinsuffizienz mit linksventrikulärer Dilatation und Wandhypertrophie aufwiesen (65).

In der vorliegenden experimentellen Arbeit sollten in einer ersten Untersuchungsreihe die phänotypischen Auswirkungen einer herzspezifischen chronischen Überexpression der katalytischen Untereinheit  $\alpha$  der Proteinphosphatase 2A am transgenen *in vivo*-Mausmodell untersucht werden und diese mit Ergebnissen bereits vorliegender Studien verglichen werden. Zudem sollten insbesondere die altersabhängigen echokardiographischen Veränderungen, der Zeitpunkt der Erstmanifestation einer Herzdilatation und der Verlauf der Herzdilatation analysiert werden.

Die zentralen Fragen, die mit der Doppler-echokardiographischen Untersuchungsmethode in dieser Arbeit beantwortet werden sollten, waren daher:

Wirkt sich die herzspezifische chronische Überexpression der katalytischen Untereinheit  $\alpha$  der PP2A auf die Herzfunktion aus?

In welchem Lebensalter manifestieren sich die Auswirkungen einer herzspezifischen PP2A-Überexpression? Wird im Zeitverlauf eine Progression der vermuteten Herzinsuffizienz beobachtet?

Ist die Reaktion auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation im PP2A-transgenen Mausmodell als Zeichen für eine vorliegende Herzinsuffizienz verändert?

Bestehen Unterschiede in der Leistungsfähigkeit zwischen PP2A-transgenen Tieren und Wildtypen?

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden die folgenden Untersuchungen am PP2A-transgenen Mausmodell *in vivo* durchgeführt:

1. Serielle Doppler-echokardiographische Untersuchungen (nach 8 Wochen, 32 Wochen und 56 Wochen)
2. Doppler-echokardiographische Untersuchungen unter Isoprenalinbelastung ( $\beta$ -adrenerge Stimulation)
3. Laufstreckenanalyse bei einem freiwilligen 6-wöchigen Laufradtraining und anschließende Doppler-echokardiographische Untersuchungen

Die für die PP2A-Maus erhobenen kardiovaskulären Parameter wurden jeweils mit denen der Wildtyp-Maus gleichen Alters und Geschlechts verglichen.

2. In einer zweiten Versuchsreihe sollte die kardiale und hämodynamische Funktion der GC-A KO Maus und damit die Bedeutung des ANP / GC-A Systems für die Entwicklung von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz *in vivo* untersucht werden.

Die Generierung des Mausmodells erfolgte extern. Hier wurde mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems das murine GC-A Gen global ablatiert. Die so erzeugte systemische Aufhebung der ANP-Wirkungen führt möglicherweise aufgrund einer gesteigerten Nachlast zu einer Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz. Die kardiale und hämodynamische Funktion der GC-A KO Maus wurde wie oben vorbeschrieben im Zeitverlauf echokardiographisch bestimmt. Die zentralen Fragen dieser Analyse waren daher:

Wirkt sich eine globale Ausschaltung des GC-A Gens in der Maus auf die Herzfunktion *in vivo* aus?

In welchem Lebensalter manifestieren sich diese Veränderungen der Herzfunktion? Liegt im Zeitverlauf eine Progression der vermuteten Herzinsuffizienz vor?

Liegen in den unterschiedlichen Mausmodellen (PP2A vs. GC-A KO) verschiedene Formen der Herzinsuffizienz vor?

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden die folgenden Untersuchungen am GC-A Knockout Mausmodell *in vivo* durchgeführt:

Zeitabhängige Doppler-echokardiographische Untersuchungen (nach 4 Monaten (16 Wochen), 8 Monaten (32 Wochen) und 12 Monaten (48 Wochen))

Erneut erfolgte ein Vergleich mit Messungen an Wildtyp-Geschwistertieren gleichen Alters und Geschlechts.

Die Dissertation wurde im Rahmen der zentralen Projektgruppe „Kleintierphänotypisierung“ (ZPG4) des IZKF Münster und der zentralen Projektgruppe Z2 „Kardiale Phänotypisierung transgener Mäuse – Pumpfunktion und Elektrophysiologie“ im Sonderforschungsbereich 556 „Herzinsuffizienz und Arrhythmien“ angefertigt.

## 2 Methoden

### 2.1 Mausmodell PP2A

#### 2.1.1 Mausmodell mit Überexpression von PP2A

Zahlreiche Vorteile sprechen für die Verwendung eines transgenen Mausmodells zur Analyse von gezielt erzeugten Gendefekten. Für die Generierung genetisch manipulierter Mäuse bestehen etablierte Methoden. Ferner gleicht das Mausgenom dem des Menschen hinsichtlich Größe und Anzahl der Gene. Mäuse haben eine hohe Reproduktionsrate dank kurzer Generationszeiten von 2,5 bis 3 Monaten und einer geringen Lebenserwartung von 2,5 bis zu 3 Jahren. Daher lassen sich die Effekte einer Genmanipulation im Laufe der Entwicklung der Maus gut beobachten.

Die Zucht und Genotypisierung der PP2A-überexprimierenden Mäuse wurde im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Münster unter der Leitung von Dr. med. U. Gergs vorgenommen.

Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte eine Doppler-echokardiographische *in vivo*-Phänotypisierung des Mausmodells, ein Katecholamin-Belastungstest sowie die Durchführung und Analyse eines freiwilligen Laufradtrainings. Einzelheiten zur Generierung des PP2A-Mausmodells sind in der Dissertation von G. Hanske „Zur Bedeutung der kontraktiven Dysfunktion und der Auswirkung von Calcium-regulierenden Proteinen auf L-Typ-Calciumkanäle im Herz-Kreislauf-System“ (2003) zu entnehmen.

#### 2.1.2 Versuchsablauf und Tierversuchsgruppen

Zur *in vivo*-Phänotypisierung des Mausmodells wurden paarweise ein PP2A-transgenes (n=10) und ein nichttransgenes Geschwistertier gleichen Geschlechts und gleichen Alters (n=10) zunächst im Alter von 8 Wochen Doppler-echokardiographisch untersucht. Erneute Untersuchungen erfolgten im Alter von 16 Wochen und als seneszente Maus im Alter von 52 Wochen. Die einzelne Maus wurde so im Verlauf dreimal untersucht.

Im M-Mode und 2D Bild wurden die Größen der Herzhöhlen, der basalen Aortenwurzel, die Wanddicken des linken Ventrikels und die linksventrikuläre Kammerlänge beurteilt. Zusätzlich wurden mit Hilfe der Doppler-Untersuchung Aussagen über die intrakardialen Blutstromverhältnisse möglich.

Die aus transgenen Tieren erhaltenen Werte dienten zum Vergleich mit Normalwerten, welche von Wildtyp-Geschwistertieren gewonnen wurden.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden im Rahmen eines Belastungstests 10 transgene und 10 WT-Geschwistertiere im Alter von 52 Wochen unmittelbar nach einer i.p.-Injektion mit Isoprenalin (2mg/kg Körpergewicht) Doppler-echokardiographisch untersucht.

Ein freiwilliges 6-wöchiges Laufradtraining wurde von PP2A-transgenen Tieren (n=10) und Wildtyp-Tieren (n=10) in einer dritten Versuchsreihe absolviert. Hier wurden die transgenen Mäuse und Wildtyp-Mäuse zufällig in eine nicht trainierende und eine trainierende Gruppe eingeteilt, und diese wurden jeweils vor und nach der Trainingsperiode Doppler-echokardiographisch untersucht.

Hieraus ergaben sich die in der Tabelle 1 gelisteten Untergruppen:

<b>Untersuchungsreihe</b>	<b>Wildtyp</b>		<b>PP2A</b>	
Serielle Doppler-Echokardiographie (Alter: 8W, 16W, 52W)	n = 10		n = 10	
β-adrenerge Stimulation (Alter: 52W)	n = 10		n = 10	
Laufradtraining (Alter: 11W)	n = 10		n = 10	
	<b>trainiert</b>	<b>untrainiert</b>	<b>trainiert</b>	<b>untrainiert</b>
	n=5	n=5	n=5	n=5

**Tabelle 1: Tierversuchsgruppen und Arbeitsprogramm**

**W:** Alter in Wochen; **n:** Anzahl der Tiere; **Wildtyp:** Wildtyp-Maus; **PP2A:** PP2A-transgene Maus.

### **2.1.3 Genehmigung**

Das Versuchsvorhaben wurde von der Bezirksregierung Münster unter der Nummer G 61/99 genehmigt.

## **2.2 Mausmodell GC-A Knockout**

### **2.2.1 Mausmodell mit einer systemischen Deletion von GC-A**

Die Zucht und Genotypisierung der GC-A Knockout Mäuse erfolgte im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Münster unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. M. Kuhn.

Ausgewählte Tiere wurden an die Medizinische Klinik C weitergeleitet. Einzelheiten zur Erzeugung dieses transgenen Modells sind publiziert (89).

### **2.2.2 Versuchsablauf und Tierversuchsgruppen**

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Doppler-echokardiographischen Phänotypisierung des Mausmodells mit einer systemischen Deletion von Guanylyl Cyclase-A (GC-A) im Zeitverlauf.

Dazu wurden paarweise eine GC-A KO Maus (n=10) und ein nichttransgenes Geschwistertier gleichen Geschlechts und gleichen Alters (n=10) seriell im Alter von 4 Monaten, 8 Monaten und 12 Monaten Doppler-echokardiographisch untersucht.

Im M-Mode und 2D Bild wurden die Größen der Herzhöhlen, der basalen Aortenwurzel, die linksventrikulären Wanddicken und die Kammerdurchmesser beurteilt.

In der Doppler-Untersuchung erfolgten Analysen der intrakardialen Blutstromverhältnisse.

Die aus transgenen Tieren erhaltenen Werte dienten zum Vergleich mit Normalwerten, welche von Wildtyp-Geschwistertieren gewonnen wurden.



Hieraus ergaben sich die in der Tabelle 2 gelisteten Untergruppen:

Untersuchungsreihe	Wildtyp	GC-A KO
Serielle Doppler-Echokardiographie (Alter: 4M (16W), 8M (32W), 12M (48W))	n = 10	n = 10

**Tabelle 2: Tierversuchsgruppen und Arbeitsprogramm**

**M:** Alter in Monaten, **W:** Alter in Wochen, **n:** Anzahl Tiere, **Wildtyp:** Wildtyp-Maus, **GC-A KO:** GC-A Knockout Maus.

### 2.2.3 Genehmigung

Das Versuchsvorhaben wurde von der Bezirksregierung Münster unter der Nummer G 82/02 genehmigt.

## 2.3 Transthorakale Echokardiographie und Doppleruntersuchung

### 2.3.1 Vorbereitungen und Anästhesie

Die Durchführung der Ultraschalluntersuchungen erfolgte für beide Mausmodelle identisch: Zunächst wurde die Maus sediert (25 mg Ketamin S und 10 mg Xylazin 2% pro kg Körpergewicht intraperitoneal (i.p.)). Die Anästhesie mit Ketamin S und Xylazin stellt eine in der Literatur etablierte Methode zur Sedierung der Maus vor der Doppler-Echokardiographie dar (90-94). Sie führt bei der Maus zu einer Vollnarkose mit guter Analgesie, Muskelrelaxation und leichter Atemdepression. Anschließend wurden zur Verbesserung der Bildqualität der ventral-linksseitige Brustkorb sowie der kraniale Bauchbereich rasiert, zuletzt wurden die Resthaare mit einer Enthaarungscreme vollständig entfernt.

Bei 12 Monate alten GC-A Knockout Mäusen wechselten wir aufgrund in Probeversuchen mit Ketamin/Xylazin-Narkose aufgetretenen ausgeprägten Bradykardien zur Se-

dierung mit Diazepam (17,5mg Diazepam (Diazepam-ratiopharm®) pro kg Körpergewicht i.p.). Auch diese Methode wurde bereits erfolgreich von verschiedenen Arbeitsgruppen angewendet (95).

Die sedierte Maus wurde anschließend mit Hilfe von Klebestreifen an den Gliedmaßen in Rückenlage auf einer Plexiglaswärmeplatte fixiert. Mit Kontaktgel benetzte EKG-Elektrodenplättchen wurden unter die Vorderpfoten und die linke Hinterpfote geschoben. So konnte simultan während der echokardiographischen Untersuchung ein EKG aufgezeichnet werden. Das Ultraschallgerät HP Sonos 5500 (Firma Philips, Hamburg, Germany) bestimmte kontinuierlich die Herzfrequenz der Maus. In seltenen Fällen von tiefer Bradykardie (Herzfrequenz < 180 Schläge/min) wurde die Untersuchung abgebrochen und tachykardisierende Maßnahmen (externe Erwärmung, Körpermassage, Isoprenalingabe) eingeleitet.

Der Brustkorb wurde nun mit einer ca. 1,5 cm dicken Schicht aus zentrifugiertem und damit luftblasenfreiem Ultraschallgel bedeckt. Das Gel diente als Schallfenster und als Abstandhalter zur optimalen Fokussierung.

Die Wärmeplatte wurde um 15° gekippt, so dass die Maus in linker Seitenlage zu liegen kam.

### **2.3.2 Echokardiographie**

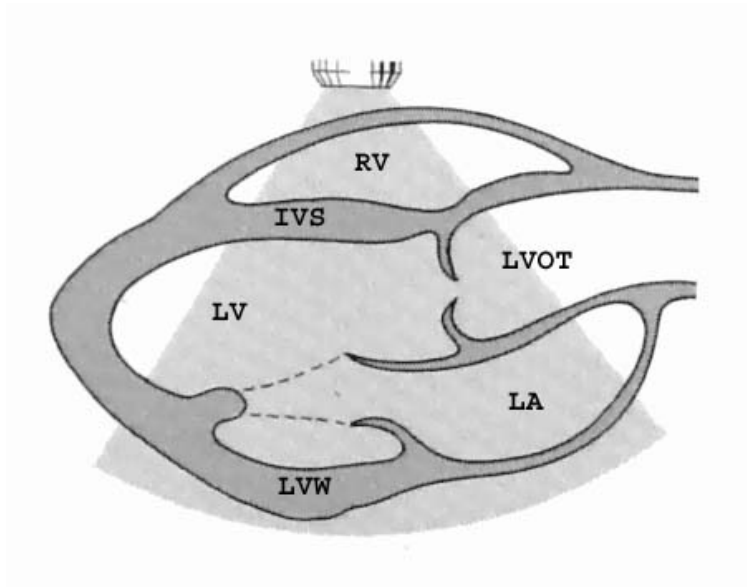
#### **2.3.2.1 Sonos 5500 Doppler-Echokardiographiesystem**

Alle Messungen wurden mit dem handelsüblichen Gerät Philips SONOS 5500 Doppler-Echokardiographiesystem durchgeführt. Ausgestattet war das Gerät mit einem 12 MHz Doppler- und einem 15 MHz 2D-Schallkopf, die klinisch in der Neonatologie und Dermatologie zum Einsatz kommen. Bei der Maus konnten so auch feine kardiale Strukturen in einer Tiefe von 0-4 cm abgebildet werden. Das Gerät verfügte über eine Software, die eine Bildspeicherung mit hoher Bildfrequenz ermöglichte.

Die erhobenen Daten wurden digital auf einer magnetooptischen Platte (Magneto Optical Disk, MOD) aufgezeichnet und nach der Untersuchung bearbeitet.

### 2.3.2.2 2D-Echtzeitmodus

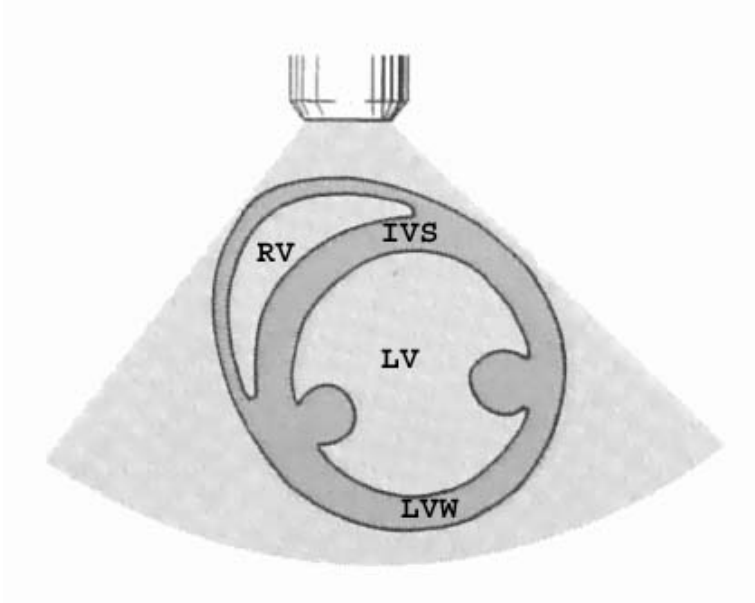
Zunächst wurden mit einem 15MHz Linearschallkopf Längs- und Querachsenansichten des Mausherzens dargestellt. Als Standardeinstellungen wurden die beim Menschen etablierten Standardeinstellungen der langen und kurzen parasternalen Achse gewählt. Bei der Längsachsenansicht wurde der Schallkopf, vom linken Rippenbogen zur rechten Schulter weisend, leicht ohne Druck auszuüben in das Gelkissen eingetaucht. In der bildlichen Darstellung lag die Aortenwurzel waagrecht im rechten Bildausschnitt. Bei geschlossener Aortenklappe erschien diese als Mittelecho innerhalb der Aorta. Der linke Ventrikel schloss sich im Bild waagrecht nach links weisend an. Weiterhin waren das linke Atrium und Teile des rechten Ventrikels sichtbar (s. Abb. 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung einer echokardiographischen Längsachsenansicht des Herzens nach Köhler und Tataru (2001).**

**IVS:** Interventrikuläres Septum; **LV:** linker Ventrikel; **LVW:** Hinterwand des linken Ventrikels; **RV:** rechter Ventrikel.

Nach Drehung des Schallkopfes um 90° mit dem Uhrzeigersinn gelang die Darstellung der Querachsenansicht mit der Standardeinstellung durch die Papillarmuskelebene (s. Abb. 6).



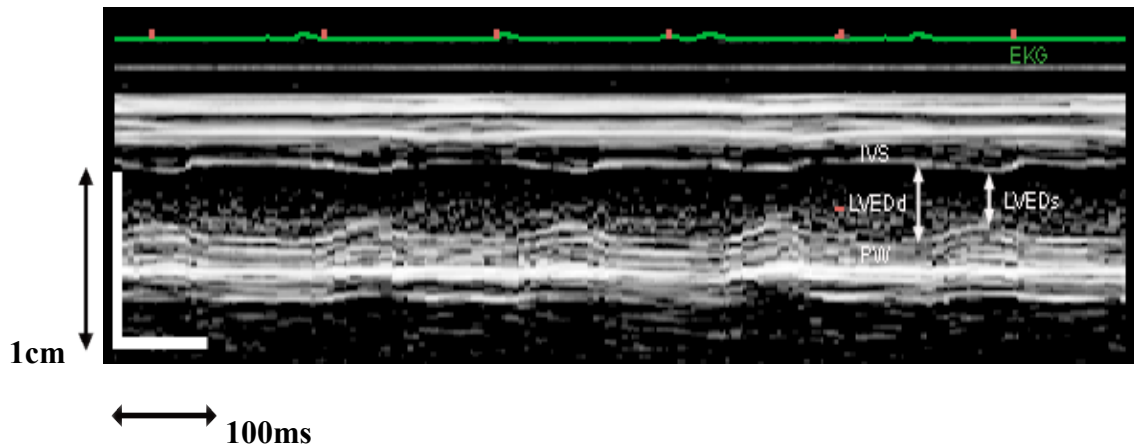
**Abbildung 6: Schematische Darstellung einer echokardiographischen Querachsenansicht des Herzens nach Köhler und Tataru (2001).**

IVS: Interventrikuläres Septum; LV: linker Ventrikel; LVW: Hinterwand des linken Ventrikels; RV: rechter Ventrikel.

### 2.3.2.3 M-Mode

Beim Time-Motion-Mode (M-Mode) wird ein Strahl bei einer hohen Pulswiederholungsfrequenz (1000-5000/s) eingesetzt. Die Darstellung der Signal-Amplitude erfolgt auf der vertikalen Achse. Die von den hintereinander liegenden Pulsen erzeugten Echozüge sind auf der horizontalen Achse gegeneinander verschoben. Diese Achse stellt somit die Zeitachse dar. Bewegungen wie bei der Echokardiographie die Herzkontraktion haben Unterschiede in den einzelnen Pulsechos zur Folge, es lassen sich so die Bewegungsabläufe einzelner Herzmuskelbereiche eindimensional darstellen (96).

Die M-Modes wurden in der parasternalen Längsachsenansicht dicht unterhalb der Mitralklappe mit Darstellung des interventrikulären Septums, des linken Ventrikels und der linken Ventrikelwand angefertigt. Bei im Querschnitt auf Papillarmuskelebene angefertigten M-Modes wurde der Schallstrahl direkt zwischen die Papillarmuskeln gelegt (s. Abb. 7). So war gewährleistet, dass annähernd die gleichen Strukturen wie im Längsschnitt dargestellt wurden.



**Abbildung 7: M-Mode einer Wildtyp-Maus bei Anlotung in der parasternalen Querachse mit oben (grün) dargestelltem EKG.**

**IVS:** intraventrikuläres Septum; **LVEDd:** linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; **LVEDs:** linksventrikulärer systolischer Durchmesser; **PW:** Hinterwand.

### 2.3.3 Doppler-Untersuchung

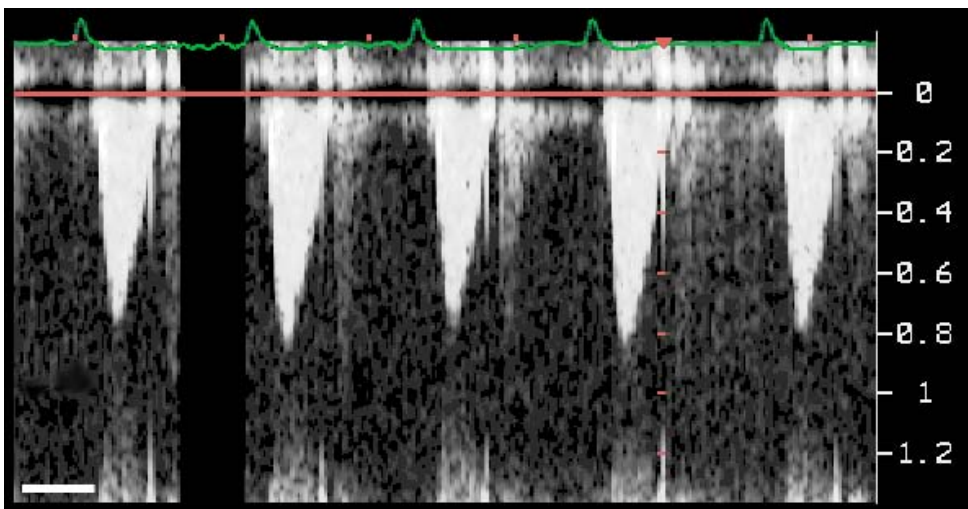
Die Doppler-Untersuchung erfolgte mit einem 12 MHz Sektorschallkopf. Zur Linearisierung der Ultraschallsignale wurde eine ca. 1 cm lange Vorlaufstrecke, bestehend aus einem mit zentrifugiertem Ultraschallgel gefüllten Zeigefinger eines handelsüblichen puderfreien Latexhandschuhs, vorgeschaltet. Es wurde das CW (continuous wave)-Dopplerverfahren eingesetzt, um den Blutstrom im Bereich der Aorten- und Mitralklappe darzustellen. Bei diesem Verfahren werden kontinuierlich Ultraschallwellen ausgesandt und empfangen, wobei auch sehr schnelle Geschwindigkeiten registriert werden und die typischen Dopplerfrequenzspektren entstehen (s. Abb. 8 und 9). Anhand der Frequenzspektren konnte so der gedoppelte Gefäßbereich definiert und die Flussgeschwindigkeiten gemessen werden (97).

Der Schallkopf wurde dabei so ausgerichtet, dass im 2-D-Bild eine Längsachsenansicht des Herzens zur Kontrolle dargestellt werden konnte. Der Strahl wurde für die Aortendopplermessungen durch die Aorta gelegt. Die Strömung in der Aorta descendens bewegte sich entgegengesetzt zum Schallkopf und war demnach negativ (s. Abb. 8).

Zur Darstellung des Blutstroms in der Mitralklappe erfolgte eine Strahleinstellung durch die Mitralklappe unter Neigung des Schallkopfes. Als Kennzeichen des frühen, schnell-

len und passiven Einflusses stellte sich die E-Welle dar. Am Ende des spätdiastolischen Einflusses kam es zur erneuten Flusszunahme in Form der A-Welle als Zeichen der Vorhofkontraktion. Beide Strömungen bewegten sich auf den Schallkopf zu und waren demnach positiv (s. Abb. 9). Es entstanden aortale bzw. mitrale Spektralkurven, die denen von Menschen sehr ähnelten. Voraussetzung für die quantitative Auswertung waren klar abgrenzbare Flächen der Spektralkurven.

Zur Minimierung der Untersuchungszeit wurden die Bilddaten digital auf einer Magneto-Optical Disk zur off line Analyse gespeichert.



100ms

Abbildung 8: CW-Doppler-Spektralkurven des Aortenflusses (systolischer Ausstrom aus dem linken Ventrikel) bei einer WT-Maus.

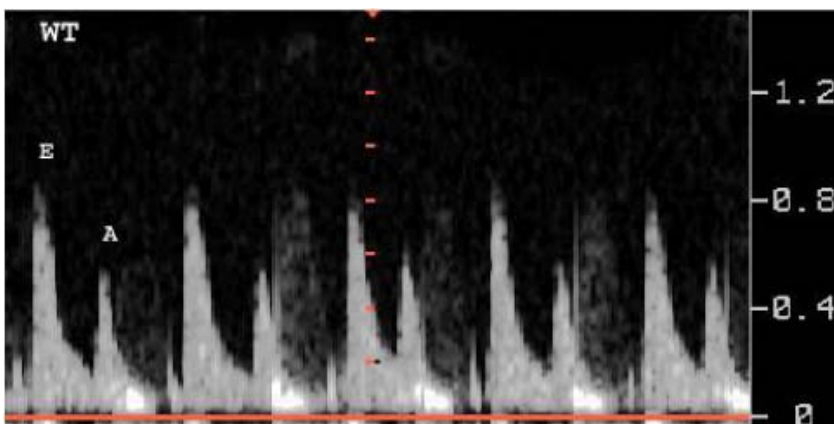


Abbildung 9: Darstellung der CW-Doppler-Spektralkurven auf Höhe der Mitralklappe bei einer WT-Maus.

### **2.3.4 $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin beim PP2A-Mausmodell**

Zur Simulation einer plötzlichen Belastung und Detektierung kardialer Ereignisse erfolgte im Anschluss an die Doppler-Untersuchung bei 52 Wochen (13 Monate) alten PP2A-Mäusen und ihren WT-Geschwistertieren (n=10) eine intraperitoneal injizierte Isoprenalingabe (2 $\mu$ g/g Körpergewicht i.p.). Schon nach wenigen Sekunden ließ sich im EKG eine Herzfrequenzzunahme als Bestätigung der korrekten Applizierung ausmachen.

Es folgte wie schon oben beschrieben erneut eine echokardiographische Untersuchung der Querachsenansicht durch die Papillarmuskelebene mit dem 15 MHz-Linearschallkopf, anschließend erfolgte eine Doppler-Untersuchung mit dem 12 MHz-Sektorschallkopf zur Erfassung der Blutströme durch Aorten- und Mitralklappen.

Auch diese Bilddaten wurden digital auf Magneto-Optical Discs zur off-line-Analyse aufgezeichnet.

Zuletzt wurde die Maus von der Fixierung befreit und für den Zeitraum von zwei Stunden unter Rotlicht im Käfig nachbeobachtet. Vom Zeitpunkt der Sedierung bis zum Ende der Untersuchung vergingen in der Regel 20 bis 25 Minuten.

### **2.3.5 Auswertung der Echokardiographiedaten**

Alle Auswertungen erfolgten offline durch einen Untersucher, der bezüglich des Genotyps (PP2A-transgen vs. WT bzw. GC-A KO vs. WT) geblindet war. Einzelne Variablen, die sich nicht optimal messen ließen oder bei denen die Anschallungsebene nicht den Standardschnitten entsprach, wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Messungen der einzelnen Parameter erfolgten mit dem im Echokardiographiergerät integrierten Messsystem. Bei quantitativen Distanzmessungen wurde nach der „Leading-Edge-Methode“, entsprechend den Leitlinien der amerikanischen Gesellschaft für Echokardiographie, verfahren. Hier wurde von der Vorderkante der jeweils interessierenden Echolinie gemessen.

In den zweidimensionalen Standardeinstellungen wurden die folgenden Parameter gemessen: In der enddiastolischen Längsachsenansicht wurden der linksventrikuläre Ausflusstrakt (LVOT) an der engsten Stelle der Aorta und der Aortenwurzeldurchmesser

(**AoV**) in Klappenhöhe gemessen. Jeder Parameter wurde dreimal in jeweils neu angelegten Einstellungen gemessen und anschließend wurde der Mittelwert aus den Einzelwerten bestimmt.

Für die weitere Linksherzvermessung wurden im M-Mode die Wanddicken des Septums (**IVSd / IVSs**), die Wanddicken der linksventrikulären Kammerwand (**LVWd / LVWs**) und der linksventrikuläre Durchmesser (**LVEDd / LVEDs**) jeweils in der Diastole und in der Systole bestimmt. Für jeden Parameter wurden zwei Messungen im M-Mode des Längsschnittes und drei Messungen im M-Mode des Querschnittes verwendet. Aus diesen fünf Einzelwerten wurde dann der Mittelwert für jeden oben genannten Parameter bestimmt. Alle Messwerte wurden in mm angegeben.

Im CW-Doppler wurden anschließend sieben weitere Linksherz-Parameter gemessen: Im Aortendoppler wurde die maximale Flussgeschwindigkeit in der Aorta (**AoVmax**) als Punkt des frühsystolischen Geschwindigkeitsmaximums ermittelt. Außerdem wurden der zeitliche Abstand zwischen zwei Aortenschlägen (**Ao R-R**) sowie die Akzelerationszeit (**Ao Accel-Zeit**) und Dezelerationszeit (**Ao Decel-Zeit**) in ms gemessen. Des Weiteren wurden im Bereich der Aorta der maximale Druck (**AoPGmax**) und der durchschnittliche Druck (**AoPGmean**) erfasst.

Im Mitraldoppler wurden im atrioventrikulären Übergang in der frühen Diastole die maximale Flussgeschwindigkeit (**MV Vmax = MV E Punkt = erster Gipfel der zweigipfeligen Darstellung des Mitralklappenflusses**) direkt nach der Mitralklappenöffnung gemessen. Am Ende der Diastole folgte die Bestimmung des Punktes der höchsten Flussgeschwindigkeit zum Zeitpunkt der Vorhofkontraktion (**MV A Punkt = zweiter Gipfel**). Vom Zeitpunkt der höchsten Flussgeschwindigkeit (**MV E Punkt**) bis zum Ende des ersten Einstroms wurde die Dezelerationszeit (**MV Decel-Zeit**) in ms bestimmt. Zusätzlich wurde die Kontur des Mitralflusses zur automatischen Errechnung des maximalen und durchschnittlichen Mitralflusses (**MV max PG / MV MPG**) bestimmt. Die genannten Parameter wurden jeweils in drei Einstellungen gemessen, aus den Einzelwerten wurde ein Mittelwert errechnet.



Aus den gemessenen Werten wurden folgende Parameter rechnerisch ermittelt:

Parameter	Abkürzung	Formel	Einheit
Herzfrequenz	HF	$1000/AoRR*60$	Schläge/ min
Linksventrikuläre Verkürzungsfraction	FS	$((LVEDd-LVEDs)/LVEDd)*100$	%
Herzzeitvolumen	HZV	Schlagvolumen*Herzfrequenz	ml/min
Schlagvolumen (Aorta)	SV (Ao)	$(Ao/2)^2 * \pi * VT/ 100$	ml
Schlagvolumen (LVOT)	SV (LVOT)	$(LVOT/2)^2 * \pi * VT/ 100$	ml
Linksventrikuläre Ejektionszeit	LVET	Zeit in ms des Aortendopplersignals	ms
Verhältnis von E Punkt zum A Punkt	MV E/A	MV E Punkt/ MV A Punkt	
Masse des linken Ventrikels	LV Masse	$((IVSd+LVEDd+LVWd)^3-LVEDd^3)*1,055$	mg
Verhältnis von der linksventrikulären Masse zum Körpergewicht	LV/BW ratio	LV Masse/KG	
Zirkuläre Faserverkürzung	Vcf	$10* FS/LVET$	Circ/s
Verhältnis vom HZV zum Körpergewicht	Cardiac index	HZV/KG	g/ml

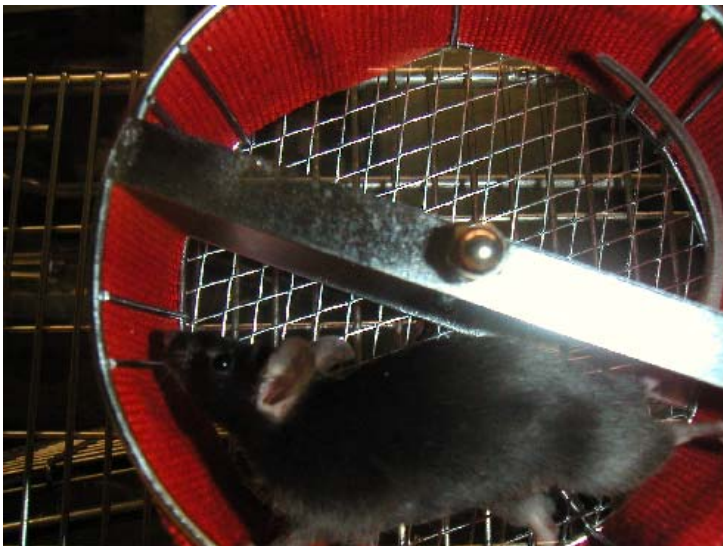
**Tabelle 3: Errechnete Werte aus echokardiographischen Daten.**

## **2.4 Freiwilliges Laufradtraining der PP2A-Maus**

In Vorbereitung auf ein freiwilliges sechswöchiges Laufradtraining wurden 8 Wochen alte PP2A transgene Mäuse (n=5) und ihre Wildtyp-Geschwistertiere (n=5) zufällig einer trainierenden Gruppe zugeteilt. Dieser gegenübergestellt wurde eine nichttrainierende alters-, gewichts- und geschlechtsadaptierte Kontrollgruppe bestehend aus PP2A transgenen Mäusen (n=5) und Wildtypmäusen (n=5). Um Ausgangswerte zu erhalten wurden im Vorfeld sowohl Trainingsgruppen als auch Kontrollgruppen Doppler-

echokardiographisch untersucht. Anschließend wurden die Mäuse je nach Gruppenzugehörigkeit in transparenten Einzelkäfigen mit oder ohne Laufräder untergebracht. Die speziell für Nager konzipierten Laufräder (aus rostfreiem Material mit Teppich ausgekleidet, Durchmesser ca. 14 cm) der trainierenden Gruppen waren fest am Käfig befestigt. Alle Tiere hatten freien Zugriff auf artgerechtes Futter und Leitungswasser. Die freiwilligen Laufstrecken, die von den trainierenden Mäusen innerhalb einer 24-stündlichen Zeitspanne abgeleistet wurden, konnten an einem außen am Käfig befestigten im Handel erhältlichen Kilometerzähler abgelesen werden. Die durchschnittliche wöchentliche Laufstrecke jeder Maus wurde aus den täglichen Laufstrecken summiert. Ferner wurde während der Trainingsphase wöchentlich das Körpergewicht notiert. Die Trainingsperiode wurde auf 6 Wochen festgelegt, da Studien zufolge die täglichen Renndistanzen bei Ratten nach 7-8 Wochen einen Höhepunkt aufwiesen und ab diesem Zeitpunkt wieder abnahmen (98).

Die Tiere der trainierenden Gruppen begannen ohne weitere Anreize vor allem nachts zu laufen (s. Abb. 10). Im Anschluss an die sechswöchige Trainingsperiode wurden sowohl die Trainingsgruppen als auch die nichttrainierende Kontrollgruppen erneut Dopplerechokardiographisch untersucht. Diese Messwerte wurden den Ausgangswerten gegenübergestellt.



**Abbildung 10: Eine Maus der Trainingsgruppe bei Benutzung des Laufrades.**

## **2.5 Statistik**

Die Werteverteilung in den zu vergleichenden Gruppen wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung überprüft. Nach Bestätigung einer Normalverteilung wurden alle Variablen nach Genotypen mit Hilfe *des post-hoc Student's T test* (Microsoft Excel 2000) für unverbundene Stichproben und *ANOVA* (SPSS Version 10) verglichen. Diese Testverfahren vergleichen, ob zwei Gruppen von quantitativen, normal verteilten Merkmalen um den gleichen Mittelwert streuen.

Als signifikant wurden Unterschiede anerkannt, die einen zweiseitigen alpha-Fehler  $<0,05$  ( $p < 0,05$ ) aufwiesen. Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen der PP2A-Maus

##### 3.1.1 Basale Untersuchungen

##### 3.1.1.1 PP2A vs. Wildtyp im Alter von 16 Wochen

PP2A-transgene Mäuse waren äußerlich nicht von WT-Mäusen unterscheidbar. Die Mäuse waren ähnlich groß und schwer und zeigten weder Verhaltensauffälligkeiten noch eine erhöhte Mortalitätsrate.

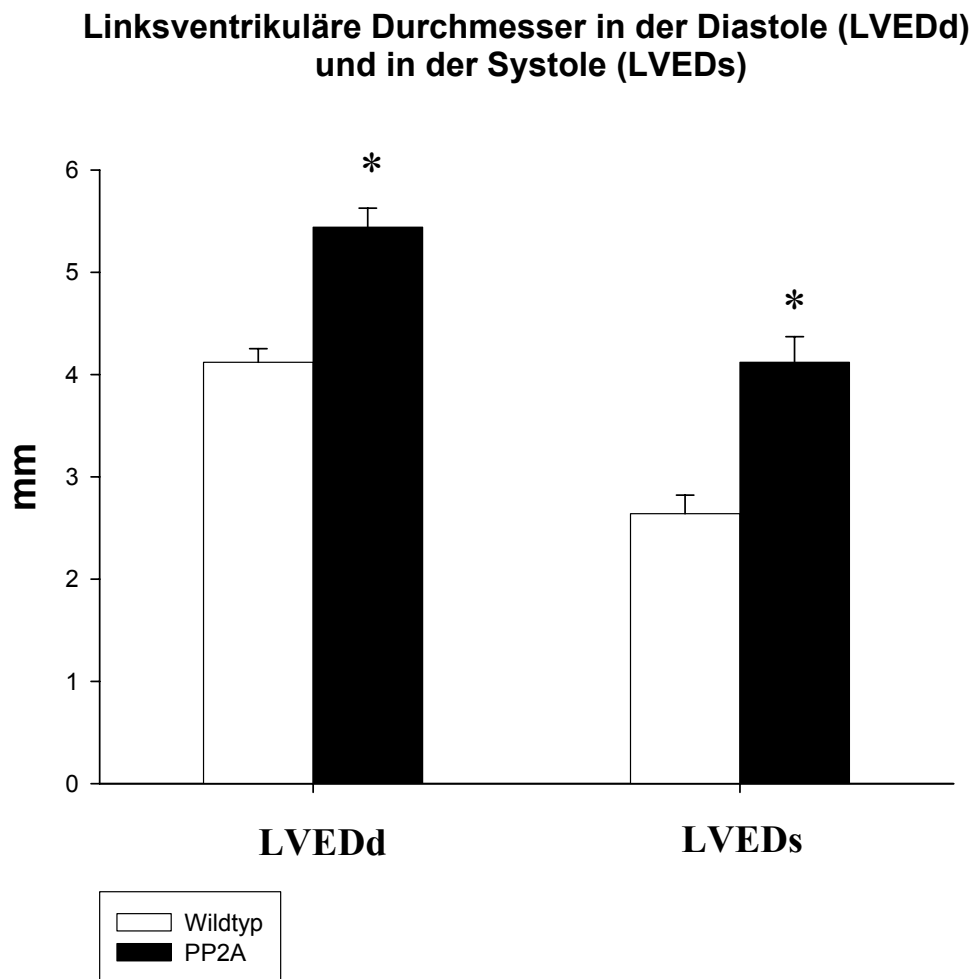
Auch die Ruhe-Herzfrequenz (HF) unterschied sich im PP2A Mausmodell nicht signifikant im Vergleich zu den Werten der altersadaptierten WT-Maus. Zwischen männlichen und weiblichen Mäusen gleichen Genotyps wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Die durchschnittliche Herzfrequenz unter der Sedierung mit Ketamin/Xylazin lag im Alter von 16 Wochen in der PP2A-Gruppe bei  $334 \pm 14$  Schläge pro Minute und in der Wildtyp-Gruppe bei  $317 \pm 13$  Schläge pro Minute (s. Tab. 4).

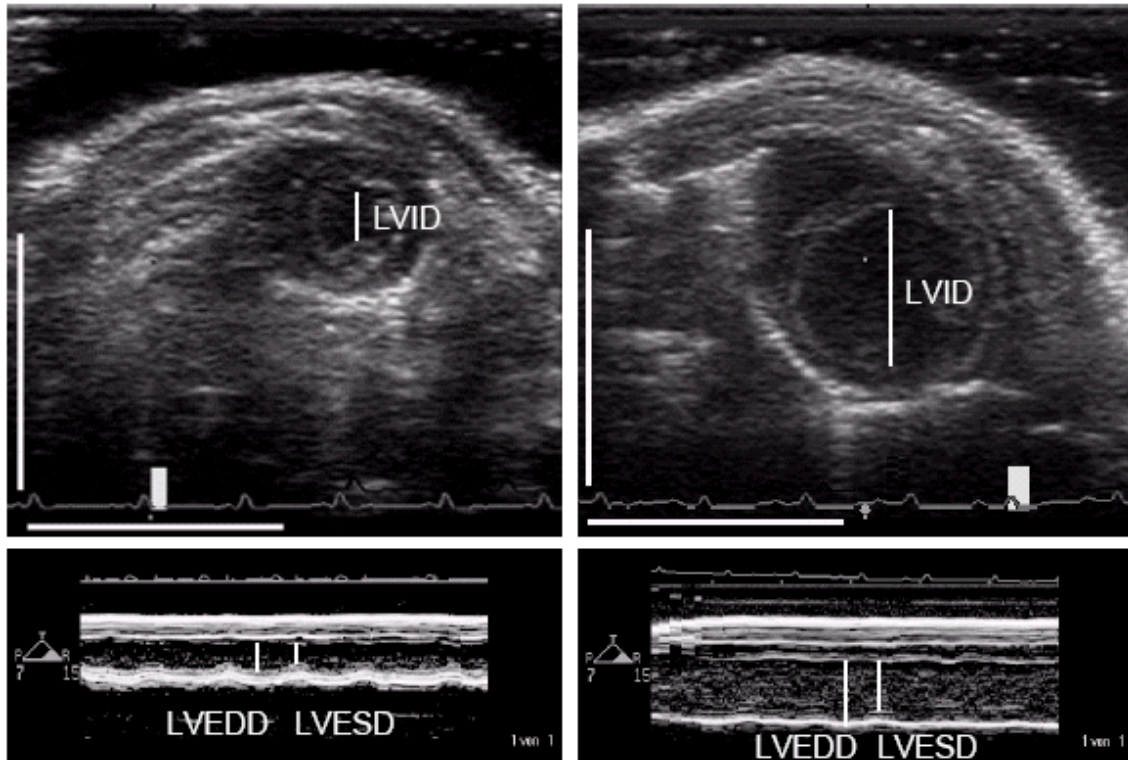
Parameter	WT	PP2A	Anzahl	Alter (Wochen)
Körpergewicht (g)	$31,73 \pm 1,6$	$32,57 \pm 1,5$	10	16
HF (Schläge/min)	$317 \pm 13$	$334 \pm 14$	10	16
LVEDd (mm)	$4,12 \pm 0,13$	$5,44 \pm 0,19 *$	10	16
LVEDs (mm)	$2,65 \pm 0,18$	$4,12 \pm 0,25 *$	10	16
FS %	$35,8 \pm 1,3$	$24,7 \pm 2,1 *$	10	16
LV-Masse (mg)	$82 \pm 6$	$146 \pm 10 *$	10	16

**Tabelle 4: Mittelwerte des Körpergewichts, der Herzfrequenz (HF), des linksventrikulären enddiastolischen (LVEDd) und systolischen (LVEDs) Durchmessers, der linksventrikulären Verkürzungsfraction (FS%) und des relativen Herzgewichts (LV-Masse) innerhalb der WT- und der PP2A-Gruppe im Alter von 16 Wochen. WT: Wildtyp-Maus; PP2A: PP2A-transgene Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen.**

Signifikante Unterschiede fanden sich hingegen beim Vergleich der linksventrikulären Herzdurchmesser. Sowohl der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDd) als auch der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser (LVEDs) waren bei der PP2A-Maus im Vergleich zum Wildtypen signifikant vergrößert (um 32% bzw. 55% ( $p < 0,05$ ), s. Tab. 4 und s. Abb. 11 u. 12).



**Abbildung 11: Linksventrikuläre Durchmesser in der Diastole (LVEDd in mm) und in der Systole (LVEDs in mm). WT: Wildtyp-Maus; PP2A: PP2A-transgene Maus.** Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen.



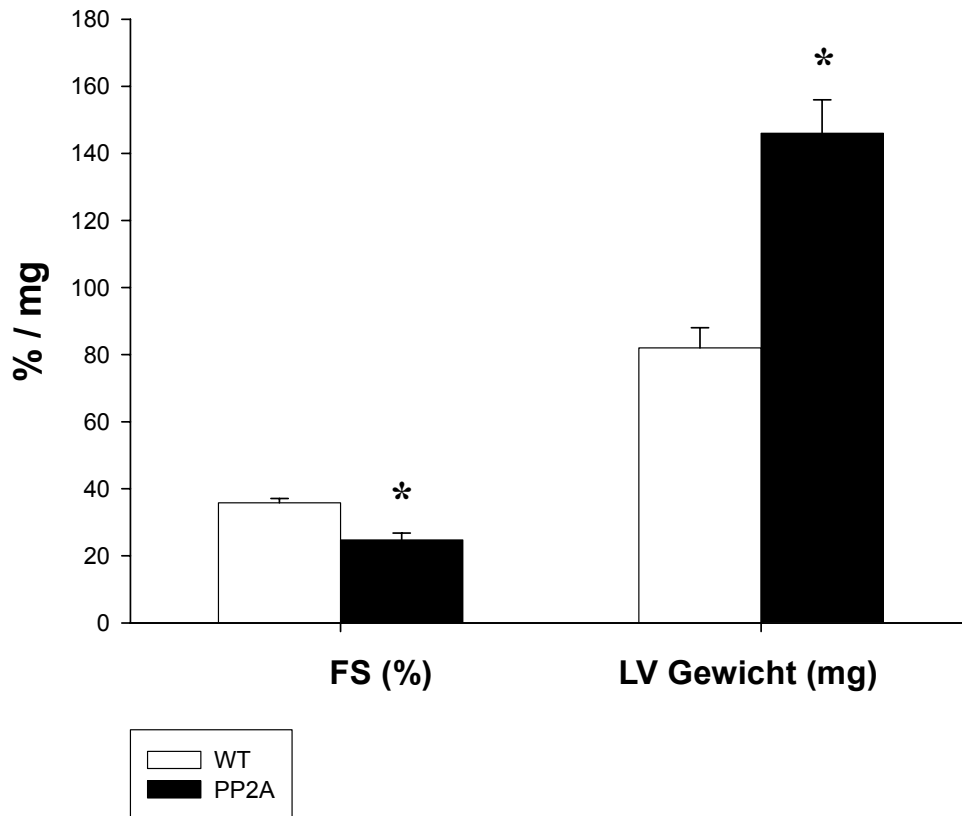
A Wildtyp

B PP2A

**Abbildung 12:** Linksventrikulärer Durchmesser im 2D-Übersichtsbild (LVID, oberes Bild, Querachse) und linksventrikuläre Durchmesser der Diastole (LVEDD) und Systole (LVESD) im M-Mode jeweils von Wildtyp (A) und PP2A-Maus (B). Deutlich vergrößerter linker Ventrikel der PP2A-Maus. Die vertikalen weißen Balken zeigen 10 mm an, die horizontalen Balken zeigen 100 ms an.

Die kardiale Kontraktilität bei der PP2A-Maus war im Vergleich zur Wildtyp-Maus deutlich eingeschränkt, ersichtlich an einer signifikant reduzierten Ventrikelverkürzungsfraction (FS%, bei der PP2A-Gruppe um 31% reduziert im Vergleich zur WT-Gruppe ( $p < 0,05$ ), s. Tab. 4 und Abb. 13). *In vivo* war das errechnete relative Herzgewicht (linksventrikuläre Masse, LV-Masse, s. Tab. 4 und Abb. 13) der PP2A-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe signifikant erhöht (PP2A  $146 \pm 10$  mg vs. WT  $82 \pm 6$  mg ( $p < 0,05$ )).

### Linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS%) und linksventrikuläres Gewicht (LV Gewicht in mg)



**Abbildung 13: Linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS (%)) und errechnetes linksventrikuläres Gewicht (LV Gewicht (mg)). WT: Wildtyp-Maus; PP2A: PP2A-transgene Maus.** Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen.

#### 3.1.1.2 Vergleich linksventrikulärer Parameter im Zeitverlauf

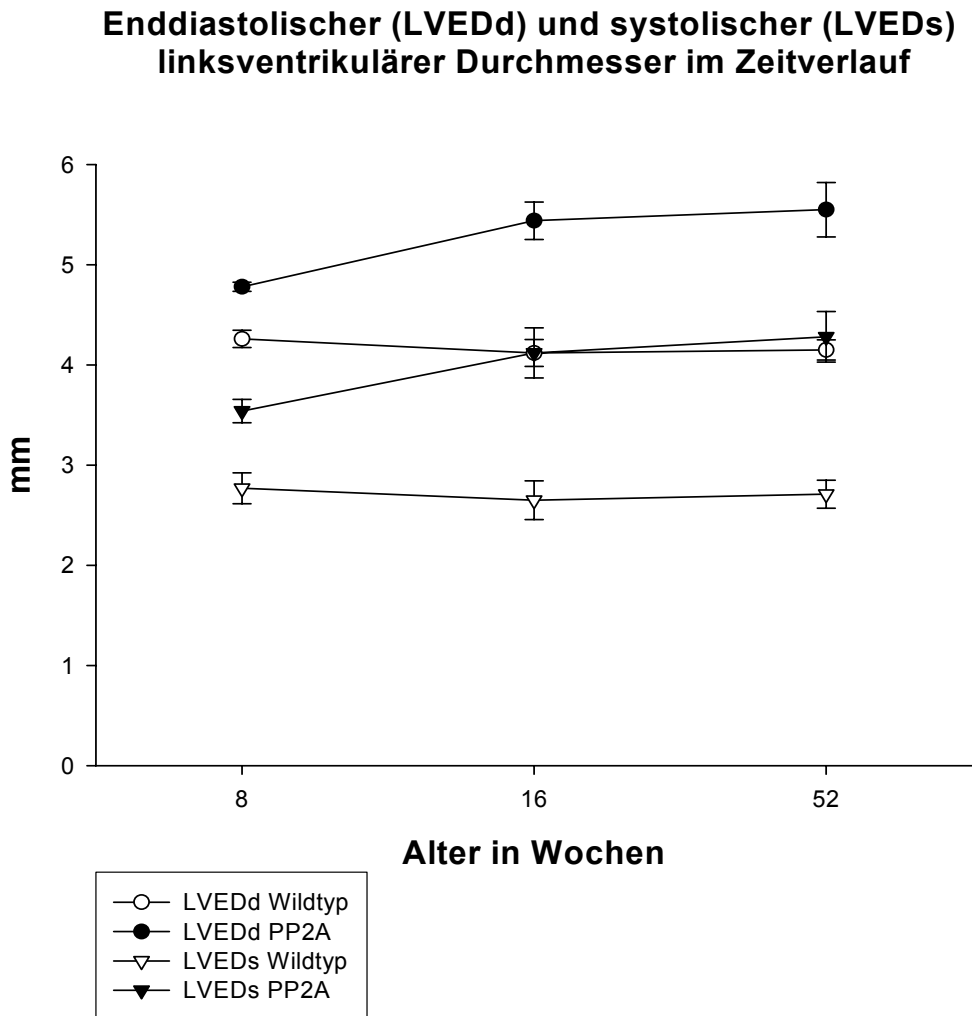
Eine kardiale Dilatation manifestierte sich bei den PP2A-transgenen Mäusen schon im Alter von 8 Wochen: Die linksventrikulären Durchmesser (LVEDd und LVEDs) waren signifikant vergrößert (um 14% in der Diastole und 30% in der Systole ( $p < 0,05$ ), s. Abb. 14 und Tab. 5). Die Herzdilatation schritt im Untersuchungszeitraum von 8 Wochen bis zur nächsten Untersuchung im Alter von 32 Wochen und auch im Alter bis zu 52 Wochen fort, ersichtlich an einer stetigen Vergrößerung des linksventrikulären diastolischen

Durchmessers (LVEDd, Zunahme um 14%, s. Abb. 14). Die linksventrikulären Durchmesser (LVEDs und LVEDd) der Wildtyp-Gruppe hingegen stagnierten im selben Zeitraum (s. Abb. 14).

Parameter	8 Wochen		16 Wochen		52 Wochen	
	WT	PP2A	WT	PP2A	WT	PP2A
Körpergewicht (g)	26,51 ± 2,3	22,42 ± 0,3	31,7 ± 1,6	32,57 ± 1,5	33,41 ± 1,5	35,3 ± 1,8
HF (Schläge/min)	349 ± 16	350 ± 6	317 ± 13	334 ± 14	332 ± 11	304 ± 11
MV E Punkt (cm/s)	76,6 ± 4,6	56,8 ± 0,6	74,5 ± 4,6	72,8 ± 4,0	64,8 ± 2,8	60,0 ± 3,0
MV A Punkt (cm/s)	29,9 ± 3,2	24,1 ± 4,1	31,5 ± 2,5	29,0 ± 2,8	26,0 ± 2,0	23,5 ± 4,3
MV Decel-Zeit (ms)	49,2 ± 5,2	28,0 ± 3,2	45,1 ± 3,7	40,7 ± 2,5	47,7 ± 4,7	54,1 ± 4,9
IVSs (mm)	0,85 ± 0,06	0,82 ± 0,02	0,95 ± 0,05	0,93 ± 0,06	0,96 ± 0,03	0,90 ± 0,06
IVSd (mm)	0,47 ± 0,02	0,48 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,53 ± 0,02	0,58 ± 0,02	0,56 ± 0,02
LVEDd (mm)	4,20 ± 0,13	4,77 ± 0,05	4,12 ± 0,13	5,44 ± 0,19	4,19 ± 0,16	5,7 ± 0,36
LVEDs (mm)	2,73 ± 0,15	3,54 ± 0,21	2,65 ± 0,18	4,12 ± 0,25	2,71 ± 0,12	4,75 ± 0,4
PWEDd (mm)	0,56 ± 0,02	0,58 ± 0,03	0,65 ± 0,03	0,70 ± 0,02	0,66 ± 0,02	0,66 ± 0,02
PWEDs (mm)	1,24 ± 0,03	1,22 ± 0,02	1,22 ± 0,03	1,24 ± 0,03	1,2 ± 0,03	4,75 ± 0,4
FS (%)	35,3 ± 1,8	26,0 ± 3,5	35,8 ± 1,3	24,7 ± 2,1	35,5 ± 1,3	18,9 ± 1,3
Ao V max (cm/s)	91,2 ± 6,7	80,2 ± 1,5	88,7 ± 4,1	97,6 ± 5,3	93,4 ± 6,7	84,0 ± 4,1
HZV (ml/min)	9,4 ± 0,5	8,5 ± 0,3	8,9 ± 0,6	10,1 ± 1,0	14,6 ± 1,4	12,9 ± 1,2
Vcf (circ/s)	4,59 ± 0,39	3,75 ± 0,44	5,07 ± 0,20	3,8 ± 0,33	4,35 ± 0,21	2,21 ± 0,22
LV Masse (mg)	71 ± 4	89 ± 3	82, ± 6	146 ± 10	93 ± 6	165 ± 22

**Tabelle 5: Echokardiographieergebnisse ausgewählter Linksherzparameter bei 8 Wochen alten, 16 Wochen alten und 56 Wochen alten Tieren.** Die Werte werden angegeben als Mittelwert ± Standardfehler. **HF:** Herzfrequenz, **MV E Punkt:** höchster Punkt der E-Welle im Mitralisdoppler, **MV A Punkt:** höchster Punkt der A-Welle im Mitralisdoppler, **MV Decel-Zeit:** Dezeleationszeit der Mitralwelle, **IVSd:** Durchmesser des linksventrikulären Septums in der Diastole, **LVEDd/LVEDs:** linksventrikulärer Durchmesser diastolisch/systolisch, **FS:** Ventrikelverkürzungsfraction, **Ao Vmax:** maximale Geschwindigkeit des Aortendopplers, **HZV:** Herzzeitvolumen, **Vcf:** Zirkuläre Faserverkürzung, **LV-Masse:** errechnete Masse des linken Ventrikels.



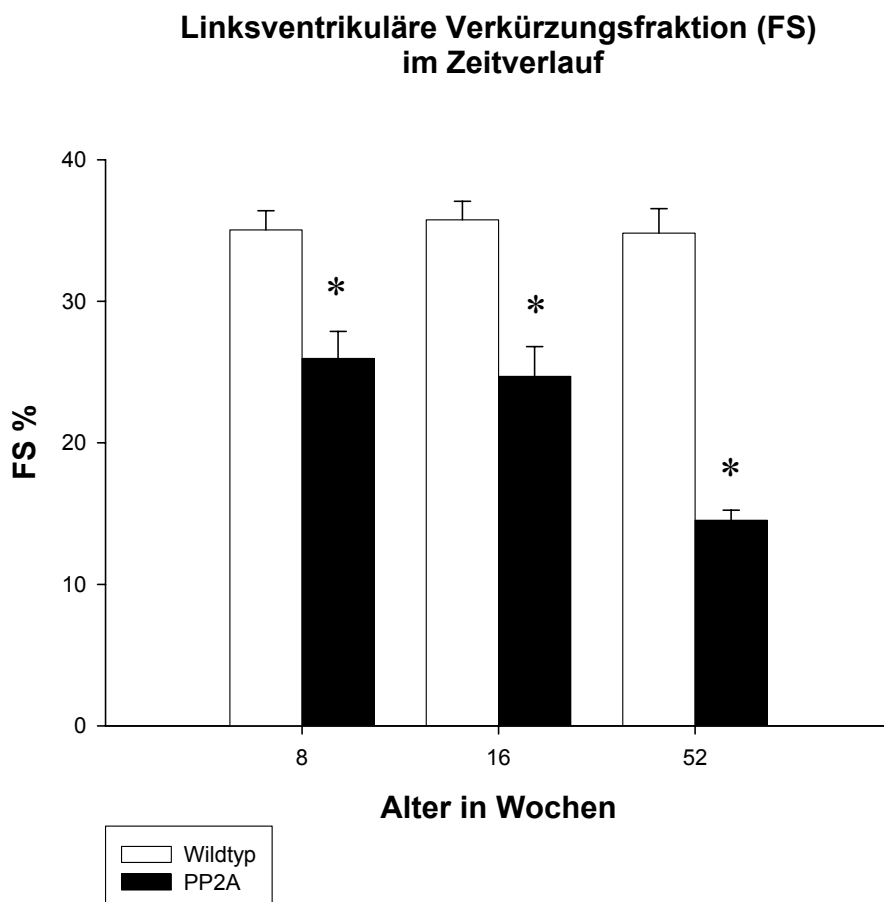


**Abbildung 14: Enddiastolischer (LVEDd) und systolischer (LVEDs) linksventrikulärer Durchmesser im Zeitverlauf.** Wildtyp: Wildtyp-Maus; PP2A: PP2A-transgene Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Die Kurvenverläufe der linksventrikulären Parameter innerhalb der Gruppen sind ähnlich (LVEDd Wildtyp vs. LVEDs Wildtyp, LVEDd PP2A vs. LVEDs PP2A).

Schon im Alter von 8 Wochen war ein signifikanter Unterschied in der Ventrikelverkürzungsfraction (Fractional Shortening, FS%) festzustellen: Bei der PP2A-Maus war der Mittelwert im Vergleich zum altersentsprechenden Wildtypen signifikant um 25% herabgesetzt (s. Abb. 15 und Tab. 5, FS% PP2A  $26,0 \pm 3,5$  vs. WT  $35,3 \pm 1,8$  ( $p < 0,05$ )). Diese signifikant verminderte linksventrikuläre Kontraktilität der PP2A-transgenen Maus fiel darüber hinaus zu allen Untersuchungszeitpunkten (im Alter von 8 Wochen,

16 Wochen und 52 Wochen) im Vergleich zur gleichalten Wildtyp-Maus auf. Im Zeitraum von 8 bis 16 Wochen blieben die Parameter für eine eingeschränkte Kontraktilität bei der PP2A-Maus auf einem stabil niedrigen Niveau (s. Abb. 15). Zum Zeitpunkt der nächsten Untersuchung im Alter von 52 Wochen jedoch nahm die ventrikuläre Fraktionsverkürzung (FS%) verglichen mit den Voruntersuchungen im Alter von 16 Wochen sprunghaft ab (signifikante Abnahme der FS% im Zeitraum von 16 bis 52 Wochen ( $p < 0,05$ ), s. Abb. 15). Die linksventrikuläre Kontraktion bei der Wildtyp-Maus dagegen blieb im selben Zeitraum konstant.

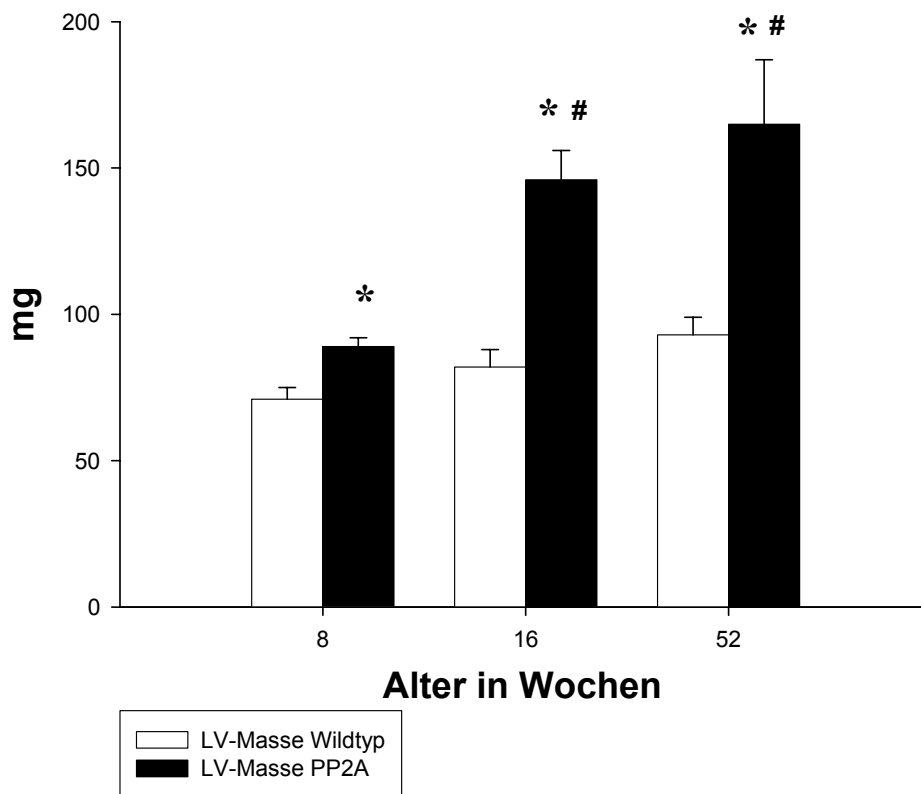
Im Vergleich zur Wildtyp-Maus zeigte sich die kardiale Kontraktilität bei der seneszenten PP2A-Maus im Alter von 52 Wochen um 53% vermindert (Verkürzungsfraction, FS% PP2A  $18,9 \pm 1,3$  vs. WT  $35,5 \pm 1,3$  ( $p < 0,05$ ), s. Abb. 15 und Tab. 5).



**Abbildung 15: Linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS%) der Wildtyp-Maus und der PP2A-Maus im Zeitverlauf. Wildtyp:** Wildtyp-Maus; **PP2A:** PP2A-transgene Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen.

Auch das errechnete linksventrikuläre Gewicht (LV-Masse) war bei den PP2A-Mäusen in allen Altersklassen signifikant höher im Vergleich zu den altersadaptierten Wildtyp-Tieren. Innerhalb der PP2A-Gruppe ist im Zeitraum von 16 Wochen bis zum Alter von 52 Wochen eine signifikante Gewichtszunahme zu vermerken (s. Abb. 16 und Tab. 5, von  $146 \pm 10$  mg auf  $165 \pm 22$  mg ( $p < 0,05$ )).

### Linksventrikuläres Gewicht (LV-Masse) im Zeitverlauf



**Abbildung 16: Fortschreitende Zunahme des linksventrikulären Gewichts im Zeitverlauf.** **Wildtyp:** Wildtyp-Maus; **PP2A:** PP2A-transgene Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen, Rauten ( # ) die Signifikanz zwischen den Altersgruppen.

Zusammengefasst induziert die herzspezifische Überexpression der Proteinphosphatase 2A im Mausmodell im Vergleich zum gleichaltrigen Wildtypen eine in allen untersuchten Altersklassen (8, 16 und 52 Wochen) beobachtete verminderte Herzkontraktilität, eine mit dem Alter zunehmende Herzdilatation und eine Zunahme des linksventrikulären Herzgewichts mit Ausbildung einer Herzhypertrophie.

Die Progression der linksventrikulären Dilatation war in der Zeitspanne zwischen 8 und 16 Wochen deutlicher ausgeprägt als in der folgenden Zeitspanne zwischen 16 Wochen und 52 Wochen, schreitet aber dennoch bis zum seneszenten Alter von 52 Wochen weiter fort. Bei der Wildtyp-Maus hingegen zeigten sich diese Parameter im beobachteten Zeitraum konstant.

Die Gesamtheit dieser bei der PP2A-transgenen Maus beobachteten pathologisch veränderten Parameter weist auf das Vorliegen einer Herzinsuffizienz hin.

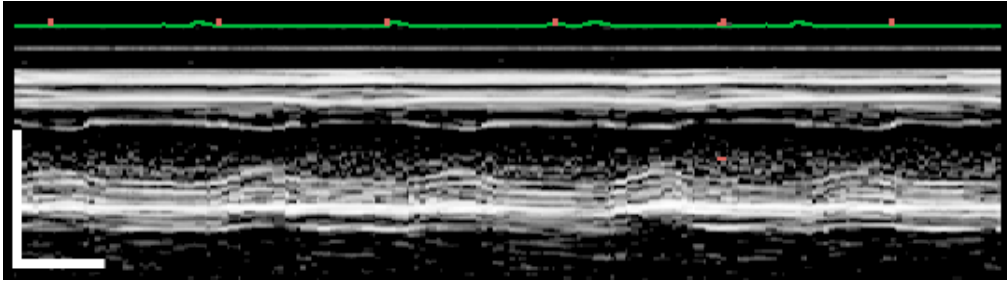
Zur Detektierung einer vermutlich bei der herzinsuffizienten PP2A-transgenen Maus vorhandenen Leistungsminderung wurden anschließend eine Isoprenalin-Belastung und ein Ausdauertraining durchgeführt.

### **3.1.2 Isoprenalin-Belastung**

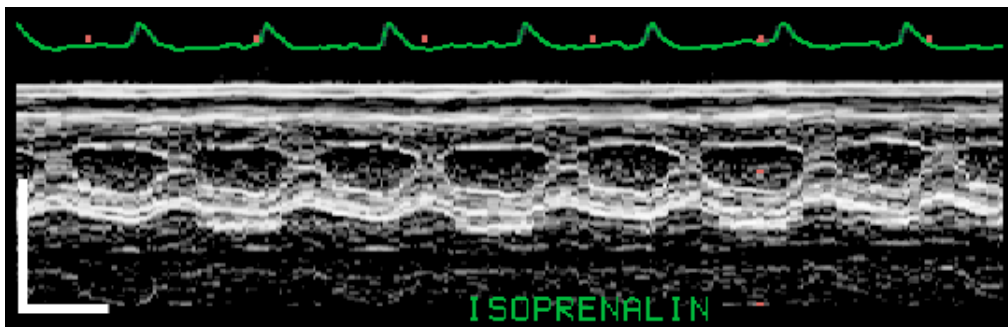
Die Belastung mit Katecholaminen stellt eine in der Literatur etablierte Methode zur Überprüfung der maximalen Herzleistung im transgenen Mausmodell dar: Mäuse mit einer manifesten Herzinsuffizienz zeigten eine deutlich herabgesetzte Ansprechbarkeit auf Isoprenalin (99;100). Zeichen für eine herabgesetzte Katecholamin-Sensitivität aufgrund einer chronischen Herab-Regulation der  $\beta$ -Rezeptoren sind ein im Vergleich zur WT-Maus verminderter Herzfrequenzanstieg und eine eingeschränkte adaptive Steigerung der linksventrikulären Verkürzungsfraction (Fractional shortening, FS%).

Schon wenige Sekunden nach der intraperitonealen Isoprenalin-Gabe ließ sich im EKG eine Frequenzzunahme ausmachen (s. Abb. 17)

A



B



100ms

**Abbildung 17: M-Mode Darstellung bei Anlotung im parasternalen Querschnitt (WT-Maus)**

**A: basal; B nach Injektion von Isoprenalin (i.p.).**

Frequenzanstieg und Zunahme der Kontraktilität nach Isoprenalingabe.

Die Herzfrequenz unterschied sich im Rahmen der pharmakologischen Belastung nicht signifikant zwischen den Genotypen. Sowohl in der PP2A-Gruppe als auch in der Wildtyp-Gruppe beobachteten wir verglichen mit den Basalwerten einen adäquat gleichmäßigen Herzfrequenzanstieg (um 33,86% bei den PP2A-transgenen Mäusen und um 37,83% bei den Wildtypen (s. Tab. 6)).

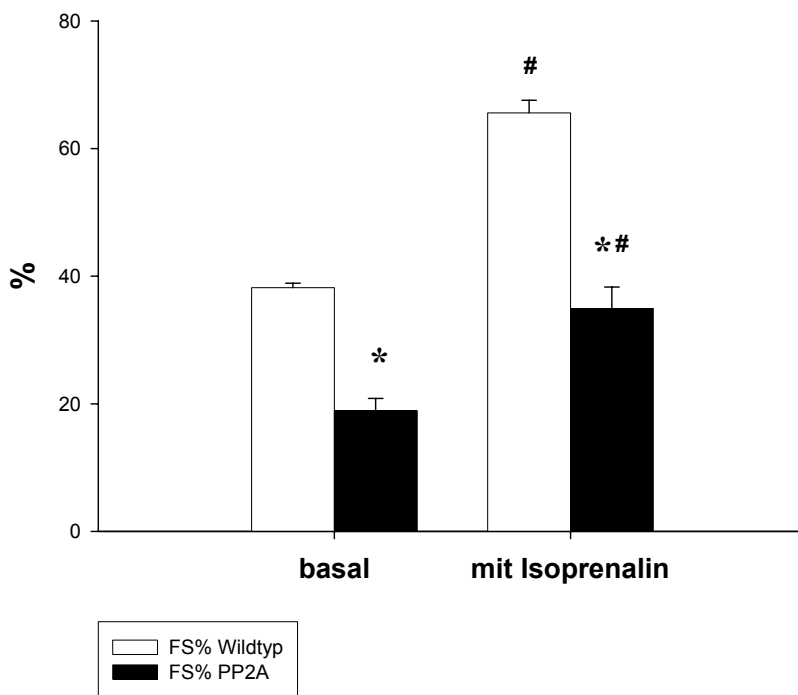
Parameter	Wildtyp		PP2A	
	basal	mit Isoprenalin	basal	mit Isoprenalin
HF (Schläge/min)	332 ± 11	502 ± 17 #	304 ± 11	489 ± 29 #
FS%	38,19 ± 0,70	65,61 ± 1,98 #	18,90 ± 1,92 *	34,95 ± 3,35 *#

**Tabelle 6: Herzfrequenz (HF) und linksventrikuläre Verkürzungsfraktion (FS%) von Wildtypen und PP2A erst ohne (basal) und dann mit Isoprenalin. Wildtyp:** Wildtyp-Maus, **PP2A:** PP2A-transgene Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert ± Standardfehler. Sterne (\*) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen, Rauten (#) stellen die Signifikanz zwischen den Altersgruppen dar.

Die Provokation mit Isoprenalin steigerte die Ventrikelverkürzungsfraction der Wildtyp-Maus im Vergleich zum Basalwert signifikant um  $41,8 \pm 1\%$  und die der PP2A-Maus signifikant um  $45,9 \pm 4\%$  (fractional shortening, FS%( $p < 0,05$ ), s. Abb. 18).

Wir vermuteten, dass eine erhöhte kardiale PP2A-Expression zu einer reduzierten Katecholamin-Sensitivität als Zeichen einer manifesten Herzinsuffizienz im Mausmodell führen könnte. Diese Annahme wurde im Rahmen dieser Versuchsreihe nicht bestätigt: Insbesondere wurde kein ableibender Anstieg der Herzfrequenz im Sinne einer pathologischen Reaktion nach systemischer Katecholamingabe beobachtet. Jedoch zeigte sich bei der transgenen PP2A-Maus wie auch bereits in den basalen Untersuchungen beschrieben unter Isoprenalin-Belastung eine im Vergleich zur Wildtyp-Maus signifikant reduzierte kardiale Kontraktilität (fractional shortening, FS% PP2A 34,95 vs. WT 65,61, s. Tab. 6 und Abb. 18 ( $p < 0,05$ )).

**Linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS%) basal und nach Gabe von Isoprenalin**



**Abbildung 18: Linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS%) von Wildtyp und PP2A-Maus ohne Isoprenalin (basal) und mit Isoprenalin-Injektion. Wildtyp:** Wildtyp-Maus, **PP2A:** PP2A-transgene Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne (\*) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen, Rauten (#) stellen die Signifikanz zwischen den Altersgruppen dar.

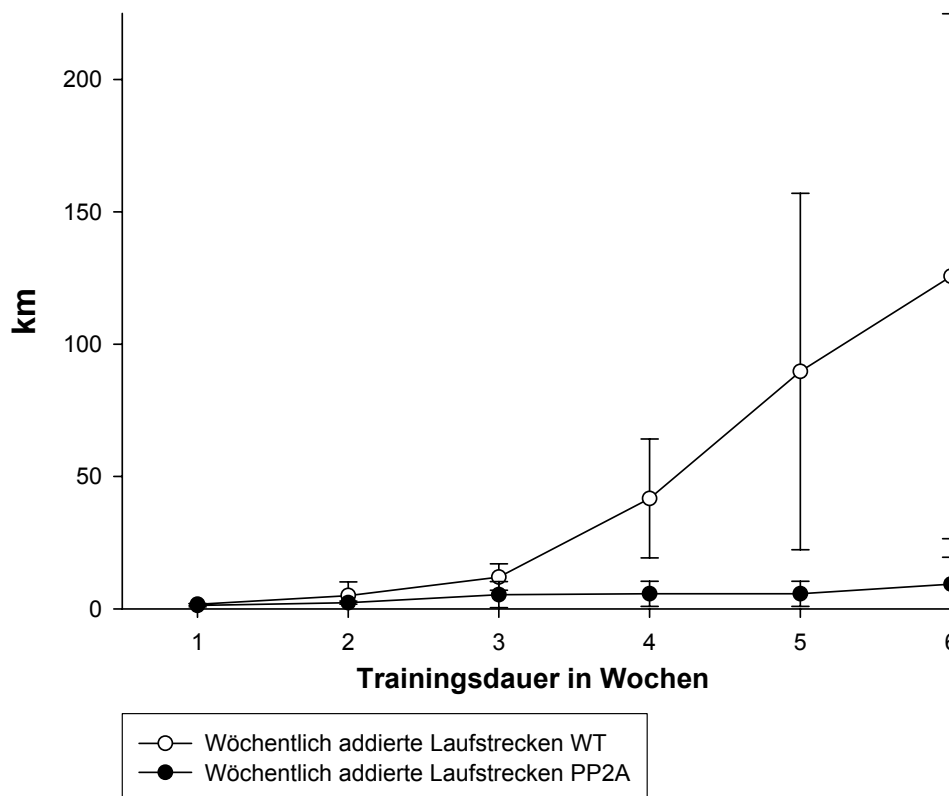
### 3.1.3 Auswirkung von Ausdauertraining

Um die Auswirkung eines körperlichen Trainings auf die Herzfunktion bei transgenen Mäusen mit manifester Herzinsuffizienz zu analysieren, wurden Dopplerechokardiographische Untersuchungen der PP2A-transgenen Maus und ihrer Wildtyp-Geschwistertiere vor und nach einem freiwilligen sechswöchigen Laufradtraining durchgeführt (n=5 Tiere pro Gruppe).

Die summarischen Trainingsleistungen waren bei den PP2A-transgenen Tieren verglichen mit denen der Wildtypen erniedrigt.

Die wöchentlich geleisteten Laufstrecken unterschieden sich zwischen den Genotypen nicht signifikant, am ehesten bedingt durch die kleine Gruppengröße (s. Abb. 19).

#### Addierte Laufstrecken (km) von PP2A und WT im Trainingsverlauf



**Abbildung 19: Addierte wöchentlich geleistete Laufstrecken der Genotypen in km. WT:** Wildtyp-Maus; **PP2A:** PP2A-transgene Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD).

Wir erhielten die folgenden Parameter aus den Doppler-echokardiographischen Untersuchungen vor und nach dem chronischen Laufradtraining:

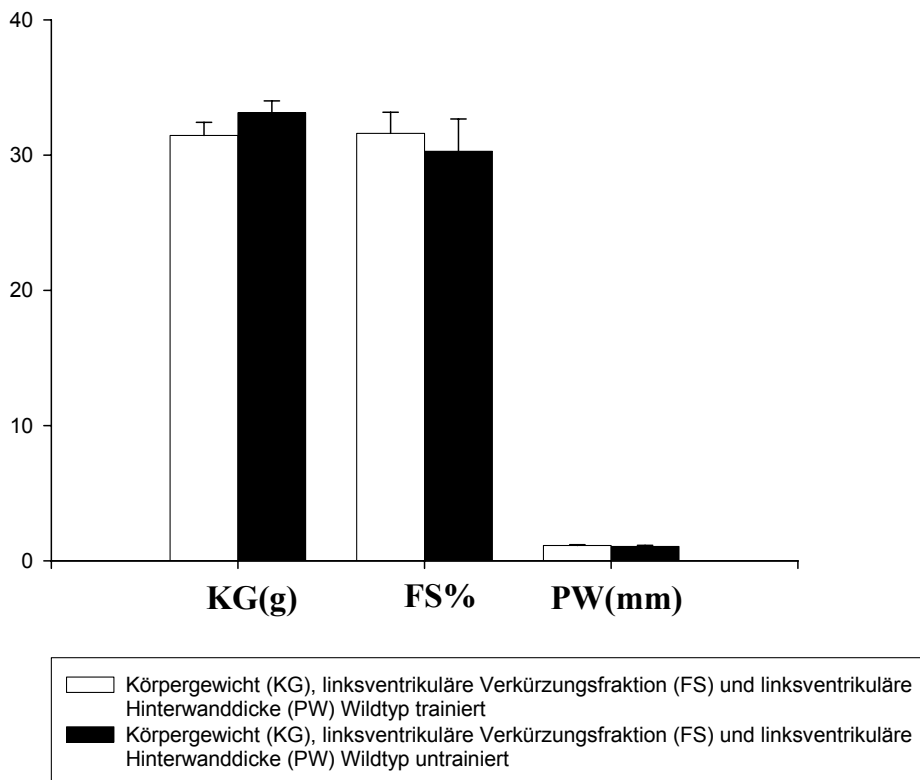
Parameter	vor Training (11 Wochen alt)			nach Training (17 Wochen alt)		
	WT	PP2A	WT untrainiert	PP2A untrainiert	WT trainiert	PP2A trainiert
Körpergewicht (g)	28,84 ± 1,78	25,11 ± 2,03	32,81 ± 0,23	32,57 ± 1,54	29,56 ± 1,18	28,83 ± 2,23 *
HF (Schläge/min)	343 ± 12	332 ± 10	354 ± 21	334 ± 14	311 ± 9	317 ± 10
MV E Punkt (cm/s)	75,88 ± 2,82	68,1 ± 5,04	74,03 ± 6,53	72,77 ± 3,97	73,58 ± 2,84	68,43 ± 5,79
MV A Punkt (cm/s)	29,93 ± 1,91	24,46 ± 2,54	21,8 ± 2,08	28,95 ± 2,8	27,9 ± 2,71	24,95 ± 2,58
MV Decel-Zeit (ms)	46,13 ± 3,69	46,4 ± 8,43	49 ± 9,64	40,7 ± 2,47	42,25 ± 4,79	46,5 ± 7,42
IVSs (mm)	0,86 ± 0,05	0,82 ± 0,02	0,87 ± 0,03	0,93 ± 0,06	0,93 ± 0,07	0,9 ± 0,07 *
IVSd (mm)	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,53 ± 0,04	0,53 ± 0,02	0,66 ± 0,05	0,6 ± 0,07
LVEDd (mm)	4,26 ± 0,09	4,78 ± 0,05	4,32 ± 0,17	5,44 ± 0,19	4,33 ± 0,23	5,15 ± 0,27
LVEDs (mm)	2,77 ± 0,1	3,54 ± 0,11	3,05 ± 0,07	4,12 ± 0,25	3,08 ± 0,27	4,26 ± 0,31*
PWEDd (mm)	0,59 ± 0,02	0,58 ± 0,02	0,7 ± 0,04	0,7 ± 0,02	0,79 ± 0,07	0,81 ± 0,12 *
PWEDs (mm)	1,24 ± 0,02	1,20 ± 0,02	1,14 ± 0,09	1,24 ± 0,03	1,27 ± 0,03	1,18 ± 0,09
FS (%)	35,05 ± 1,4	26,0 ± 1,9	29,23 ± 1,09	24,7 ± 2,1	29,43 ± 2,41	17,45 ± 2,5
Ao V max (cm/s)	90,73 ± 4,61	83,34 ± 4,32	92,6 ± 1,09	97,6 ± 5,3	127,28 ± 27,15	84,15 ± 6,96
HZV (ml/min)	9,38 ± 0,36	8,6 ± 0,75	8,67 ± 0,29	10,1 ± 1,0	16,5 ± 4,44	10,25 ± 1,32
Vcf (circ/s)	4,36 ± 0,27	3,51 ± 0,23	3,6 ± 0,48	3,8 ± 0,33	3,87 ± 0,49	2,06 ± 0,18
LV Masse (mg)	261 ± 10	300 ± 7	249 ± 32	304 ± 10	270 ± 53	274,83 ± 44,35

**Tabelle 7: Echokardiographieergebnisse ausgewählter Linksherzparameter bei 11 Wochen alten PPA und WT-Mäusen vor dem Training und 17 Wochen alten jeweils untrainierten und trainierten PP2A-Mäusen und WT-Mäusen. WT: Wildtyp-Maus; PP2A: PP2A-transgene Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert ± Standardfehler. HF: Herzfrequenz; MV E Punkt: höchster Punkt der E-Welle im Mitralisdoppler; MV A Punkt: höchster Punkt der A-Welle im Mitralisdoppler; MV Decel-Zeit: Dezelerationszeit der Mitralwelle; IVSd: Durchmesser des linksventrikulären Septums in der Diastole; LVEDd/LVEDs: linksventrikulärer Durchmesser diastolisch/systolisch; FS: Ventrikelverkürzungsfraktion; Ao Vmax: maximale Geschwindigkeit des Aortendopplers; HZV: Herzzeitvolumen; Vcf: Zirkuläre Faserverkürzung; LV-Masse: errechnete Masse des linken Ventrikels.**

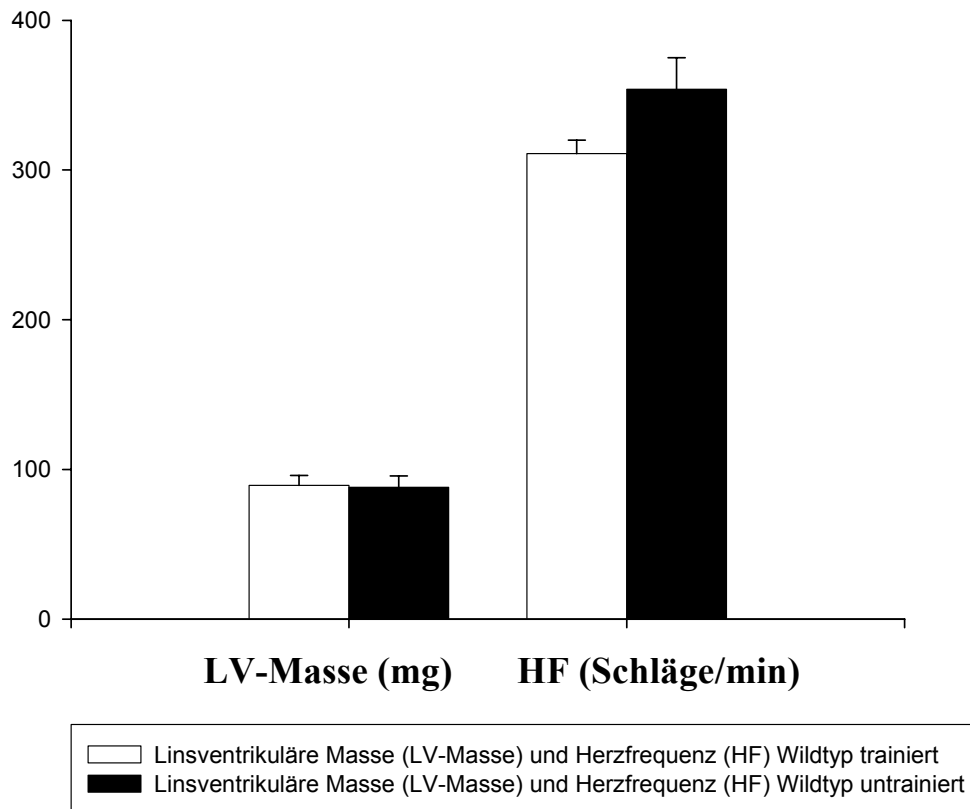


Im Vergleich von gleich alten trainierten Wildtypen und untrainierten Wildtypen zeigten sich in der Trainingsgruppe als Adaption an das Ausdauertraining ein tendenziell geringeres Körpergewicht (KG (g) WT trainiert  $29,56 \pm 1,18$  vs. WT untrainiert  $32,81 \pm 0,23$ , s. Abb. 20 und Tab. 7), ein in der Tendenz gesteigertes linksventrikuläres Gewicht (LV-Gewicht (mg) WT trainiert  $270 \pm 53$  vs. WT untrainiert  $249 \pm 32$ , s. Abb. 21), eine tendenziell verminderte Ruhfrequenz (HF WT trainiert  $311 \pm 9$  vs. WT untrainiert  $354 \pm 21$ , s. Abb. 21) und ein tendenziell gesteigertes Herzzeitvolumen (HZV WT trainiert  $16,5 \pm 4,44$  vs. WT untrainiert  $8,67 \pm 0,29$ , s. Tab. 7). Im Trainingsverlauf entwickelten trainierende WT-Tiere eine tendenziell vergrößerte linksventrikuläre Hinterwand (PW ( $p=0,06$ ), s. Abb.20) verglichen mit den vor der Trainingsperiode erhobenen echokardiographischen Werten.

### Trainierter Wildtyp vs. untrainierter Wildtyp



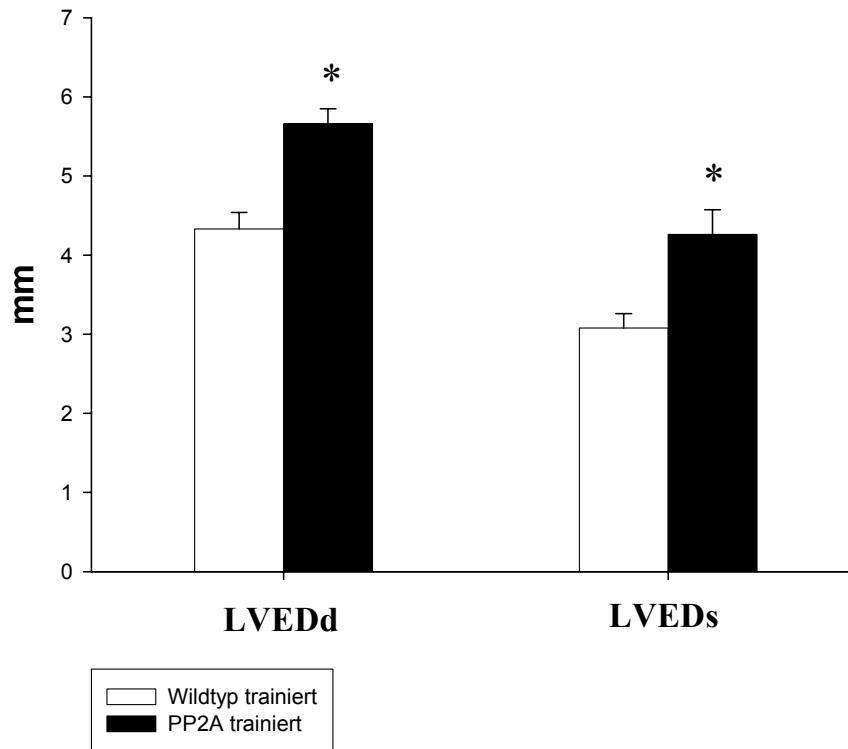
**Abbildung 20: Körpergewicht (KG in mg), linksventrikuläre Verkürzungsfraktion (FS%) und linksventrikuläre Hinterwanddicke von trainierter Wildtyp-Maus gegenüber untrainierter Wildtyp-Maus im Alter von 30 Wochen.** Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

**Trainierter Wildtyp vs. untrainierter Wildtyp**

**Abbildung 21: Linksventrikuläres Gewicht (LV-Masse) und Herzfrequenz (HF) von trainierter Wildtyp-Maus gegenüber untrainierter Wildtyp-Maus im Alter von 30 Wochen. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.**

Trainierende PP2A-transgene Mäuse entwickelten ebenso wie die untrainierten PP2A-transgenen Kontrolltiere einen signifikant vergrößerten linksventrikulären Durchmesser im Vergleich zu den trainierten Wildtypen (signifikant vergrößerter LVEDd und LVEDs ( $p < 0,05$ ), s. Abb. 22).

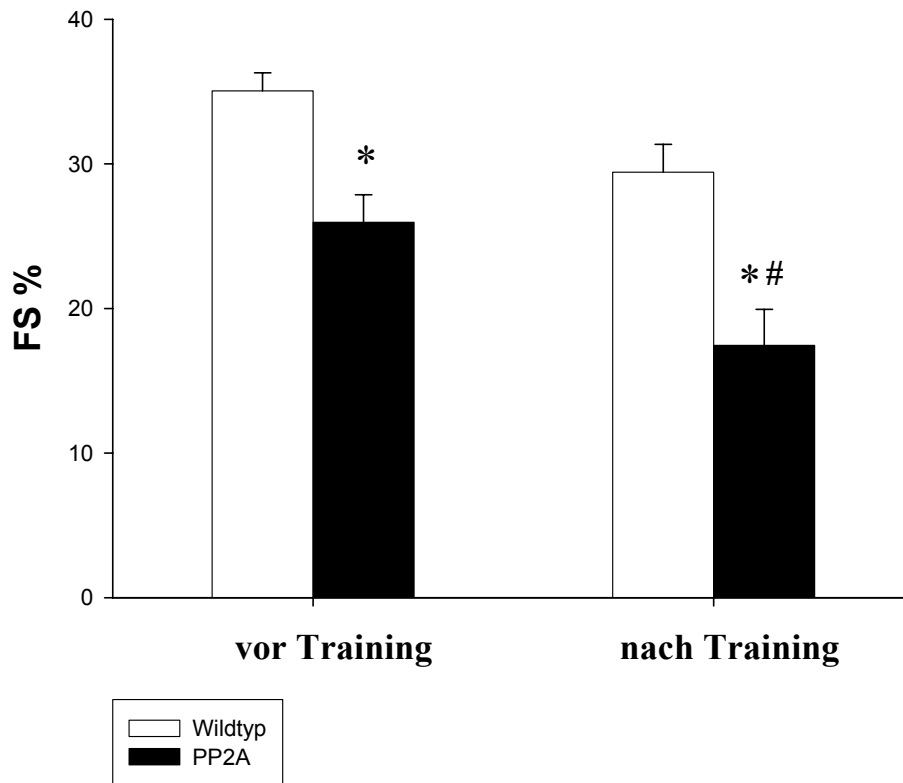
### Linksventrikuläre systolische und diastolische Durchmesser von trainierten Wildtypen und trainierten PP2A



**Abbildung 22: Vergleich linksventrikulärer systolischer und diastolischer Parameter von trainierten Wildtyp-Mäusen und trainierten PP2A-transgenen Mäusen.** Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen.

Weiterhin zeigte sich bei der trainierten PP2A-transgenen Maus am Ende der Trainingsphase eine signifikant reduzierte linksventrikuläre Kontraktilität (FS% WT  $29,43 \pm 1,92$  vs. PP2A  $17,45 \pm 2,49$  ( $p < 0,05$ )) im Vergleich zur trainierten Wildtyp-Maus (s. Tab. 7). Vergleicht man echokardiographisch gewonnene Parameter der trainierten PP2A-transgenen Maus vor und nach der Trainingsperiode, so schreitet auch unter einem Ausdauertraining die Abnahme der linksventrikulären Verkürzungsfraktion unverändert fort (FS% PP2A vor Training  $25,96 \pm 1,91$  vs. nach Training  $17,45 \pm 2,49$ , s. Abb. 23).

### Linksventrikuläre Verkürzungsfraction von Wildtyp und PP2A vor und nach dem Training

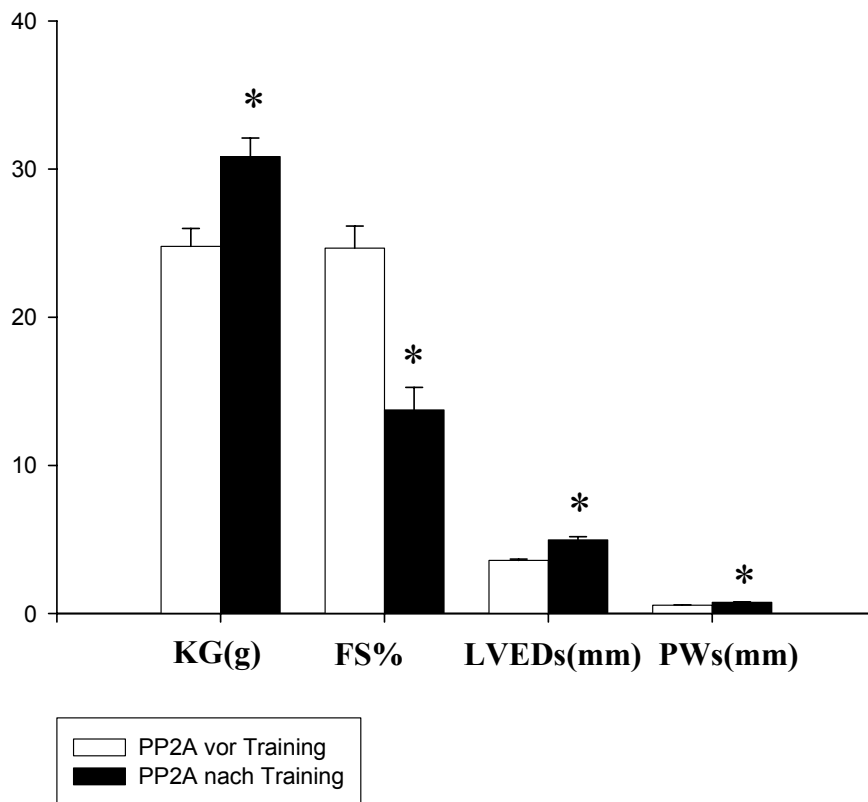


**Abbildung 23: Vergleich der linksventrikulären Verkürzungsfraction (FS%) von Wildtyp und PP2A vor und nach dem Training.** Wildtyp: Wildtyp-Maus; PP2A: PP2A-transgene Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Rauten ( # ) geben Signifikanzen zwischen den Trainingsgruppen an.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass ein freiwilliges Ausdauertraining den Verlauf einer genetisch determinierten kompensierten Herzinsuffizienz durch kardiale Überexpression von PP2A im Mausmodell nicht abschwächen oder gar aufhalten kann.

Auch die bereits bei den Basaluntersuchungen beschriebene Herzdilatation der PP2A-transgenen Gruppe war durch chronisches Training nicht modifizierbar (LVEDd PP2A vor dem Training vs. nach dem Training, s. Abb. 24).

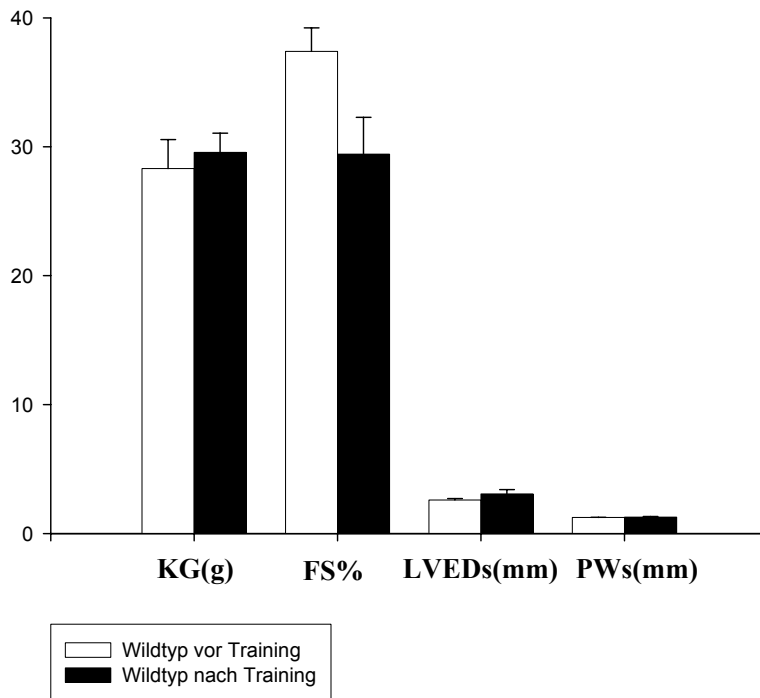
### Ausgewählte Parameter der PP2A-transgenen Maus vor dem Training vs. nach dem Training



**Abbildung 24: Vergleich von Körpergewicht (KG), linksventrikulärer Verkürzungsfraction (FS), linksventrikulärem systolischem Durchmesser (LVEDs) und systolischer linksventrikulärer Hinterwanddicke (PWs) bei der transgenen PP2A-Maus vor und nach dem Training.** Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Altersklassen.

Beim trainierten Wildtypen zeigte sich im Vergleich zu den vor dem Training erhobenen Werten ein tendenziell reduziertes Körpergewicht als Anpassungsreaktion auf das chronische Training (s. Abb. 25). Bei der trainierenden PP2A-Maus hingegen blieb dieser Effekt aus, vielmehr haben die Mäuse im Trainingsverlauf an Gewicht zugenommen (KG PP2A vor Training  $25,11\text{g} \pm 2,03\text{g}$  vs. PP2A nach Training  $28,83 \pm 2,23\text{g}$ , s. Abb. 24). Zum anderen lagen die zurückgelegten freiwilligen Laufstrecken der trainierenden PP2A-transgenen Maus deutlich unter denen der trainierenden Wildtyp-Maus.

**Ausgewählte Parameter der Wildtyp-Maus vor dem Training vs. nach dem Training**



**Abbildung 25: Vergleich von Körpergewicht (KG), linksventrikulärer Verkürzungsfraction (FS), linksventrikulärem systolischem Durchmesser (LVEDs) und systolischer linksventrikulärer Hinterwanddicke (PWs) bei der Wildtyp-Maus vor und nach dem Training. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Altersklassen.**

Untergruppen	FS%	LVEDd	LVEDs
Wildtyp vor Training	35,05 $\pm$ 1,25	4,26 $\pm$ 0,09	2,77 $\pm$ 0,09
Wildtyp ohne Training	29,23 $\pm$ 1,09	4,32 $\pm$ 0,2	3,05 $\pm$ 0,07
Wildtyp nach Training	29,43 $\pm$ 1,92	4,33 $\pm$ 0,21	3,08 $\pm$ 0,18
PP2A vor Training	25,96 $\pm$ 1,91 *	4,76 $\pm$ 0,04 *	3,54 $\pm$ 0,12 *
PP2A ohne Training	24,70 $\pm$ 2,10 *	5,44 $\pm$ 0,19 *	4,12 $\pm$ 0,25 *
PP2A nach Training	17,45 $\pm$ 2,49 *	5,15 $\pm$ 0,27 *	4,26 $\pm$ 0,31 *

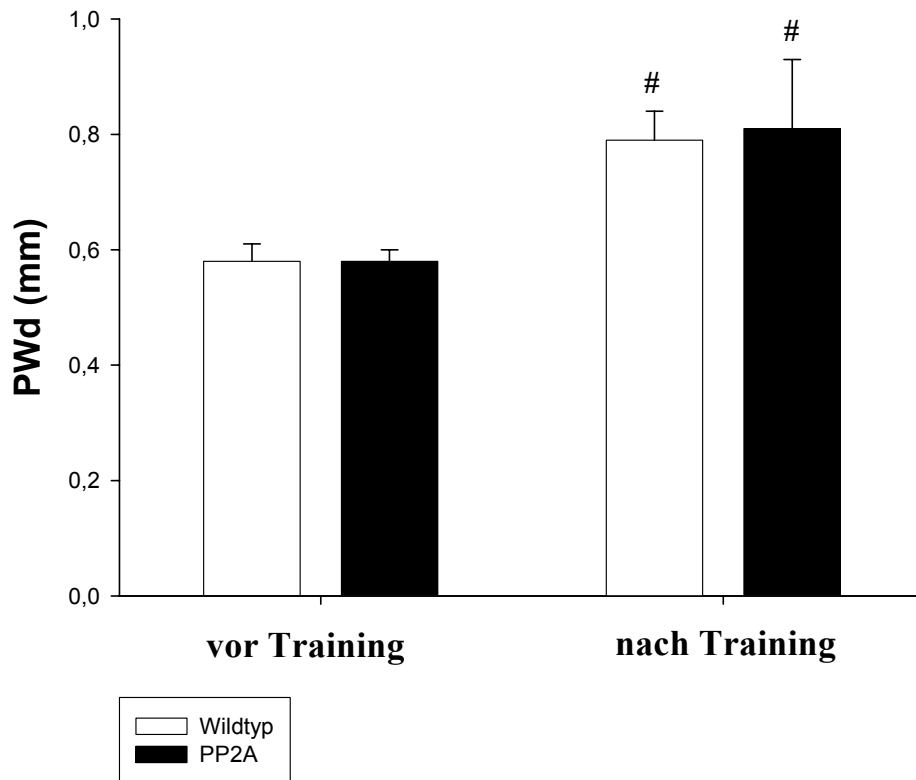
**Tabelle 8: Linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS%) und Durchmesser (LVEDd, LVEDs in mm) der verschiedenen Untergruppen. Wildtyp: Wildtyp-Maus; PP2A: PP2A-transgene Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen.**

Parameter	PP2A	
	vor Training	nach Training
PWEDd	0,58 ± 0,02	0,81 ± 0,12 #
PWEDs	1,20 ± 0,02	1,18 ± 0,04
Herzfrequenz	332 ± 10	315 ± 9 #
	Wildtyp	
PWEDd	0,58 ± 0,03	0,79 ± 0,05 #
PWEDs	1,25 ± 0,01	1,27 ± 0,04
Herzfrequenz	366 ± 12	354 ± 22

**Tabelle 9: Enddiastolische und systolische Dicke der linksventrikulären Hinterwand (PWEDd, PWEDs) und Herzfrequenz. Wildtyp:** Wildtyp-Maus, **PP2A:** PP2A-transgene Maus. Rauten (#) kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Trainingsklassen.

Als adäquate Anpassungsreaktion auf ein chronisches Training fand sich sowohl beim Wildtyp als auch bei der PP2A-Maus eine signifikante Verdickung der diastolischen Hinterwand des linken Ventrikels (PWEDd (mm) PP2A vor Training  $0,58 \pm 0,02$  vs. nach dem Training  $0,81 \pm 0,12$  und PWEDd (mm) WT vor Training  $0,58 \pm 0,03$  vs. nach dem Training  $0,79 \pm 0,05$  ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ), s. Abb. 26 und Tab. 9).

### Diastolische linksventrikuläre Hinterwand (PWd in mm) vor dem Training und nach dem Training

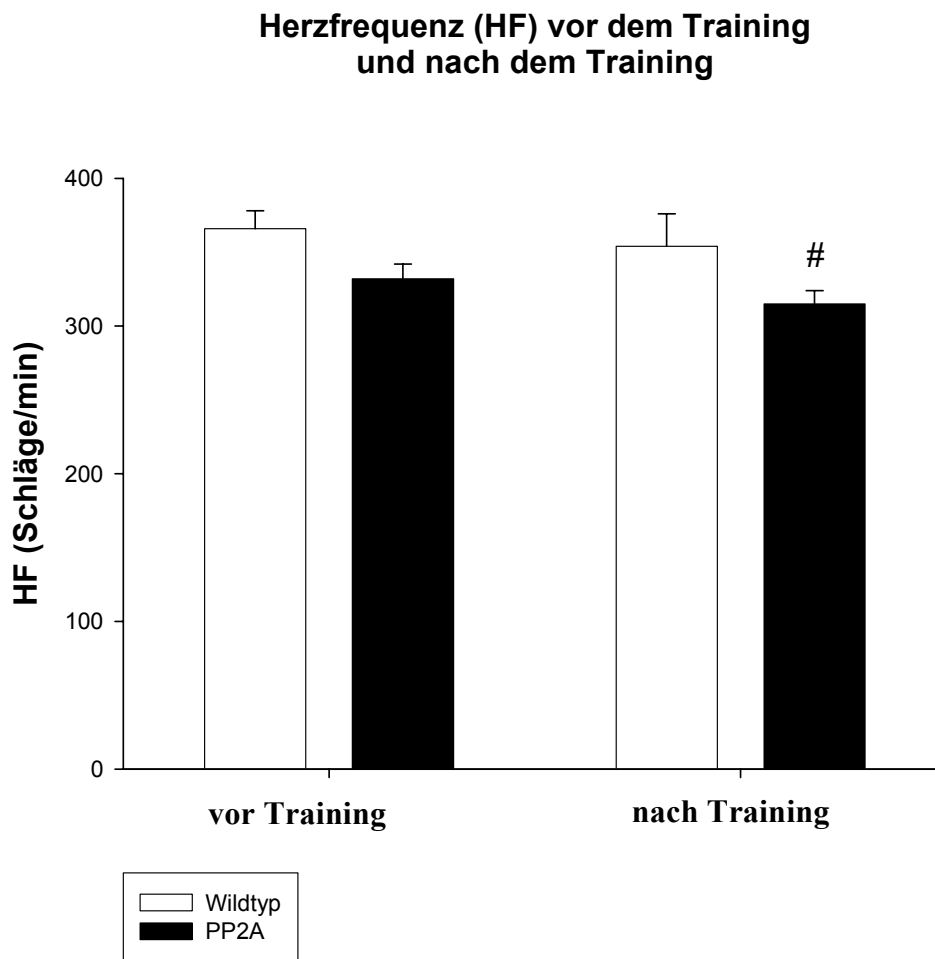


**Abbildung 26: Diastolische linksventrikuläre Hinterwand (PWd) von Wildtyp und PP2A-Maus vor und nach dem Training.** Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Rauten ( # ) kennzeichnen die Signifikanz zwischen den Altersgruppen. Es bestehen keine Signifikanzen zwischen den Genotypen.

Wie bereits erwähnt, wirkte sich in unserer Versuchsreihe ein chronisches freiwilliges Ausdauertraining bei den Wildtypmäusen nicht signifikant auf die Herzfrequenz aus.

Bei den PP2A-transgenen Mäusen hingegen wurde nach dem Training eine signifikante Reduktion der Ruhfrequenz im Vergleich zu den vor der Trainingsperiode erhobenen Werten beobachtet (HF PP2A vor dem Training  $332 \pm 10$  Schläge pro Minute vs. nach dem Training  $315 \pm 9$  Schläge pro Minute ( $p < 0,05$ ), s. Abb. 27 und Tab. 9).





**Abbildung 27: Herzfrequenz (HF in Schlägen pro Minute) von Wildtyp-Maus und PP2A-Maus vor und nach dem Training.** Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Rauten ( # ) kennzeichnen die Signifikanz zwischen den Altersgruppen. Es bestehen keine Signifikanzen zwischen den Genotypen.

## 3.2 Untersuchungen der GC-A KO Maus

### 3.2.1 GC-A KO vs. WT im Alter von 4 Monaten

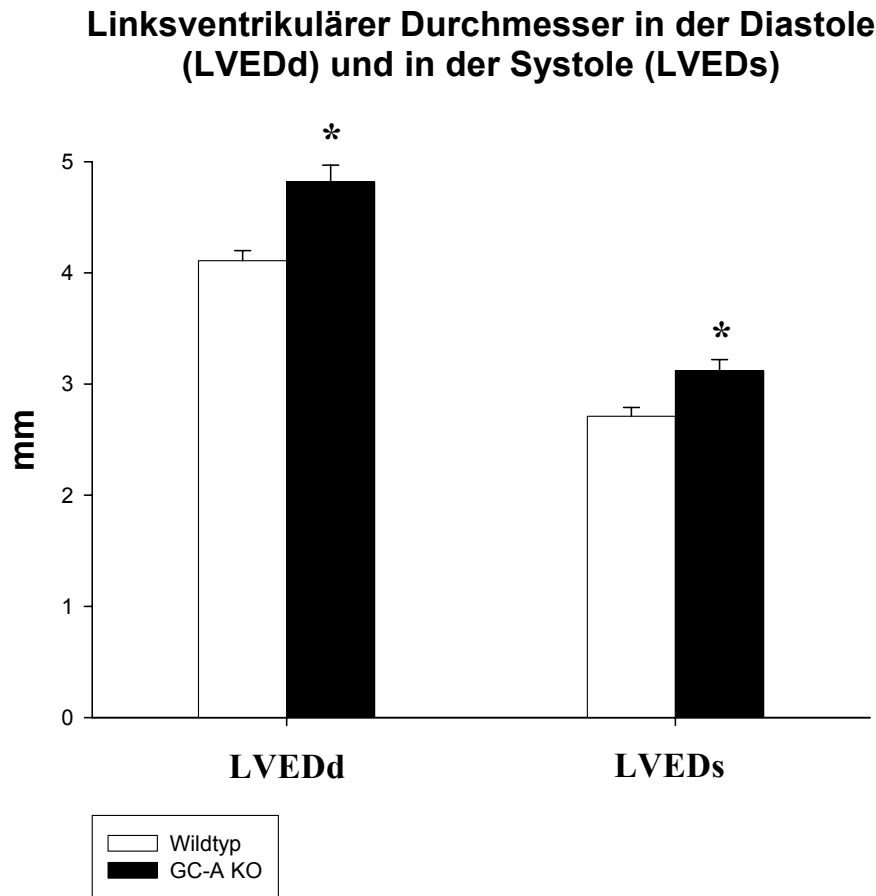
Das GC-A Knockout Mausmodell wurde in der Arbeit von SKRYABIN et al. (101) ausführlich beschrieben. Im Rahmen dieser Studie führten wir Dopplerechokardiographische Untersuchungen ähnlich dem Versuchsaufbau der PP2A-Maus im Alter von 4, 8 und 12 Monaten (16, 32 und 48 Wochen) durch. Auch hier wurden für die ersten beiden Untersuchungsreihen eine Ketamin/Xylazin-Narkose (i.p.) verwendet.

Die GC-A KO Mäuse unterschieden sich äußerlich nicht von den Wildtyp-Geschwistertieren. Transgene Mäuse waren ähnlich groß und schwer und zeigten weder Verhaltensauffälligkeiten noch eine erhöhte Mortalitätsrate. Auch die Herzfrequenz (HF) wies im Alter von 4 Monaten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen auf (HF GC-A KO  $311 \pm 11$  Schläge pro Minute vs. WT  $303 \pm 5$  Schläge pro Minute, s. Tab.10). Zwischen männlichen und weiblichen Mäusen gleichen Genotyps wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Parameter	WT	GCA-KO	Anzahl	Alter (Monate)
Körpergewicht (g)	$30,0 \pm 0,93$	$31,2 \pm 1,2$	10	4
HF (Schläge/min)	$303 \pm 5$	$311 \pm 11$	10	4
LVEDd (mm)	$4,11 \pm 0,09$	$4,82 \pm 0,15 *$	10	4
LVEDs (mm)	$2,71 \pm 0,08$	$3,12 \pm 0,1 *$	10	4
IVS (mm)	$0,58 \pm 0,03$	$0,73 \pm 0,04 *$	10	4
PWEDd (mm)	$0,73 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,03 *$	10	4
FS %	$33,92 \pm 1,92$	$35,25 \pm 1,41$	10	4

**Tabelle 10: Mittelwerte des Körpergewichts, der Herzfrequenz (HF), des linksventrikulären enddiastolischen (LVEDd) und systolischen (LVEDs) Durchmessers, der interventrikulären Septumdicke (IVS), Hinterwanddicke in der Diastole (PWEDd) und der linksventrikulären Verkürzungsfraction (FS%) innerhalb der Wildtyp- und der GC-A KO Gruppe im Alter von 4 Monaten. Wildtyp: Wildtyp-Maus, GC-A KO: GC-A Knockout-Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen.**

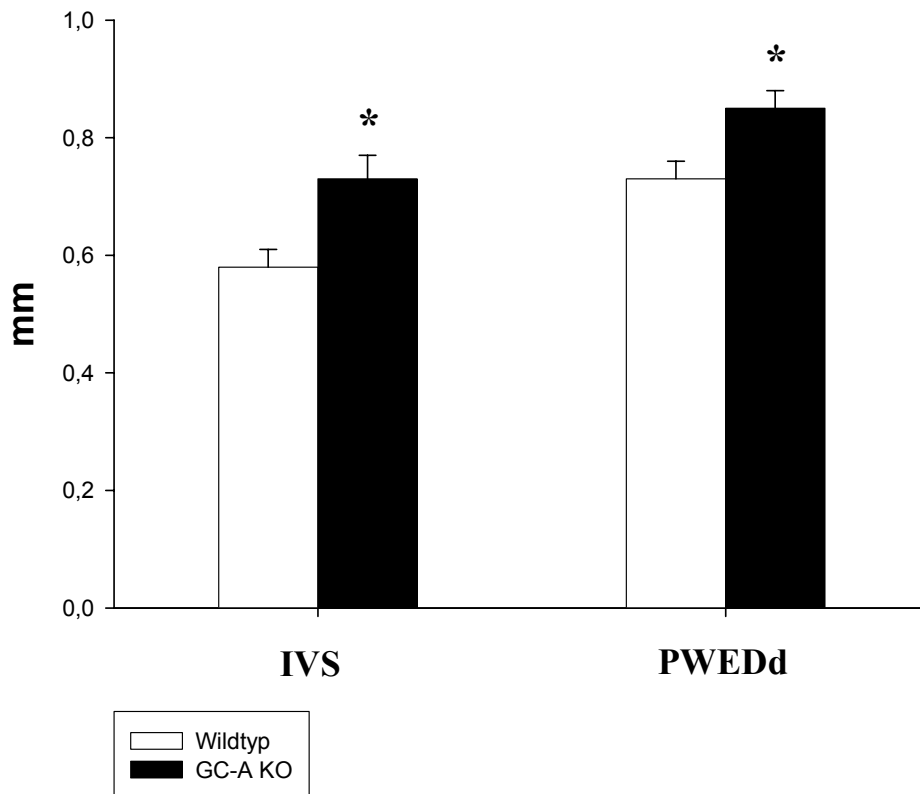
Signifikante Unterschiede fanden sich jedoch beim Vergleich der echokardiographisch bestimmten linksventrikulären Herzdurchmesser. Sowohl der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDd) als auch der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser (LVEDs) waren bei der GC-A KO Maus im Vergleich zur Wildtypmaus signifikant vergrößert (LVEDd (mm) GC-A KO  $4,82 \pm 0,15$  vs. WT  $4,11 \pm 0,09$  und LVEDs (mm) GC-A KO  $3,12 \pm 0,1$  vs. WT  $2,71 \pm 0,08$  (p jeweils  $< 0,05$ ), s. Tab.10 und Abb. 28).



**Abbildung 28: Linksventrikuläre Durchmesser in der Diastole (LVEDd in mm) und in der Systole (LVEDs in mm). Wildtyp:** Wildtyp-Maus, **GC-A KO:** GC-A Knockout Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen.

Zusätzlich zeigte sich im Alter von 4 Monaten bei der GC-A KO Maus eine signifikante Verdickung des interventrikulären Septums (IVS (mm) GC-A KO  $0,73 \pm 0,04$  vs. WT  $0,58 \pm 0,03$  ( $p < 0,05$ ), s. Abb. 29) und eine signifikant verdickte linksventrikuläre Hinterwand (PWEDd (mm) GC-A KO  $0,85 \pm 0,03$  vs. WT  $0,73 \pm 0,03$  ( $p < 0,05$ ), s. Abb. 29) im Vergleich zum Wildtypen. Beide Parameter weisen auf eine beim GC-A KO Mausmodell vorliegende Herzhypertrophie hin. Da die ventrikuläre Verkürzungsfraction als Maß für die Herzfunktion jedoch keine signifikanten Unterschiede aufwies (FS% GC-A KO  $35,25 \pm 1,41$  vs. WT  $33,92 \pm 1,92$ , s. Tab. 10), liegt hier eine kompensierte Form der Herzhypertrophie vor.

### Interventrikuläre Septumdicke (IVS) und linksventrikuläre Hinterwanddicke in der Diastole (PWEDd)

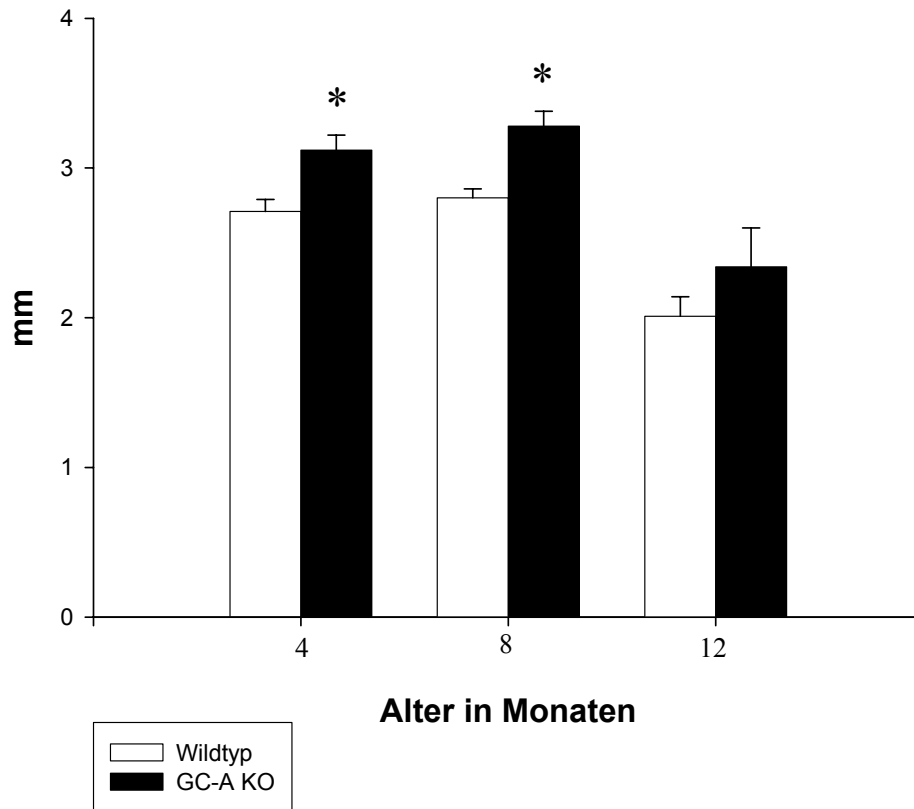


**Abbildung 29: Interventrikuläre Septumdicke (IVS in mm) und diastolische linksventrikuläre Hinterwanddicke (PWEDd in mm). Wildtyp: Wildtyp-Maus, GC-A KO: GC-A Knockout Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen.**

#### 3.2.2 GC-A KO im Zeitverlauf

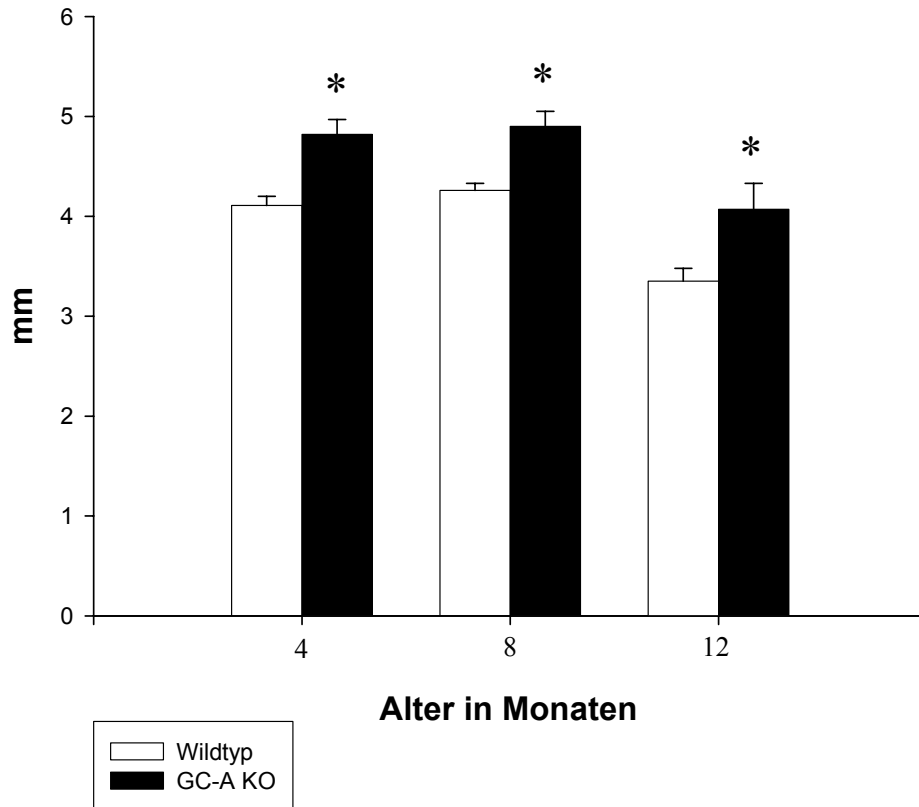
Alle untersuchten GC-A Knockout Mäuse entwickelten eine linksventrikuläre Hypertrophie kombiniert mit einer linksventrikulären Kammervergrößerung: In allen Altersklassen waren das interventrikuläre Septum und die Hinterwand des linken Ventrikels im Vergleich zum Wildtypen verdickt und die systolischen und diastolischen linksventrikulären Durchmesser zeigten sich signifikant vergrößert (s. Tab. 11 und Abb. 30 und Abb. 31, ( $p < 0,05$ )).

### Linksventrikulärer systolischer Durchmesser (LVEDs) im Zeitverlauf



**Abbildung 30: Systolische linksventrikuläre Durchmesser im Zeitverlauf (LVEDs in mm).** Wildtyp: Wildtyp-Maus, GC-A KO: GC-A Knockout-Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen.

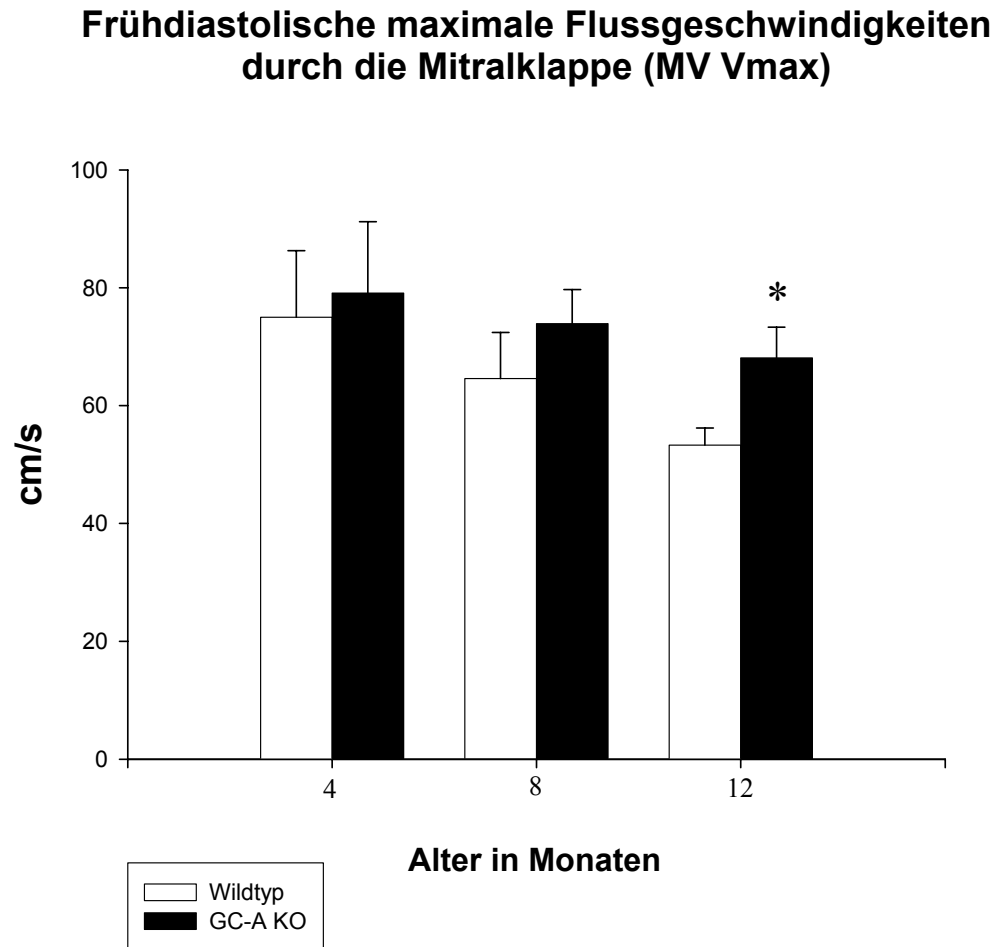
### Linksventrikulärer diastolischer Durchmesser (LVEDd) im Zeitverlauf



**Abbildung 31: Diastolische linksventrikuläre Durchmesser im Zeitverlauf (LVEDd in mm).** Wildtyp: Wildtyp-Maus, GC-A KO: GC-A Knockout-Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen.

Trotz der ausgeprägten Herzhypertrophie blieb die linksventrikuläre Funktion der GC-A transgenen Mäuse verglichen mit den Werten der Wildtyp-Geschwistertiere im Zeitverlauf unverändert: die linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS%) und die Geschwindigkeit der zirkumferenten Faserverkürzung (Vcf) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (s. Tab. 11).

Im Alter von 12 Monaten manifestierte sich jedoch eine signifikant gesteigerte maximale Geschwindigkeit des frühen diastolischen Einstroms (erhöhte E-Welle, MV Vmax (cm/s) GC-A KO  $132,6 \pm 11,8$  vs. WT  $94,0 \pm 7,1$  ( $p < 0,05$ ), s. Tab. 11 und Abb. 32) als Zeichen einer diastolischen Dysfunktion.



**Abbildung 32: Frühdiastolische maximale Flussgeschwindigkeiten durch die Mitralklappe (MV Vmax in cm/s) im Zeitverlauf. Wildtyp:** Wildtyp-Maus, **GC-A KO:** GC-A Knockout-Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen.

Ebenfalls im seneszenten Alter von 12 Monaten zeigte sich eine exzessive linksventrikuläre Hypertrophie, die teilweise zu einer Flussbeschleunigung im linksventrikulären Ausflusstrakt führte.

Zusammenfassend beobachteten wir bei der GC-A Knockout Mauslinie in der Doppler-Echokardiographie eine -in allen Altersklassen manifeste- funktionell kompensierte Herzhypertrophie mit einer begleitenden Herzdilatation. Im seneszenten Alter von 12 Monaten stellte sich erstmalig eine eingeschränkte diastolische Herzfunktion dar.

Parameter	4 Monate		8 Monate		12 Monate	
	WT	GC-A KO	WT	GC-A KO	WT	CG-A KO
Anästhesie	Ket/Xyl	Ket/Xyl	Ket/Xyl	Ket/Xyl	Diazepam	Diazepam
Körpergewicht (g)	30,3 ± 0,93	31,2 ± 1,2	32,1 ± 1,2	31,5 ± 1,2	36,4 ± 1,9	37,6 ± 1,8
HF (Schläge/min)	303 ± 5	311 ± 11	287 ± 4	313 ± 17	420 ± 57	488 ± 47
IVSs (mm)	0,58 ± 0,03	0,73 ± 0,04 *	0,49 ± 0,01	0,60 ± 0,02 *	0,84 ± 0,03	0,99 ± 0,04 *
LVEDd (mm)	4,11 ± 0,09	4,82 ± 0,15 *	4,26 ± 0,07	4,90 ± 0,15 *	3,35 ± 0,13	4,07 ± 0,26 *
LVEDs (mm)	2,71 ± 0,08	3,12 ± 0,1 *	2,80 ± 0,06	3,28 ± 0,1 *	2,01 ± 0,13	2,34 ± 0,26
PWEDd (mm)	0,73 ± 0,03	0,85 ± 0,03 *	0,68 ± 0,04	0,88 ± 0,05 *	0,86 ± 0,02	0,98 ± 0,03
Ao Vmax (cm/s)	86,72 ± 3,63	136,1 ± 11,3 *	81,02 ± 0,89	110,7 ± 4,74 *	94,0 ± 7,1	132,6 ± 11,8 *
MV Vmax (cm/s)	75,0 ± 11,3	79,1 ± 12,1	64,6 ± 7,8	73,9 ± 5,8	53,3 ± 2,9	68,1 ± 5,2 *
FS (%)	33,9 ± 1,9	35,3 ± 1,4	34,3 ± 1,3	32,9 ± 1,4	41,6 ± 2,7	41,8 ± 2,6
Ao V max (cm/s)	86,72 ± 3,63	136,1 ± 11,3 *	81,02 ± 89	110,7 ± 4,75 *	94,0 ± 7,1	132,6 ± 11,8 *
Vcf (circ/s)	4,05 ± 0,32	4,01 ± 0,2	3,72 ± 0,20	3,53 ± 0,13	6,6 ± 0,4	7,1 ± 0,9

**Tabelle 11: Echokardiographieergebnisse ausgewählter Linksherzparameter bei 4 Monate alten, 8 Monate alten und 12 Monate alten GC-A KO-Mäusen. Wildtyp:** Wildtyp-Maus, **GC-A KO:** GC-A Knockout-Maus. Die Werte werden angegeben als Mittelwert ± Standardfehler. Sterne ( \* ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen. **Ket/Xyl:** Ketamin/Xylazin-Narkose, **HF:** Herzfrequenz, **IVSs:** Durchmesser des linksventrikulären Septums in der Systole, **LVEDd/LVEDs:** linksventrikulärer Durchmesser diastolisch/systolisch, **PWEDd:** diastolischer Durchmesser der Hinterwand, **FS:** Ventrikelverkürzungsfraction, **Ao Vmax:** maximale Geschwindigkeit des Aortendopplers, **MV Vmax:** maximale Geschwindigkeit des Mitraldopplers, **Vcf:** Zirkuläre Faserverkürzung.



## 4 Diskussion

### 4.1 Methodik

#### 4.1.1 Doppler-Echokardiographie bei der Maus

In den vergangenen Jahren war es ein Ziel vieler Arbeitsgruppen, funktionelle Herzkreislaufdaten der Maus zu erhalten. Im Vordergrund stand insbesondere die kardiovaskuläre Phänotypisierung von genetisch veränderten Mäusen. Aktuell können sowohl elektrische wie auch hämodynamische Parameter *ex vivo* und *in vivo* erhoben werden. Die transthorakale Echokardiographie ist eine nicht invasive Untersuchungsmethode, die eine funktionelle und eine morphologische *in vivo* Charakterisierung des kardialen Phänotyps von Mäusen ermöglicht (102-104). Ferner können kardiale Strukturen lokalisiert werden und zeitliche Veränderungen von Kammerwänden und Klappen dargestellt werden. In der Vergangenheit konnten so zuverlässig linksventrikuläre Veränderungen wie Wanddicke, Kammergröße, Masse und Funktion detektiert werden (90;105-110). Zur Bestimmung von Ventrikeldurchmessern und Wanddicken sind Aufzeichnungen im Motion (M)-Mode von der parasternalen langen und kurzen Achse geeignet. Insbesondere für die aus M-Mode Messungen bestimmbare Verkürzungsfraction (FS%) und die Bestimmung des linksventrikulären Gewichts (LV-Masse) stellt die Echokardiographie eine gut untersuchte Methode dar. So gelangen bei der Maus Nachweis von linksventrikulärer Hypertrophie und von eingeschränkter linksventrikulärer Funktion mittels Berechnung einer Formel nach MANNING et al. und GARDIN et al. (111;112). Das Maximum des Aortenflusses und des Mitralflusses kann mit einem nach apikal angenäherten Winkel von der parasternalen Längsachse ausgehend im CW (continuous wave)-Dopplerverfahren ermittelt werden (103;113). Die Erfassung von absoluten Werten bei der Doppleruntersuchung des Aortenflusses ist nur eingeschränkt möglich, da der Winkel zwischen dem Dopplerstrahl und dem Blutstrom nicht gleich null ist und so die Flussgeschwindigkeiten unterschätzt werden. Auch eine optimale Darstellung vom Apex ausgehend ist aufgrund des sehr kleinen echokardiographisch zugänglichen Fensters nur erschwert möglich. Studien wiesen aber eine gute Vergleichbarkeit von im CW-Modus erhaltenen angenäherten Dopplerwerten an die tatsächlichen Flussgeschwindigkeiten nach. Des Weiteren zeigten sich die relativen Dopplerwerte in dieser Arbeit untereinander gut vergleichbar.

Nahezu gegen null geht der Winkel bei der Dopplerbestimmung des Flusses durch die Mitralklappe (103).

In dieser Studie wurden echokardiographische Untersuchungen mit dem handelsüblichen Gerät Philips SONOS 5500 Doppler-Echokardiographiesystem durchgeführt. Zahlreiche Studien haben die gute Einsetzbarkeit der Doppler-Echokardiographie zur morphologischen und funktionellen Charakterisierung des kardialen Phänotyps bei Mäusen belegt (113-121). Zur echokardiographischen Systemausstattung gehörten ein 12 MHz Hochfrequenzschallkopf und ein 15 MHz Linearschallkopf. Der 12 Mhz Sektorschallkopf kommt in der klinischen Medizin insbesondere bei pädiatrischen und dermatologischen Fragestellungen zum Einsatz, da er feine Strukturen in einer Tiefe von 0-4 cm abbilden kann und somit auch für die Maus-Echokardiographie geeignet erscheint.

#### **4.1.2 Mausmodell PP2A im Zeitverlauf**

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen ist ein essentieller regulatorischer Mechanismus für viele Zellfunktionen. Im Gegensatz zu den gut untersuchten Proteinkinasen ist die Aufgabe und Regulation der Proteinphosphatasen für die Ausbildung von Herzerkrankungen noch nicht vollständig verstanden. Zahlreiche Arbeitsgruppen beschrieben das Vorliegen von Serin/Threonin-Phosphatasen vom Typ 1, Typ 2A, Typ 2B und Typ2C im Herzen. Die kardialen PP1 und PP2A bilden hier etwa 90% der Phosphataseaktivität (33;44;45;122).

Neuere Befunde deuteten auf eine pathologische Rolle der Proteinphosphatasen (PP) für die Entwicklung einer Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz hin: In den aus menschlichen insuffizienten Herzen gewonnenen Myokardproben waren die mRNA-Expression und die Aktivität der katalytischen Untereinheit von PP1 erhöht (23).

Darüber hinaus ging diese erhöhte PP1-Aktivität mit einer Dephosphorylierung von kardioregulatorischen Proteinen einher.

Unabhängige Studien zeigten auf, dass auch in menschlichen Myokardbiopsien bei Patienten im Endstadium der Herzinsuffizienz die kardialen Regulatorproteine PLB und TnI im dephosphorylierten Zustand vorlagen (21;44;45;66;68). Ferner wurde eine Störung in der kardialen  $Ca^{2+}$ -Homeostase als eine Ursache für die Ausbildung von Herz-

hypertrophie und Herzinsuffizienz diskutiert. Daher könnte eine vermehrte Aktivität von PP1 und PP2A mit konsekutiver Dephosphorylierung von kardialen Calcium-regulierenden Proteinen verantwortlich für die Induktion einer Herzhypertrophie sein.

Es gibt Hinweise darauf, dass die PP2A ebenso wie die PP1 an der Dephosphorylierung von den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom regulierenden Proteinen wie u.a. Phospholamban (PLB) beteiligt ist und sich auf kontraktile Filamente (TnI) im sarkoplasmatischen Retikulum auswirkt (46;123). An dieser Stelle wäre eine genaue Analyse der Phosphorylierungszustände von ausgesuchten herzregulierenden Proteinen weiterführend.

Eine andere Studie verdeutlichte eine kausale Verbindung zwischen Herzhypertrophie und erhöhter Aktivität von PP1 bzw. PP2A im Tiermodell: Eine chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch Isoprenalin-Infusionen führte bei der Ratte zu einer Herzhypertrophie, zu einer erhöhten Proteinphosphataseaktivität (sowohl von PP1 als auch PP2A) und zu einer Dephosphorylierung von PLB (22). Schlussfolgernd stand fest, dass die Dephosphorylierung von PLB auf die gesteigerte Aktivität von PP1 und PP2A zurückzuführen ist und dass eine chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation zu einer Aktivitätssteigerung dieser Proteinphosphatasen führen kann. Dieses Tiermodell stellt möglicherweise ein klinisch relevantes Modell für das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz dar, da eine erhöhte  $\beta$ -adrenerge Stimulation das typische Kennzeichen bei der menschlichen Herzinsuffizienz ist und Patienten so erfolgreich durch die Gabe von  $\beta$ -Blockern therapiert werden können.

Durch Hemmung der PP1 mittels Überexpression eines konstitutiv aktiven Inhibitors konnte die Kontraktilitätszunahme auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation in Kardiomyozyten aus terminal insuffizienten Herzen verbessert werden (65). Auch diese Beobachtung veranschaulicht die Bedeutung der Proteinphosphatasen als möglichen Regulator der Herzkontraktion.

Knockout-Experimente zeigten, dass die PP2A für eine normale intrauterine Herzentwicklung essentiell ist: Mäuse mit fehlender katalytischer Untereinheit  $\alpha$  der PP2A verstarben bereits am 6. embryonalen Tag (124).

BREWIS et al. entwickelten ein transgenes Mausmodell, welches eine dominante negative Mutante der strukturellen A-Untereinheit von PP2A überexprimierte (125). Die spezifische Überexpression veränderte die Bindungsstellen der PP2A; die strukturelle A-Untereinheit konnte so nur die katalytische Untereinheit, jedoch nicht die regulatori-

sche Untereinheit der PP2A binden. Die Autoren verzeichneten einen im Herzen vorliegenden gesteigerten Anteil des PP2A Core-Enzyms (bestehend aus den Untereinheiten A und C) im Vergleich zum PP2A Holoenzym (bestehend aus der katalytischen Untereinheit C und den regulatorischen Untereinheiten A und B). Es wurden eine erhöhte Sterblichkeit und eine echokardiographisch gesicherte Herzvergrößerung mit verminderter kardialer Funktion beobachtet, wiederum ähnlich dem Bild einer dilatativen Kardiomyopathie.

Eine spezifische Überexpression der katalytischen Untereinheit PP1 im Mausmodell führte zur Herzinsuffizienz mit den echokardiographischen Kennzeichen einer dilatativen Kardiomyopathie sowie zu einer erhöhten Sterblichkeit (65).

Zur Analyse der spezifischen Bedeutung von PP2A auf die Herzfunktion erfolgten im Rahmen dieser Dissertation Untersuchungen an einem transgenen Mausmodell mit einer um 110% erhöhten herzspezifischen Expression der katalytischen Untereinheit PP2A $\alpha$ . Wir beobachteten eine kompensierte Herzinsuffizienz mit einer Dilatation des linken Ventrikels, ähnlich dem klinischen Bild einer beim Menschen auftretenden dilatativen Kardiomyopathie. Die Mäuse wiesen im Vergleich zum Wildtypen im ersten Lebensjahr im Gegensatz zum PP1-Mausmodell keine erhöhte Mortalität auf.

#### **4.1.3 Vergleich von zwei verschiedenen Mausmodellen - PP2A vs. GC-A KO**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Doppler-echokardiographische Untersuchungen annähernd identisch zum Versuchsaufbau der PP2A-Maus im Alter von 4, 8 und 12 Monaten (16, 32 und 48 Wochen) an GC-A Knockout-Tieren durchgeführt.

Sowohl das transgene PP2A-Mausmodell als auch das GC-A Knockout-Mausmodell wiesen eine funktionelle Herzinsuffizienz auf. Während bei der PP2A-transgenen Maus eine linksventrikuläre Dilatation mit systolischer Dysfunktion im Vordergrund stand (ähnlich dem klinischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM)), ähnelte der echokardiographische Phänotyp des GC-A-Knockout-Mausmodells dem klinischen Bild einer hypertrophen Kardiomyopathie (HCM). Hier waren eine kardiale Hypertrophie und eine eingeschränkte diastolische Funktion bei fast unveränderter systolischer Funktion zu beobachten.

#### 4.1.4 $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin

Isoprenalin ist ein synthetisch hergestelltes Katecholamin. Im Gegensatz zu den körpereigenen Katecholaminen wie Adrenalin, Noradrenalin oder Dopamin, wirkt Isoprenalin selektiv auf die  $\beta$ -Rezeptoren. Es hat also nahezu keine Wirkung auf die  $\alpha$ -Rezeptoren (126).

Durch die ausgeprägte Wirkung auf  $\beta_1$ -Rezeptoren wirkt Isoprenalin positiv inotrop und chronotrop (127;128). Nach intravenöser oder intraperitonealer Applikation tritt die Wirkung unverzüglich ein und hält nur wenige Minuten an. Das Ende der Wirkung ist in erster Linie eine Folge der Aufnahme von Isoprenalin in das Gewebe (128). Isoprenalin koppelt dabei an den adrenergen Rezeptor an, so dass die stimulierende Untereinheit eines G-Proteins die Adenylatcyclaseaktivität erhöht. Dieser Mechanismus führt zur Erhöhung der cAMP-Konzentration und aktiviert die Proteinkinase A, die anschließend ihre Zielproteine (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle) phosphoryliert. Diese Reaktionskette führt letztlich zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration.

In terminal insuffizienten Herzen wurde eine verminderte Effektivität von  $\beta$ -adrenergen Substanzen beobachtet (63), hier lag ursächlich eine verminderte Katecholaminsensitivität aufgrund einer erniedrigten Expression von  $\beta$ -Rezeptoren (Herabregulation) vor.

Die Katecholamin-Belastung im Rahmen einer echokardiographischen Untersuchung stellt eine in der Literatur etablierte Methode zur Detektierung einer Herzinsuffizienz im transgenen Mausmodell dar (129-135). Transgen erzeugte Mäuse, welchen das Gen für Phospholamban fehlte (PLB Knockout-Mäuse), zeigten *in vivo* eine verminderte Ansprechbarkeit auf Isoprenalin (136).

Eine andere Studie stimulierte während einer echokardiographischen Untersuchung CREB-transgene Mäuse ebenfalls mit Isoprenalin (137). Zeichen für eine in diesem Mausmodell vorliegende herabgesetzte Katecholaminsensitivität waren ein im Vergleich zur Wildtyp-Maus verminderter Herzfrequenzanstieg und eine fehlende bzw. nur sehr gering adaptive Steigerung der linksventrikulären Verkürzungsfraction (Fractional shortening, FS) nach Katecholamingabe.

Auch bei menschlichen Patienten, die an einer dilatativen Kardiomyopathie erkrankt sind, wurde eine herabgesetzte Antwort auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation beobachtet (138).

In einer weiteren Studie wurde durch Überexpression eines konstitutiv aktiven Inhibitors die Proteinphosphatase 1 (PP1) gehemmt. Diese Hemmung der PP1 führte *ex vivo* zur Wiederherstellung einer adäquaten Kontraktilitätszunahme auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation in Kardiomyozyten (gewonnen aus terminal insuffizienten Herzen) (65). Dies veranschaulicht erneut die Bedeutung der Proteinphosphatasen als möglichen Regulator der Herzkontraktion und eine Aktivitätsinhibierung könnte ein therapeutisches Ziel zur Bekämpfung der Herzinsuffizienz darstellen.

Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass die PP2A ebenso wie die PP1 an der Steuerung der Herzkontraktion beteiligt ist. Eine erhöhte Aktivität führt zu einer reduzierten Phosphorylierung von herzregulierenden Proteinen mit konsekutiver Ausbildung einer Herzinsuffizienz.

Auch das in unserer Studie verwendete Mausmodell mit einer herzspezifischen PP2A-Überexpression wies in den Doppler-echokardiographischen Untersuchungen eine Herzinsuffizienz auf und wurde daher einer Belastungsuntersuchung mit Isoprenalin unterzogen. Im Vergleich zum Wildtypen wurde im transgenen Tier *in vivo* ein tendenziell geringerer maximaler Effekt auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation beobachtet (123). Eine Signifikanz konnte jedoch vermutlich aufgrund der kleinen Gruppengröße (n=10 Tiere) nicht nachgewiesen werden.

#### **4.1.5 Freiwilliges Laufradtraining**

In der Literatur werden „pathologische“ und „physiologische“ Formen der Herzhypertrophie unterschieden. Körperliches Training kann zu einer „physiologischen“ kardialen Hypertrophie führen. Diese Art von Hypertrophie wird durch eine normale kardiale Struktur mit unauffälligem Muster der kardialen Genexpression charakterisiert und führt im Zeitverlauf nicht zu einer dekompensierten Kardiomyopathie oder zu Herzversagen (139;140). Körperliche Aktivität schützt nicht zuletzt vor kardiovaskulären Erkrankungen und es wurde vormals beschrieben, dass eine physiologische kardiale Hypertrophie durch moderates Training die Herzfunktion aufrecht erhält (141).

Im menschlichen Organismus führt ein isotonisches Training wie z.B. Laufen oder Schwimmen zu einer Vergrößerung der Kammerdurchmesser und ggf. zu einer proportionalen Wanddickenzunahme (139;142). Daher könnte ein moderates körperliches

Training neben der bewährten Pharmakotherapie einen alternativen Therapieansatz bei verschiedenen Herzerkrankungen darstellen.

Allgemeine Richtlinien empfehlen Patienten mit einer kompensierten dilatativen Kardiomyopathie die Ausübung eines moderaten körperlichen Trainings (143) und zahlreiche klinische Studien belegen ein Profitieren von Patienten mit Herzerkrankungen durch Teilnahme an einem Rehabilitationsprogramm mit integrierten Trainingsmöglichkeiten (144-147).

Dabei beschäftigten sich die meisten Arbeitsgruppen mit der ischämischen Variante einer Kardiomyopathie, z.B. der Situation nach einem Myokardinfarkt (143). GIANNUZZI et al. (148) zeigten, dass ein körperliches Training den Verlauf einer linksventrikulären Vergrößerung bei Patienten reduzieren konnte. Wiederum andere Studien bemerkten keine Veränderung des linksventrikulären Kammerdurchmessers bei Patienten mit linksventrikulärer Infarkt-bedingter Dysfunktion nach einem chronischem Training (147).

Studien am menschlichen Kollektiv zur Auswirkung eines Ausdauertrainings auf die (wie hier im PP2A-transgenen Modell vorliegende) dilatative Kardiomyopathie stehen noch aus. Schwierigkeiten träten hier vor allem durch bestehende Komorbiditäten und ggf. mangelnde Compliance und Motivation auf (143).

Freiwilliges Nutzen des Laufrades scheint ein natürliches Verhalten von Labortieren zu sein, um ihrem Bewegungsdrang nachzugehen (149;150). Studien, die das Laufverhalten im Hinblick auf einen zirkadianen Rhythmus untersuchten, stellten fest, dass die Tiere vornehmlich in der Aktivitätsphase, bei Mäusen ist dies die Dunkelphase, laufen (149;150). Das Laufradtraining wurde im Tiermodell zur Beobachtung des Einflusses von körperlicher Aktivität auf verschiedenste Organsysteme, u.a. auch auf das Herz-Kreislaufsystem, angewendet. Es zeigten sich eine Vielzahl von positiven Trainingseffekten, wie u.a. eine Abnahme des Körpergewichts, Normalisierung des Blutdruckes, Absinken der Herzschlagrate und eine Stabilisierung des Immunsystems (151;152).

SPENCER et al. (143) generierten ein transgenes Mausmodell, um die Bedeutung eines moderaten körperlichen Trainings als Therapiealternative zur Behandlung der dilatativen Kardiomyopathie echokardiographisch zu untersuchen: Die CREB-transgenen Mäuse entwickelten ebenso wie die in unserer Studie untersuchten PP2A-transgenen Mäuse vergrößerte Kammerdurchmesser und eine herabgesetzte kontraktile Funktion.

Im Gegensatz zum PP2A-Mausmodell wurde bei den CREB-Mäusen jedoch eine gesteigerte Mortalität beobachtet. Die Trainingsmöglichkeiten stellten, ähnlich wie in dieser Arbeit beschrieben, im Käfig integrierte Laufräder dar, die die Mäuse freiwillig nutzen konnten. Ein Training verhinderte weder ein Fortschreiten des Abfalls der linksventrikulären Funktion, noch reduzierte sich die Mortalitätsrate.

In dieser Arbeit entwickelten die PP2A-transgenen Tiere vergrößerte linksventrikuläre Durchmesser und eine eingeschränkte systolische Funktion, ähnlich dem klinischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie. Zudem wurde das Trainingsverhalten von PP2A-transgenen Tieren und Wildtyp-Geschwistertieren gegenübergestellt. Trainierende Tiere unserer Versuchsreihe hatten freien Zugang auf ein Laufrad und nutzten dieses ausgiebig in der Dunkelphase. Die Wildtyp-Mäuse erliefen in dem sechswöchigen Trainingszeitraum eine durchschnittliche Laufstrecke von  $125,67 \pm 57,24$  km; demnach betrug die durchschnittliche täglich absolvierte Laufstrecke 3 km. Diese Zahlen decken sich mit denen verschiedener Arbeitsgruppen mit vergleichbarem Studiendesign: hier wurden täglich zurückgelegte Laufdistanzen von 2-4 km beobachtet (149;153).

LERMAN et al. untersuchten sieben unterschiedliche Mausstämme zur Analyse genetisch determinierter Unterschiede im Hinblick auf das Laufverhalten im Rahmen eines freiwilligen Laufradtrainings (154). C57BL/6J Mäuse und Swiss Webster (SW) Mäuse zeigten signifikant größere täglich zurückgelegte Laufdistanzen im Vergleich zu anderen ausgewählten Mauslinien (6,4 km bzw. 7,5 km/24h). DBA/1J Mäuse hingegen absolvierten im Durchschnitt die kleinste täglich zurückgelegte Laufdistanz (1,4 km/24h). Im mittleren Bereich befanden sich absteigend die Laufstrecken von FVB/NJ Mäusen (4 km/24h), BALB/cByJ Mäusen (3,5 km/24h), C3H/HeJ Mäusen (3 km/24h) und DBA/2J Mäusen (2,8 km/24h). Die Autoren wiesen darauf hin, dass die erbrachte Trainingsleistung eine hochkomplexe Eigenschaft aus unterschiedlichen Komponenten darstellt: In die Leistung fließen neben der kardialen Funktion auch Lungenfunktion, Sauerstofftransport und Muskelkontraktion mit ein. Hinzu kommen weniger quantifizierbare Variablen wie Motivation und Verlangen.

In unserer Studie lagen die absolut geleisteten Laufstrecken der PP2A-Mäuse während des sechswöchigen Trainings durchschnittlich deutlich unter denen der Wildtyp-Mäuse (PP2A  $9,33 \pm 5,84$  km vs. WT  $125,67 \pm 57,24$  km).



Da das Trainingsprotokoll einen freiwilligen Zugang zu den Laufrädern vorsah, wurden die Einflussgrößen „Motivation“ bzw. „individuelle körperliche Eignung“ als möglicherweise die Ergebnisse verfälschende Parameter nicht ausgeschlossen. Dennoch wurden die Laufräder von beiden Genotypen rege genutzt. Als Alternative könnte in einer weiteren Versuchsreihe eine erzwungene Trainingsmethode angewandt werden, beispielsweise in Form eines regelmäßigen Schwimmtrainings oder eines Laufbandtrainings. Diese Trainingsmethoden wären hingegen möglicherweise weniger „physiologisch“ und Studien bemerkten wiederum, dass ein Anbieten von freiwilligen Trainingsmöglichkeiten weniger häufig zu negativen Stressreaktionen bei den Tieren führte (155).

Wir entschlossen uns daher ein freiwilliges Training über einen Trainingszeitraum von 6 Wochen anzubieten, da unabhängige Arbeitsgruppen mit ähnlichen Studienprotokollen in den ersten Wochen einen Anstieg der Laufdistanzen feststellten, die dann nach der sechsten Woche auf einem Höchstwert stagnierten (98).

Als Nebenbefund konnte beobachtet werden, dass die weiblichen Tiere tendenziell weniger Laufstrecke absolvierten als die männlichen Tiere. Gleichzeitig beobachteten wir seitens der Weibchen eine vermehrte Neigung zum Nestbau im Laufrad.

Das freiwillige Ausdauertraining führte bei PP2A-transgenen Tieren zwar nicht zu einer Verzögerung der genetisch vorprogrammierten Herzinsuffizienz, die Entwicklung der Herzinsuffizienz wurde aber auch nicht akzeleriert (z.B. in Richtung einer dekompensierten Form). Im Allgemeinen waren die herzinsuffizienten PP2A-transgenen Tiere trainierbar. In diesem Modell einer genetisch bedingten Herzinsuffizienz aufgrund verstärkter Phosphatase-Aktivität scheint somit ein physiologisches körperliches Training keine schädlichen Auswirkungen zu haben.

#### **4.1.6 Einfluss der Ketamin/Xylazin-Narkose**

Die aktuelle Literatur berichtet über zahlreiche Narkoseverfahren zur Sedierung von Mäusen. Neben der in dieser Studie hauptsächlich verwendeten Ketamin/Xylazin-Narkose wurden von anderen Arbeitsgruppen Injektionsnarkotika, wie z.B. Diazepam (i.p.), Pentobarbital oder Inhalationsnarkotika wie z.B. Isofluran verwendet. Die einzel-

nen Narkoseformen wirken sich jeweils unterschiedlich auf das murine Herzkreislaufsystem aus und können so echokardiographische Untersuchungsergebnisse verändern.

Ein ideales Narkosemittel für die Mausechokardiographie sollte eine möglichst geringe Auswirkung auf die Herzfunktion aufweisen und aufgrund der relativ kurzen erforderlichen Untersuchungszeit von ca. 20 Minuten gut steuerbar sein.

Im Vergleich zu in anderen Studien verwendeten Diazepam- und Inhalationsnarkosen wirkte die in unserer Studie verwendete Kombinationsanästhesie aus Ketamin und Xylazin negativ inotrop und negativ chronotrop: kurz nach der Injektion beobachteten wir bei der Wildtyp-Maus regelmäßig eine Bradykardieentstehung mit einer durchschnittlichen Herzfrequenz von  $317 \pm 13$  Schlägen pro Minute, bei der PP2A-transgenen Maus mit Durchschnittswerten von  $349 \pm 6$  Schlägen pro Minute. Demgegenüber wird in der Literatur unter Anwendung einer Isoflurannarkose von einer deutlich höheren Herzfrequenz um  $438 \pm 45$  Schläge pro Minute berichtet (156).

Verschiedene Arbeitsgruppen beschreiben ebenfalls einen Herzfrequenzabfall unter Ketamin/Xylazin-Narkose auf durchschnittliche Werte von  $333 \pm 63$  Schläge pro Minute (157-159). Zum Vergleich liegt die physiologische Ruhefrequenz von wachen Mäusen mit 550-620 Schlägen pro Minute (160) deutlich über der Frequenz von mittels Ketamin/Xylazin narkotisierten Tieren.

Aufgrund der negativ inotropen und chronotropen Wirkung der Ketamin/Xylazin-Narkose wiesen Mäuse zusätzlich eine verminderte linksventrikuläre Verkürzungsfraktion (FS%) auf.

Gleichzeitig beobachteten wir häufig einen Wirkungsüberhang der Narkose von ca. 20 Minuten: einer möglichen Unterkühlung der Mäuse wurde mit Rotlichtbestrahlung entgegengewirkt.

Wiederum andere Arbeitsgruppen verwendeten Diazepam zur Narkotisierung der Maus (95). Diazepam, ein Benzodiazepin, wirkt intraperitoneal appliziert sowohl sedativ als auch anxiolytisch. Trotz standardisierter Applikation variierten der Zeitpunkt des Wirkungseintritts und die Wirkdauer stark von Maus zu Maus. Da unter Sedierung mit Ketamin/Xylazin (25mg / 10mg i.p.) eine massive Bradykardieeigung bei 12 Monate alten GC-A KO Mäusen auffiel, wechselten wir das Narkose-Regime zu Diazepam (17,5mg Diazepam (Valium®) pro kg Körpergewicht i.p.). Hierunter lag die durchschnittliche Herzfrequenz der GC-A KO Maus bei  $488 \pm 47$  Schlägen pro Minute, bei

der Wildtyp-Maus beobachteten wir eine Herzfrequenz von durchschnittlich  $420 \pm 57$  Schlägen pro Minute. Diese Werte näherten sich denen einer physiologischen Herzfrequenz unter Ruhebedingungen an.

Wiederum andere Arbeitsgruppen präferierten eine echokardiographische Untersuchung an wachen, nicht narkotisierten Mäusen (93), hier wurde jedoch ein stressinduzierter sympathischer Herzfrequenzanstieg beobachtet.

Einige Studien zeigten deutliche technische Vorteile bei der Verwendung von Ketamin/Xylazin für die Maus-Echokardiographie auf (161): Die langsamen Herzfrequenzen ermöglichen eine bessere zeitliche Bildauflösung und damit auch die Darstellung besonders feiner anatomischer Strukturen, wie z.B. der Ventrikelwände. Zudem wird bei langsameren Frequenzen ein Verschmelzen von E- und A-Welle des Mitralisstroms verhindert, so dass die diastolische Ventrikelfunktion einfacher bestimmt werden kann (161). Da zahlreiche Arbeitsgruppen die Anästhesie mit Ketamin/Xylazin in der Vergangenheit erfolgreich angewendet haben (91;94;113;162;163), entschieden wir uns nach Abwägen der Vor- und Nachteile ebenfalls für diese Narkoseform.

## **4.2 Ausblicke**

In den letzten Jahren beschäftigten sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der kardiovaskulären Phänotypisierung von transgenen Mausmodellen.

Wir untersuchten ein transgenes Mausmodell mit einer herzgerichteten Überexpression von PP2A, um die pathogene Rolle der Proteinphosphatase für die Ausbildung von Herzerkrankungen zu analysieren. PP2A-transgene Mäuse entwickelten eine kompensierte dilatative Kardiomyopathie. Fraglich bleibt der verfälschende Einfluss der kardio-depressiv wirkenden Ketamin/Xylazin-Narkose auf die Untersuchungsergebnisse. Hier könnten zur Klärung Untersuchungen mit alternativen Narkosemitteln angeschlossen werden.

Ein freiwilliges sechswöchiges Laufradtraining führte bei trainierenden Tieren zu positiven kardialen Effekten, sowohl transgene Mäuse als auch Wildtypen nutzten die Laufräder. Die transgenen Mäuse zeigten sich trotz manifester Herzinsuffizienz trainierbar. Im direkten Vergleich nutzten die herzinsuffizienten PP2A-transgenen Mäuse das freiwillige Trainingsangebot weniger intensiv. Ein Grund könnte die reduzierte physikali-

sche Verfassung bei vorliegender dilatativer Kardiomyopathie sein. Ein erzwungenes körperliches Training, wie z.B. ein Schwimmtraining würde zu einer identischen Trainingsbelastung von trainierenden Wildtyp- und transgenen Mäusen führen. Als Konsequenz wäre ein echokardiographischer Vergleich zwischen den Trainingsgruppen besser möglich. Zum Erhalt signifikanter Werte wäre ggf. eine Ausweitung der Gruppengröße von trainierenden und nicht trainierenden Mäusen notwendig.

Natürlich lassen sich Rückschlüsse aus Messwerten der transgenen Maus nur mit großer Vorsicht auf den menschlichen Patienten übertragen, da artspezifische Unterschiede, insbesondere in der Herzgröße und der Herzfrequenz bestehen (164). Unter anderem liegt die physiologische Herzfrequenz der Maus ungefähr zehnfach über der des Menschen (160). Hinzu kommen multiple rassenspezifische Unterschiede auf Zellebene, z.B. wurden unterschiedliche Signalwege und Mediatoren für Maus und Mensch beobachtet. Unter Berücksichtigung dieser Punkte geben transgene Tiermodelle ein grundlegendes Verständnis über unterschiedlichste Grunderkrankungen (164) und können als Basis für die Entwicklung von neuen Erkrankungshypothesen fungieren.

Es bleibt unklar, ob ein Maus-Modell die therapeutischen Antworten der menschlichen Kardiomyopathie imitieren kann (143). An dieser Stelle sollte betont werden, dass wir unsere Trainingsuntersuchungen nur an einem einzigen Mausmodell mit einer dilatativen Kardiomyopathie durchgeführt haben. Mäuse mit einer Kardiomyopathie aufgrund anderer Ursachen könnten laut SPENCER et al. unterschiedlich auf ein Training reagieren (143).

Insgesamt legen unsere am Mausmodell gewonnenen Befunde nahe, dass ein moderates körperliches Training auch für menschliche Patienten mit einer kompensierten Herzinsuffizienz eine die Pharmakotherapie unterstützende Therapiealternative, z.B. im Ablauf eines Rehabilitationsprogrammes darstellen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich echokardiographische *in vivo* Beobachtungen der PP2A-transgenen Mauslinie und der GC-A Knockout Mauslinie erbracht. Weiterführende morphologische Analysen von Biopsien aus transgenen Mausherzen zur Untersuchung auf Myokardschäden wie Fibrose- oder Nekrosebildung, sowie biochemische Untersuchungen zum Aktivierungszustand kardialer Regulatorproteine, wie Phospholamban (PLB) und Troponin-I (TnI), sind detailliert in den Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppen beschrieben.

**Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit**

Skryabin, B. V., Holtwick, R., Fabritz, L., Kruse, M. N., **Veltrup, I.**, Stypmann, J., Kirchhof, P., Sabrane, K., Bubikat, A., Voss, M., and Kuhn, M. Hypervolemic Hypertension in Mice With Systemic Inactivation of the (Floxed) Guanylyl Cyclase-A Gene by AlphaMHC-Cre-Mediated Recombination. *Genesis*. 2004;39(4):288-98.

## Literatur

1. Weil, J. and Schunkert, H. [Pathophysiology of Chronic Heart Failure]. *Clin.Res.Cardiol.* 2006;95 Suppl 4:1-15.
2. Francis, G. S. Pathophysiology of Chronic Heart Failure. *Am.J.Med.* 7-5-2001;110 Suppl 7A:37S-46S.
3. Ho, K. K., Anderson, K. M., Kannel, W. B., Grossman, W., and Levy, D. Survival After the Onset of Congestive Heart Failure in Framingham Heart Study Subjects. *Circulation* 1993;88(1):107-15.
4. Kitzman, D. W., Little, W. C., Brubaker, P. H., Anderson, R. T., Hundley, W. G., Marburger, C. T., Brosnihan, B., Morgan, T. M., and Stewart, K. P. Pathophysiological Characterization of Isolated Diastolic Heart Failure in Comparison to Systolic Heart Failure. *JAMA* 6-11-2002;288(17):2144-50.
5. Heyen, J. R., Blasi, E. R., Nikula, K., Rocha, R., Daust, H. A., Friedrich, G., Van Vleet, J. F., De Ciechi, P., McMahon, E. G., and Rudolph, A. E. Structural, Functional, and Molecular Characterization of the SHHF Model of Heart Failure. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2002;283(5):H1775-H1784.
6. Kishi, H., Nakagawa, K., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M., Taya, Y., and Yamaizumi, M. Osmotic Shock Induces G1 Arrest Through P53 Phosphorylation at Ser33 by Activated P38MAPK Without Phosphorylation at Ser15 and Ser20. *J.Biol.Chem.* 19-10-2001;276(42):39115-22.
7. Luo, Z., Zheng, J., Lu, Y., and Bregman, D. B. Ultraviolet Radiation Alters the Phosphorylation of RNA Polymerase II Large Subunit and Accelerates Its Proteasome-Dependent Degradation. *Mutat.Res.* 4-9-2001;486(4):259-74.

8. Douville, E. and Downward, J. EGF Induced SOS Phosphorylation in PC12 Cells Involves P90 RSK-2. *Oncogene* 24-7-1997;15(4):373-83.
9. Lin, K., Hwang, P. K., and Fletterick, R. J. Distinct Phosphorylation Signals Converge at the Catalytic Center in Glycogen Phosphorylases. *Structure*. 15-11-1997;5(11):1511-23.
10. Davis, M. J., Wu, X., Nurkiewicz, T. R., Kawasaki, J., Gui, P., Hill, M. A., and Wilson, E. Regulation of Ion Channels by Protein Tyrosine Phosphorylation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2001;281(5):H1835-H1862.
11. Srivastava, A. K. and St Louis, J. Smooth Muscle Contractility and Protein Tyrosine Phosphorylation. *Mol.Cell Biochem.* 1997;176(1-2):47-51.
12. Alcazar, A., Rivera, J., Gomez-Calcerrada, M., Munoz, F., Salinas, M., and Fando, J. L. Changes in the Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2 Alpha, Initiation Factor 2B Activity and Translational Rates in Primary Neuronal Cultures Under Different Physiological Growing Conditions. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 1996;38(1):101-8.
13. D'Arpa, P. and Liu, L. F. Cell Cycle-Specific and Transcription-Related Phosphorylation of Mammalian Topoisomerase I. *Exp.Cell Res.* 1995;217(1):125-31.
14. Cohen, P. The Regulation of Protein Function by Multisite Phosphorylation-- a 25 Year Update. *Trends Biochem.Sci.* 2000;25(12):596-601.
15. Rapundalo, S. T. Cardiac Protein Phosphorylation: Functional and Pathophysiological Correlates. *Cardiovasc.Res.* 1998;38(3):559-88.
16. Wegener, A. D., Simmerman, H. K., Lindemann, J. P., and Jones, L. R. Phospholamban Phosphorylation in Intact Ventricles. Phosphorylation of Serine 16 and Threonine 17 in Response to Beta-Adrenergic Stimulation. *J.Biol.Chem.* 5-7-1989;264(19):11468-74.

17. Simmerman, H. K. and Jones, L. R. Phospholamban: Protein Structure, Mechanism of Action, and Role in Cardiac Function. *Physiol Rev.* 1998;78(4):921-47.
18. Campbell, K. P., MacLennan, D. H., and Jorgensen, A. O. Staining of the Ca<sup>2+</sup>-Binding Proteins, Calsequestrin, Calmodulin, Troponin C, and S-100, With the Cationic Carbocyanine Dye "Stains-All". *J.Biol.Chem.* 25-9-1983;258(18):11267-73.
19. Ikemoto, N., Ronjat, M., Meszaros, L. G., and Koshita, M. Postulated Role of Calsequestrin in the Regulation of Calcium Release From Sarcoplasmic Reticulum. *Biochemistry* 8-8-1989;28(16):6764-71.
20. Zhang, R., Zhao, J., Mandveno, A., and Potter, J. D. Cardiac Troponin I Phosphorylation Increases the Rate of Cardiac Muscle Relaxation. *Circ.Res.* 1995;76(6):1028-35.
21. Bartel, S., Stein, B., Eschenhagen, T., Mende, U., Neumann, J., Schmitz, W., Krause, E. G., Karczewski, P., and Scholz, H. Protein Phosphorylation in Isolated Trabeculae From Nonfailing and Failing Human Hearts. *Mol.Cell Biochem.* 12-4-1996;157(1-2):171-9.
22. Boknik, P., Fockenbrock, M., Herzig, S., Knapp, J., Linck, B., Luss, H., Muller, F. U., Muller, T., Schmitz, W., Schroder, F., and Neumann, J. Protein Phosphatase Activity Is Increased in a Rat Model of Long-Term Beta-Adrenergic Stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 2000;362(3):222-31.
23. Neumann, J., Eschenhagen, T., Jones, L. R., Linck, B., Schmitz, W., Scholz, H., and Zimmermann, N. Increased Expression of Cardiac Phosphatases in Patients With End-Stage Heart Failure. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1997;29(1):265-72.



24. Hobai, I. A. and O'Rourke, B. Decreased Sarcoplasmic Reticulum Calcium Content Is Responsible for Defective Excitation-Contraction Coupling in Canine Heart Failure. *Circulation* 20-3-2001;103(11):1577-84.
25. Maassen, A. Phosphatasen - Enzyme Als Schlüssel Für Neue Therapeutika. *Pharmazeutische Zeitung Online* 2004.
26. Okamura, H., Aramburu, J., Garcia-Rodriguez, C., Viola, J. P., Raghavan, A., Tahiliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P. G., and Rao, A. Concerted Dephosphorylation of the Transcription Factor NFAT1 Induces a Conformational Switch That Regulates Transcriptional Activity. *Mol.Cell* 2000;6(3):539-50.
27. Sugiura, R., Sio, S. O., Shuntoh, H., and Kuno, T. Molecular Genetic Analysis of the Calcineurin Signaling Pathways. *Cell Mol.Life Sci.* 2001;58(2):278-88.
28. Barford, D. Colworth Medal Lecture. Structural Studies of Reversible Protein Phosphorylation and Protein Phosphatases. *Biochem.Soc.Trans.* 1999;27(6):751-66.
29. Dahmus, M. E. Reversible Phosphorylation of the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *J.Biol.Chem.* 9-8-1996;271(32):19009-12.
30. Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J. M., Henikoff, S., Skupski, M. P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M. S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S. E., Chervitz, S. A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R. F., Gelbart, W. M., George, R. A., Goldstein, L. S., Gong, F., Guan, P., Harris, N. L., Hay, B. A., Hoskins, R. A., Li, J., Li, Z., Hynes, R. O., Jones, S. J., Kuehl, P. M., Lemaitre, B., Littleton, J. T., Morrison, D. K., Mungall, C., O'Farrell, P. H., Pickeral, O. K., Shue, C., Vossball, L. B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X. H., and Lewis, S. Comparative Genomics of the Eukaryotes. *Science* 24-3-2000;287(5461):2204-15.

31. Pearson, G., Robinson, F., Beers, Gibson T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr.Rev.* 2001;22(2):153-83.
32. Janssens, V. and Goris, J. Protein Phosphatase 2A: a Highly Regulated Family of Serine/Threonine Phosphatases Implicated in Cell Growth and Signalling. *Biochem.J.* 1-2-2001;353(Pt 3):417-39.
33. Cohen, P. and Cohen, P. T. Protein Phosphatases Come of Age. *J.Biol.Chem.* 25-12-1989;264(36):21435-8.
34. Herzig, S. and Neumann, J. Effects of Serine/Threonine Protein Phosphatases on Ion Channels in Excitable Membranes. *Physiol Rev.* 2000;80(1):173-210.
35. Cohen, P. Classification of Protein-Serine/Threonine Phosphatases: Identification and Quantitation in Cell Extracts. *Methods Enzymol.* 1991;201:389-98.
36. Nairn, A. C. and Shenolikar, S. The Role of Protein Phosphatases in Synaptic Transmission, Plasticity and Neuronal Development. *Curr.Opin.Neurobiol.* 1992;2(3):296-301.
37. Shenolikar, S. and Nairn, A. C. Protein Phosphatases: Recent Progress. *Adv.Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1991;23:1-121.
38. Mumby, M. C. and Walter, G. Protein Serine/Threonine Phosphatases: Structure, Regulation, and Functions in Cell Growth. *Physiol Rev.* 1993;73(4):673-99.
39. Cohen, P. T. Novel Protein Serine/Threonine Phosphatases: Variety Is the Spice of Life. *Trends Biochem.Sci.* 1997;22(7):245-51.
40. Hunter, T. Protein Kinases and Phosphatases: the Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. *Cell* 27-1-1995;80(2):225-36.

41. Shenolikar, S. and Nairn, A. C. Protein Phosphatases: Recent Progress. *Adv.Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1991;23:1-121.
42. Wera, S. and Hemmings, B. A. Serine/Threonine Protein Phosphatases. *Biochem.J.* 1-10-1995;311 ( Pt 1):17-29.
43. Crabtree, G. R. and Olson, E. N. NFAT Signaling: Choreographing the Social Lives of Cells. *Cell* 2002;109 Suppl:S67-S79.
44. Ingebritsen, T. S. and Cohen, P. Protein Phosphatases: Properties and Role in Cellular Regulation. *Science* 22-7-1983;221(4608):331-8.
45. Luss, H., Klein-Wiele, O., Boknik, P., Herzig, S., Knapp, J., Linck, B., Muller, F. U., Scheld, H. H., Schmid, C., Schmitz, W., and Neumann, J. Regional Expression of Protein Phosphatase Type 1 and 2A Catalytic Subunit Isoforms in the Human Heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2000;32(12):2349-59.
46. MacDougall, L. K., Jones, L. R., and Cohen, P. Identification of the Major Protein Phosphatases in Mammalian Cardiac Muscle Which Dephosphorylate Phospholamban. *Eur.J.Biochem.* 28-3-1991;196(3):725-34.
47. Cohen, P. T. Novel Protein Serine/Threonine Phosphatases: Variety Is the Spice of Life. *Trends Biochem.Sci.* 1997;22(7):245-51.
48. Hubbard, M. J. and Cohen, P. On Target With a New Mechanism for the Regulation of Protein Phosphorylation. *Trends Biochem.Sci.* 1993;18(5):172-7.
49. Mumby, M. C. and Walter, G. Protein Serine/Threonine Phosphatases: Structure, Regulation, and Functions in Cell Growth. *Physiol Rev.* 1993;73(4):673-99.
50. Goldberg, Y. Protein Phosphatase 2A: Who Shall Regulate the Regulator? *Biochem.Pharmacol.* 15-2-1999;57(4):321-8.

51. Mayer-Jaekel, R. E. and Hemmings, B. A. Protein Phosphatase 2A--a 'Menage a Trois'. *Trends Cell Biol.* 1994;4(8):287-91.
52. Millward, T. A., Zolnierowicz, S., and Hemmings, B. A. Regulation of Protein Kinase Cascades by Protein Phosphatase 2A. *Trends Biochem.Sci.* 1999;24(5):186-91.
53. Sontag, E. Protein Phosphatase 2A: the Trojan Horse of Cellular Signaling. *Cell Signal.* 2001;13(1):7-16.
54. Virshup, D. M. Protein Phosphatase 2A: a Panoply of Enzymes. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2000;12(2):180-5.
55. Zolnierowicz, S. Type 2A Protein Phosphatase, the Complex Regulator of Numerous Signaling Pathways. *Biochem.Pharmacol.* 15-10-2000;60(8):1225-35.
56. Hemmings, B. A., Adams-Pearson, C., Maurer, F., Muller, P., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J., and Stone, S. R. Alpha- and Beta-Forms of the 65-KDa Subunit of Protein Phosphatase 2A Have a Similar 39 Amino Acid Repeating Structure. *Biochemistry* 3-4-1990;29(13):3166-73.
57. Stone, S. R., Hofsteenge, J., and Hemmings, B. A. Molecular Cloning of cDNAs Encoding Two Isoforms of the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 2A. *Biochemistry* 17-11-1987;26(23):7215-20.
58. Khew-Goodall, Y. and Hemmings, B. A. Tissue-Specific Expression of MRNAs Encoding Alpha- and Beta-Catalytic Subunits of Protein Phosphatase 2A. *FEBS Lett.* 10-10-1988;238(2):265-8.
59. Orgad, S., Brewis, N. D., Alpey, L., Axton, J. M., Dudai, Y., and Cohen, P. T. The Structure of Protein Phosphatase 2A Is As Highly Conserved As That of Protein Phosphatase 1. *FEBS Lett.* 26-11-1990;275(1-2):44-8.

60. Hong, C. S., Cho, M. C., Kwak, Y. G., Song, C. H., Lee, Y. H., Lim, J. S., Kwon, Y. K., Chae, S. W., and Kim, do H. Cardiac Remodeling and Atrial Fibrillation in Transgenic Mice Overexpressing Junctin. *FASEB J.* 2002;16(10):1310-2.
61. Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E. J. The WD Repeat: a Common Architecture for Diverse Functions. *Trends Biochem.Sci.* 1999;24(5):181-5.
62. Mishra, S., Gupta, R. C., Tiwari, N., Sharov, V. G., and Sabbah, H. N. Molecular Mechanisms of Reduced Sarcoplasmic Reticulum Ca(2+) Uptake in Human Failing Left Ventricular Myocardium. *J.Heart Lung Transplant.* 2002;21(3):366-73.
63. Bristow, M. R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R. S., Sageman, W. S., Lurie, K., Billingham, M. E., Harrison, D. C., and Stinson, E. B. Decreased Catecholamine Sensitivity and Beta-Adrenergic-Receptor Density in Failing Human Hearts. *N.Engl.J.Med.* 22-7-1982;307(4):205-11.
64. Gupta, R. C., Mishra, S., Rastogi, S., Imai, M., Habib, O., and Sabbah, H. N. Cardiac SR-Coupled PP1 Activity and Expression Are Increased and Inhibitor 1 Protein Expression Is Decreased in Failing Hearts. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2003;285(6):H2373-H2381.
65. 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., and Kranias, E. G. Type 1 Phosphatase, a Negative Regulator of Cardiac Function. *Mol.Cell Biol.* 2002;22(12):4124-35.
66. Schwinger, R. H., Munch, G., Bolck, B., Karczewski, P., Krause, E. G., and 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(3):479-91.

67. Bodor, G. S., Oakeley, A. E., Allen, P. D., Crimmins, D. L., Ladenson, J. H., and Anderson, P. A. Troponin I Phosphorylation in the Normal and Failing Adult Human Heart. *Circulation* 2-9-1997;96(5):1495-500.
68. Zakhary, D. R., Moravec, C. S., Stewart, R. W., and Bond, M. Protein Kinase A (PKA)-Dependent Troponin-I Phosphorylation and PKA Regulatory Subunits Are Decreased in Human Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 2-2-1999;99(4):505-10.
69. Kodama, I., Kondo, N., and Shibata, S. Electromechanical Effects of Okadaic Acid Isolated From Black Sponge in Guinea-Pig Ventricular Muscles. *J.Physiol* 1986;378:359-73.
70. Linck, B., Boknik, P., Knapp, J., Muller, F. U., Neumann, J., Schmitz, W., and Vahlensieck, U. Effects of Cantharidin on Force of Contraction and Phosphatase Activity in Nonfailing and Failing Human Hearts. *Br.J.Pharmacol.* 1996;119(3):545-50.
71. Neumann, J., Herzig, S., Boknik, P., Apel, M., Kaspereit, G., Schmitz, W., Scholz, H., Tepel, M., and Zimmermann, N. On the Cardiac Contractile, Biochemical and Electrophysiological Effects of Cantharidin, a Phosphatase Inhibitor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1995;274(1):530-9.
72. Davis, D., Baily, R., and Zelis, R. Abnormalities in Systemic Norepinephrine Kinetics in Human Congestive Heart Failure. *Am.J.Physiol* 1988;254(6 Pt 1):E760-E766.
73. Goldsmith, S. R., Francis, G. S., Cowley, A. W., Jr., Levine, T. B., and Cohn, J. N. Increased Plasma Arginine Vasopressin Levels in Patients With Congestive Heart Failure. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1983;1(6):1385-90.
74. Rodeheffer, R. J., Lerman, A., Heublein, D. M., and Burnett, J. C., Jr. Increased Plasma Concentrations of Endothelin in Congestive Heart Failure in Humans. *Mayo Clin.Proc.* 1992;67(8):719-24.

75. Burnett, J. C., Jr., Kao, P. C., Hu, D. C., Heser, D. W., Heublein, D., Granger, J. P., Opgenorth, T. J., and Reeder, G. S. Atrial Natriuretic Peptide Elevation in Congestive Heart Failure in the Human. *Science* 7-3-1986;231(4742):1145-7.
76. Clerico, A., Iervasi, G., Del Chicca, M. G., Emdin, M., Maffei, S., Nannipieri, M., Sabatino, L., Forini, F., Manfredi, C., and Donato, L. Circulating Levels of Cardiac Natriuretic Peptides (ANP and BNP) Measured by Highly Sensitive and Specific Immunoradiometric Assays in Normal Subjects and in Patients With Different Degrees of Heart Failure. *J.Endocrinol.Invest* 1998;21(3):170-9.
77. Melo, L. G., Veress, A. T., Ackermann, U., Pang, S. C., Flynn, T. G., and Sonnenberg, H. Chronic Hypertension in ANP Knockout Mice: Contribution of Peripheral Resistance. *Regul.Pept.* 5-2-1999;79(2-3):109-15.
78. Hama, N., Itoh, H., Shirakami, G., Nakagawa, O., Suga, S., Ogawa, Y., Masuda, I., Nakanishi, K., Yoshimasa, T., Hashimoto, Y., and . Rapid Ventricular Induction of Brain Natriuretic Peptide Gene Expression in Experimental Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 15-9-1995;92(6):1558-64.
79. Suzuki, T., Yamazaki, T., and Yazaki, Y. The Role of the Natriuretic Peptides in the Cardiovascular System. *Cardiovasc.Res.* 15-8-2001;51(3):489-94.
80. Lattion, A. L., Michel, J. B., Arnauld, E., Corvol, P., and Soubrier, F. Myocardial Recruitment During ANF mRNA Increase With Volume Overload in the Rat. *Am.J.Physiol* 1986;251(5 Pt 2):H890-H896.
81. de Bold, A. J., Bruneau, B. G., and Kuroski de Bold, M. L. Mechanical and Neuroendocrine Regulation of the Endocrine Heart. *Cardiovasc.Res.* 1996;31(1):7-18.

82. Kuhn, M. Structure, Regulation, and Function of Mammalian Membrane Guanylyl Cyclase Receptors, With a Focus on Guanylyl Cyclase-A. *Circ.Res.* 17-10-2003;93(8):700-9.
83. Tremblay, J., Desjardins, R., Hum, D., Gutkowska, J., and Hamet, P. Biochemistry and Physiology of the Natriuretic Peptide Receptor Guanylyl Cyclases. *Mol.Cell Biochem.* 2002;230(1-2):31-47.
84. Matsukawa, N., Grzesik, W. J., Takahashi, N., Pandey, K. N., Pang, S., Yamauchi, M., and Smithies, O. The Natriuretic Peptide Clearance Receptor Locally Modulates the Physiological Effects of the Natriuretic Peptide System. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 22-6-1999;96(13):7403-8.
85. Nakao, K., Ogawa, Y., Suga, S., and Imura, H. Molecular Biology and Biochemistry of the Natriuretic Peptide System. I: Natriuretic Peptides. *J.Hypertens.* 1992;10(9):907-12.
86. Kuhn, M., Voss, M., Mitko, D., Stypmann, J., Schmid, C., Kawaguchi, N., Grabellus, F., and Baba, H. A. Left Ventricular Assist Device Support Reverses Altered Cardiac Expression and Function of Natriuretic Peptides and Receptors in End-Stage Heart Failure. *Cardiovasc.Res.* 1-11-2004;64(2):308-14.
87. Dillingham, M. A. and Anderson, R. J. Inhibition of Vasopressin Action by Atrial Natriuretic Factor. *Science* 28-3-1986;231(4745):1572-3.
88. Cuneo, R. C., Espiner, E. A., Nicholls, M. G., Yandle, T. G., and Livesey, J. H. Effect of Physiological Levels of Atrial Natriuretic Peptide on Hormone Secretion: Inhibition of Angiotensin-Induced Aldosterone Secretion and Renin Release in Normal Man. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1987;65(4):765-72.



89. Skryabin, B. V., Holtwick, R., Fabritz, L., Kruse, M. N., Veltrup, I., Stypmann, J., Kirchhof, P., Sabrane, K., Bubikat, A., Voss, M., and Kuhn, M. Hypervolemic Hypertension in Mice With Systemic Inactivation of the (Floxed) Guanylyl Cyclase-A Gene by AlphaMHC-Cre-Mediated Recombination. *Genesis*. 2004;39(4):288-98.
90. Gergs, U., Boknik, P., Buchwalow, I., Fabritz, L., Matus, M., Justus, I., Hanske, G., Schmitz, W., and Neumann, J. Overexpression of the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 2A Impairs Cardiac Function. *J.Biol.Chem.* 24-9-2004;279(39):40827-34.
91. Gottshall, K. R., Hunter, J. J., Tanaka, N., Dalton, N., Becker, K. D., Ross, J., Jr., and Chien, K. R. Ras-Dependent Pathways Induce Obstructive Hypertrophy in Echo-Selected Transgenic Mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 29-4-1997;94(9):4710-5.
92. Kemi, O. J., Loennechen, J. P., Wisloff, U., and Ellingsen, O. Intensity-Controlled Treadmill Running in Mice: Cardiac and Skeletal Muscle Hypertrophy. *J.Appl.Physiol* 2002;93(4):1301-9.
93. Semeniuk, L. M., Kryski, A. J., and Severson, D. L. Echocardiographic Assessment of Cardiac Function in Diabetic Db/Db and Transgenic Db/Db-HGLUT4 Mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2002;283(3):H976-H982.
94. Wessely, R., Klingel, K., Santana, L. F., Dalton, N., Hongo, M., Jonathan, Lederer W., Kandolf, R., and Knowlton, K. U. Transgenic Expression of Replication-Restricted Enteroviral Genomes in Heart Muscle Induces Defective Excitation-Contraction Coupling and Dilated Cardiomyopathy. *J.Clin.Invest* 1-10-1998;102(7):1444-53.
95. Knollmann, B. C., Knollmann-Ritschel, B. E., Weissman, N. J., Jones, L. R., and Morad, M. Remodelling of Ionic Currents in Hypertrophied and Failing Hearts of Transgenic Mice Overexpressing Calsequestrin. *J.Physiol* 1-6-2000;525 Pt 2:483-98.

96. Dössel, O., Bildgebende Verfahren in der Medizin. Von der Technik zur medizinischen Anwendung. 1. Auflage ed. Berlin Heidelberg: Springer; 2000.
97. Poulsen Nautrup, C.; Tobias, R. Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik bei Hund und Katze. 2001. Verlag Schlütersche GmbH & Co. KG, Hannover. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
98. Natali, A. J., Turner, D. L., Harrison, S. M., and White, E. Regional Effects of Voluntary Exercise on Cell Size and Contraction-Frequency Responses in Rat Cardiac Myocytes. *J.Exp.Biol.* 2001;204(Pt 6):1191-9.
99. Luo, W., Grupp, I. L., Harrer, J., Ponniah, S., Grupp, G., Duffy, J. J., Doetschman, T., and Kranias, E. G. Targeted Ablation of the Phospholamban Gene Is Associated With Markedly Enhanced Myocardial Contractility and Loss of Beta-Agonist Stimulation. *Circ.Res.* 1994;75(3):401-9.
100. Fentzke, R. C., Korcarz, C. E., Lang, R. M., Lin, H., and Leiden, J. M. Dilated Cardiomyopathy in Transgenic Mice Expressing a Dominant-Negative CREB Transcription Factor in the Heart. *J.Clin.Invest* 1-6-1998;101(11):2415-26.
101. Skryabin, B. V., Holtwick, R., Fabritz, L., Kruse, M. N., Veltrup, I., Stypmann, J., Kirchhof, P., Sabrane, K., Bubikat, A., Voss, M., and Kuhn, M. Hypervolemic Hypertension in Mice With Systemic Inactivation of the (Floxed) Guanylyl Cyclase-A Gene by AlphaMHC-Cre-Mediated Recombination. *Genesis.* 2004;39(4):288-98.
102. Hoit, B. D. New Approaches to Phenotypic Analysis in Adult Mice. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2001;33(1):27-35.
103. Tanaka, N., Dalton, N., Mao, L., Rockman, H. A., Peterson, K. L., Gottshall, K. R., Hunter, J. J., Chien, K. R., and Ross, J., Jr. Transthoracic Echocardiography in Models of Cardiac Disease in the Mouse. *Circulation* 1-9-1996;94(5):1109-17.

104. Yang, X. P., Liu, Y. H., Rhaleb, N. E., Kurihara, N., Kim, H. E., and Carretero, O. A. Echocardiographic Assessment of Cardiac Function in Conscious and Anesthetized Mice. *Am.J.Physiol* 1999;277(5 Pt 2):H1967-H1974.
105. Fentzke, R. C., Korcarz, C. E., Shroff, S. G., Lin, H., Leiden, J. M., and Lang, R. M. The Left Ventricular Stress-Velocity Relation in Transgenic Mice Expressing a Dominant Negative CREB Transgene in the Heart. *J.Am.Soc.Echocardiogr.* 2001;14(3):209-18.
106. Kedzierski, R. M., Grayburn, P. A., Kisanuki, Y. Y., Williams, C. S., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Schneider, M. D., and Yanagisawa, M. Cardiomyocyte-Specific Endothelin A Receptor Knockout Mice Have Normal Cardiac Function and an Unaltered Hypertrophic Response to Angiotensin II and Isoproterenol. *Mol.Cell Biol.* 2003;23(22):8226-32.
107. Kim, Y. K., Kim, S. J., Yatani, A., Huang, Y., Castelli, G., Vatner, D. E., Liu, J., Zhang, Q., Diaz, G., Zieba, R., Thaisz, J., Drusco, A., Croce, C., Sadoshima, J., Condorelli, G., and Vatner, S. F. Mechanism of Enhanced Cardiac Function in Mice With Hypertrophy Induced by Overexpressed Akt. *J.Biol.Chem.* 28-11-2003;278(48):47622-8.
108. Lin, F., Owens, W. A., Chen, S., Stevens, M. E., Kesteven, S., Arthur, J. F., Woodcock, E. A., Feneley, M. P., and Graham, R. M. Targeted Alpha(1A)-Adrenergic Receptor Overexpression Induces Enhanced Cardiac Contractility but Not Hypertrophy. *Circ.Res.* 17-8-2001;89(4):343-50.
109. Matsui, T., Li, L., Wu, J. C., Cook, S. A., Nagoshi, T., Picard, M. H., Liao, R., and Rosenzweig, A. Phenotypic Spectrum Caused by Transgenic Overexpression of Activated Akt in the Heart. *J.Biol.Chem.* 21-6-2002;277(25):22896-901.

110. 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., and Brown, J. H. The Cardiac-Specific Nuclear Delta(B) Isoform of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Induces Hypertrophy and Dilated Cardiomyopathy Associated With Increased Protein Phosphatase 2A Activity. *J.Biol.Chem.* 11-1-2002;277(2):1261-7.
111. Gardin, J. M., Siri, F. M., Kitsis, R. N., Edwards, J. G., and Leinwand, L. A. Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Mass and Systolic Function in Mice. *Circ.Res.* 1995;76(5):907-14.
112. Hoit, B. D., Khoury, S. F., Kranias, E. G., Ball, N., and Walsh, R. A. In Vivo Echocardiographic Detection of Enhanced Left Ventricular Function in Gene-Targeted Mice With Phospholamban Deficiency. *Circ.Res.* 1995;77(3):632-7.
113. Stypmann, J., Glaser, K., Roth, W., Tobin, D. J., Petermann, I., Matthias, R., Monnig, G., Haverkamp, W., Breithardt, G., Schmahl, W., Peters, C., and Reinheckel, T. Dilated Cardiomyopathy in Mice Deficient for the Lysosomal Cysteine Peptidase Cathepsin L. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 30-4-2002;99(9):6234-9.
114. Weiss, R. E., Korcarz, C., Chassande, O., Cua, K., Sadow, P. M., Koo, E., Samarut, J., and Lang, R. Thyroid Hormone and Cardiac Function in Mice Deficient in Thyroid Hormone Receptor-Alpha or -Beta: an Echocardiograph Study. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 2002;283(3):E428-E435.
115. McConnell, B. K., Fatkin, D., Semsarian, C., Jones, K. A., Georgakopoulos, D., Maguire, C. T., Healey, M. J., Mudd, J. O., Moskowitz, I. P., Conner, D. A., Giewat, M., Wakimoto, H., Berul, C. I., Schoen, F. J., Kass, D. A., Seidman, C. E., and Seidman, J. G. Comparison of Two Murine Models of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ.Res.* 2-3-2001;88(4):383-9.

116. Takuma, S., Suehiro, K., Cardinale, C., Hozumi, T., Yano, H., Shimizu, J., Mullis-Jansson, S., Sciacca, R., Wang, J., Burkhoff, D., Di Tullio, M. R., and Homma, S. Anesthetic Inhibition in Ischemic and Nonischemic Murine Heart: Comparison With Conscious Echocardiographic Approach. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2001;280(5):H2364-H2370.
117. Gao, X. M., Dart, A. M., Dewar, E., Jennings, G., and Du, X. J. Serial Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Dimensions and Function After Myocardial Infarction in Mice. *Cardiovasc.Res.* 14-1-2000;45(2):330-8.
118. Du, X. J., Gao, X. M., Wang, B., Jennings, G. L., Woodcock, E. A., and Dart, A. M. Age-Dependent Cardiomyopathy and Heart Failure Phenotype in Mice Overexpressing Beta(2)-Adrenergic Receptors in the Heart. *Cardiovasc.Res.* 2000;48(3):448-54.
119. Ducharme, A., Frantz, S., Aikawa, M., Rabkin, E., Lindsey, M., Rohde, L. E., Schoen, F. J., Kelly, R. A., Werb, Z., Libby, P., and Lee, R. T. Targeted Deletion of Matrix Metalloproteinase-9 Attenuates Left Ventricular Enlargement and Collagen Accumulation After Experimental Myocardial Infarction. *J.Clin.Invest* 2000;106(1):55-62.
120. Feldman, M. D., Erikson, J. M., Mao, Y., Korcarz, C. E., Lang, R. M., and Freeman, G. L. Validation of a Mouse Conductance System to Determine LV Volume: Comparison to Echocardiography and Crystals. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000;279(4):H1698-H1707.
121. Rohde, L. E., Ducharme, A., Arroyo, L. H., Aikawa, M., Sukhova, G. H., Lopez-Anaya, A., McClure, K. F., Mitchell, P. G., Libby, P., and Lee, R. T. Matrix Metalloproteinase Inhibition Attenuates Early Left Ventricular Enlargement After Experimental Myocardial Infarction in Mice. *Circulation* 15-6-1999;99(23):3063-70.

122. DePaoli-Roach, A. A., Park, I. K., Cerovsky, V., Csontos, C., Durbin, S. D., Kuntz, M. J., Sitikov, A., Tang, P. M., Verin, A., and Zolnierowicz, S. Serine/Threonine Protein Phosphatases in the Control of Cell Function. *Adv.Enzyme Regul.* 1994;34:199-224.
123. Fabritz, L. Kirchhoff P. Veltrup I. Fortmüller L. Matus M. Neumann J. Boknik P. Schmitz W. Gergs U. Time course of impaired ventricular contractility and cardiac dilatation in protein phosphatase 2A (PP2A) over-expressing mice. 2007. Ref Type: Poster
124. Gotz, J., Probst, A., Ehler, E., Hemmings, B., and Kues, W. Delayed Embryonic Lethality in Mice Lacking Protein Phosphatase 2A Catalytic Subunit Calpha. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 13-10-1998;95(21):12370-5.
125. Brewis, N., Ohst, K., Fields, K., Rapacciuolo, A., Chou, D., Bloor, C., Dillmann, W., Rockman, H., and Walter, G. Dilated Cardiomyopathy in Transgenic Mice Expressing a Mutant A Subunit of Protein Phosphatase 2A. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000;279(3):H1307-H1318.
126. Frey H.H., Löscher W., *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. 2.Auflage* ed.Enke Verlag, Stuttgart; 2002.(Frey H.H., Löscher W.
127. Keene BW. *Cardiovascular Drugs.* Bonagura, JD. *Cardiologie.*Churchill Livingstone, New York; 1987. pp.21-57.
128. Plumb, DC, *Veterinary Drug Handbook*PharmaVet Publishing, White Bear Lake (USA); 1999.
129. 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., and Kranias, E. G. Type 1 Phosphatase, a Negative Regulator of Cardiac Function. *Mol.Cell Biol.* 2002;22(12):4124-35.

130. Funakoshi, H., Kubota, T., Machida, Y., Kawamura, N., Feldman, A. M., Tsutsui, H., Shimokawa, H., and Takeshita, A. Involvement of Inducible Nitric Oxide Synthase in Cardiac Dysfunction With Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2002;282(6):H2159-H2166.
131. Hardt, S. E., Geng, Y. J., Montagne, O., Asai, K., Hong, C., Yang, G. P., Bishop, S. P., Kim, S. J., Vatner, D. E., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Homcy, C. J., and Vatner, S. F. Accelerated Cardiomyopathy in Mice With Overexpression of Cardiac G(s)Alpha and a Missense Mutation in the Alpha-Myosin Heavy Chain. *Circulation* 5-2-2002;105(5):614-20.
132. Kiriazis, H., Du, X. J., Feng, X., Hotchkiss, E., Marshall, T., Finch, S., Gao, X. M., Lambert, G., Choate, J. K., and Kaye, D. M. Preserved Left Ventricular Structure and Function in Mice With Cardiac Sympathetic Hyperinnervation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2005;289(4):H1359-H1365.
133. Liu, Y. H., Carretero, O. A., Cingolani, O. H., Liao, T. D., Sun, Y., Xu, J., Li, L. Y., Pagano, P. J., Yang, J. J., and Yang, X. P. Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Cardiac Function and Remodeling in Mice With Heart Failure Due to Myocardial Infarction. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2005;289(6):H2616-H2623.
134. Roman, B. B., Goldspink, P. H., Spaite, E., Urboniene, D., McKinney, R., Geenen, D. L., Solaro, R. J., and Buttrick, P. M. Inhibition of PKC Phosphorylation of CTnI Improves Cardiac Performance in Vivo. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2004;286(6):H2089-H2095.
135. Sun, Y., Carretero, O. A., Xu, J., Rhaleb, N. E., Wang, F., Lin, C., Yang, J. J., Pagano, P. J., and Yang, X. P. Lack of Inducible NO Synthase Reduces Oxidative Stress and Enhances Cardiac Response to Isoproterenol in Mice With Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertension. *Hypertension* 2005;46(6):1355-61.

136. Luo, W., Grupp, I. L., Harrer, J., Ponniah, S., Grupp, G., Duffy, J. J., Doetschman, T., and Kranias, E. G. Targeted Ablation of the Phospholamban Gene Is Associated With Markedly Enhanced Myocardial Contractility and Loss of Beta-Agonist Stimulation. *Circ.Res.* 1994;75(3):401-9.
137. Fentzke, R. C., Korcarz, C. E., Lang, R. M., Lin, H., and Leiden, J. M. Dilated Cardiomyopathy in Transgenic Mice Expressing a Dominant-Negative CREB Transcription Factor in the Heart. *J.Clin.Invest* 1-6-1998;101(11):2415-26.
138. Wallukat, G. The Beta-Adrenergic Receptors. *Herz* 2002;27(7):683-90.
139. Fagard, R. H. Impact of Different Sports and Training on Cardiac Structure and Function. *Cardiol.Clin.* 1997;15(3):397-412.
140. Kaplan, M. L., Cheslow, Y., Vikstrom, K., Malhotra, A., Geenen, D. L., Nakouzi, A., Leinwand, L. A., and Buttrick, P. M. Cardiac Adaptations to Chronic Exercise in Mice. *Am.J.Physiol* 1994;267(3 Pt 2):H1167-H1173.
141. McMullen, J. R., Amirahmadi, F., Woodcock, E. A., Schinke-Braun, M., Bouwman, R. D., Hewitt, K. A., Mollica, J. P., Zhang, L., Zhang, Y., Shioi, T., Buerger, A., Izumo, S., Jay, P. Y., and Jennings, G. L. Protective Effects of Exercise and Phosphoinositide 3-Kinase(P110alpha) Signaling in Dilated and Hypertrophic Cardiomyopathy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 9-1-2007;104(2):612-7.
142. Child, J. S., Barnard, R. J., and Taw, R. L. Cardiac Hypertrophy and Function in Master Endurance Runners and Sprinters. *J.Appl.Physiol* 1984;57(1):176-81.
143. Spencer, K. T., Collins, K., Korcarz, C., Fentzke, R., Lang, R. M., and Leiden, J. M. Effects of Exercise Training on LV Performance and Mortality in a Murine Model of Dilated Cardiomyopathy. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000;279(1):H210-H215.



144. Arvan, S. Exercise Performance of the High Risk Acute Myocardial Infarction Patient After Cardiac Rehabilitation. *Am.J.Cardiol.* 1-8-1988;62(4):197-201.
145. Coats, A. J., Adamopoulos, S., Meyer, T. E., Conway, J., and Sleight, P. Effects of Physical Training in Chronic Heart Failure. *Lancet* 13-1-1990;335(8681):63-6.
146. Conn, E. H., Williams, R. S., and Wallace, A. G. Exercise Responses Before and After Physical Conditioning in Patients With Severely Depressed Left Ventricular Function. *Am.J.Cardiol.* 1-2-1982;49(2):296-300.
147. Sullivan, M. J., Higginbotham, M. B., and Cobb, F. R. Exercise Training in Patients With Severe Left Ventricular Dysfunction. Hemodynamic and Metabolic Effects. *Circulation* 1988;78(3):506-15.
148. Giannuzzi, P., Temporelli, P. L., Corra, U., Gattone, M., Giordano, A., and Tavazzi, L. Attenuation of Unfavorable Remodeling by Exercise Training in Postinfarction Patients With Left Ventricular Dysfunction: Results of the Exercise in Left Ventricular Dysfunction (ELVD) Trial. *Circulation* 16-9-1997;96(6):1790-7.
149. Harri, M., Lindblom, J., Malinen, H., Hyttinen, M., Lapvetelainen, T., Eskola, S., and Helminen, H. J. Effect of Access to a Running Wheel on Behavior of C57BL/6J Mice. *Lab Anim Sci.* 1999;49(4):401-5.
150. Solberg, L. C., Horton, T. H., and Turek, F. W. Circadian Rhythms and Depression: Effects of Exercise in an Animal Model. *Am.J.Physiol* 1999;276(1 Pt 2):R152-R161.
151. Hoffmann, P., Friberg, P., Ely, D., and Thoren, P. Effect of Spontaneous Running on Blood Pressure, Heart Rate and Cardiac Dimensions in Developing and Established Spontaneous Hypertension in Rats. *Acta Physiol Scand.* 1987;129(4):535-42.

152. Morimoto, K., Tan, N., Nishiyasu, T., Sone, R., and Murakami, N. Spontaneous Wheel Running Attenuates Cardiovascular Responses to Stress in Rats. *Pflugers Arch.* 2000;440(2):216-22.
153. Festing, M. F. Wheel Activity in 26 Strains of Mouse. *Lab Anim* 1977;11(4):257-8.
154. Lerman, I., Harrison, B. C., Freeman, K., Hewett, T. E., Allen, D. L., Robbins, J., and Leinwand, L. A. Genetic Variability in Forced and Voluntary Endurance Exercise Performance in Seven Inbred Mouse Strains. *J.Appl.Physiol* 2002;92(6):2245-55.
155. Moraska, A. and Fleshner, M. Voluntary Physical Activity Prevents Stress-Induced Behavioral Depression and Anti-KLH Antibody Suppression. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 2001;281(2):R484-R489.
156. Janssen, B. J., De Celle, T., Debets, J. J., Brouns, A. E., Callahan, M. F., and Smith, T. L. Effects of Anesthetics on Systemic Hemodynamics in Mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2004;287(4):H1618-H1624.
157. Chaves, A. A., Weinstein, D. M., and Bauer, J. A. Non-Invasive Echocardiographic Studies in Mice: Influence of Anesthetic Regimen. *Life Sci.* 1-6-2001;69(2):213-22.
158. Chaves, A. A., Dech, S. J., Nakayama, T., Hamlin, R. L., Bauer, J. A., and Carnes, C. A. Age and Anesthetic Effects on Murine Electrocardiography. *Life Sci.* 11-4-2003;72(21):2401-12.
159. Fentzke, R. C., Korcarz, C. E., Shroff, S. G., Lin, H., Sandelski, J., Leiden, J. M., and Lang, R. M. Evaluation of Ventricular and Arterial Hemodynamics in Anesthetized Closed-Chest Mice. *J.Am.Soc.Echocardiogr.* 1997;10(9):915-25.

160. Uechi, M., Asai, K., Osaka, M., Smith, A., Sato, N., Wagner, T. E., Ishikawa, Y., Hayakawa, H., Vatner, D. E., Shannon, R. P., Homcy, C. J., and Vatner, S. F. Depressed Heart Rate Variability and Arterial Baroreflex in Conscious Transgenic Mice With Overexpression of Cardiac Gsalpha. *Circ.Res.* 9-3-1998;82(4):416-23.
161. Roth, D. M., Swaney, J. S., Dalton, N. D., Gilpin, E. A., and Ross, J., Jr. Impact of Anesthesia on Cardiac Function During Echocardiography in Mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2002;282(6):H2134-H2140.
162. Patten, R. D., Aronovitz, M. J., Einstein, M., Lambert, M., Pandian, N. G., Mendelsohn, M. E., and Konstam, M. A. Effects of Angiotensin II Receptor Blockade Versus Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition on Ventricular Remodelling Following Myocardial Infarction in the Mouse. *Clin.Sci.(Lond)* 2003;104(2):109-18.
163. Semeniuk, L. M., Severson, D. L., Kryski, A. J., Swirp, S. L., Molkentin, J. D., and Duff, H. J. Time-Dependent Systolic and Diastolic Function in Mice Overexpressing Calcineurin. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2003;284(2):H425-H430.
164. London, B. Cardiac Arrhythmias: From (Transgenic) Mice to Men. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* 2001;12(9):1089-91.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADH	antidiuretisches Hormon
ANP	atriales natriuretisches Peptid
Ao	Aorta
Ao RR	zeitlicher Abstand zweier Aortenausschläger im Doppler
AoV	Aortenwurzeldurchmesser
AoVmax	Maximale Geschwindigkeit des Aortendopplers
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	B-Typ (brain) natriuretisches Peptid
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CSQ	Calsequestrin
CW Doppler	Doppler im „continuous wave“ Modus
DNS	Desoxyribonucleinsäure
ET-1	Endothelin-1
FS	Ventrikelverkürzungsfraction
GC-A	Guanylyl Cyklase-A
GTP	Guanosintriphosphat
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen
IVS	interventrikuläres Septum
KG	Körpergewicht
KO	knockout
LV	linker Ventrikel
LVEDd	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEDs	linksventrikulärer systolischer Durchmesser
LV-Masse	linksventrikuläres Gewicht
LVOT	linksventrikuläre Ausflusstrakt

LVWd	Wanddicke der linksventrikulären Hinterwand diastolisch
LVWs	Wanddicke der linksventrikulären Hinterwand systolisch
M-Mode	Time-Motion-Mode
MV E-Punkt	Höchster Punkt der E-Welle im Mitraldoppler
MV-Decelzeit	Dezelerationszeit der Mitralwelle in ms
MV Vmax	Maximale Geschwindigkeit des Mitraldoppler
NPR-A	natriuretische Peptidrezeptor-A
P	Phosphatrest
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PLB	Phospholamban
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PP2A $\alpha$	katalytische Untereinheit $\alpha$ der PP2A
PP2B	Proteinphosphatase 2B (Calcineurin)
PP2C	Proteinphosphatase 2C
PPM	PPM-Genfamilie
PPP	PPP-Genfamilie
PW	Hinterwand
PWEDd	Enddiastolische Dicke der linksventrikulären Hinterwand
PWEDs	Systolische Dicke der linksventrikulären Hinterwand
RAAS	Renin-Angiotensin-System
RV	rechter Ventrikel
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SERCA	sarkoplasmatische Ca <sup>2+</sup> -Adenosintri-phosphatase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TG	transgenes Tier
TnC	Ca <sup>2+</sup> -bindenes Troponin
TnI	Troponin-Inhibitor
Vcf	zirkuläre Faserverkürzung
vs	versus
WT	Wildtyp



## **Danksagung**

Dr. med Larissa Fabritz und Prof. Dr. med Paulus Kirchhof möchte ich für ihre sehr gute, freundliche Betreuung und Unterstützung während dieser Arbeit danken.

Lisa Fortmüller danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Maus-Echokardiographie und Daniela Volkery und Marcel Tebrook danke ich für die Beratung in technischen Fragen.

Den Arbeitsgruppen um Dr. med. U. Gergs und Univ.-Prof. Dr. med. M. Kuhn danke ich für die Bereitstellung der transgenen Mausmodelle.

Meiner Mutter Annegret Veltrup danke ich für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

### Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn  
Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz  
Institut für Pharmakologie und  
Toxikologie der  
Westf. Wilhelms-Universität Münster  
Domagkstraße 12

48149 Münster



Dienstgebäude  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Zimmer: 431  
Frau Möllers  
Aktenzeichen  
23.0835.1.0 (G 61/99)

8. Oktober 1999

Betr.: Tierschutz;  
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 14.07.1999, hier eingegangen am 16.07.1999  
Ihr Ergänzungsschreiben vom 29.09.1999, hier eingegangen am  
01.10.1999

### G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Schmitz,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

- I. Bedeutung Calcium-regulierender Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums
- II. Bedeutung von Proteinphosphatase-Isoenzymen für die Kontraktilität und den Gefäßtonus
- III. Bedeutung cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktoren bei der Herzinsuffizienz
- IV. Bedeutung kardialer Adenosinrezeptoren.

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle Telefax (0251) 411-2525  
Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz



Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr

Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz  
Institut für Pharmakologie  
und Toxikologie der WWU  
Domagkstraße 12  
48149 Münster

Herr

Prof. Dr. med. Joachim Neumann  
Institut für Pharmakologie  
und Toxikologie der WWU  
Domagkstraße 12  
48149 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum 31.10.2002.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

2.440 Mäuse.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

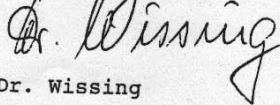
Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

| Ich bitte um umgehende Rückgabe des Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



Dr. Wissing



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

### Gegen Empfangsbekanntnis

Frau  
Prof. Dr. med. Michaela Kuhn  
Institut für Pharmakologie  
und Toxikologie des  
Universitätsklinikums Münster  
Domagkstr. 12  
48129 Münster

Dienstgebäude:  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Telefax: 2115  
Raum: 431  
Auskunft erteilt:  
Frau Möllers  
E-Mail:  
irmgard.moellers@bezreg-muenster.nrw.de  
Aktenzeichen:  
50.0835.1.0 (G 82/2002)

10. Jan. 2003

### **Tierschutz; Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren**

Ihr Antrag vom 24.10.2002, hier eingegangen am 28.10.2002

### **Genehmigungsbescheid:**

Sehr geehrte Frau Professor Kuhn,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) in der zur Zeit geltenden Fassung wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

### **„Doppler-Echokardiographische Untersuchung der Herzhypertrophie und der Herzfunktion von „CM GC-A KO Mäusen“ nach einer mechanisch induzierten Hypertonie durch operative Aorten-Konstriktion.“**

Leiterin des Versuchsvorhabens ist:

Frau  
Prof. Dr. med. Michaela Kuhn  
Institut für Pharmakologie  
und Toxikologie des  
Universitätsklinikums Münster  
Domagkstr. 12  
48129 Münster

Stellvertretende Leiterin ist:

Frau  
Dr. med. Larissa Fabritz  
Medizinische Klinik u. Poliklinik C  
Kardiologie und Angiologie des  
Universitätsklinikums Münster  
Albert-Schweitzer-Str. 33  
48149 Münster

**Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300**

E-Mail: [poststelle@bezreg-muenster.nrw.de](mailto:poststelle@bezreg-muenster.nrw.de) • Internet: [www.bezreg-muenster.nrw.de](http://www.bezreg-muenster.nrw.de)  
zentrale Telefonnummer: (0251) 411-2525

Konten der Landeskasse Münster:

Deutsche Bundesbank - Filiale Münster - BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820

ÖPNV ab Hbf. Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz, Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis Haltestelle Windthorstraße (Haus K), Linie 7 bis Haltestelle Wiemannstr. (Haus M)

1/2



Diese Genehmigung gilt bis zum 31. 12. 2003.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

80 Mäuse.

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Ich weise darauf hin, dass diese Genehmigung eine evtl. erforderliche Zustimmung nach dem Gentechnikgesetz für Arbeiten mit transgenen Tieren nicht einschließt.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

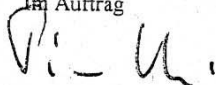
**Rechtsbehelfsbelehrung:**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

**Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.**

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag



Dr. Piontkowski