

# **Rolle des Cystein-reichen LIM-Proteins 4 (CRP4) für die cGMP-modulierte Pathobiologie myokardialer Remodelingprozesse**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Dipl.-Pharm. Julia Straubinger  
aus Tübingen

Tübingen  
2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	23.07.2015
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	JProf. Dr. Robert Lukowski
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Peter Ruth

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Kardiale Hypertrophie .....	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie von Herzhypertrophie und Hypertrophie-assoziierten Erkrankungen .....	1
1.1.2 Kennzeichen und Ausprägungen physiologischer und patho-physiologischer Myokardhypertrophie .....	2
1.1.3 Zelluläre Mechanismen kardialer Hypertrophie .....	4
1.1.4 Molekulare Mechanismen pathophysiologischer kardialer Hypertrophie in Kardiomyozyten .....	8
1.1.5 Rolle von Angiotensin II bei Myokardhypertrophie und Fibrosierung .....	13
1.1.6 Mutationen in kardialen Strukturproteinen als Risikofaktoren für hereditäre Kardiomyopathien .....	14
1.2 Der NO/cGMP/cGKI-Signalweg .....	16
1.2.1 cGMP: Bildung, Effektoren und Inaktivierung .....	17
1.2.2 Struktur, Funktion und Vorkommen cGMP-abhängiger Proteinkinasen .....	20
1.2.3 Bedeutung des cGMP/cGKI-Signalwegs im Organismus .....	22
1.2.4 Effektorproteine der cGKI in Kardiomyozyten .....	23
1.2.5 Rolle des cGMP/cGKI-Signalwegs bei hypertrophen Herzerkrankungen .....	27
1.2.6 cGMP-Generatoren und Effektoren, sowie PDEs als Arzneistofftargets .....	29
1.3 LIM-Proteine .....	31
1.4 Cystein-reiche LIM-Proteine (CRPs) .....	32
1.4.1 CRP1 und CRP2/SmLIM .....	34
1.4.2 CRP3/MLP .....	34
1.4.3 CRP4 .....	35
1.5 Ziele der Arbeit .....	38
<b>2 Material</b> .....	<b>40</b>
2.1 Mauslinien .....	40
2.2 Geräte .....	41
2.3 Software .....	42
2.4 Substanzen, Lösungen, Puffer, Kitsysteme, Verbrauchsmaterial .....	43
2.4.1 Genotypisierung .....	43
2.4.2 <i>In vivo</i> -Versuche .....	45
2.4.3 Organentnahme und Zellkultur .....	46
2.4.4 Histologie .....	49
2.4.5 RNA-Analytik .....	51
2.4.6 Proteinanalytik .....	53
2.4.7 Bestimmung von cGMP .....	57
<b>3 Methoden</b> .....	<b>58</b>
3.1 Methoden der Mausezucht .....	58
3.1.1 Tierhaltung .....	58
3.1.2 Verpaarung der Versuchstiere .....	58
3.2 Genotypisierung der Versuchstiere .....	60

3.2.1	DNA-Isolierung aus Schwanzspitzenbiopsien .....	60
3.2.2	Amplifikation der DNA mittels Polymerasekettenreaktion .....	60
3.2.3	Detektion der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	61
3.3	In-vivo Versuche .....	63
3.3.1	Sildenafil-Behandlung .....	63
3.3.2	Induktion physiologischer Herzhypertrophie durch Schwimmtraining .....	64
3.3.3	Angiotensin II-Applikation mittels osmotischer Minipumpen .....	65
3.3.4	Radiotelemetrische Blutdruckmessung .....	67
3.3.5	Echokardiographische Bestimmung der Herzfunktion .....	69
3.4	Organentnahme und Zellkultur .....	71
3.4.1	Organpräparation und Bestimmung der kardialen Hypertrophie .....	71
3.4.2	<i>In vitro</i> -Stimulationsexperimente .....	72
3.4.3	Isolation und Kultivierung muriner Kardiomyozyten .....	72
3.4.4	FRET-Messungen in isolierten Kardiomyozyten .....	74
3.4.5	Isolation und Kultivierung kardialer Fibroblasten .....	74
3.5	Histologie .....	75
3.5.1	Einbetten der Gewebe und Anfertigung von Kryoschnitten .....	75
3.5.2	Immunhistochemie von CRP4 .....	75
3.5.3	Immunfluoreszenz von CRP4 .....	76
3.5.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	77
3.5.5	Sirius-Rot Färbung .....	77
3.5.6	Bestimmung der Kardiomyozytengröße .....	78
3.5.7	Quantifizierung kardialer Fibrosierung .....	78
3.6	RNA-Analytik .....	79
3.6.1	Isolierung von RNA .....	79
3.6.2	DNase Behandlung .....	80
3.6.3	Erststrang cDNA-Synthese .....	80
3.6.4	Quantitative Real-Time-PCR .....	80
3.7	Proteinbiochemische Methoden .....	82
3.7.1	Proteinextraktion .....	82
3.7.2	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford .....	82
3.7.3	Co-Immunpräzipitation .....	83
3.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	85
3.7.5	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen .....	86
3.7.6	Western Blot und Detektion der Proteine .....	86
3.8	Bestimmung von cGMP .....	87
3.8.1	Probenaufbereitung .....	88
3.8.2	Durchführung des kompetitiven Enzym-Immunassays .....	89
3.8.3	Auswertung des kompetitiven Enzym-Immunassays .....	90
3.9	Statistik .....	90
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>91</b>
4.1	Kardialer Phänotyp der $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Tiere .....	91
4.1.1	Einfluss der AT <sub>1</sub> R-Überexpression auf Morphologie und Herzfunktion .....	91
4.1.2	Expression und Funktion des cGMP/cGKI-Signalwegs in hypertrophen $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Herzen .....	95
4.2	Effekte von Sildenafil auf die kardialen Umbauprozesse im $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Mausmodell .....	97
4.2.1	Einfluss von Sildenafil auf die kardiale Hypertrophie .....	98
4.2.2	Einfluss von Sildenafil auf die kardiale Fibrosierung .....	101
4.2.3	Einfluss von Sildenafil auf die Herzfunktion .....	103
4.3	Rolle der PDEs für den kardialen cGMP-Turnover in $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Mäusen .....	105
4.4	Rolle des kardialen CRP4 in unterschiedlichen Hypertrophie-Modellen .....	109
4.4.1	Expression von CRP4 im Herzmuskel .....	109
4.4.2	CRP4 bei physiologischem Herzmuskelwachstum nach körperlichem Ausdauertraining .....	110

4.4.3	Rolle von CRP4 in Angiotensin II-induzierter kardialer Hypertrophie .....	112
4.5	Untersuchungen zur vaskulären Expression von CRP4 .....	115
4.5.1	Radiotelemetrische Blutdruckmessung .....	116
4.5.2	Blutdruckmessung während der 7-tägigen Ang II-Infusion .....	118
4.6	Zelluläre und molekulare Effekte der Ang II-Infusion auf das kardiale Remodeling in CRP4-WT und CRP4-KO Tieren .....	121
4.7	Untersuchungen zu CRP4-abhängigen Änderungen im kardialen cGMP/cGKI-Signalweg .....	125
4.7.1	Expression der natriuretischen Peptide und natriuretischen Peptidrezeptoren im chronischen Ang II-Infusionsmodell .....	125
4.7.2	cGMP-Messungen nach Angiotensin II-Infusion .....	126
4.7.3	Untersuchungen zur cGKI-Expression nach Ang II-Behandlung .....	127
4.7.4	Untersuchungen zur Phosphorylierung von kardialen cGKI-Substraten in CRP4-WT und CRP4-KO Herzen .....	128
4.7.5	Nachweis einer direkten Interaktion von cGKI mit CRP4 in Herzlysaten .....	130
4.8	Massenspektrometrie-basierte Identifikation von kardialen CRP4-Interaktionsproteinen .....	131
4.8.1	Identifikation des kardialen CRP4-Interaktoms unter physiologischen Bedingungen .....	132
4.8.2	Analyse des CRP4-Interaktoms nach Angiotensin II-induzierter Herzhypertrophie .....	134
4.8.3	Bestätigung ausgewählter CRP4-Interaktoren mittels Immunoblot .....	135
4.9	Massenspektrometrische Analyse des CRP4-Proteoms .....	137
4.9.1	Vergleichende Proteomanalyse von CRP4-WT und CRP4-KO Herzen .....	138
4.9.2	CRP4-abhängige Proteinregulation bei Ang II-induzierter Hypertrophie .....	140
4.9.3	Boxplot-Analyse von CRP4-abhängig regulierten Proteinen .....	141
4.9.4	Crip1 kompensiert den Verlust von CRP4 .....	143
4.9.5	Expressionsanalyse der homologen Proteine CRP1-CRP3 in CRP4-WT und CRP4-KO Herzlysaten .....	146
4.10	Echokardiographische Untersuchung der Herzfunktion .....	148
4.10.1	Herzfunktion von CRP4-WT und CRP4-KO Tieren .....	148
4.10.2	Beurteilung der Kontraktilität von CRP4-WT und CRP4-KO Herzen nach akuter Stimulation mit Isoprenalin .....	151
4.10.3	Bestimmung der Herzstruktur und Herzfunktion nach Ang II-Dauerinfusion .....	153
4.11	Charakterisierung der $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -transgenen CRP4-WT und CRP4-KO Mauslinie .....	155
4.11.1	Kardiale Hypertrophie in $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> /CRP4-doppeltransgenen Tieren .....	155
4.11.2	Echokardiographische Untersuchung der $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> /CRP4-WT und $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> /CRP4-KO Tiere .....	157
4.11.3	Kontraktilitätsmessungen im $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> /CRP4-Modell nach ISO .....	160
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>163</b>
5.1	Untersuchungen an Mäusen mit myozytenspezifischer Überexpression des AT <sub>1</sub> R .....	163
5.1.1	Kardialer Phänotyp der $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Mäuse .....	163
5.1.2	Hochregulation des cGMP/cGKI-Signalwegs in $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Tieren .....	167
5.1.3	PDEs regulieren die myozytären cGMP-Spiegel in $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Mäusen .....	169
5.1.4	Die hypertrophen Umbauprozesse im $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Mausmodell sind Sildenafil-insensitiv .....	171
5.1.5	Alternative Ansätze zur cGMP-basierten Verbesserung der progressiven Remodelingprozesse im $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Mausmodell .....	174
5.2	Kardialer Phänotyp CRP4-defizienter Mäuse .....	176
5.2.1	Expression und mögliche Funktionen von kardialem CRP4 .....	176
5.2.2	Rolle von CRP4 in unterschiedlichen Hypertrophie-Modellen .....	177
5.2.3	Molekulare Effekte von CRP4 bei kardialer Hypertrophie und Fibrosierung .....	179
5.2.4	Kardiales CRP4 ist ein pathophysiologisch relevanter Effektor des cGMP/cGKI-Signalwegs .....	181
5.2.5	Identifizierung von neuen CRP4-Interaktionspartnern im gesunden und hypertrophen Herzen .....	185
5.2.6	Kardiale CRP4-Proteomanalyse unter patho-/physiologischen Bedingungen .....	190
5.2.7	Die Ablation von CRP4 resultiert in einer selektiven Hochregulation von Crip1 im Myokard .....	193

5.2.8	Verschlechterte Herzfunktion in CRP4-defizienten Tieren .....	195
5.2.9	Funktionale Untersuchungen der $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> /CRP4-doppelmutanten Mauslinie .....	197
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>199</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>202</b>
7.1	Kardialer Phänotyp der $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Mäuse.....	202
7.1.1	Sildenafil-Behandlung von $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Tieren .....	202
7.1.2	Expressionanalyse partikulärer Guanylatzyklasen .....	203
7.1.3	Zellspezifische Analyse der cGKI, PDE5 und PDE1C .....	203
7.2	Untersuchungen zu kardialem CRP4.....	204
7.2.1	Validierung der Co-Immunpräzipitation .....	204
7.2.2	Analyse des CRP4-Interaktoms.....	205
7.2.3	Vergleichende Proteomanalyse $\pm$ Ang II.....	210
7.2.4	Analyse der HOCM-Symptomatik der CRP4-KO Tiere .....	220
7.2.5	CRP4-Expression in kardialen Fibroblasten .....	221
7.2.6	CRP4 wird nicht in Mitochondrien exprimiert.....	222
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>223</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen und Kongressbeiträge .....</b>	<b>254</b>
9.1	Publikationen.....	254
9.2	Kongressbeiträge.....	254
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>256</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>257</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Unterschiedliche Ausprägungen kardialer Hypertrophieformen. ....	3
Abb. 1.2: Parakrine/Autokrine Kommunikation zwischen Kardiomyozyten und Fibroblasten. ....	7
Abb. 1.3: Schematische Darstellung hypertropher Signaltransduktionswege. ....	9
Abb. 1.4: Generierung, Effektorproteine und Abbau von cGMP. ....	17
Abb. 1.5: Schematische Darstellung kardialer Phosphodiesterasen. ....	19
Abb. 1.6: Strukturmodell der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I. ....	21
Abb. 1.7: Schematische Darstellung von cGKI-Substraten im (hypertrophen) Herzmuskel. ....	24
Abb. 1.8: Vergleich der Aminosäuresequenz der Cystein-reichen LIM-Proteine. ....	33
Abb. 1.9: Topologie von CRP4. ....	36
Abb. 1.10: Schematische Darstellung der Fragestellungen dieser Dissertationsarbeit. ....	39
Abb. 3.1: Genotypisierung und Identifizierung der Versuchstiere. ....	62
Abb. 3.2: Schema der Sildenafil-Behandlung. ....	63
Abb. 3.3: Schwimmversuche zur Induktion einer physiologischen Herzhypertrophie. ....	65
Abb. 3.4: Ang II-Infusion mittels osmotischer Minipumpen. ....	66
Abb. 3.5: Operation zur Implantation telemetrischer Blutdruckmesskatheter. ....	68
Abb. 3.6: Messung der Herzfunktion mittels nicht-invasiver Echokardiographie. ....	69
Abb. 3.7: Auswertung der echokardiographischen Messungen. ....	70
Abb. 3.8: Langendorff-Perfusionsanlage zur Isolation von Kardiomyozyten. ....	72
Abb. 3.9: Schematische Darstellung des Ablaufs der Co-Immunpräzipitation. ....	84
Abb. 3.10: Ablauf des kompetitiven Enzym-Immunoassays (EIA) zur Bestimmung von cGMP. ....	88
Abb. 4.1: Kardiomyozytenspezifische Überexpression des humanen AT <sub>1</sub> R. ....	91
Abb. 4.2: Progressive kardiale Hypertrophie in $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Mäusen. ....	92
Abb. 4.3: Echokardiographie von WT- und $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Mäusen. ....	93
Abb. 4.4: Bestimmung der myozytären Hypertrophie und der Myokardfibrosierung. ....	94
Abb. 4.5: Kompensatorische Hochregulation des cGMP/cGKI-Signalwegs. ....	96
Abb. 4.6: cGMP-Spiegel in Herzen und Aorten von SIL-behandelten $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Tieren. ....	97
Abb. 4.7: SIL mildert das Ausmaß der Hypertrophie von $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Tieren nicht. ....	99
Abb. 4.8: Untersuchungen zur Genexpression verschiedener Hypertrophiemarker. ....	101
Abb. 4.9: Keine Reduktion der kardialen Fibrosierung durch SIL. ....	102
Abb. 4.10: Expressionsanalyse von Faktoren des ECM-Umbaus. ....	103
Abb. 4.11: SIL führt nicht zu einer Wiederherstellung der Herzfunktion. ....	104
Abb. 4.12: FRET-Messungen an isolierten Kardiomyozyten. ....	106
Abb. 4.13: Expressionsanalyse kardialer PDEs. ....	108
Abb. 4.14: Nachweis der CRP4-Expression im Herzmuskel. ....	110
Abb. 4.15: Ausmaß der physiologischen Herzhypertrophie nach 4-wöchigem Ausdauertraining. ....	111
Abb. 4.16: Erhöhtes Hypertrophieausmaß in CRP4-defizienten Herzen nach Ang II-Infusion. ....	113
Abb. 4.17: Expressionsmuster von CRP4 nach Stimulation mit Ang II. ....	114
Abb. 4.18: Expression von CRP4 in der Aorta. ....	115
Abb. 4.19: Telemetrische Blutdruckmessungen an CRP4-WT und CRP4-KO Tieren. ....	116
Abb. 4.20: CRP4 ist nicht in die Regulation der Herzfrequenz und der Aktivität involviert. ....	117
Abb. 4.21: Blutdruckverlaufskurve während der 7-tägigen Ang II-Infusion. ....	118
Abb. 4.22: Gesamtanstieg des Blutdrucks nach 7-tägiger Ang II-Infusion. ....	119
Abb. 4.23: Herzfrequenz- und Aktivitätsverlauf während der 7-tägigen Ang II-Infusion. ....	120
Abb. 4.24: Erhöhtes Ausmaß zellulärer Hypertrophie in CRP4-KO Tieren nach Ang II-Infusion. ....	122

Abb. 4.25: Ang II-induzierte kardiale Fibrosierung betrifft vor allem CRP4-defiziente Tiere. ....	123
Abb. 4.26: Quantitative mRNA-Analyse verschiedener Fibrosemarker. ....	124
Abb. 4.27: qRT-PCR Analyse von natriuretischen Peptiden und deren Rezeptoren. ....	126
Abb. 4.28: Erniedrigte cGMP-Spiegel in CRP4-KO Herzen. ....	127
Abb. 4.29: cGKI-Expression in CRP4-WT und CRP4-KO Herzen $\pm$ Ang II. ....	128
Abb. 4.30: Phosphorylierung von VASP als Index für die Aktivität des cGMP/cGKI-Signalwegs. ....	129
Abb. 4.31: Co-Immunpräzipitation der cGKI mit Agarosebeads-gekoppelten CRP4-Antikörpern. ....	130
Abb. 4.32: Massenspektrometrisch detektierte CRP4-Interaktoren unter Basalbedingungen. ....	133
Abb. 4.33: CRP4-Interaktom nach 7-tägiger Ang II-Infusion. ....	135
Abb. 4.34: Vinculin und Moesin sind zytoskelettale Interaktionspartner von CRP4. ....	136
Abb. 4.35: CRP4 bindet an die Z-Scheiben Proteine $\alpha$ -Actinin 2 und CRP3/MLP. ....	136
Abb. 4.36: Bestätigung der Interaktion von CRP4 mit Mybpc3 und Troponin I. ....	137
Abb. 4.37: Vergleichende Proteomanalyse von unbehandelten CRP4-WT und CRP4-KO Herzen. ...	139
Abb. 4.38: CRP4-abhängige Proteinexpression nach Ang II-Infusion. ....	141
Abb. 4.39: Boxplot-Analyse des CRP4-Proteoms $\pm$ Ang II. ....	143
Abb. 4.40: Sequenzanalyse und Lokalisation von Crip1 und Crip2/CRP4. ....	144
Abb. 4.41: Die Deletion von CRP4 führt zur kardialen Überexpression von Crip1. ....	145
Abb. 4.42: Gewebespezifische Analyse der Crip1-Expression. ....	146
Abb. 4.43: CRP1-CRP3 kompensieren nicht für den Verlust von CRP4. ....	147
Abb. 4.44: M-Mode Aufnahmen linksventrikulärer Herzparameter unter Basalbedingungen. ....	149
Abb. 4.45: Eingeschränkte Herzfunktion in CRP4-defizienten Tieren. ....	149
Abb. 4.46: Verminderte systolische Kraftentwicklung in CRP4-KO Herzen. ....	150
Abb. 4.47: M-Mode Aufnahmen nach Injektion von Isoprenalin (0,1 mg/kg). ....	151
Abb. 4.48: Akute Kontraktilitätssteigerung durch ISO in beiden Genotypen. ....	152
Abb. 4.49: Echokardiographische Messungen nach 7-tägiger Ang II-Infusion. ....	153
Abb. 4.50: B-Mode Aufnahmen der Längsachse von Herzen Ang II-behandelter Tiere. ....	154
Abb. 4.51: Hypertrophieausmaß in $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> /CRP4-doppeltransgenen Tieren. ....	156
Abb. 4.52: M-Mode Aufnahmen von $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> /CRP4-doppelmutanten Herzen. ....	157
Abb. 4.53: Eingeschränkte Kontraktilität in $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> /CRP4-KO Herzen. ....	158
Abb. 4.54: Verminderte systolische Wandstärken der $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> /CRP4-KO Herzen. ....	159
Abb. 4.55: M-Mode Aufnahmen von $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> /CRP4-Hezen nach ISO-Injektion. ....	160
Abb. 4.56: Echokardiographie der $\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup> -Doppelmutanten nach ISO-Injektion. ....	161
Abb. 5.1: Interaktion von CRP4 und cGMP/cGKI in hypertrophen Herzmuskelzellen. ....	184
Abb. 6.1: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Dissertationsarbeit. ....	201
Abb. 7.1: Expressionsanalysen nach Sildenafil. ....	202
Abb. 7.2: Expressionsstatus der partikulären Guanylatzyklen. ....	203
Abb. 7.3: Expression von cGKI, PDE5 und PDE1C in kardialen Myozyten und Fibroblasten. ....	203
Abb. 7.4: Bestätigung der Funktionalität der Co-IP. ....	204
Abb. 7.5: Expressionsanalyse von CRP4 in kardialen Fibroblasten. ....	221
Abb. 7.6: CRP4 ist in Mitochondrien nicht detektierbar. ....	222



## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1.1: HCM-assoziierte Mutationen in Sarkomer-Proteinen.....	15
Tab. 3.1: Pipettierschema des cGMP-EIAs.....	89
Tab. 7.1: CRP4-Interaktom unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen.....	209
Tab. 7.2: CRP4-Proteom unter Basalbedingungen und nach 7-tägiger Ang II-Dauerinfusion.....	219
Tab. 7.3: Beurteilung der HOCM-Symptomatik.....	220

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
8-Br-cGMP	8-Bromo-zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
Abb	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ACE	<i>Angiotensin-Converting-Enzym</i>
ActBI2	<i>Beta-actin-like protein 2</i>
AK	Antikörper
AKT/PKB	Proteinkinase B
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT <sub>1</sub> R	Angiotensin II Rezeptor Subtyp1
AT <sub>2</sub> R	Angiotensin II Rezeptor Subtyp1
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B-Mode	<i>Brightness modulation</i>
Bag3	<i>BCL2-associated athanogene 3</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BK-Kanal	Ca <sup>2+</sup> -aktivierter K <sup>+</sup> -Kanal mit großer Leitfähigkeit
Blk	<i>Blank-Probe</i> (Nullabgleich)
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
ca	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Cav3	Caveolin 3
Cct3	<i>Chaperonin containing T-complex polypeptide 1, subunit 3</i>
cDNA	<i>copy-DNA</i>
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I
cGKII	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ II
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CICR	Ca <sup>2+</sup> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung
Clu	Clusterin
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CnA	Calcineurin A
CNG	Durch zyklische Nukleotide gesteuerter Ionenkanal
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Col	Kollagen

---

Crip1	<i>Cysteine-rich intestinal protein</i>
CRP1	Cystein-reiches Protein 1
CRP2	Cystein-reiches Protein 2
CRP3	Cystein-reiches Protein 3
CRP4	Cystein-reiches Protein 4
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
CTR	Kontrolle
d	Tag
DAG	Diacylglycerol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Des	Desmin
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DTNB	2-Nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazellulärmatrix
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing Factor</i>
EF	Auswurfraction ( <i>Ejection Fraction</i> )
EGR1	<i>Early growth response protein 1</i>
EHNA	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin
EIA	Enzym-Immunoassay
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated kinase</i>
ESP	<i>Estradiol-Stimulated Protein</i>
ET I	Endothelin 1
etc	et cetera
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
FHL	<i>Four and a half LIM-domain</i>
Fn1	Fibronektin 1
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FS	Verkürzungsfraction ( <i>Fractional Shortening</i> )
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GC	Guanylatzyklase
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Gyg	Glycogenin
H <sup>+</sup>	Proton
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HDAC	Histondeacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HET	Heterozygot
HG	Herzgewicht
HLP	<i>Heart LIM-Protein</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

HOCM	Hypertroph-obstruktive Kardiomyopathie
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICH	Immunhistochemie
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
IEG	Immediate early genes
IF	Immunfluoreszenz
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IGFR	<i>Insulin Growth-Factor</i> Rezeptor;
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Iqce	<i>IQ motif containing protein E</i>
IRAG	IP3-Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinase Substrat
ISO	Isoprenalin
IVS	Interventrikuläres Septum
JAK	Januskinase
Kbtbd5	<i>Kelch repeat and BTB domain containing protein 5</i>
kDa	Kilodalton
KF	Kardialer Fibroblast
KG	Körpergewicht
KM	Kardiomyozyt
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter
LIF	<i>Leukemia-Inhibitory Factor</i>
LIMK	LIM-Kinase
Lpl	Lipoproteinlipase
LTTC	Spannungsabhängiger Ca <sup>2+</sup> -Kanal
LVAD	linksventrikuläre Unterstützungssysteme
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVESD	Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVHW	Linksventrikuläre Hinterwandsdicke
M	Marker
M-Mode	<i>Time motion</i>
mA	Milliampere
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck,
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF2	Myozyten Enhancer Faktor 2
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
MLC-2	Myosinkette-2
MLP	Muskel-LIM-Protein
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloprotease
Msn	Moesin
Mybpc3	Myosin-Bindeprotein C3
Myl	<i>Myosin light chain</i>

---

MYPT1	Myosin-Leichtkettenphosphatase (regulatorische Untereinheit)
n	Anzahl
Na <sup>+</sup>	Natrium
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
Ndrd2	<i>N-Myc downstream-regulated gene</i>
NDS	Eselnormals Serum
NEP	Neutrale Endopeptidase
NFAT	Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen
NHBLI	National Heart Lung and Blood Institute
NHE	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher
NIH	National Institute of Health
NLS	Nukleäres Translokationssignal
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
n.s.	nicht signifikant
Nsb	<i>Non-specific binding</i> (unspezifische Bindung)
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pGC	partikuläre Guanylatzyklase
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2	Proteinphosphatase 2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RGS	<i>Regulator of G-protein signaling</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RyR	Ryanodin-Rezeptor

s	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler
SERCA	Sarkoplasmatische und endoplasmatische Ca <sup>2+</sup> -ATPase
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SIL	Sildenafil
Sirt5	Sirtuin 5
SMA	smooth muscle
SmLIM	<i>smooth muscle</i> LIM-Protein
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SRF	Serum-Response-Faktor
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Tab	Tabelle
TAC	Transversale Aortenkonstriktion
TBB	<i>Trueblotbeads</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tg	Transgen
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TL	Tilialänge
TLP	Thymus-LIM-Protein
TnT	Troponin T
TRIM72	<i>Tripartite motif-containing protein 72</i>
TRPC	<i>Transient Receptor Potential Canonical</i>
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
V	Volt
VASP	<i>Vasodilator-stimulated Phosphoprotein</i>
Vcl	Vinculin
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Vim	Vimentin
VSMC	Glattmuskelzellen ( <i>Vascular smooth muscle cells</i> )
Wdh	Wiederholung
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
α-MHC	α-Isoform der schweren Myosinkette (adult)
α-SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
β-MHC	β-Isoform der schweren Myosinkette (fetal)
β-RM	<i>β-Rescue mice</i>
β <sub>1</sub> AR	β <sub>1</sub> -Adrenozeptor
β <sub>3</sub> AR	β <sub>3</sub> -Adrenozeptor
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

# 1 Einleitung

## 1.1 Kardiale Hypertrophie

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie von Herzhypertrophie und Hypertrophie-assoziierten Erkrankungen

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zählen neben Krebserkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in modernen Industrienationen. Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt und daraus resultierende Herzinsuffizienz sind laut *American Heart Association* für mehr als ein Drittel aller Todesfälle verantwortlich (Lloyd-Jones et al. 2009). Chronisch, bzw. terminal insuffiziente Herzen sind nicht mehr in der Lage, den Organismus mit ausreichend Blut und somit Sauerstoff zu versorgen. Neben Herzrhythmusstörungen und Minderdurchblutung sämtlicher Organe sind Dyspnoe, Erschöpfungszustände und Ödembildungen Kardinalsymptome dieses Krankheitsbildes (Roger 2010). Trotz verbesserter Therapieoptionen liegt die Prognose für die 5-Jahres-Überlebensrate bei terminaler Herzinsuffizienz noch hinter den meisten neoplastischen Erkrankungen, verbunden mit einem hohen Leidensdruck der Patienten und immensen Kosten für die Gesundheitssysteme (Robertson et al. 2012, Braunwald 2014). Gemäß der Klassifikation durch die *New York Heart Association* (NYHA) wird die Schwere einer Herzinsuffizienz in vier Stadien eingeteilt. Die Lebensqualität nimmt in fortgeschrittenen Erkrankungsphasen (NYHA III und NYHA IV) deutlich ab, da die typischen Beschwerden bereits in alltäglichen Situationen auftreten (Dickstein et al. 2008). Bei Patienten im Endstadium (NYHA IV) sind meist linksventrikuläre Unterstützungssysteme (LVAD) unausweichlich. LVADs können prinzipiell dauerhaft eingesetzt werden, oftmals dienen diese künstlichen Ventrikel jedoch nur zur kurzfristigen Überbrückung, bis eine Herztransplantation vorgenommen werden kann (Selzman et al. 2015). Durch unterschiedliche Anpassungsmechanismen ist das Herz in der Lage, für eine gewisse Zeit die progredient schlechter werdende Pumpfunktion zu kompensieren. Im Zuge des sogenannten kardialen *Remodelings* kommt es unter Einwirkung mechanischer, genetischer und neurohumoraler Faktoren zu einer Umgestaltung des Herzens (Colucci 1997). Das Zellwachstum der einzelnen Myozyten und die Fibrosierung des Myokards resultieren in einer Zunahme der gesamten Herzmuskelmasse, wobei hauptsächlich die linke Kammer von diesen Umbauprozessen betroffen ist (Sutton and Sharpe 2000). Im weiteren Krankheitsverlauf entsteht aufgrund der Minderdurchblutung des vergrößerten Herzens ein ungünstiges Verhältnis von Muskelmasse zu Sauerstoffversorgung. Der Verlust an Kardiomyozyten und die vermehrte Einlagerung von extrazellulären Matrixproteinen führen zu einer kontinuierlichen Verschlechterung der Herzleistung bis hin zur Dekompensation (Gradman and Alfayoumi 2006). Um neue Ansätze sowohl zur Behandlung als auch zur Prävention der Herzinsuffizienz zu entwickeln, ist es von großer Bedeutung, Pathogenese und molekulare

Mechanismen frühzeitiger Veränderungen dieser Erkrankung zu verstehen und zu nutzen. Insbesondere Adaptationsprozesse, die zu einer linksventrikulären Hypertrophie führen, sind hierbei von speziellem Interesse.

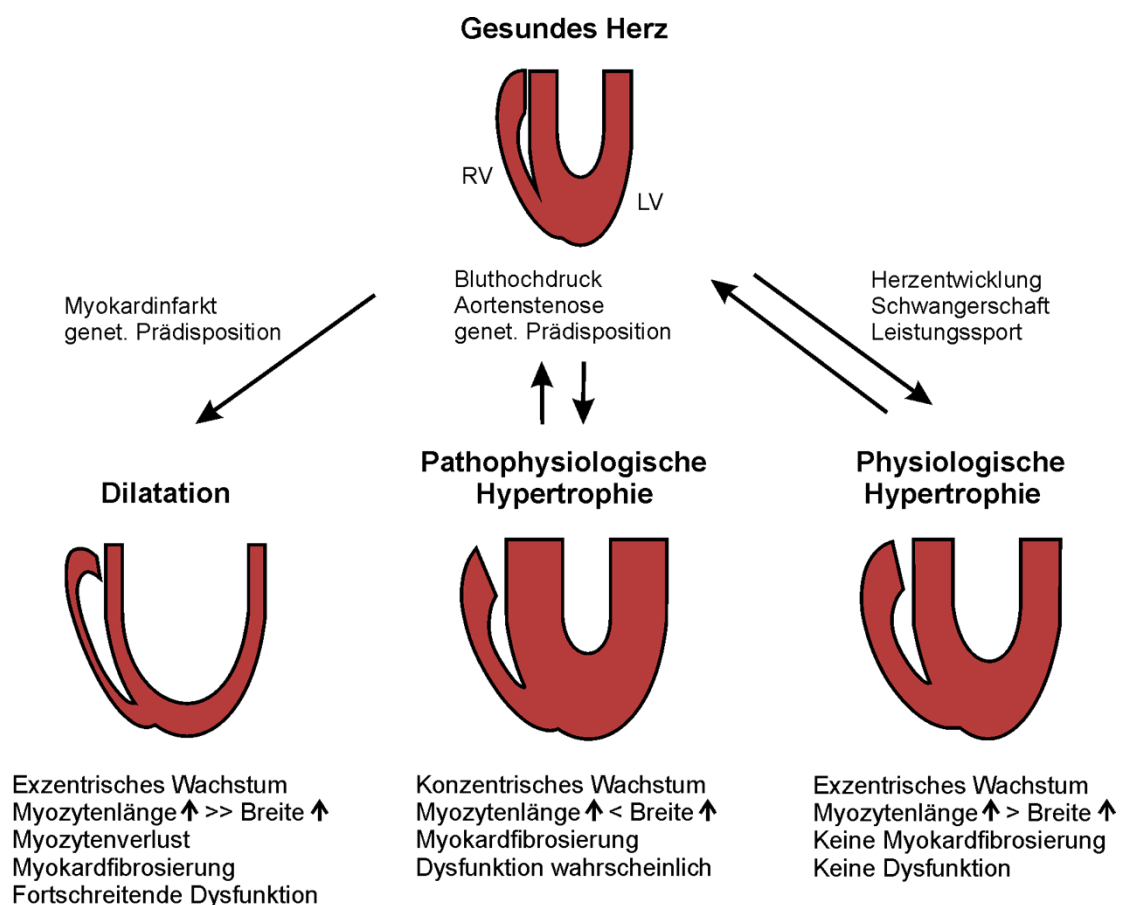
### **1.1.2 Kennzeichen und Ausprägungen physiologischer und pathophysiologischer Myokardhypertrophie**

Der Begriff Hypertrophie beschreibt das übermäßige Wachstum eines Organs durch Zunahme der Größe einzelner Zellen bei gleichbleibender Zellzahl (Geisterfer et al. 1988). Die kardiale Hypertrophie beruht auf einer Vergrößerung der Kardiomyozyten, die als terminal differenzierte Zellen nur in äußerst geringem Maße zur Zellteilung befähigt sind (Beltrami et al. 2001). Dennoch ist das Myokardwachstum ein wichtiger protektiver Mechanismus, um die Herzleistung an gesteigerte, bzw. veränderte hämodynamische Anforderungen anzupassen (Barry et al. 2008). Beispielsweise nehmen bei schwangeren Frauen Wanddicke und Ventrikelvolumen als Anpassung an die erhöhte Vorlast durch vermehrtes Blutvolumen und der resultierenden erhöhten Auswurfraction zu (Chung and Leinwand 2014). Ein physiologisches Wachstum des Arbeitsmyokards tritt außerdem bei Leistungssportlern auf. Der bis heute existierende Begriff des „Sportlerherzens“ wurde 1899 vom finnischen Arzt Salomon Henschen geprägt, als dieser perkussorisch feststellte, dass Skilangläufer vergrößerte Herzen aufweisen (Rost and Hollmann 1983). Obwohl das Sportlerherz meist durch ein symmetrisches, exzentrisches Wachstum (s. Abb. 1.1) charakterisiert ist, zeigen neuere Studien, dass die Größenzunahme abhängig von der Sportart ist: so sind Herzen von Ausdauersportlern sowohl durch verdickte Wände als auch durch eine insgesamt vergrößerte linke Kammer gekennzeichnet. Dies ist vor allem auf die erhöhte Volumenbelastung zurückzuführen. „Statische“ Sportarten, bei denen die Kraftentwicklung im Vordergrund steht, wie beispielsweise Gewichtheben, führen aufgrund des stark erhöhten arteriellen Blutdrucks zu Herzen mit verdickten Wänden aber unveränderten Kammerdimensionen (Pluim et al. 2000). Generelle Merkmale der physiologischen Myokardhypertrophie sind die Zunahme der Anzahl an Mitochondrien und Kapillaren, die Aufrechterhaltung bzw. Verbesserung von systolischer und diastolischer Herzfunktion sowie der histologischen Feinstruktur. Ferner treten keine Arrhythmien und fibrotische Einlagerungen auf (McMullen and Jennings 2007, Aljabri et al. 2011). Deshalb ist auch eine zügige Rückbildung der Herzmasse nach Beenden des Leistungssports in den allermeisten Fällen möglich (Pelliccia et al. 2002). Gleichwohl ist es schwierig, allein anhand morphologischer Kriterien gesundes und krankhaft verändertes Herzwachstum voneinander abzugrenzen. Manifeste diastolische Fehlfunktionen bezüglich der Relaxationsfähigkeit und des Füllungsvermögens können bei linksventrikulärer Hypertrophie jedoch auch schon im Frühstadium mit Hilfe der Echokardiographie erfasst werden (Schannwell et al. 2002). Die exakten molekularen Signalkaskaden und transkriptionelle Veränderungen, die bei Schwangerschaft und Ausdauersport zum Myokardwachstum führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt (Weeks and McMullen 2011). Man vermutet teilweise dieselben Mechanismen, die auch bei pathophysiologischem Herzwachstum zu finden sind: Vor allem



der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)-Signalweg (Patrucco et al. 2004), aber auch die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), sowie Calcineurin A-Signaltransduktionswege (s. Kapitel 1.1.4) scheinen in abgeschwächter Form, bzw. unterschiedlicher Gewichtung und Ausprägung involviert zu sein (Dorn 2007).

Auslöser und Einflussgrößen des pathophysiologischen Herzwachstums sind meist erhöhter Blutdruck, Myokardinfarkt, Herzklappendefekte, vermehrte Ausschüttung neurohumoraler Botenstoffe wie Angiotensin II (Ang II), Endothelin I (ET I) und Katecholaminen, sowie Fettleibigkeit und Mutationen in kardialen Strukturproteinen (Hill and Olson 2008). Jedoch ist die Herzhypertrophie nicht als uniforme Wachstumsreaktion des Gewebes zu vereinfachen, man unterscheidet vielmehr verschiedene Arten des Kardiomyozytenwachstums (s. Abb. 1.1). Bei physiologischer Hypertrophie als wichtiger Bestandteil der normalen postnatalen Entwicklung und bei sportlicher Betätigung beobachtet man eine exzentrische Wachstumsform des Herzens, bei der die Ventrikelwände und Ventrikelvolumina gleichmäßig vergrößert sind. Auf Ebene der Herzmuskelzellen kommt es hierbei durch regelmäßige Anordnung der neu gebildeten Sarkomere zu einem annähernd einheitlichen Längen- und Breitenwachstum. Die kardiale Feinstruktur bleibt somit intakt (Heineke and Molkentin 2006).



**Abb. 1.1: Unterschiedliche Ausprägungen kardialer Hypertrophieformen.**

Das Schema zeigt die Entstehung von physiologischer und pathophysiologischer Herzmuskelhypertrophie (RV: Rechter Ventrikel; LV: Linker Ventrikel). Modifiziert nach Heineke & Molkentin (2006). Weitere Erläuterungen im Text.

Anders stellt es sich bei der konzentrischen Wachstumsform dar: die einzelnen Kardiomyozyten nehmen hierbei durch parallelen Anbau neuer Sarkomere vor allem in der Breite zu. Dies führt insgesamt zu einer erhöhten Wand- und Septumsdicke, einhergehend jedoch mit vermindertem Kammervolumen und somit verringerter kardialer Auswurffraktion. Diese Wachstumsform resultiert meist aus chronischer Druckbelastung beispielsweise bei arterieller Hypertonie oder Aortenklappenstenosen (Carabello 1995). Dagegen mündet eine anhaltende Volumenbelastung phänotypisch in einer Mischform zwischen exzentrischem und dilatativem Wachstum. Auslöser hierfür sind häufig Myokardinfarkte und Mutationen in Proteinen des kontraktilen Apparates, aber auch bei einer Mitralklappeninsuffizienz kommt es zum Blutrückstau vor allem während der Diastole. Der Frank-Starling-Mechanismus (erhöhte Wandspannung führt zu einer Zunahme der Kontraktionskraft) kann hierbei nur kurzfristig greifen. Der unvollständige Verschluss der Klappe führt letztlich zu einer chronischen Volumenbelastung des Vorhofs, sowie des Ventrikels, was im weiteren Verlauf strukturelle Umbauvorgänge im Myokard induziert. Charakterisiert ist diese dilatative Wachstumsform deshalb durch extremes Längenwachstum der Herzfasern, wodurch sich die Herzhöhlen stark erweitern, die Wanddicken aber vermindert sind. Das Krankheitsbild einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) kann sich auch im Laufe der Zeit aus einer konzentrischen Hypertrophie entwickeln, indem dem anhaltend erhöhten diastolischen Wandstress mit einer Dilatation entgegengewirkt wird (Schiemann and Stimpel 1997, Heineke and Molkentin 2006, Katz et al. 2013). Da sich das Herz jedoch nur zu einem gewissen Grad in einem beschränkten Zeitraum den erhöhten Anforderungen anpassen kann, ist vor allem bei dauerhafter Einwirkung der kardialen Stressfaktoren die kompensatorische Fähigkeit des Herzens überschritten und der Übergang zu einer Dekompensation, sowie die Ausprägung einer manifesten Herzinsuffizienz wahrscheinlich (Lorell and Carabello 2000).

### 1.1.3 Zelluläre Mechanismen kardialer Hypertrophie

Kardiale Hypertrophie ist keinesfalls „nur“ auf ein pathophysiologisches Wachstum der Herzmuskelzellen zurückzuführen. Vielmehr sind sämtliche Zellen des Herzens am kardialen *Remodeling* beteiligt und tragen zur Umgestaltung des Myokards bei: Fibroblasten, glatte Muskelzellen, endotheliale Zellen sowie Zellen des Immunsystems (Takeda and Manabe 2011). Kardiomyozyten nehmen aber zweifelsohne eine zentrale Rolle bei den *Remodeling*-Prozessen ein, was auch durch die Vielzahl der beteiligten Signalwege deutlich wird (s. Kapitel 1.1.4). Diese pro-hypertrophen Signalkaskaden führen zu einer Zunahme des Zellvolumens um den Faktor 2-3 (Messerli et al. 1993). Ursächlich hierfür ist eine erhöhte Proteinsyntheserate bei gleichzeitig verminderter proteasomaler Degradation (McDermott and Morgan 1989, Sugden and Fuller 1991). Dies ist wiederum auf multiple Veränderungen auf transkriptioneller Ebene zurückzuführen: Letztlich werden vermehrt Proteine gebildet, die in der fetalen bzw. embryonalen Herzentwicklung für die Ausbildung eines funktionsfähigen Myokards unerlässlich sind (Kehat and Molkentin 2010). Diese sogenannte Reaktivierung (auch Reprogrammierung) des fetalen Genprogramms ist ein typischer Kompensations-

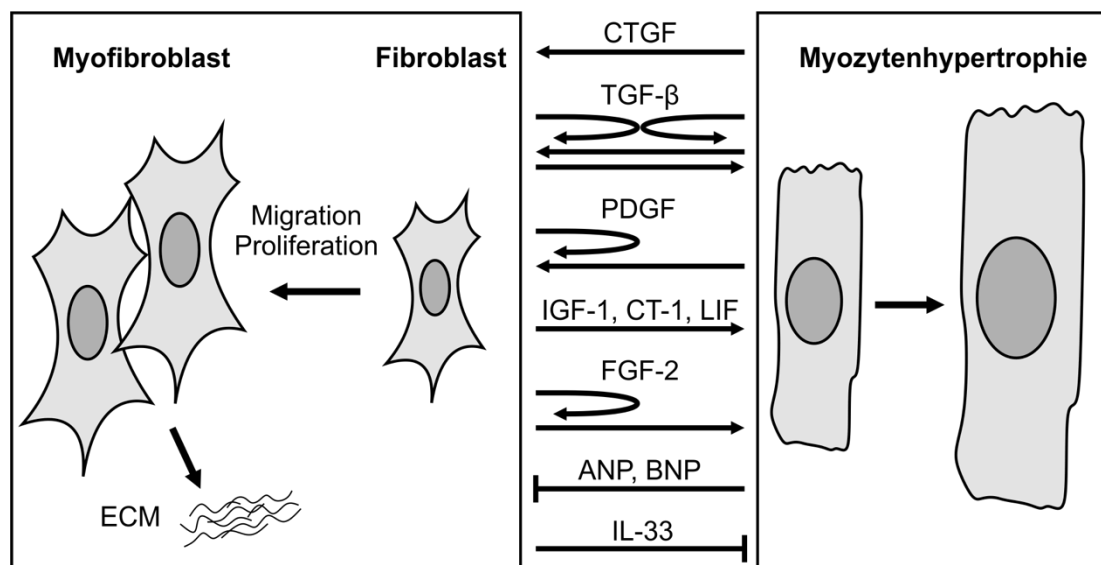
mechanismus bei kardialer Hypertrophie, wobei sich vor allem die Zusammensetzung der kontraktilen Proteine ändert: die  $\beta$ -Isoform der schweren Myosinkette ( $\beta$ -MHC),  $\alpha$ -Skelettmuskel-Aktin, sowie  $\alpha$ -Glattmuskel-Aktin werden verstärkt exprimiert, wohingegen die Expression adulter Isoformen der schweren Myosinkette ( $\alpha$ -MHC) und des  $\alpha$ -kardialen Aktins vermindert ist (Cappola 2008). Weitere typische Hypertrophiemarker sind außerdem die leichte Myosinkette-2, MLC-2 (Lee et al. 1988), sowie die natriuretischen Peptide ANP (Atriales natriuretisches Peptid) und BNP (Brain natriuretic peptide) (Hanford et al. 1994). In diesem Zusammenhang ist auch eine Zunahme der Anzahl an Ribosomen von Bedeutung, wodurch sich die gesteigerte Proteinbiosynthese während des hypertrophen Herzwachstums überhaupt erst realisieren lässt (McDermott et al. 1989). Sehr zügig, 30-60 Minuten nach hypertropher Stimulation, werden zunächst relativ unspezifische, sogenannte „*immediate early genes*“ (IEG) vermehrt gebildet, beispielsweise die Protoonkogene c-Myc, c-Fos und c-Jun (Izumo et al. 1988). Diese transiente Expression ist essentiell zur primären Adaptation der Herzmuskelzellen an die hypertrophen Bedingungen und dient der Induktion von Änderungen hinsichtlich Transkription und Translation und somit der Vorbereitung des Myozytenwachstums (Carreno et al. 2006). Die eigentliche Synthese fetaler Gene setzt erst nach circa 6 Stunden ein. Als bedeutendste Vermittler der Gentranskription, die in Herzmuskelzellen unter hypertrophen Bedingungen zur Reprogrammierung führen, sind folgende Faktoren zu nennen: SRF (Serum-Response-Faktor), Faktoren der NFAT-Familie (Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen), MEF2 (Myozyten Enhancer Faktor 2), EGR1 (*Early growth response protein 1*) und GATA4 (Buitrago et al. 2005, Heineke and Molkentin 2006). GATA4 beispielsweise ist außerordentlich wichtig für die Angiogenese im hypertrophierten Muskel via VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) und kann somit hypoxischen Zuständen entgegenwirken (Heineke et al. 2007).

Veränderungen im Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Haushalt der Kardiomyozyten tragen ebenso zum Fortschreiten der Dysfunktion bei. Die Expression der herzspezifischen Sarkoplasmatischen und endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2) ist in hypertrophierten Herzen verringert (Mercadier et al. 1990). Verbunden mit verminderter Phosphorylierung von Phospholamban (PLB), einem wichtigen Regulator der SERCA2, führt dies in der Diastole zu erhöhten zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegeln und demzufolge niedrigeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Das im SR gespeicherte  $\text{Ca}^{2+}$  wird normalerweise während der Systole freigesetzt und steht dann für die Bindung an Troponin C und wiederum für die Initiation der Kontraktion zur Verfügung (O'Rourke et al. 1999). Weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -speicherabhängige Signalwege, die für die Kardiomyozytenfunktion von essentieller Bedeutung sind, werden durch Ryanodinrezeptoren (RyR) vermittelt. Im hypertrophen Herz wird allerdings die Integrität des Ryanodin-Rezeptor-Komplexes am SR durch verstärkte Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) und die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) gestört. Dies resultiert in einer erhöhten Durchlässigkeit des Kanalproteins für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auch in der Diastole und damit gewissermaßen in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck, wodurch es zu unkontrollierten Kontraktionen bzw. Arrhythmien kommen kann (Marx et al. 2000, Curran et al. 2007). Die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR wird durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum über spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ und

-zu einem geringeren Anteil- über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) gesteuert (Sipido et al. 1997, Bers 2000). In hypertrophen Herzen sind die Expression und die Funktion bzw. Regulation sowohl von Proteinen verändert, die den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom steuern als auch von Proteinen, die nach der Kontraktion am Transport von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Myozyten, sowie ins SR oder Mitochondrium beteiligt sind. Die dadurch gestörte elektromechanische Kopplung und daraus resultierende mechanische Dysfunktion ist ein entscheidender Faktor, der den Krankheitsverlauf negativ beeinflusst und den Übergang einer Herzhypertrophie in eine Herzinsuffizienz letztlich vorantreibt (Hasenfuss et al. 1997). Eine Vielzahl Hypertrophie-promovierender Signalkaskaden werden vor allem am Beginn des Myokardwachstums durch  $\text{Ca}^{2+}$  stimuliert bzw. münden in einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (s. Kapitel 1.1.4 und Abb. 1.3), sodass diesem Ion eine Schlüsselrolle in der Krankheitsprogression zuteil wird (Frey et al. 2000). Darüber hinaus besitzt  $\text{Ca}^{2+}$  auch eine starke Triggerfunktion zur Induktion des fetalen Genprogramms, reguliert den Zellzyklus und kann letztendlich durch die Stimulation verschiedener Signalkaskaden den Zelltod induzieren (Berridge et al. 1998). Die initial kompensatorischen Mechanismen münden im Verlauf der Erkrankung in erheblichem Stress, dem die Herzmuskelzellen auf Dauer nicht gewachsen sind. Letztlich kann die Myozytenfunktion nicht mehr aufrechterhalten werden, eine Dekompensation ist die Folge. Vor allem in späteren Stadien der Myokardhypertrophie besteht ein Ungleichgewicht zwischen Faktoren, die das Überleben der Kardiomyozyten fördern, und den eigentlich kompensatorischen Mechanismen, die letztlich zum Zelltod durch Apoptose, Nekrose oder Autophagie führen (Oka and Komuro 2008). Ähnlich wie nach überstandener Myokardinfarkt werden auch hier die abgestorbenen Kardiomyozyten durch Extrazellulärmatrix (ECM) bzw. Bindegewebe ersetzt.

Die im Zuge des kardialen *Remodelings* aus Fibroblasten entstandene Myofibroblasten sezernieren vor allem Kollagen Typ I und III, ferner Kollagen Typ IV,V,VI sowie Elastin, Laminine und Proteoglykane (Bosman and Stamenkovic 2003). Myofibroblasten repräsentieren histologisch eine Zwischenform aus Fibroblasten und glatten Muskelzellen, sind jedoch nicht an kontraktile Vorgänge des Herzens beteiligt. Problematisch ist auch, dass Myofibroblasten nicht die eigentliche Funktion von kardialen Fibroblasten, nämlich die Aufrechterhaltung der biochemischen und strukturellen Integrität des Myokards sowie die Vermittlung der Herzaktion erfüllen (Souders et al. 2009). Die massive Fibrosierung des Herzmuskels durch die Proliferation von Myofibroblasten und die Einlagerung von ECM führt vielmehr zu einem Elastizitätsverlust und zu einer Versteifung des Myokards. Die Folge sind voranschreitende diastolische, später auch systolische Dysfunktion sowie Arrhythmien aufgrund der behinderten elektromechanischen Kopplung (Spach and Boineau 1997). Exzessive interstitielle Fibrose reduziert außerdem die Kapillardichte und somit die Versorgung der Herzmuskelzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen, was im Myozyt selber hypoxische Zustände und in der näheren Umgebung lokale Ischämien verursacht und somit die Zell- und Herzfunktion noch weiter verschlechtert (Sabbah et al. 1995). Biomechanischer Stress und neurohumorale Stimulation, beispielsweise durch Ang II (s. Kapitel 1.1.5), fördern aber auch direkt die Synthese extrazellulärer Matrixproteine in Myofibroblasten (Schorb et al.

1993, Piacentini et al. 2000). Darüber hinaus findet beim kardialen *Remodeling* auch eine intensive Kommunikation zwischen Kardiomyozyten und Myofibroblasten statt. Dies geschieht entweder durch direkten Zellkontakt über Zusammenfügung zellspezifischer Connexine zu sogenannten „gemischten *gap junctions*“, über die Ionen und andere Moleküle ausgetauscht werden können (Kakkar and Lee 2010) oder über autokrine und parakrine Faktoren (s. Abb. 1.2). Diese Interaktion erscheint umso wichtiger, wenn man bedenkt, dass 30 bis 50% aller Zellen des Herzens Fibroblasten sind (Nag 1980, Banerjee et al. 2007). Das wohl bedeutendste Signalmolekül in diesem Zusammenhang ist der *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β). Autokrine Stimulation durch TGF-β fördert in einem in sich verstärkenden Mechanismus die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, deren Proliferation, und die Transkription von ECM-Proteinen. Parakrine Effekte von TGF-β auf Kardiomyozyten führen ebenfalls zu verstärkter Expression pro-hypertropher Gene in den Herzmuskelzellen (Rosenkranz 2004). Ein wichtiger Kofaktor für die Umsetzung der Effekte von TGF-β bei der Entstehung der Myokardfibrose ist der *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), der speziell die ECM-Produktion, sowie die Adhäsion und Proliferation von Fibroblasten vermittelt (Leask and Abraham 2004). Darüber hinaus induziert TGF-β wiederum die Expression von CTGF in kardialen Fibroblasten und Myozyten (Chen et al. 2000). Eine ähnliche Wirkung wie TGF-β besitzt *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2), der ebenfalls eine starke hypertrophe Wirkung auf Kardiomyozyten ausübt (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Parakrine/Autokrine Kommunikation zwischen Kardiomyozyten und Fibroblasten.**

Myozyten und (Myo-) Fibroblasten beeinflussen sich gegenseitig in ihrem hypertrophen Wachstum, bzw. ihrer Transformation. Als Kommunikationsmoleküle dienen Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie natriuretische Peptide. Das Schema wurde modifiziert nach Takeda & Manabe (2011). CTGF: *Connective Tissue Growth Factor*; TGF-β: *Transforming Growth Factor-β*; PDGF: *Platelet-derived Growth Factor*; IGF-1: *Insulin-like Growth Factor-1*; CT-1: *Cardiotrophin-1*; LIF: *Leukemia-Inhibitory Factor*; FGF-2: *Fibroblast Growth Factor-2*; ANP: *Atriales natriuretisches Peptid*; BNP: *Brain natriuretic peptide*; IL-33: *Interleukin-33*; ECM: *Extrazellulärmatrix*. Weitere Erläuterungen im Text.

Weitere erwähnenswerte Signalmoleküle, welche in die Kommunikation zwischen Kardiomyozyten und Myofibroblasten involviert sind, sind Interleukine (IL) wie IL-33, Mitglieder der IL-6 Familie wie der *Leukemia-Inhibitory Factor* (LIF) und *Cardiotrophin-1*

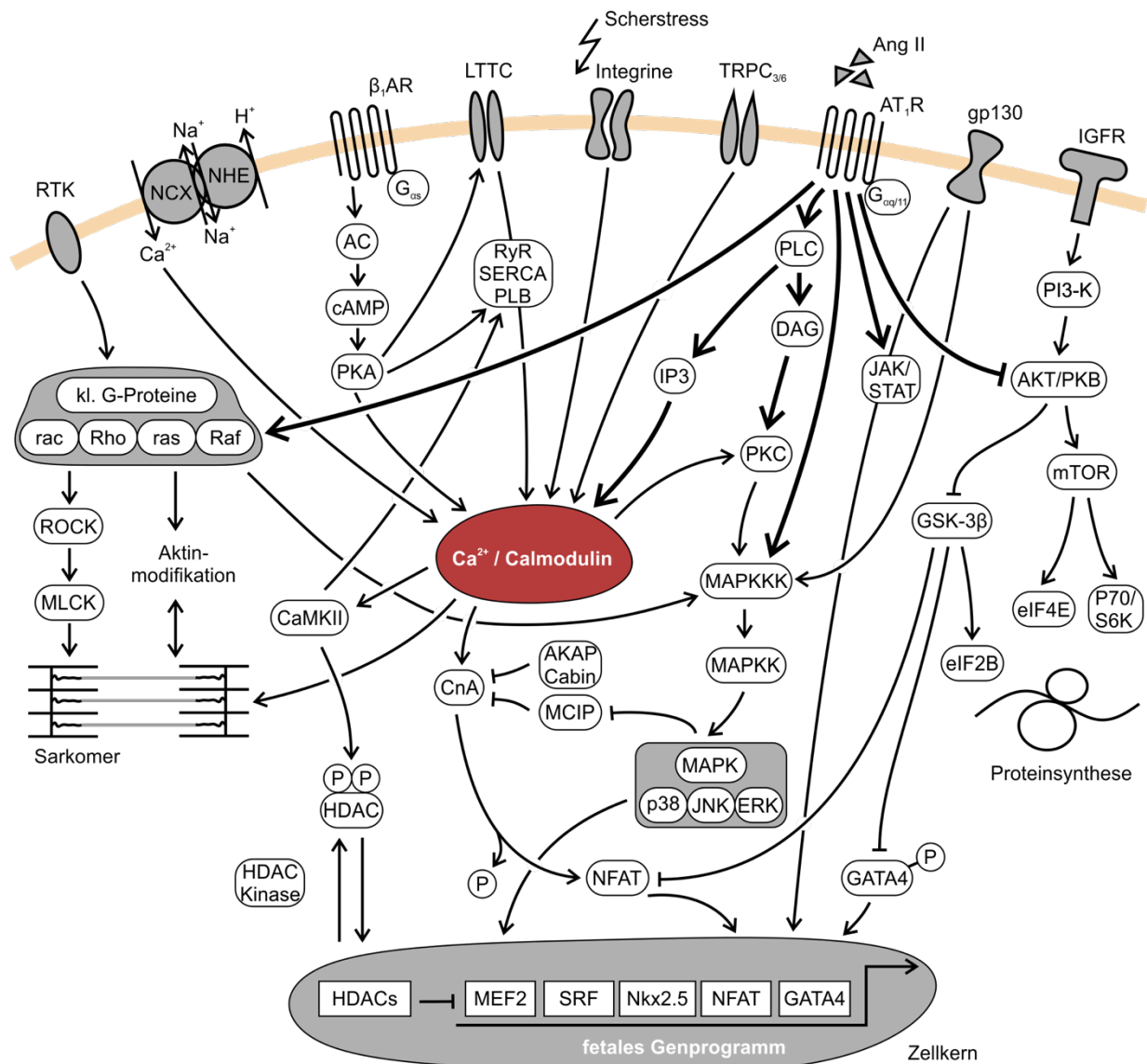
(CT-1), ET I, sowie Serotonin und die natriuretischen Peptide (s. Kapitel 1.1.5 und 1.2.4). Darüber hinaus repräsentieren verschiedene Isoformen des *Platelet-derived Growth Factors* (PDGF) bzw. der *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1) weitere Wachstumsfaktoren, die primär von Myofibroblasten sezerniert werden (Takeda and Manabe 2011).

Entzündliche Prozesse sind ebenfalls an kardialen Umbauprozessen beteiligt. Man vermutet Immunreaktionen z.B. als Antwort auf das Absterben von Kardiomyozyten, sowie der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies. Ebenso resultiert eine direkte Stimulation des Myokards mit Ang II in einem inflammatorischen Phänotyp (Westermann et al. 2012, Kong et al. 2014). Neuesten Vermutungen zufolge können kardiale und migrierende Monozyten sowie Makrophagen und Lymphozyten durch pro-inflammatorische Signale über Chemokine und Zytokine zu Fibroblasten-ähnlichen Zellen differenzieren und wiederum pro-fibrotische Signale wie TGF- $\beta$ , PDGFs und FGF-2 aussenden (Sakai et al. 2006, Kong et al. 2014). Interessanterweise sezernieren Mastzellen Renin und Chymase, die wiederum die lokale Bildung von Ang II induzieren und so indirekt zur Myozytenhypertrophie und der Fibrosierung des Herzens beitragen (Balakumar et al. 2008). Ferner liegt der Akkumulation von extrazellulärer Matrixsubstanz in hypertroph-fibrotischen Herzen oft ein Ungleichgewicht zwischen Matrixgenerierung und Matrixdegenerierung zugrunde. Generell ist die krankhafte Herzhypertrophie durch eine Zunahme von Proteinen der Extrazellulärmatrix wie Kollagen und Fibronectin charakterisiert. Matrixmetalloproteasen (MMP) als ECM-abbauende Enzyme und deren gewebspezifische Inhibitoren, die TIMPs (*Tissue-inhibitor of Metalloproteinases*), spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei diesen myokardialen Umbauprozessen (Jackson et al. 2010, Mishra et al. 2013). Viele der 28 bisher entdeckten MMPs, beispielsweise die Kollagenasen MMP1 und MMP13 sowie die Gelatinasen MMP2 und MMP9 und alle vier TIMP-Isoformen werden im Herzen exprimiert (Li et al. 2000). Ihr Expressions- und Aktivitätsmuster wird ebenfalls von Ang II beeinflusst und variiert in unterschiedlichen Stadien hypertropher Herzerkrankungen (Feldman et al. 2001).

### **1.1.4 Molekulare Mechanismen pathophysiologischer kardialer Hypertrophie in Kardiomyozyten**

Die zahlreichen zellulären Veränderungen, die in hypertrophen Herzen angestoßen werden, beruhen auf außerordentlich komplexen Signalwegen, die sich zum Teil gegenseitig beeinflussen sowie in verschiedenen Zellkompartimenten wie Membran, Sarkomer oder dem Nukleus ineinander übergehen bzw. sich überschneiden. Am Anfang dieser Wachstumssignalkaskaden stehen verschiedene Transmembranproteine, überwiegend G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Integrinrezeptoren oder Rezeptor-Tyrosinkinasen. Über diese Strukturen werden die Trigger der Myokardhypertrophie (z.B. Scherstress, Wachstumsfaktoren oder neurohumorale Stimuli) ins Zellinnere übersetzt. Die hypertrophen Signalkaskaden beinhalten überwiegend Phosphorylierungs- aber auch Dephosphorylierungsreaktionen, über die die Signale in den Nukleus weiter gegeben werden und die Reexpression des fetalen Genprogrammes induziert wird (Heineke and Molckentin

2006). Abb. 1.3 zeigt eine Übersicht der wichtigsten, „klassischen“ Hypertrophie-Signaltransduktionswege und deren außerordentlich komplexe Verknüpfung im Kardiomyozyten.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung hypertropher Signaltransduktionswege.**

Die Grafik wurde modifiziert nach Frey & Olson (2003), sowie Heineke & Molckentin (2006). Hypertrophie-promovierende Signalwege, die durch Ang II induziert werden, sind hervorgehoben. RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase; Ca<sup>2+</sup>: Calcium; NCX: Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher; NHE: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher; β<sub>1</sub>AR: β<sub>1</sub>-Adrenozeptor; LTTC: Spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanal; TRPC: *Transient Receptor Potential Canonical*; SERCA: Sarkoplasmatische und endoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-ATPase; PLB: Phospholamban; RyR: Ryanodin-Rezeptor; AT<sub>1</sub>R: Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1; Ang II: Angiotensin II; gp130: Glycoprotein 130; IGFR: *Insulin-like Growth Factor* Rezeptor; AC: Adenylatzyklase; cAMP: zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat; PKA: Proteinkinase A; PLC: Phospholipase C; IP3: Inositol-1,4,5-trisphosphat; DAG: Diacylglycerol; PKC: Proteinkinase C; JAK: Januskinase; STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription*; PI3-K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; AKT/PKB: Proteinkinase B; mTOR: *mammalian target of rapamycin*; eIF: Eukaryotische Translations-Initiationsfaktoren; p70S6K: p70S6-Kinase; GSK-3β: Glykogensynthase-Kinase 3β; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; ERK: *Extracellular-signal Regulated kinase*; JNK: c-Jun-N-terminale Kinase; MCIP: *Modulatory Calcineurin-interacting protein*; AKAP: *A-kinase anchor protein*; NFAT: Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen; CaMKII: Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II; CnA: Calcineurin A; HDAC: Histondeacetylase; ROCK: Rho-assozierte Proteinkinase; MLCK: Myosinleichtketten-Kinase; MEF2: Myozyten Enhancer Faktor 2; SRF: Serum Response-Faktor. Weitere Erläuterungen im Text.

Eine Vielzahl dieser Signalwege führen direkt oder indirekt über unterschiedliche intrazelluläre Proteinkinasen als Schlüsselenzyme zu erhöhten myozytären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (Nakayama et al. 2013). Neben direkten Auswirkungen auf die Kontraktilität, sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auch an der Induktion des fetalen Genprogramms beteiligt (s. Kapitel 1.1.3). So wird beispielsweise die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin A (CnA) durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM) aktiviert und dephosphoryliert ihrerseits Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie (Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen), die sogleich in den Kern translozieren und dort transkriptionelle Vorgänge induzieren. Mäuse mit einer Überexpression von CnA oder einer NFAT-Variante leiden an einer massiven kardialen Hypertrophie (Molkentin et al. 1998). Die Deletion der Phosphatase mildert im Mausmodell das Ausmaß des krankhaften Herzwachstums, welches durch Isoprenalin, Ang II oder durch Transversale Aortenkonstriktion (TAC) induziert wurde. Eine gleichzeitig um circa 12% verringerte Herzmasse unter nicht-stimulierten Konditionen impliziert außerdem eine physiologische Rolle von CnA in der Herzentwicklung (Bueno et al. 2002). Ciclosporin A ist ein bekannter CnA-Inhibitor, der seit geraumer Zeit in der Transplantationsmedizin zur Prävention von Abstoßungsreaktionen eingesetzt wird. Ein therapeutischer Einsatz auch bei kardialer Hypertrophie ist jedoch aufgrund der hohen Wirkstoffspiegel für eine effiziente CnA-Hemmung im Herz und der daraus resultierenden Nephrotoxizität nicht möglich (Leinwand 2001). Darüber hinaus aktivieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), die wiederum über Histondeacetylasen die Transkription induziert und gleichzeitig das  $\text{Ca}^{2+}$ -Recycling am Sarkoplasmatischen Retikulum reguliert (Passier et al. 2000).

Abb. 1.3 verdeutlicht außerdem, dass der MAP-Kinase-Signalweg eine zentrale Komponente des pathophysiologischen Herzwachstums darstellt. Diese mehrstufige Phosphorylierungskaskade wird durch pro-hypertrophe Stimuli über  $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptoren sowie biomechanischen Stress aufgrund von Scherbelastung aktiviert (Rose et al. 2010). Die „eigentlichen“ MAP-Kinasen, die die terminalen Phosphorylierungsschritte ausführen, bestehen aus drei Subfamilien mit wiederum einer Vielzahl an Isoenzymen: JNK (c-Jun-N-terminale Kinase), ERKs (*Extracellular-signal Regulated kinase*) und p38-MAPK (Pearson et al. 2001). Die Induktion des fetalen Genprogramms erfolgt teilweise im Zusammenspiel mit dem CnA-Signalweg, entweder über die Interaktion mit speziellen Proteinen, die die Aktivität von CnA regulieren, sogenannte MCIP-Proteine (*Modulatory Calcineurin-interacting proteins*) oder direkt durch Aktivierung von NFAT-Transkriptionsfaktoren (Yang et al. 2002, Molkentin 2004). Die Weiterleitung von Wachstumssignalen über kleine G-Proteine, insbesondere der Raf1-Kinase, resultiert ebenso in der Aktivierung von MAP-Kinasen (Molkentin and Dorn 2001), wie die Signaltransduktion über gp130 (Glycoprotein 130), einer Untereinheit des Zytokinrezeptors der Klasse I. Gp130 ist essentiell für das Überleben von Myozyten unter Einwirkung von biomechanischem Stress. So zeigen phänotypisch unauffällige gp130-defiziente Tiere erst nach experimenteller TAC eine Dilatation des linken Ventrikels, einhergehend mit massiver Apoptose von Herzmuskelzellen (Nyui et al. 1998, Hirota et al. 1999). Eine dauerhafte Stimulation von gp130, z.B. durch CT-1 ist zudem ein starker Stimulus des hypertrophen Myokardwachstums (Pennica et al. 1995). Erhöhte endogene CT-1 Spiegel sind sowohl in insuffizienten Herzen als auch experimentell nach Stimulation



mit Ang II messbar (Sano et al. 2000, Talwar et al. 2000). Aufgrund des Fehlens einer eigenständigen Tyrosinkinase-Aktivität ist gp130 neben den MAP-Kinasen auch an Januskinasen (JAK) assoziiert. Die nachfolgende Signalweiterleitung über STAT-Proteine (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) stellt einen alternativen Signalweg zur Induktion des fetalen Genprogramms dar (Fischer and Hilfiker-Kleiner 2007).

Die Enzymfamilie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-K) ist einerseits essentiell im Zuge der embryonalen Herzentwicklung und der physiologischen Adaptation bei Schwangerschaft und Leistungssport, andererseits führt eine zu starke Kinase-Aktivität bzw. Überexpression der PI3-K zu hypertrophen Herzerkrankungen (Shioi et al. 2000). PI3-Kinasen werden in hypertrophen Herzen hauptsächlich durch Tyrosinkinasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sowie kleine G-Proteine (z.B. Ras) aktiviert (Proud 2004). Den PI3-Kinasen nachgeschaltet folgt die Aktivierung der Proteinkinase B (PKB), auch bekannt unter ihrem Gennamen AKT. AKT/PKB nimmt über die Phosphorylierung von mTor (*mammalian target of rapamycin*) direkt Einfluss auf die Proteinsynthese (Wang and Proud 2006). Ein weiteres Substrat von AKT/PKB ist die Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). GSK-3 $\beta$  phosphoryliert unter anderem GATA4 und inhibiert dadurch diesen Transkriptionsfaktor bzw. verhindert seine Kerntranslokation. In hypertrophen Zuständen jedoch wird GSK-3 $\beta$  verstärkt durch AKT/PKB phosphoryliert und somit inhibiert. Dies resultiert letztlich in einer verminderten GATA4-Phosphorylierung durch GSK-3 $\beta$  und der verstärkten Transkription Hypertrophie-assoziiierter fetaler Gene (Morisco et al. 2001)

Anhand Abb. 1.3 wird ebenso ersichtlich, dass viele der beschriebenen Signalwege über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) induziert werden. Im Myokard werden vor allem adrenerge und muskarinerge GPCRs sowie Rezeptoren für Ang II, ET I, Histamin und Adenosin exprimiert (Salazar et al. 2007). GPCRs spielen sowohl in gesunden als auch in hypertrophen Herzen eine wichtige Rolle in der Regulation der Herzfunktion (Penela et al. 2006). GPCRs bestehen aus insgesamt 7 Transmembrandomänen und sind intrazellulär an drei unterschiedliche Klassen GTP (Guanosin-5'-triphosphat)-bindender Proteine gebunden: G<sub>as</sub>, G<sub>ai</sub> und G<sub>aq/11</sub>. Durch die Bindung von GPCR-Agonisten wird GDP (Guanosindiphosphat) gegen GTP ausgetauscht. Die dadurch erfolgende Konformationsänderung führt zum Zerfall des heterotrimeren G-Protein-Komplexes in seine Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Zumeist dient die nun aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit der weiteren Signalweiterleitung (Gether and Kobilka 1998, Lefkowitz 2007). Ang II vermittelt seine pro-hypertrophen Effekte über G<sub>aq/11</sub>. Sämtliche Signalwege, die durch Ang II angestoßen werden, sind in Abb. 1.3 hervorgehoben. Durch die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) werden die sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) gebildet. IP<sub>3</sub> induziert die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern, sowie nachfolgend aus dem Extrazellulärraum und verstärkt somit die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Hypertrophieentwicklung (Balakumar and Jagadeesh 2014). Die Proteinkinase C (PKC) ist ein wichtiger Vermittler der Ang II-Effekte, insbesondere den Isoformen PKC $\beta$  und PKC $\epsilon$  wird eine bedeutende Rolle in der Entwicklung kardialer Hypertrophie zugeschrieben (Frey and Olson 2003). Die PKC wird sowohl durch Ca<sup>2+</sup>-Ionen als auch durch DAG aktiviert und stößt ihrerseits wiederum den

MAPK-Signalweg an. Eine PLC und PKC-unabhängige, direkte Aktivierung von MAP-Kinasen durch die hypertrophe Ang II-Stimulation sowie von AKT/PKB und JAK/STAT ist ebenso möglich, wie die Aktivierung kleiner G-Proteine wie Ras, Rho und Rac im Sinne einer Signalverstärkung (Hunter et al. 1995, Higuchi et al. 2007). Die Aktivierung  $G_{\alpha q}$ -abhängiger Signaltransduktionswege ist ein wichtiger Bestandteil der kardialen Hypertrophieantwort sowie der embryonalen Herzentwicklung: Mäuse mit einer Überexpression von  $G_{\alpha q}$  entwickeln dilatierte Ventrikel und massive Kontraktionsstörungen (D'Angelo et al. 1997). Die globale Deletion von  $G_{\alpha q/11}$  jedoch führt bereits im Embryonalstadium aufgrund der verzögerten Herzentwicklung zum Tod (Offermanns et al. 1998), wohingegen eine kardiomyozytenspezifische Ablation von  $G_{\alpha q/11}$  schützend bei TAC-induzierter Myokardhypertrophie wirkt (Wettschureck et al. 2001).  $G_{\alpha s}$ -Proteine üben ihre stimulierende Wirkung auf das Herzgewebe über Adenylatzyklasen (AC) und die nachfolgende Aktivierung der PKA durch den sekundären Botenstoff cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat) aus. Die sympathomimetische Stimulation über  $G_s$ -gekoppelte  $\beta_1$ -Adrenozeptoren ( $\beta_1AR$ ) ist zudem ein bedeutender Signalweg zur Induktion kardialer Hypertrophie. Eine zentrale Wirkkomponente umfasst auch hier die Erhöhung intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen mit positiv chronotropen, positiv inotropen und positiv lusitropen Effekten auf das Myokard (Brodde and Michel 1999, Morisco et al. 2001). Eine Überexpression des  $\beta_1AR$  (Engelhardt et al. 1999), sowie von  $G_s$ -Proteinen (Gaudin et al. 1995) und auch der PKA (Antos et al. 2001) führte ebenso wie eine chronische Aktivierung des Rezeptors durch Katecholamine (Lowes et al. 2000, Xiang and Kobilka 2003) zunächst zu einer transienten Erhöhung der Kontraktilität mit anschließender progressiver Hypertrophie und Fibrosierung bis hin zur Dekompensation. Die Signalübertragung über inhibitorische G-Proteine ( $G_{\alpha i}$ ) mündet in einer Hemmung der AC, mit nachfolgend geringeren cAMP-Mengen und verminderter Aktivierung der PKA (Sunahara et al. 1996). Trotz der bislang unzureichenden Datenlage bezüglich kardialer  $G_{\alpha i}$ -Proteine ist bekannt, dass diese vor allem bei terminaler Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert werden (Eschenhagen et al. 1992). Mögliche kompensatorische Effekte werden durch die direkte Modulation von L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen durch  $G_{\alpha i2}$  und  $G_{\alpha i3}$  vermittelt (Dizayee et al. 2011). Dass jedoch auch eine myozytenspezifische Überexpression von  $G_{\alpha i}$ -Proteinen im Mausmodell zu Dilatation und Herzversagen führt, bezeugt wiederum die komplexen Regulationsmechanismen in der Entstehung hypertropher und dilatativer Herzerkrankungen (Redfern et al. 2000).

Die in Abb. 1.3 dargestellten Komponenten sind als Teil der Gesamtheit pro-hypertropher Signaltransduktionswege zu verstehen. Trotz des immensen Zuwachs an Wissen in den letzten 20 Jahren bezüglich der molekularen Entstehung hypertropher Herzerkrankungen sind die Therapiemöglichkeiten bis dato limitiert und beschränken sich mit  $AT_1$ -Rezeptorantagonisten, Betablockern, Diuretika und Calciumantagonisten meist auf Strategien, die der Herzentlastung dienen (Lip 2001, Prinz et al. 2011). Hiermit kann das Voranschreiten der hypertrophen Umbauprozesse zu einem gewissen Ausmaß tatsächlich gestoppt werden. Nichtsdestotrotz sind zusätzliche, zielgerichtete Therapien, die eine noch effizientere Pharmakotherapie erlauben, wünschenswert, insbesondere wenn genetische Defekte dem Krankheitsbild zugrunde liegen. Hierfür müssen zukünftig die gesamten

beteiligten endogenen Signalwege, Effektoren, sowie deren Interaktionen in Kardiomyozyten bis ins Detail aufgeschlüsselt werden. Da sämtliche kardiale Zelltypen an der hypertrophen Umgestaltung des Herzens beteiligt sind (s. Kapitel 1.1.3), wäre die Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen z.B. auch in Fibroblasten erstrebenswert. Insbesondere zur Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung der Myokardfibrosierung als bedeutende Begleitsymptomatik (Tarone et al. 2014).

### 1.1.5 Rolle von Angiotensin II bei Myokardhypertrophie und Fibrosierung

Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) mit dem Oktapeptid Ang II als wichtigstem Effektormolekül ist der wohl bedeutendste neurohumorale Signalweg, der zur Entwicklung einer kardialer Hypertrophie beiträgt (Dahlof 1995). Diverse Organe sind bei der Bildung von Ang II involviert: Physiologisch wird bei Abfall des Perfusionsdruckes, sympathischer Aktivierung oder Salzverlust in den juxtaglomerulären Zellen der Niere Renin gebildet, woraufhin die Protease aus der in der Leber produzierten Vorstufe Angiotensinogen Angiotensin I (Ang I) bildet. Vor allem in der Lunge wird Ang I durch das *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE) in die aktive Isoform Ang II umgewandelt (Reid et al. 1978). Die Effekte von Ang II werden über zwei Subtypen von GPCRs den AT<sub>1</sub>-Rezeptor (AT<sub>1</sub>R) und den AT<sub>2</sub>-Rezeptor (AT<sub>2</sub>R), vermittelt (Sandmann and Unger 2002). Die molekularen Signalwege, die der Aktivierung des G<sub>αq</sub>-gekoppelten AT<sub>1</sub>R durch Ang II nachgeschaltet sind, wurden bereits in Kapitel 1.1.4 beschrieben. In den meisten Organen weisen die Rezeptoren gegensätzliche Funktionen auf, wobei Signaltransduktionsprozesse über den AT<sub>2</sub>R-Subtyp vorwiegend als protektiv angesehen werden, die tatsächlichen Ang II-Effekte allerdings von der jeweiligen Ausstattung der Zelle mit Rezeptoren abhängig sind (Nakamura et al. 1999). Jedoch scheint vor allem an Niere, Gefäßen und Herz der AT<sub>1</sub>R, bei Nagern genauer gesagt der Subtyp AT<sub>1a</sub>R, zu dominieren (Ito et al. 1995). Ang II als einer der potentesten Vasokonstriktoren ist unmittelbar an der Regulation des Gefäßtonus und somit des Blutdrucks beteiligt und besitzt darüber hinaus auch direkte wachstumsfördernde Effekte auf Kardiomyozyten und induziert die Proliferation von Fibroblasten, unabhängig von der Nachlast, der Summe des Auswurfwiderstandes (Mazzolai et al. 1998). Insbesondere weisen kardiale Fibroblasten eine hohe Dichte G<sub>αq</sub>-gekoppelter AT<sub>1</sub>R auf (Booz and Baker 1996). Nicht zuletzt wird Ang II nach hypertrophen Stimuli auch von Kardiomyozyten selbst freigesetzt (Sadoshima et al. 1993). Dass dieses lokale RAAS maßgeblich in der Pathogenese kardialer Umbauprozesse involviert ist, wurde auch anhand der breit angelegten LIFE-Studie (*The Losartan Intervention For Endpoint Reduction*) deutlich: unter Therapie mit dem AT<sub>1</sub>R-Antagonist Losartan konnte im Vergleich zu dem β<sub>1</sub>-Adrenozeptor-Antagonist Atenolol eine signifikante Regression der linksventrikulären Hypertrophie, verbunden mit einer Mortalitätssenkung erreicht werden, die nicht nur auf die Erniedrigung des systemischen Blutdrucks zurückzuführen war (Dahlof et al. 1997). Auch mit Hilfe verschiedener Tiermodelle wurde diesbezüglich in den letzten Jahren viel Aufklärungsarbeit geleistet. Alleinige Überexpression bzw. Überstimulation des humanen AT<sub>1</sub>R in Kardiomyozyten von Nagern resultiert unabhängig vom Blutdruck in Hypertrophie, Fibrose

und Dilatation des linken Ventrikels (Paradis et al. 2000, Ainscough et al. 2009). Wird der murine Rezeptorsubtyp spezifisch in Myozyten überexprimiert, sterben die Tiere trotz Behandlung des Muttertieres mit dem AT<sub>1</sub>R-Antagonist Captopril sogar wenige Tage nach der Geburt (Hein et al. 1997). Überdies scheint auch eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors in Abwesenheit von endogenem Ang II bereits zu Symptomen einer DCM zu führen, wie an Angiotensinogen-Knockout Tieren mit Überexpression des AT<sub>1</sub>R demonstriert werden konnte (Yasuda et al. 2012). Ein gewisser Beitrag zum Herzwachstum bei erhöhten zirkulierenden Ang II-Spiegeln ist auch auf renale AT<sub>1</sub>R zurückzuführen. So konnten bei Tieren mit einer globalen Deletion der AT<sub>1</sub>R nach Verpflanzung einer Wildtyp-Niere und anschließender Ang II-Infusion kardiale Umbauprozesse demonstriert werden, die auf einen erhöhten Blutdruck durch verringerte Natriurese, verstärkte Ödembildung und dadurch vermehrte Volumenbelastung zurückzuführen waren (Crowley et al. 2006). Versuche auf zellulärer Ebene stützen aber auch die Annahme einer direkten Wirkung von Ang II auf unterschiedliche kardiale Zelltypen. So lässt sich die Proliferation von isolierten und kultivierten kardialen Myozyten und Fibroblasten durch Ang II stimulieren. Diese wachstumsfördernden Effekte von Ang II sind darüber hinaus sensitiv gegenüber einer Behandlung mit AT<sub>1</sub>R-Antagonisten (Sadoshima and Izumo 1993, Liu et al. 1998).

### **1.1.6 Mutationen in kardialen Strukturproteinen als Risikofaktoren für hereditäre Kardiomyopathien**

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass eine Hypertrophie des Herzmuskels nicht nur eine Folgeerkrankung darstellt, sondern auch durch Veränderungen im Expressionsmuster verschiedener Gene verursacht werden kann bzw. dass Mutationen in bestimmten Genen die Entstehung von diversen familiär bedingten Kardiomyopathien begünstigen (Watkins et al. 2011). Hierbei ist Kardiomyopathie ein Überbegriff für heterogene Erkrankungen des Herzmuskels, einhergehend mit mechanischer und/oder elektrischer Dysfunktion und in den allermeisten Fällen entweder verbunden mit übermäßiger Verdickung oder Dilatation des Myokards. Oftmals sind die Übergänge fließend, so kann eine hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), charakterisiert durch konzentrisches Wachstum, in eine dilatative Kardiomyopathie (DCM), mit stark ausgedünnten Ventrikelwänden und vergrößertem Ventrikelvolumen mit ausgeprägter systolischer Dysfunktion münden (s. Kapitel 1.1.2). Darüber hinaus gibt es weitere Subklassen: die hypertroph-obstruktive Kardiomyopathie (HOCM) weist zusätzlich Ausstülpungen der basisnahen Ventrikelwände auf, die den Blutfluss behindern können. Eine ischämische Kardiomyopathie (ICM) ist gekennzeichnet durch eine atherosklerotisch bedingte Minderdurchblutung des Herzens aufgrund von Erkrankungen der Koronarien, eine restriktive Kardiomyopathie (RCM) durch extrem versteifte Herzen aufgrund übermäßiger Akkumulation von Extrazellulärmatrix als Folgekrankheit einer Amyloidose. Bei extrinschen Kardiomyopathien wird, sofern der auslösende Faktor bekannt ist, beispielsweise Alkohol, Drogen oder Entzündungen, das Krankheitsbild danach benannt (Richardson et al. 1996, Maron et al. 2006, Elliott et al. 2008, Harvey and Leinwand 2011). Ein Übergreifen der Symptomatik von der Skelettmuskulatur

auf den Herzmuskel ist ebenso eine typische Begleiterscheinung in späten Stadien von Muskeldystrophien. Aufgrund einer hereditären Muskelschwäche resultieren dabei meist dilatative Formen (Annexstad et al. 2014).

Treten Kardiomyopathien schon in frühen Lebensstadien auf, liegen meist autosomal dominant vererbte Mutationen in Genen für Sarkomerproteine vor. Seltener sind auch Proteine der Z-Scheibe, der Intermediärfilamente oder des Zytoskeletts betroffen (Watkins et al. 2011). Bislang wurden über 400 Mutationen in mindestens 15 sarkomerischen Proteinen gefunden (s. Tab. 1.1). Hauptsächlich betroffen hiervon sind Proteine der kontraktilen Einheiten wie schwere sowie leichte Myosinketten, das kardiale Myosin-Bindeprotein C3 (Mybpc3), alle Komponenten des Troponin-Komplexes sowie Tropomyosin. In der Gruppe der Z-Scheiben Proteine sind vor allem Mutationen im Cystein-reichen Protein 3 (CRP3), auch als Muskel-LIM-Protein (MLP) bezeichnet, neben  $\alpha$ -Actinin 2 für die Entstehung hereditärer Kardiomyopathien verantwortlich (Murphy and Starling 2005, Seidman and Seidman 2011). In vielen Fällen liegen auch mehrere Mutationen in unterschiedlichen Genen vor (Maisch and Mahrholdt 2014). Tab. 1.1 beschreibt exemplarisch die bedeutendsten Mutationen, die einer hypertrophen Kardiomyopathie zugrunde liegen (Alcalai et al. 2008).

Bezeichnung des Proteins ( <i>Genname</i> )	Lokalisation	Zahl Mutationen	%-Anteil aller Fälle
$\beta$ -Isoform der schweren Myosinkette ( <i>Myh7</i> )	dickes Filament	212	44
Myosin-Bindeprotein C3 ( <i>Mybpc3</i> )	dickes Filament	165	35
Troponin T ( <i>Tnnt2</i> )	dünnes Filament	33	7
Troponin I ( <i>Tnni3</i> )	dünnes Filament	27	5
$\alpha$ -Tropomyosin ( <i>Tpm1</i> )	dünnes Filament	12	2,5
Regulatorische leichte Myosinkette ( <i>MyI2</i> )	dickes Filament	10	2
Essentielle leichte Myosinkette ( <i>MyI3</i> )	dickes Filament	5	1
Actin ( <i>Actc1</i> )	dünnes Filament	7	1
Titin ( <i>Ttn</i> )	Z-Scheibe	2	<1
CRP3/MLP ( <i>Csrp3</i> )	Z-Scheibe	3	<1
Telethonin ( <i>Tcap</i> )	Z-Scheibe	2	<1
Myozenin 2 ( <i>Myoz2</i> )	Z-Scheibe	1	<1
Vinculin ( <i>Vcl</i> )	Z-Scheibe (u.a.)	2	<1

**Tab. 1.1: HCM-assoziierte Mutationen in Sarkomer-Proteinen.**

Exemplarische Darstellung von Genmutationen, welche die Ausbildung einer hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) begünstigen. Eine Vielzahl der verantwortlichen Mutationen betreffen direkt den kontraktilen Apparat. Da oftmals unterschiedliche Mutationen in demselben Gen vorliegen, ist die exakte Voraussage des resultierenden Phänotyps nicht möglich. Darüber hinaus sind dieselben Gene auch bei der Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) beteiligt. Die Aufstellung wurde von Alcalai et al. (2008) übernommen. Weitere Erläuterungen im Text.

Durch die Vielzahl an Mutationen können fehlerhaft gefaltete Proteine, aber auch reduzierte Mengen an funktionalem Protein entstehen, wodurch die hoch organisierten Strukturen des kontraktilen Apparates mehr oder weniger stark destabilisiert werden, was sich in unterschiedlichen Ausprägungen darstellt. (Geisterfer-Lowrance et al. 1996, Tardiff et al. 1998). Obwohl die exakte Pathogenese der HCM bzw. DCM nicht vollständig verstanden ist,

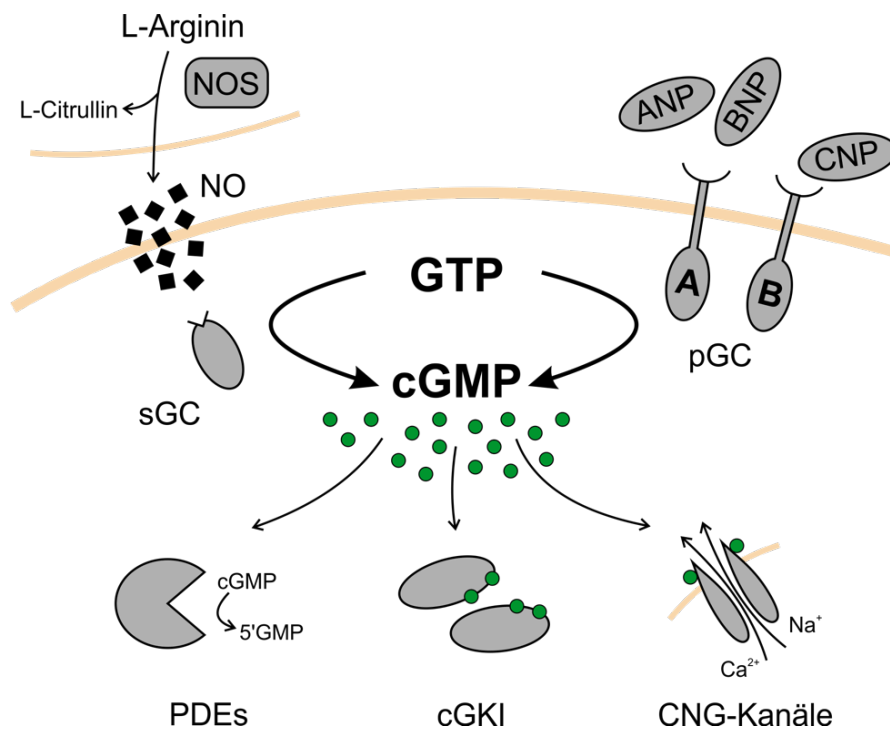
vermutet man, dass mutationsbedingte Veränderungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt die Kontraktilität und den Herzrhythmus beeinflussen (Nicol et al. 2000). Bei der HCM liegt demnach eine verstärkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität vor, die zu einer verstärkten Kraftentwicklung in der Kontraktionsphase führt, wohingegen bei der DCM eine massiv verringerte Kontraktionskraft zu einer starken Volumenbelastung und letztlich zu dilatierten, schlaffen Ventrikeln führt. Je nach Art und Lokalisation der Mutation, selbst wenn ein und dasselbe Protein betroffen ist, können unterschiedliche Ausprägungen der Kardiomyopathie resultieren, die außerdem ineinander übergehen können. Dies macht es so schwierig, den Verlauf der Krankheit vorherzusagen, weshalb eine exakte Genotypisierung jeder Myopathie notwendig ist. Auch unter dem Aspekt, dass konventionellen Therapien bei hereditären Formen oft Grenzen gesetzt sind und  $\text{AT}_1\text{R}$ -Antagonisten oder  $\beta_1$ -Adrenozeptor-Antagonisten bei diesen Ausprägungen oftmals keinen Benefit zeigen (Axelsson et al. 2015). Deshalb sollten die Auswirkungen der jeweiligen Mutation und die kompensatorischen Signalkaskaden für eine erfolgreiche individuelle Therapie aufgedeckt und verstanden werden. Das Fernziel stellt hierbei eine präventive Therapie bzw. ein Aufschieben des klinischen Vollbildes und Vermeidung von Herztransplantationen als Ultima Ratio dar (Bos et al. 2014).

## 1.2 Der NO/cGMP/cGKI-Signalweg

Die gefäßerweiternde Wirkung des gasförmigen Moleküls Stickstoffmonoxid (NO) wurde schon vor annähernd 150 Jahren entdeckt und wird bis heute in Form von Nitroglycerin für medizinische Zwecke genutzt. Ironischerweise wurden die pektangiösen Beschwerden Alfred Nobels, der maßgeblich an der Entwicklung von Dynamit auf der Grundlage von Nitroglycerin beteiligt war, hiermit behandelt (Marsh and Marsh 2000). Zu dieser Zeit war gewiss niemandem bewusst, dass dieses gasförmige Molekül erst der Beginn einer faszinierenden Signalkaskade für sämtliche Stoffwechselprozesse darstellt. Im Jahre 1988 wurde den Forschern Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad die nach Alfred Nobel benannte Ehrung verliehen. Sie entdeckten, dass ein bislang unbekannter Faktor mit dem Namen EDRF (*Endothelium-derived relaxing factor*), der zur Gefäßrelaxation führt, kein geringeres Molekül als NO ist (Katsuki et al. 1977, Furchgott and Zawadzki 1980, Ignarro et al. 1987, Raju 2000). Auch viele Jahre später wirft die Bedeutung von NO als Signalmolekül sowie die Rolle nachgeschalteter Signalkaskaden für die gesamte Zellfunktion noch immer viele interessante Fragestellungen auf. NO kann in Abhängigkeit von den vorhandenen Zielstrukturen und seiner Konzentration entweder die Produktion von zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) stimulieren (s. Kapitel 1.2.1) oder über einen alternativen Weg direkt die Aktivität von zellulären Proteinen modulieren (Hofmann et al. 2000). Dies geschieht z. B. durch Nitrosylierung freier Thiol-Gruppen, was einerseits einen endogenen Schutzmechanismus vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) darstellt (Sun et al. 2006), andererseits auch eine Modulation von  $\text{Ca}^{2+}$ - und spannungsabhängigen Kaliumkanälen erreicht (Bolotina et al. 1994, Sampson et al. 2001).

### 1.2.1 cGMP: Bildung, Effektoren und Inaktivierung

Die enzymatische Bildung von cGMP erfolgt mit Hilfe von Guanylatzyklasen aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat (Hardman and Sutherland 1969). Die NO-abhängige Generierung von cGMP wird hierbei durch lösliche, im Zytosol vorliegende Guanylatzyklasen (sGC) vermittelt (Kimura and Murad 1974). Die Bildung, sowie Effektoren von cGMP werden nachfolgend in Abb. 1.4 beschrieben.



**Abb. 1.4: Generierung, Effektorproteine und Abbau von cGMP.**

cGMP wird durch lösliche oder membranständige Guanylatzyklasen gebildet, der Haupteffektor im kardiovaskulären System ist die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I. Die Degradation von cGMP erfolgt durch Phosphodiesterasen. NOS: NO-Synthase; NO: Stickstoffmonoxid; GTP: Guanosin-5'-triphosphat; cGMP: zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat; ANP: Atriales natriuretisches Peptid; BNP: *Brain natriuretic peptide*; CNP: C-Typ natriuretisches Peptid; sGC: lösliche Guanylatzyklase; pGC: partikuläre Guanylatzyklase; PDE: Phosphodiesterase; 5'GMP: Guanosin-5'-monophosphat; cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I; CNG: durch zyklische Nucleotide (*cyclic nucleotide-gated*) gesteuerter Ionenkanal. Das Schema wurde modifiziert nach Hofmann et al. 2000. Weitere Erläuterungen im Text.

In einem primären Reaktionsschritt erfolgt zunächst die endogene Bildung des Radikals NO durch NO-Synthasen (NOS), von denen drei Isoformen bekannt sind: die endotheliale NO-Synthase (eNOS/NOS-3) und die neuronale NO-Synthase (nNOS/NOS-1) werden konstitutiv, entgegen ihrer Namensgebung, in vielen Geweben exprimiert und leiten nach Aktivierung durch Ca<sup>2+</sup>/CaM die NO-vermittelte Signalübertragung ein (Marletta 1994). Die im Zuge von Entzündungs- und Immunabwehrreaktionen durch die induzierbare NOS (NOS-2) erzeugte NO-Mengen sind um ein vielfaches höher, werden Ca<sup>2+</sup>/CaM-unabhängig durch Endotoxin- sowie Zytokineinwirkungen generiert und dienen der zytotoxischen Lyse von Bakterien und infizierten Zellen (Radomski et al. 1990). Unabhängig von der NOS-Isoform

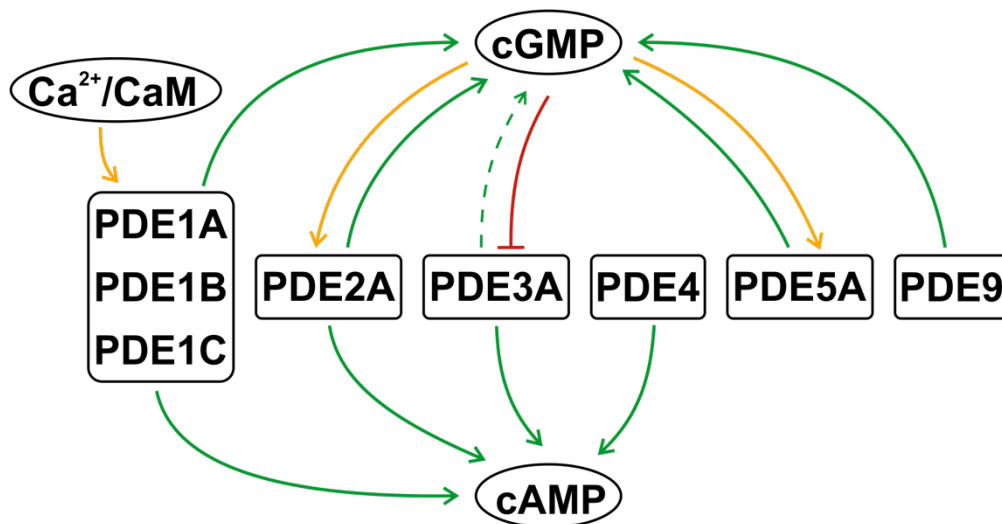
wird L-Arginin unter Oxidation seines terminalen Stickstoffs der Guanidinogruppe zu L-Citrullin und NO umgesetzt (Nathan and Xie 1994). Für das kurzlebige NO stehen keine Speicherformen zur Verfügung, es diffundiert direkt nach seiner Bildung nahezu ungehindert durch die Zellmembran und kann auf diese Weise die sGC in benachbarten Zielzellen erreichen und aktivieren (Krumenacker et al. 2004). Diese bestehen aus zwei Untereinheiten  $\alpha_1$  bzw.  $\alpha_2$  und  $\beta_1$  und erlauben die Abgrenzung in zwei katalytisch aktive Heterodimere NO-GC1 ( $\alpha_1\beta_1$ ), und NO-GC2 ( $\alpha_2\beta_1$ ). Während NO-GC2 vor allem in Lunge und Gehirn vorzufinden ist, wird NO-GC1 in annähernd allen Geweben exprimiert und ist somit für den Großteil der NO-induzierten cGMP-Bildung verantwortlich (Mergia et al. 2003). Die  $\beta_1$ -Untereinheit mit einer prosthetischen Häm-Gruppe fungiert hierbei als Rezeptor für NO und katalysiert letztlich die Umsetzung von GTP zu cGMP (Russwurm and Koesling 2004, Martin et al. 2005). Ein alternativer, NO-unabhängiger Weg zur Erhöhung intrazellulärer cGMP-Spiegel wird durch membranständige, partikuläre Guanylatzyklasen (pGC) vermittelt. Bislang wurden 7 verschiedene Isoformen (GC-A bis GC-G) isoliert, die allesamt als Homodimere vorliegen (Denninger and Marletta 1999). Die pGCs besitzen keinen Protoporphyrin IX-Ring und werden nicht durch NO, sondern hauptsächlich durch die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP (C-Typ natriuretisches Peptid) aktiviert (Garbers et al. 1994). Während ANP und BNP mit einer hohen Affinität an GC-A binden, aktiviert CNP bevorzugt die Isoform GC-B. Guanylin und Uroguanylin sind Liganden der GC-C. Physiologische Stimulatoren und exakte Funktionen der anderen pGCs, oft auch als *orphan receptors* bezeichnet, sind zum Großteil noch unerforscht (Kuhn 2003, Schulz 2005).

Wesentliche Effektoren von cGMP sind die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (s. 1.2.2) vor allem die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI) sowie spezielle Ionenkanäle, die sogenannten CNG-Kanäle (*cyclic nucleotide-gated ion channels*), deren Öffnung direkt nach der Bindung von cGMP vollzogen wird. Der nachfolgende Einstrom von Natrium ( $\text{Na}^+$ ) und  $\text{Ca}^{2+}$  durch diese Kanäle induziert Änderungen im Membranpotenzial der jeweiligen Zelle, ebenso werden vielfältige  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signaltransduktionsprozesse in den jeweiligen Geweben in Gang gesetzt. (Biel et al. 1998). CNG-Kanäle spielen eine zentrale Rolle in der sensorischen Signaltransduktion und werden abundant in der Retina und im olfaktorischen Epithel exprimiert (Brown et al. 2006).

Die Dauer, das Ausmaß, sowie die regionale Distribution der cGMP-Wirkung innerhalb einer Zelle wird bestimmt durch Phosphodiesterasen (PDE). Dies sind Enzyme, die zyklische Nukleotide abbauen: cGMP wird zu Guanosin-5'-monophosphat (GMP), der sekundäre Botenstoff cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat) wird zu AMP (Adenosin-5'-monophosphat) hydrolysiert (Soderling et al. 1998). Von den elf bisher identifizierten Genfamilien der PDEs hydrolysieren PDE5, 6 und 9 hauptsächlich cGMP; PDE4, 7 und 8 sind selektiv für cAMP, die übrigen Mitglieder (PDE1, 2, 3, 10 und 11) hydrolysieren beide zyklischen Nukleotide (Kass et al. 2007). Die C-terminale Region, in der sich auch die katalytische Domäne befindet, stellt eine hoch konservierte Region aller PDEs dar. Im regulatorischen Amino-Terminus der Familien 2, 5, 6, 10 und 11 findet man außerdem sogenannte GAF-Bindungsdomänen, die die Bindung von cGMP als allosterischen



Modulator ermöglichen, was die jeweilige PDE in ihren aktiven Zustand überführt (Omori and Kotera 2007). Des Weiteren unterscheidet man innerhalb der PDE-Gruppen diverse Subfamilien und Spleißvarianten (bezeichnet mit Großbuchstaben, z.B. PDE1C) mit großen Variationen bezüglich ihrer Distribution in unterschiedlichen Geweben und Spezies (Bender and Beavo 2006). Abb. 1.5 gibt einen Überblick über die wichtigsten im Gesamtherz vorkommenden PDEs und deren Substratspezifität.



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung kardialer Phosphodiesterasen.**

Dargestellt sind die wichtigsten Phosphodiesterasen (PDE) im Gesamtherz, unabhängig von ihrem exakten zellulären Verteilungsmuster. Grüne Pfeile symbolisieren die Hydrolyse von cGMP (zyklisches Guanodin-3',5'-monophosphat), bzw. cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat) durch die jeweilige PDE. Rot impliziert die Hemmung der PDE3 durch cGMP, was sich funktional in einer extrem verlangsamten Hydrolyseaktivität für cAMP äußert. Gelbe Pfeile zeigen die Aktivierbarkeit der jeweiligen PDE-Isoform durch cGMP. Esterasen der PDE1-Familie werden überdies durch Calcium/Calmodulin ( $Ca^{2+}/CaM$ ) aktiviert. Das Schema wurde erstellt nach Kass et al. (2007), sowie nach Zaccolo & Movsesian (2007).

Die unterschiedlichen Substratspezifitäten implizieren somit im Herzen einen gewissen *Crosstalk* zwischen den PDEs in der Feinregulation der Konzentration zyklischer Nucleotide (Lincoln et al. 1995, Rybalkin et al. 2003). Während sämtliche kardiale Isoformen der PDE4 exklusiv cAMP hydrolysieren (Stangherlin and Zaccolo 2012), findet man bei allen Unterfamilien der PDE1 eine duale Affinität für cGMP und cAMP. Hierbei sind die Subtypen PDE1A und PDE1B etwas selektiver für cGMP, PDE1C weist eine höhere Affinität für cAMP auf. Die Besonderheit aller PDE1-Isoformen ist eine Bindestelle für Calmodulin und somit die allosterische Aktivierbarkeit durch  $Ca^{2+}$  (Sonnenburg et al. 1995). Die PDE2 ist ebenfalls in der Lage, cAMP und cGMP zu hydrolysieren. Die Bindung von cGMP in der GAF-B-Domäne führt jedoch zu einer Aktivitätssteigerung der PDE2 und zu einer bevorzugten Hydrolyse von cAMP. Signalwege oder Pharmaka, welche die intrazelluläre cGMP-Konzentration erhöhen und gleichzeitig cAMP-Spiegel senken, stellen in diesem Kontext ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Therapie von Herzerkrankungen dar (Martinez et al. 2002, Nikolaev et al. 2005). Im Gegensatz hierzu weist die PDE3 zwar eine hohe Affinität für cGMP auf, die Hydrolysegeschwindigkeit ist jedoch derart niedrig, sodass schon kleinste Mengen dieses Nucleotids zu einer kompetitiven Hemmung der PDE3 führen und letztendlich auch

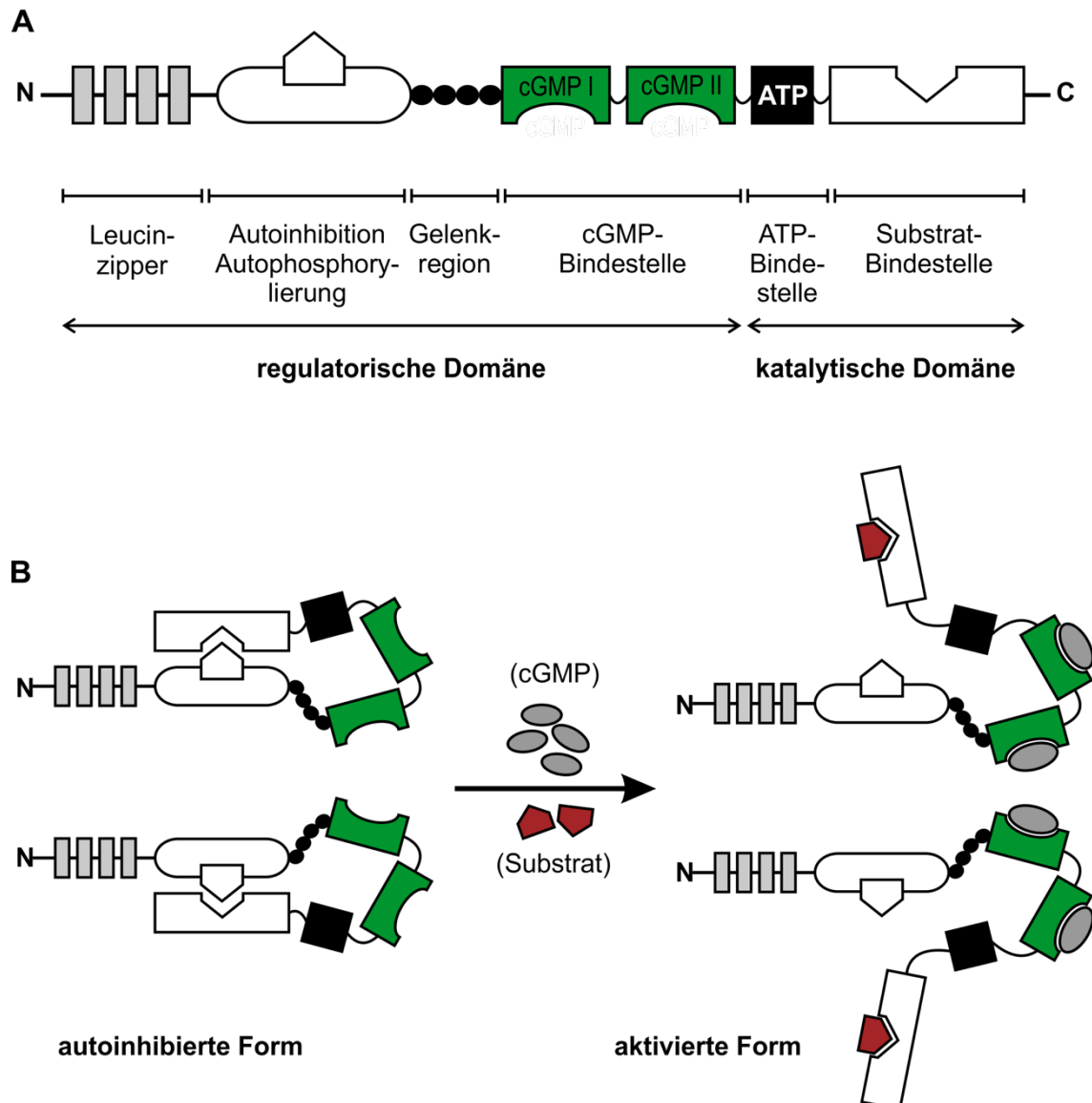
cAMP nicht mehr abgebaut werden kann (Degerman et al. 1997). Somit beeinflussen cGMP-Spiegel auf unterschiedliche Weise über PDE2 und PDE3 die tatsächliche Konzentration von cAMP. Erhöhte cGMP-Level können außerdem durch eine Kreuzaktivierung direkt die Aktivität von cAMP-abhängigen Proteinkinasen modulieren (Zaccolo and Movsesian 2007). Sowohl der *Crosstalk* zwischen unterschiedlichen PDEs als auch die Distribution der Esterasen innerhalb eines Zellkompartiments z.B. die Lokalisation im Zytosol, in Caveolae, dem T-Tubuli-System, in unmittelbarer Nähe des Zellkerns oder am Sarkomer können die Herzfunktion durch ihre Hydrolyseaktivität in diesen sogenannten Mikrodomänen entscheidend beeinflussen (Fischmeister et al. 2006). Ferner findet man häufig ein inhomogenes Expressionsmuster der PDEs bezüglich kardialer Myozyten, Glattmuskel- und Endothelzellen sowie Fibroblasten, was eine definitive Aussage zur isolierten Bedeutung bestimmter Esterasen für die Gesamtherzfunktion erschwert. So wird beispielsweise die PDE5 in gesunden Herzen von Mäusen, wie auch von Menschen, kaum in Myozyten exprimiert (Pokreisz et al. 2009, Vandeput et al. 2009). PDE5, als hochselektive cGMP-abbauende PDE, wird ebenfalls durch Bindung des zyklischen Nukleotids an die GAF-Domänen aktiviert (McAllister-Lucas et al. 1993). Die Aktivität der PDE5 kann durch die cGKI-abhängige Phosphorylierung am Serin-102, im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus zur Feinregulierung der intrazellulären cGMP-Konzentration, noch verstärkt werden (Mullershausen et al. 2004). Mit Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil und Avanafil (s. Kapitel 1.2.6.) stehen für die PDE5 die meisten und selektivsten Hemmstoffe zur Verfügung (Smith et al. 2013). Im Rahmen hypertropher Herzerkrankungen sind die Expression, Lokalisation und vor allem die Aktivität der PDEs verändert, sodass die pharmakologische Beeinflussung dieser Enzyme weiterhin von großem therapeutischen Interesse ist (Movsesian et al. 2009). Kürzlich wurden erhöhte PDE9-Spiegel in hypertrophen und insuffizienten Herzen postuliert. Diese PDE hydrolysiert ebenfalls exklusiv cGMP, sowohl die genetische Ablation als auch die pharmakologische Hemmung führte im Mausmodell zu einer Verbesserung der kardialen Symptomatik (Lee et al. 2015).

### 1.2.2 Struktur, Funktion und Vorkommen cGMP-abhängiger Proteinkinasen

Die wichtigsten cGMP-Effektoren sind zweifelsohne die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKs), die den Serin/Threonin-Kinasen zuzuordnen sind (Scott 1991). In Säugern stellen drei cGK-Isoformen das Produkt von zwei Genen, *prkg1* und *prkg2* dar. Die Spleißvarianten cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  entstammen dem *prkg1* Gen und sind strukturell sowie funktionell der cGKII, die von *prkg2* kodiert wird, sehr ähnlich (Pfeifer et al. 1999, Vallur et al. 2014).

Die cGKs vereinen regulatorische und katalytische Domänen in einem Protein (s. Abb. 1.6). Sie liegen stets als Homodimere vor, was durch das Leucinzipper-Motiv in der N-terminalen Region vermittelt wird (Hofmann et al. 1992). Am C-Terminus befindet sich die Bindestelle für Mg<sup>2+</sup>-ATP sowie die katalytische Domäne, die den Transfer eines Phosphatrestes von ATP auf ein Serin oder Threonin des jeweiligen Substrates bewerkstelligt. In der regulatorischen Domäne existieren zwei allosterische Bindungsstellen für cGMP. Die

Besetzung dieser durch cGMP resultiert in einer Autophosphorylierung des Amino-Terminus und einer Konformationsänderung des Enzyms. Hierbei wird das Zentrum der katalytischen Domäne von der Autoinhibition durch die Pseudosubstratbindestelle freigegeben und zur Bindung des eigentlichen Substrates mit dessen nachfolgender Phosphorylierung verfügbar (Doskeland et al. 1983, Huggins et al. 1991).



**Abb. 1.6: Strukturmodell der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I.**

(A) Schematische Darstellung eines cGKI-Monomeres, bestehend aus einer regulatorischen und einer katalytischen Domäne. (B) Die Bindung von cGMP (2 Moleküle cGMP/Protein) führt zur Dimerisierung und überführt die Kinase von ihrem autoinhibiertem Zustand in ihre aktivierte Form und ermöglicht die Anlagerung und Phosphorylierung spezifischer Substrate. Das Schema wurde modifiziert nach Vallur et al. (2014). Weitere Erklärungen im Text.

Zur Aktivierung der cGKI reichen cGMP-Spiegel im submikromolaren Bereich aus, wobei für die Aktivierung der cGKI $\alpha$  im Vergleich zur  $\beta$ -Isoform ungefähr 10-fach geringere Konzentration benötigt werden (Ruth et al. 1991). Die subzelluläre Positionierung der Kinase zu ihren diversen Substraten wird durch den Amino-Terminus vermittelt. Aus der Länge

dieser Struktur ergibt sich auch der Unterschied zwischen den Isoformen was sich in ungleichen Molekulargewichten (je Monomer 77 kD für cGKI, 87 kD für cGKII) äußert (Hofmann et al. 2000). Des Weiteren sind die löslichen Isoformen cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  im Zytosol lokalisiert, während eine Myristoylierung am Amino-Terminus der cGKII zu einer Verankerung dieses Enzyms in der Plasmamembran führt (Vaandrager et al. 1996). Abundant exprimiert ist die membranständige cGKII in Endothelien von Geweben, die sekretorische Funktionen ausüben: im Gastrointestinaltrakt ist die cGKII an der Regulation der Wasser- und Chloridsekretion (French et al. 1995) und in der Niere an der Renin- und Aldosteronfreisetzung beteiligt (Wagner et al. 1998, Spiessberger et al. 2009). Hohe cGKII-Level findet man unter anderem in Chondrozyten, Lunge, Prostata und sämtlichen Gehirnregionen (Vaandrager et al. 2005). cGKII wird folglich in vielen Geweben parallel zu den cGKI-Isoformen gebildet, vermittelt aber andere Funktionen (Gamm et al. 1995, Lohmann et al. 1997). Weit mehr im Fokus stehen die annähernd ubiquitär vorkommenden Isoformen der cGKI. Dabei ist die cGKI $\alpha$  dominant im Herzmuskel, der Lunge, in Spinalganglien, verlängertem Mark und im Kleinhirn exprimiert (Keilbach et al. 1992, Feil et al. 2005). cGKI $\beta$  ist überwiegend in Thrombozyten, im *Bulbus olfactorius*, Hippocampus und Hypothalamus zu finden (Waldmann et al. 1986, Kleppisch et al. 2003). Im Auge, sowie in Glattmuskelzellen des arteriellen Gefäßsystems, des Gastrointestinaltrakts, der Niere, des Uterus und der Trachea, werden beide Isoformen zu gleichen Anteilen exprimiert (Joyce et al. 1986, Hofmann et al. 2006).

### 1.2.3 Bedeutung des cGMP/cGKI-Signalwegs im Organismus

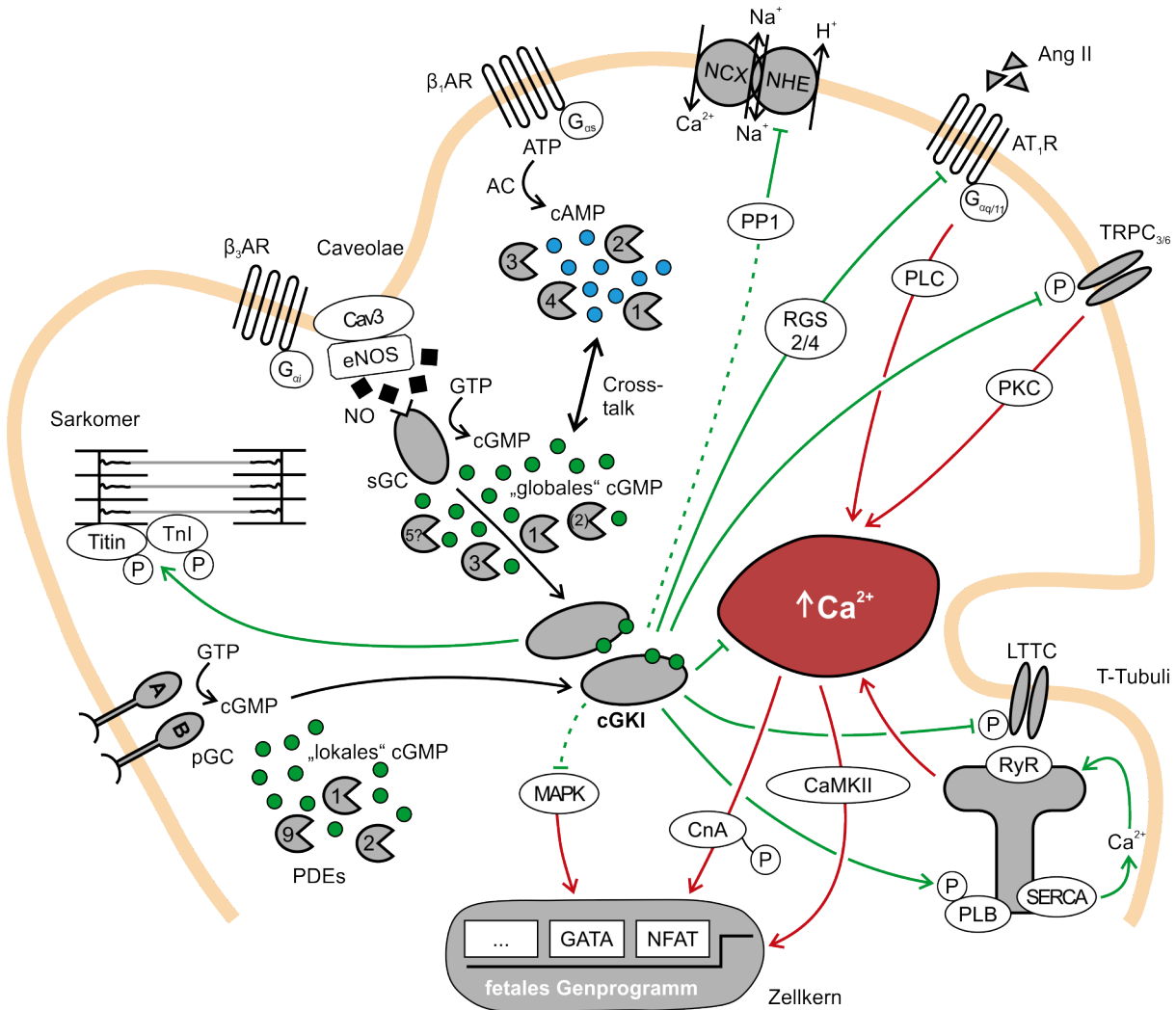
Wesentliche Erkenntnisse zur Aufklärung der physiologischen Bedeutung der cGMP/cGKI-Signalkaskade wurden mit Hilfe von genetisch veränderten Mausmutanten gewonnen. Die Wichtigkeit der cGKI für den Organismus wird umso deutlicher, wenn man bedenkt, dass rund 50% der Tiere mit einer globalen Deletion der Kinase schon im Alter von 4-6 Wochen versterben. Dies ist vor allem auf schwerwiegende vaskuläre und intestinale Defekte zurückzuführen: Aus NANC-Neuronen freigesetztes NO kann seine muskelrelaxierende Wirkung im Gastrointestinaltrakt nicht mehr vermitteln, dies resultiert in einer verlangsamten Darmmotilität mit verlängerten Magen-Darm-Passagezeiten, sowie Pylorusstenosen (Pfeifer et al. 1998). Die Sekretion von Bikarbonat als wichtiger Schutzmechanismus bei vermehrter Bildung von Magensäure, wird unter anderem im Stammhirn in einem komplexen Regulationsmechanismus über den *Nucleus tractus solitarii* durch die neuronale cGKI vermittelt (Singh et al. 2012). In dem globalen cGKI-Knockout-Modell kommt es daher zu spontanen Magenulzerationen verbunden mit Blutarmut (Foller et al. 2008). Dies scheint auch einer der Hauptgründe für das frühe Ableben der cGKI-Mausmutanten zu sein, denn durch die Gabe von Protonenpumpeninhibitoren kann die Lebenszeit dieser Tiere auf circa 20 Wochen verlängert werden (Singh et al. 2012). Alternativ können mittels des induzierbaren Cre/loxP-Systems zell- und gewebespezifische Knockout-Mäuse generiert werden (Kleppisch et al. 1999). Eine weitere Möglichkeit, die vaskulären Defekte zu umgehen und die Widerstandsfähigkeit dieser Tiere zu erhöhen, bietet die spezifische

Reinduktion der cGKI in Glattmuskelzellen. Bei den sogenannten *Rescue*-Mäusen wird das jeweilige  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Isoenzym stabil unter Kontrolle des glattmuskulären SM22-Promotor auf einem eigentlichen cGKI-defizienten Hintergrund exprimiert (Weber et al. 2007). In der Aorta und kleineren Arterien führt die Deletion der cGKI bekanntlich zu einer beeinträchtigten Vasorelaxation (Sausbier et al. 2000). Hierbei unterbleibt die cGKI-abhängige Phosphorylierung wichtiger Zielstrukturen, wie beispielsweise des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten und spannungsgesteuerten  $\text{K}^+$ -Kanal mit hoher Leitfähigkeit (BK-Kanal) (Zhou et al. 2001), von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (Yang et al. 2007) und IRAG (IP3-Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinase Substrat) (Schlossmann et al. 2000) sowie RhoA (Somlyo and Somlyo 2000) und MYPT1, die regulatorische Untereinheit der Myosin-Leichtkettenphosphatase (Surks et al. 1999). Dies führt zu erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegeln und einer verstärkten Kontraktilität und ist somit korrelierbar mit dem erhöhten Blutdruck in cGKI-defizienten Tieren (Somlyo et al. 1999, Moosmang et al. 2003, Geiselhoring et al. 2004, Sausbier et al. 2005). Des Weiteren moduliert die cGKI wichtige Funktionen von glatten Muskelzellen wie Adhäsion, Proliferation und Apoptose (Wolfsgruber et al. 2003, Weinmeister et al. 2008). Vaskuloproliferative Umbauprozesse im Zuge einer experimentellen Restenose durch Karotisligatur werden durch die cGKI im Mausmodell aber nicht beeinflusst (Lukowski et al. 2008). Tiere mit einer Deletion der cGKI zeigen außerdem einen prokoagulatorischen Phänotyp (Massberg et al. 1999). Insbesondere nach neurohumoral induziertem Bluthochdruck besteht die Gefahr einer Thrombozytenaktivierung durch erhöhte Scherbelastung (Patrucco et al. 2014). Die Rolle der cGKI in Kardiomyozyten und bei kardialer Hypertrophie wird im Kapitel 1.2.5 ausführlich beschrieben. Im Zentralnervensystem moduliert die Kinase die Verarbeitung von Emotionen, die Proteinsynthese im Rahmen der Langzeitpotenzierung bei Lernvorgängen und den Wach/Schlaf-Rhythmus (Kleppisch et al. 2003, Werner et al. 2004, Paul et al. 2008, Langmesser et al. 2009). Ferner ist die CNP/GC-B vermittelte Aktivierung der cGKI in der neuronalen Entwicklung für die Bildung von Verzweigungen sensorischer Axone in der dorsalen Eintrittszone des Rückenmarks von funktioneller Bedeutung (Schmidt et al. 2002). Dementsprechend zeigen cGKI-defiziente Tiere eine verminderte Nozizeption (Tegeder et al. 2004). Die Deletion der Kinase führt außerdem zu einem komplexen metabolischen Phänotyp mit einem reduzierten Ganzkörper- und Leberfettgehalt einhergehend mit hepatischer Inflammation und Nüchternhyperglykämie (Lutz et al. 2011). Dabei ist die erhöhte Blutglukosekonzentration vielmehr auf eine cGKI $\alpha$ -abhängige Regulation der Glucagon- als der Insulinsekretion zurückzuführen (Leiss et al. 2011). Außerdem ist die CNP-induzierte Ossifikation von chondralen Vorläuferknochen in den cGKI-KO Tieren gestört (Miyazawa et al. 2002). Dies betrifft vor allem das Längenwachstum von Röhrenknochen.

#### 1.2.4 Effektorproteine der cGKI in Kardiomyozyten

Verschiedene Mechanismen und Signalkaskaden, die das Zellwachstum und das Überleben der Kardiomyozyten, den Energiehaushalt, metabolische Vorgänge sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und die Herzmuskelkontraktion regulieren, greifen ineinander über und bieten auch der cGKI vielfältige Möglichkeiten, modulierend zu intervenieren. Obgleich in den

letzten Jahren einige kardiomyozytäre Effektoren der cGKI beschrieben wurden, sind gewiss noch nicht alle kardialen Zielstrukturen identifiziert (Shah and Mann 2011, Hofmann and Wegener 2013). Der cGKI wird insbesondere eine protektive Rolle bei Ang II-induzierter Herzmuskelhypertrophie zugeschrieben (Frantz et al. 2013). Abb. 1.7 gibt eine Übersicht der cGKI-Substratproteine und Signalwege, welche von der myozytären cGKI in gesunden sowie hypertroph-umgestalteten Herzen moduliert werden.



**Abb. 1.7: Schematische Darstellung von cGKI-Substraten im (hypertrophen) Herzmuskel.**  
 Grün dargestellt sind Interaktionen der cGKI mit bisher identifizierten Substraten in Kardiomyozyten. Die Interaktion, bzw. Modulation dieser Zielstrukturen ist essentiell für die Myozytenfunktion, insbesondere im Sinne eines gegenregulatorischen Mechanismus bei kardialer Hypertrophie. Prohypertrophe Signalwege sind rot hervorgehoben. Das Schema wurde modifiziert nach Balligand & Hammond (2013) und Perera et al. (2015). GTP: Guanosin-5'-triphosphat; cGMP: zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat; sGC: lösliche Guanylatzyklase; pGC: partikuläre Guanylatzyklase; PDE: Phosphodiesterase; cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I; Ca<sup>2+</sup>: Calcium; NO: Stickstoffmonoxid; eNOS: endotheliale NO-Synthase; ATP: Adenosin-5'-triphosphat; cAMP: zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat; AC: Adenylatzyklase; β<sub>1</sub>AR: β<sub>1</sub>-Adrenozeptor; LTTC: Spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanal; AT<sub>1</sub>R: Angiotensin II Rezeptor Subtyp1; Ang II: Angiotensin II; PLC: Phospholipase C; PKC: Proteinkinase C; TRPC: *Transient Receptor Potential Canonical*; PP1: Proteinphosphatase1; RGS: *Regulator of G-protein signaling*; SERCA: Sarkoplasmatische und endoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-ATPase; PLB: Phospholamban; RyR: Ryanodin-Rezeptor; CnA: Calcineurin A; CaMKII: Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; NFAT: Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen; Cav3: Caveolin 3; β<sub>3</sub>AR: β<sub>3</sub>-Adrenozeptor; TnI: Troponin I.

Unbestritten ist der Einfluss der Kinase auf die myozytäre Erregungsleitung und die Kontraktilität durch Regulierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Kardiales cGMP vermittelt negative Inotropie unabhängig von muskarinergen parasymphathischen Signalwegen (Wegener et al. 2002). Dies könnte auf eine Hemmung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen oder eine Desensibilisierung von kontraktilen Filamenten gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  zurückzuführen sein (Shah et al. 1994, Sumii and Sperelakis 1995). In der Tat phosphoryliert die Kinase Troponin I, was die Fähigkeit des Myokards zur Relaxation erhöht und negativ inotrope, sowie positiv lusitrope Effekte der cGKI begründet (Layland et al. 2002). Ein weiteres Substrat des kontraktilen Apparates ist Titin, das „Rückgrat“ des Sarkomers. Neben der PKA trägt die cGKI-Phosphorylierung ebenfalls zur diastolischen Relaxation bei, indem der kontraktile Apparat nach der Systole rasch wieder in die Ausgangsposition zurück gestellt wird (Kruger et al. 2009). Diese Befunde werden dadurch untermauert, dass auch bei insuffizienten humanen Herzen ein Zusammenhang zwischen verringerten cGKI-Proteinmengen, Titin-Hypophosphorylierung und erhöhter Steifigkeit des Herzmuskels in der Diastole gefunden werden konnte (Borbely et al. 2009, van Heerebeek et al. 2012).

Während des Aktionspotentials sind hauptsächlich  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ (LTTC) in den T-Tubuli der Kardiomyozyten für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum verantwortlich (Hess 1988). Durch die cGKI-vermittelte Phosphorylierung der  $\alpha$ -1C und  $\beta$ -2A Untereinheiten des  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals wird dessen Aktivität und Durchlässigkeit und somit auch die nachfolgende  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (CICR) aus sarkoplasmatischen Speichern über Ryanodin-Rezeptoren vermindert (Schroder et al. 2003, Yang et al. 2007). Dieser hemmende Einfluss der cGKI ist konträr zur PKA-vermittelten Stimulation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen, somit besteht auf Ebene der Kanalphosphorylierung sogar eine antagonistische Wirkung von cGMP auf die cAMP-induzierte Inotropiesteigerung (Hartzell and Fischmeister 1986). Nach erfolgter Kontraktion, vor allem zur Vermeidung von Extrasystolen, muss  $\text{Ca}^{2+}$  in der Diastole schnellstmöglich wieder aus dem Zytosol eliminiert werden. Auch an diesem Prozess ist die cGKI beteiligt, indem sie am Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) Phospholamban (PLB) phosphoryliert. Ausschließlich phosphoryliertes PLB aktiviert die SERCA2, die nach erfolgter Kontraktion  $\text{Ca}^{2+}$  zurück ins SR pumpt und so ebenfalls zur positiven Lusitropie beiträgt (Raeymaekers et al. 1988). Ein weiteres Substrat im Kontext der Feinjustierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Myozyten ist der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher (NHE). Dieser annähernd ubiquitär exprimierte Antiporter schleust pH-abhängig ein Proton ( $\text{H}^+$ ) im Austausch mit  $\text{Na}^+$  aus der Zelle (Slepkov and Fliegel 2002). Dieses wird sogleich gegen  $\text{Ca}^{2+}$  durch den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) wieder aus der Zelle hinaus transportiert. Diese Reaktion läuft aber nur in diese Richtung, solange NHE phosphoryliert ist. Die cGKI greift hierbei indirekt ein, indem sie die Proteinphosphatase 1 (PPI) aktiviert, diese dephosphoryliert NHE und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird letztlich gesenkt (Yeves et al. 2010). Experimentell konnte durch Aktivierung des NHE eine kardiale Hypertrophie induziert werden, ein intaktes cGMP/cGKI-System scheint diesem Prozess entgegenwirken zu können (Kilic et al. 2005, Nakamura et al. 2008).

Erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sind jedoch nicht nur bei der Herzerregung und bei Kontraktionsvorgängen nachteilig, auch viele Signalwege, die über die Induktion des fetalen Genprogrammes zu einer Myokardhypertrophie führen, sind einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Überschuss geschuldet (s. Kapitel 1.1.3 und 1.1.4). Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass Ang II den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über TRPC-Kanäle (*transient receptor potential canonical*) steuert. Vor allem die Subtypen TRPC1, C3 und C6 sind durch pathophysiologisch verändertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling mit konsekutiver PLC-Aktivierung in die Entstehung kardialer Hypertrophie und Fibrosierung involviert (Onohara et al. 2006, Seth et al. 2009). TRPC3 und insbesondere TRPC6 sind Substrate der cGKI (s. Abb. 1.7). Bei erhöhten Ang II-Spiegeln ist die funktionelle Kopplung zwischen der cGKI und TRPC3 bzw. TRPC6 Proteinen von besonderer Bedeutung, was dadurch gezeigt werden konnte, dass Mäuse mit einer Deletion aller drei Proteine ein vielfach höheres Ausmaß an kardialer Hypertrophie und Fibrosierung aufweisen, als Mäuse mit einer genetischen Ablation einer dieser drei Komponenten (Domes et al. 2014). Der cGMP/cGKI-Signalweg greift im Kontext des  $\text{Ca}^{2+}$ -Überangebots auch hemmend in die CnA/NFAT-Signalkaskade ein (Fiedler et al. 2002). Es ist nicht auszuschließen, dass die Kinase CnA und/oder NFAT-Transkriptionsfaktoren direkt phosphorylieren kann, wahrscheinlicher ist jedoch eine übergeordnete Funktion des cGMP/cGKI-Signalwegs auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über LTTCs oder TRP-Kanäle, wodurch die Phosphatase-Aktivität von CnA letztlich herabgesetzt wird (Houser and Molkentin 2008, Kinoshita et al. 2010, Koitabashi et al. 2010). Auf ähnlichem Wege scheint auch die multifunktionelle Serin/Threonin-Kinase CaMKII durch cGKI gehemmt zu werden (Kirchhof et al. 2004). Defekte in der Expression, Struktur und Funktion der CaMKII sind generell assoziiert mit Arrhythmien und hypertrophen Umbauprozessen (Anderson 2005). Des Weiteren werden JNK/ERK1/2 und AKT/GSK-3 $\beta$  als weitere Komponenten hypertropher Signalwege durch cGKI moduliert und somit die transkriptionelle Induktion des kardialen *Remodelings* blockiert (Hammond and Balligand 2012).

Wichtig für die Abschaltung GPCR-vermittelter pro-hypertropher Signalwege sind RGS-Proteine (*Regulator of G protein signaling*). RGS-Proteine verkürzen die Dauer der Rezeptoraktivität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch eine Beschleunigung der Hydrolyse von GTP zu GDP. Die cGKI-abhängige Phosphorylierung erhöht im Herzen vor allem die Aktivität von RGS2 und RGS4 (Xie and Palmer 2007, Tokudome et al. 2008, Takimoto et al. 2009). Essentiell in diesem Zusammenhang ist die Kinase-vermittelte Translokation von RGS2 zur Plasmamembran als initialer Schritt zur Beendigung von Ang II-Signalen (Klaiber et al. 2010).

Viele der hier genannten und in Abb. 1.7 dargestellten Interaktionspartner der cGKI, insbesondere Effektorproteine, die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase regulieren, sind ebenso Substrate der PKA. Dabei besitzen diese Kinasen sowohl synergistische als auch gegensätzliche Effekte. Diese sind für die Feinjustierung der Myozytenfunktion in gesunden und hypertrophumgestalteten Herzen wichtig (Hofmann and Wegener 2013). In diesem Kontext ist auch zwischen sogenanntem „lokalem“ und „globalem“ cGMP zu unterscheiden. Diese funktionale Kompartimentierung unterschiedlicher cGMP-Pools resultiert einerseits aus dem



Verteilungsmuster cGMP-abbauender PDEs (s. Kapitel 1.2.1), sowie aus lokal begrenzter cGMP-Bildung über pGCs oder der Generierung von cGMP über weitläufig im Zytosol exprimierte sGCs. Diese Tatsache wird beispielsweise in einem unterschiedlichen Einfluss der verschiedenen GCs auf die Kontraktilität wiedergespiegelt. Die sGC-induzierte cGMP-Bildung vermittelt negative Inotropie *in vitro* und *in vivo* sowohl unter Basalbedingungen als auch nach sympathomimetischer Stimulation. Jedoch ist dieser Effekt nach Aktivierung der membranständigen GC-A durch ANP in den meisten Studien nicht zu beobachten. (Gauthier et al. 1998, Cawley et al. 2011). Sogar innerhalb der Gruppe der pGCs wurden kompartimentspezifische Unterschiede auf Myozytenebene ermittelt, so führt nur eine CNP-vermittelte Stimulation der GC-B zu einer verstärkten Phosphorylierung von PLB (Frantz et al. 2013). Die dadurch verbesserte  $Ca^{2+}$ -Verwertung könnte eine Erklärung für die gesteigerte Kontraktionskraft in hypertrophen und insuffizienten Herzen nach Stimulation mit CNP darstellen (Wollert et al. 2003, Qvigstad et al. 2010).

### 1.2.5 Rolle des cGMP/cGKI-Signalwegs bei hypertrophen Herzerkrankungen

Im Herzen wird cGMP bzw. der cGKI eine Schutzfunktion gegenüber hypertrophem Wachstum und Fibrosierung zugeschrieben (Ritchie et al. 2009). Jedoch ist kardiale Hypertrophie eine sehr heterogene Erkrankung und nicht auf einzelne Strukturen, Signalwege oder sogar bestimmte Zelltypen des Myokards zu reduzieren (s. Kapitel 1.1.4). So ist es z. B. möglich, dass die Kinase auch in kardialen Fibroblasten, Endothelzellen, oder Glattmuskelzellen wichtige Funktionen erfüllt, auch wenn die Mehrheit der bislang identifizierten protektiven Effekte des cGMP/cGKI-Signalwegs in Kardiomyozyten beschrieben wurden (Lukowski et al. 2014).

Erste Erkenntnisse hierzu wurden mit Hilfe von Mäusen mit einer Deletion für GC-A, dem membranständigen Rezeptor für ANP und BNP, gewonnen. Herzen von globalen GC-A Knockout-Mäusen zeigten eine massive Hypertrophie und Fibrosierung, was nicht ausschließlich auf den Blutdruckanstieg zurückzuführen war (Oliver et al. 1997, Knowles et al. 2001). Ein kardiomyozytenspezifisches Ausschalten von GC-A bestätigte diesen Befund (Holtwick et al. 2003). Zusätzlich war es möglich, durch eine kardiomyozytäre Überexpression von GC-A auf einem eigentlichen Knockout-Hintergrund die kardialen Umbauprozesse rückgängig zu machen (Kishimoto et al. 2001). Experimente an isolierten Kardiomyozyten zeigten außerdem, dass eine durch Phenylephrin oder Ang II induzierte Hypertrophie auf zellulärer Ebene durch ANP, BNP und CNP attenuiert werden kann und stützen somit die *in vivo*-Versuche (Calderone et al. 1998, Rosenkranz et al. 2003). Bezüglich BNP war dies durchaus ein interessanter Befund, denn im Ganztiermodell standen bisher meist die antifibrotischen Effekte dieses natriuretischen Peptids im Vordergrund (Tamura et al. 2000, Ogawa et al. 2001). Für CNP wurden ebenfalls antihypertrophe und antifibrotische Effekte postuliert (Soeki et al. 2005). Kürzlich wurde die Generierung eines konditionalen GC-B-Knockouts publiziert (Ter-Avetisyan et al. 2014). Diese Mauslinie erlaubt

zukünftig die Erforschung kardialer Funktion von CNP und seinem Rezeptor GC-B in unterschiedlichen Hypertrophie-Modellen *in vivo*.

Die Deletion der endothelialen NO-Synthase (eNOS) resultiert in einer lokal verminderten NO-Produktion. Dies führt sowohl altersabhängig als auch nach experimentell induziertem Bluthochdruck mittels TAC zu konzentrisch hypertrophierten Kardiomyozyten, interstitieller Fibrose und diastolischer Dysfunktion (Ruetten et al. 2005, Flaherty et al. 2007). Der proliferative Effekt konnte auch unabhängig von Gefäßen bzw. Endothelien anhand isolierter eNOS-defizienter Myozyten gezeigt werden (Wenzel et al. 2007). Dies impliziert eine Beteiligung der sGC als primärer NO-Rezeptor und Generator des sogenannten „globalen cGMPs“ innerhalb der Kardiomyozyten an diesen Effekten. Tatsächlich konnten Studien mit sGC-Aktivatoren einen wachstumsinhibierenden Effekt zeigen (Deruelle et al. 2006, Irvine et al. 2012). Experimente zur Bestimmung der am *Remodeling* beteiligten sGC in den unterschiedlichen Herzzelltypen stehen aber noch aus und werden zukünftig von einem kürzlich generierten Mausmodell mit gefloxtem sGC-Gen profitieren (Friebe et al. 2007).

Bis dato weisen sämtliche experimentell verfügbaren Substanzen zur direkten Stimulation der cGKI eine zu geringe Spezifität auf (Burkhardt et al. 2000). Deshalb wird neben der Erhöhung intrazellulärer cGMP-Spiegel durch NO, bzw. NO-freisetzenden Substanzen, natriuretischen Peptiden oder cGMP-Analoga, auch der Abbau des zyklischen Nucleotids gehemmt. Hierfür werden PDE5-Hemmstoffe wie Sildenafil (SIL) eingesetzt (s. Kapitel 1.2.6). In diesem Zusammenhang konnten Takimoto et al. eine durch TAC induzierte Herzhypertrophie durch die Gabe von SIL rückgängig machen. Dies wurde zunächst mit einer Aktivitätssteigerung der cGKI im Kardiomyozyt und die daraus resultierenden protektiven Eigenschaften auf das Herzwachstum erklärt (Takimoto et al. 2005). Tatsächlich konnten diese Ergebnisse aber weder mit globalen cGKI-Knockout- noch mit  $\beta$ -*Rescue*-Mäusen bestätigt werden: Die Deletion der cGKI wirkte sich nicht nachteilig auf das Gesamtausmaß der kardialen Hypertrophie nach TAC aus. Ebenso ergaben sich keine Unterschiede im krankhaften Myokardwachstum nach 7-tägiger Behandlung mit dem Sympathomimetikum Isoprenalin zwischen cGKI-defizienten Tieren und deren WT-Wurfgeschwister (Lukowski et al. 2010). Diese und weitere Arbeiten lassen außerdem den Schluss zu, dass eventuell vorhandene antihypertrophe Effekte der cGKI abhängig vom vorausgehenden hypertrophen Stimulus sind (Klaiber et al. 2010). So zeigen Tiere mit einer kardiomyozytenspezifischen Deletion der cGKI nach Behandlung mit Ang II als Agonist an  $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptoren einen dekompenzierten Phänotyp mit signifikant verschlechterter Herzfunktion und massiven Einlagerungen von Extrazellulärmatrix (Frantz et al. 2013). Westermann et al. gelang es in einer Studie mit Wildtyp-Tieren, die Kardiomyozytengröße und vor allem die Ang II-induzierte Fibrosierung des Myokards durch die orale Gabe von SIL signifikant zu verringern (Westermann et al. 2012). Aufgrund der ausgeprägten antifibrotischen Effekte wird vermutet, dass möglicherweise nicht die myozytäre cGKI, sondern vielmehr die Kinase in Fibroblasten/Myofibroblasten kardiale *Remodeling*prozesse positiv beeinflusst. Insbesondere, weil die exzessive Ang II-induzierte Fibrose durch zusätzlicher Gabe von SIL nur in cGKI-Wildtyp-Tieren, nicht aber in  $\beta$ -*Rescue*-

Mäusen, deren Kardiomyozyten nachweislich cGKI-negativ sind, abgeschwächt werden konnte (Patrucco et al. 2014). Grundsätzlich wird sogar die Existenz der PDE5, der mutmaßlich primären Zielstruktur des Pharmakons SIL sowohl im murinen Kardiomyozyt (Lukowski et al. 2010), als auch im Mausherz generell in Frage gestellt (Degen et al. 2015). Offensichtlich besteht in der Aufklärung des Zusammenspiels zwischen cGMP, cGKI sowie der antihypertrophen Wirkung cGMP-erhöhender Pharmaka und den hier möglicherweise involvierten *Downstream*-Effektoren in den unterschiedlichen Herzzelltypen noch erheblicher Forschungsbedarf (Hofmann and Wegener 2013). Eine signifikante Verbesserung der Herzfunktion durch SIL wurde in einem Mausmodell für Muskeldystrophie vom Typ Duchenne beobachtet (Adamo et al. 2010). Auch hier stellt sich die Frage, welche kardialen Zelltypen und welche PDE hauptsächlich beeinflusst werden, denn SIL kann in hohen Konzentrationen neben PDE5 auch die Isoformen PDE1 und PDE2 blockieren (Vandeput et al. 2009, Lukowski et al. 2014).

### 1.2.6 cGMP-Generatoren und Effektoren, sowie PDEs als Arzneistofftargets

Auch mehr als 150 Jahre nach Alfred Nobel wird Glyceroltrinitrat noch immer in Form von Aerosolen zur Kupierung akuter pektangiöser Beschwerden eingesetzt (Wimalawansa 2008). Molsidomin und Isosorbidmononitrat (ISMN) sind gefäßerweiternde NO-Donatoren, die zur Prophylaxe der Angina Pectoris verwendet werden (Schlossmann and Hofmann 2005). Aber auch andere Komponenten des cGMP/cGKI-Signalwegs stellen attraktive Zielstrukturen für die Entwicklung innovativer Arzneimittel dar. Neue, sehr vielversprechende Pharmaka beeinflussen den Rezeptor für NO, die lösliche Guanylatzyklase. Hierbei unterscheidet man zwischen sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren; beide Arzneistoffklassen agieren unabhängig von NO, erstere benötigen aber eine funktionsfähige Häm-Gruppe und können somit auch synergistisch mit NO wirken (Evgenov et al. 2006). Nach überzeugenden Studienergebnissen wurde kürzlich Riociguat als erster Vertreter dieser Stoffklasse zur Behandlung der Pulmonalen Hypertonie und der Chronisch-Thromboembolischen Pulmonalen Hypertonie zugelassen (Ghofrani et al. 2013). Als Folge von oxidativem Stress, der typischerweise bei Perfusionsstörungen des Herzens auftritt, liegt die sGC häufig in oxidiertem bzw. Häm-freiem und somit inaktivem Zustand vor. Unter diesen Bedingungen können jedoch Aktivatoren wie Cinaciguat die Funktion der sGC und damit protektive Effekte von cGMP erhalten (Stasch et al. 2002). So wurde bereits das Infarktareal bei experimentell erzeugter Ischämie durch gleichzeitige Gabe des sGC-Aktivators Cinaciguat nur bei intaktem cGKI-Signaling signifikant reduziert. (Methner et al. 2013, Bice et al. 2014). Insbesondere nach Wiederöffnen des verschlossenen Gefäßabschnittes führt das erhöhte Angebot von molekularem Sauerstoff zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die über verschiedene molekulare Signalkaskaden letztlich den Zelltod induzieren (Ferdinandy et al. 2007, Soltysinska et al. 2014). Eine Aktivierung der sGC und die resultierende Erhöhung der cGKI-Aktivität zum Schutz vor Reperfusionsschäden, könnte demnach ein künftiger therapeutischer Ansatz bei der Behandlung des Myokardinfarkts darstellen (Methner et al. 2013). Die Effektivität dieser Substanzklasse bei akuter, dekompensierter Herzinsuffizienz

wird momentan in klinischen Studien untersucht (Hingorany and Frishman 2011). Klinische Ansätze, die partikulären Guanylatzyklen zu stimulieren, erfüllten die hohen Erwartungen bislang jedoch nicht, so konnte mit dem BNP-Analogen Nesiritid kein Überlebensvorteil und keine Verbesserung der Symptomatik bei dekompensierter Herzinsuffizienz erreicht werden (Sackner-Bernstein et al. 2005, O'Connor et al. 2011). Dies könnte auf eine Herunterregulation und/oder Desensibilisierung der GC-A Rezeptoren bei diesem Krankheitsbild zurückzuführen sein (Kuhn 2003, Flora and Potter 2010). Denkbar wäre aber auch eine cGMP-vermittelte Hemmung der PDE3, wodurch eine verstärkte cAMP/PKA-induzierte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung zu einer gesteigerten Noradrenalin-Freisetzung aus kardialen Nervenendigungen führt. Der auf diese Weise erhöhte Sympathikotonus stellt für ein geschwächtes Herz wiederum eine Mehrbelastung dar (Chan et al. 2012). Ergebnisse neuerer Studien mit Substanzen, die nur den GC-B Rezeptor oder beide pGCs stimulieren stehen noch aus (Martin et al. 2012). Insbesondere eine Stimulation von GC-B scheint interessant: Bislang wurde keine Desensibilisierung von GC-B beschrieben und eine Stimulation dieses Rezeptorsubtyps mit CNP stoppte im Mausmodell kardiale Umbauprozesse sowohl nach Ang II-Infusion, als auch nach Myokardinfarkt (Hobbs et al. 2004, Izumiya et al. 2012).

Eine direkte Stimulation der cGKI scheint ebenso ein vielversprechender Behandlungsansatz bei hypertrophen und ischämischen Herzerkrankungen zu sein. Pharmakotherapeutisch konnte dieses Prinzip allerdings nicht realisiert werden, direkte Aktivatoren mit entsprechender Selektivität und Pharmakokinetik sind bisher nicht verfügbar. Jedoch ist es möglich, die Kinase-Aktivität durch die Hemmung des PDE-vermittelten cGMP-Abbaus indirekt zu erhöhen. Hemmstoffe der PDE5 werden seit längerem zur Therapie der erektilen Dysfunktion eingesetzt. Die erhöhten cGMP-Spiegel führen zur Gefäßrelaxation und ermöglichen eine verbesserte Durchblutung des *Corpus Cavernosums* (Boolell et al. 1996). SIL wird außerdem in Monotherapie oder in Kombination mit ET I-Antagonisten, den Sentanen, zur Behandlung der Pulmonalen Hypertonie eingesetzt (Seferian and Simonneau 2013, Galie et al. 2015). Mit den Weiterentwicklungen Tadalafil, Vardenafil und Avanafil konnte die PDE5-Spezifität weiter gesteigert sowie Nebenwirkungen auf das visuelle System verringert werden. Vardenafil kann jedoch eine Verlängerung der QT-Zeit hervorrufen (Smith et al. 2013). Aufgrund positiver Resultate im Tiermodell und kleineren klinischen Studien, wurden große Hoffnungen in SIL für die Therapie der Herzinsuffizienz gesetzt. Die breit angelegten RELAX und SIDAMI-Studien, in die vor allem Patienten mit diastolischer Dysfunktion eingeschlossen waren, konnten die Erwartungen jedoch nicht erfüllen (Andersen et al. 2013, Redfield et al. 2013). Hemmstoffe der PDE5 finden insgesamt die größte therapeutische Anwendung, was gewiss auch auf ihre hohe Spezifität für die PDE5 zurückzuführen ist. Wirkstoffe zur Hemmung weiterer PDEs sind ebenfalls auf dem Markt oder befinden sich in klinischen Prüfungen. Milrinon ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der selektiven PDE3-Hemmstoffe, der zur kurzfristigen Therapie der akuten Herzinsuffizienz eingesetzt wird (Zewail et al. 2003). Studien mit langfristigen Gaben von Milrinon zeigten dagegen eine Zunahme der Sterblichkeit von herzinsuffizienten Patienten (Packer et al. 1991). Auch die Hemmung weiterer kardialer PDEs ist von großem therapeutischen

Interesse, insbesondere eine mögliche Blockade der abundant exprimierten, cGMP-hydrolysierenden Isoformen 1, 2 und 9 (s. Kapitel 1.2.1) bei Herzerkrankungen. Mit BAY73-6199 und PF-04447943 wurden bereits spezifische Hemmstoffe der cGMP-hydrolysierenden PDE9 entwickelt (Hutson et al. 2011). Letztgenannter verbesserte in Nagern die synaptische Plastizität und kognitive Funktionen, zeigte in einer Phase II-Studie beim Menschen zur Therapie von Morbus Alzheimer jedoch keinen Benefit. Nichtsdestotrotz wurde der Arzneistoff aufgrund guter Pharmakinetik und Verträglichkeit als sicher eingestuft und stellt möglicherweise einen alternativen Arzneistoff zur cGMP-Erhöhung bei kardiovaskulären Erkrankungen dar (Schwam et al. 2014, Lee et al. 2015). EHNA (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin) bzw. dessen Folgestrukturen wie BAY60-7750 oder ND-7001 als selektive PDE2-Hemmstoffe befinden sich derzeit noch in der Präklinik. Hinweise auf eine Verbesserung kognitiver Funktionen liegen aber vor (Gomez and Breitenbucher 2013, Xu et al. 2015). In insuffizienten Herzen ist sowohl die Expression, als auch die Aktivität der dualen Esterase PDE2 erhöht. Dies resultiert ebenso in einem verstärkten Abbau von cAMP und impliziert möglicherweise einen endogenen Schutzmechanismus bei intensivierter sympathomimetischer Stimulation. Daher kann vielmehr eine Aktivierung der PDE2 (z.B. mit cGMP, bzw. cGMP-Analoga) zur Dämpfung des adrenergen, sympathischen Systems eine neue Therapiestrategie bei der Behandlung der Herzinsuffizienz darstellen (Mehel et al. 2013). Die Spezifität von verfügbaren PDE1-Hemmstoffen wie Vinpocetin oder 8-MMX ist sehr gering, deshalb gestaltet sich selbst in zellulären Systemen oder Tiermodellen eine Blockade sämtlicher Isoformen und Spleißvarianten der PDE1 schwierig (Goraya and Cooper 2005, Bender and Beavo 2006).

### 1.3 LIM-Proteine

LIM-Motive sind strukturelle Bereiche innerhalb eines Proteins, die aus tandemartig angeordneten Zinkfingerstrukturen bestehen. Namensgebend war die Erstbeschreibung dieser Domänen in den Transkriptionsfaktoren Lin-11 (*C.elegans*), Isl-1 (Ratte) und Mec-3 (*C.elegans*) (Way and Chalfie 1988, Freyd et al. 1990, Karlsson et al. 1990). Durch hochkonservierte Cystein- oder Histidin-reiche Motive werden Zinkionen komplexiert und dazwischen liegende Aminosäuren so ausgerichtet, dass die LIM-Proteine durch die entstandenen Fingerstrukturen zu Interaktionen mit anderen Proteinen, selten auch mit Nukleinsäuren, befähigt werden (Weiskirchen and Gunther 2003). Zinkfinger-Proteine fungieren daher meist als Adapterproteine, die ihre Partner in Komplexen stabilisieren und deren dynamische Interaktionen vermitteln (Schmeichel and Beckerle 1997). LIM-Domänen findet man in vielen Proteinen, die in der Regulation des Zytoskeletts, der Zelladhäsion und Zellmotilität sowie der Signaltransduktion involviert sind (Arber et al. 1998, Khurana et al. 2002). Aufgrund ihres nukleären Translokationssignals (NLS) können diese Proteine auch transient im Zellkern lokalisiert sein und so als Vermittler der Kommunikation zwischen Zytosol und Kernkompartimenten fungieren sowie die Genexpression steuern (Nix et al. 2001, Muller et al. 2002). Aufgrund dieser strukturellen Merkmale kann auf eine essentielle Bedeutung der LIM-Proteine für Zelldifferenzierung, Organentwicklung, Wachstum,

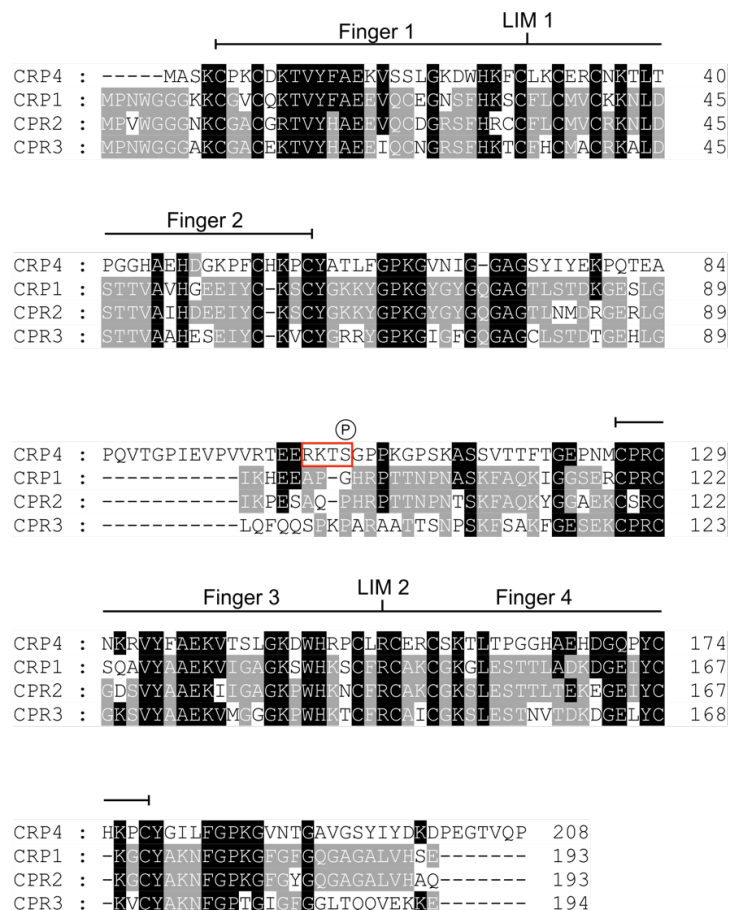
Proliferation und Tumorgenese geschlossen werden (Bach 2000). Im Herzmuskel ist die Expression von mehr als 30 verschiedenen LIM-Proteinen beschrieben, die sich unter anderem in der Anzahl ihrer LIM-Domänen unterscheiden. Regelmäßig sind hierbei zwischen einer und fünf LIM-Domänen pro Protein. Zyxin, Cypher, Nebulette, Elfin und Paxillin sind neben den FHL (*four and a half LIM-domain*) Proteinen und CRP3/MLP (s. Kapitel 1.4.2) die bekanntesten Vertreter (Li et al. 2012). In ihrer Adapterfunktion sind LIM-Proteine unerlässlich für die strukturelle Integrität adulter Kardiomyozyten und in annähernd allen Zellkompartimenten zu finden. In Fokaladhäsionen vermitteln sie im Zusammenspiel mit Integrinen die Signalweiterleitung aus dem Extrazellulärraum über die Strukturen der Costamere bis in den Zellkern (Hervy et al. 2006). Außerdem sind LIM-Proteine durch ihre Lokalisation an der Z-Scheibe und weiteren Elementen des Sarkomers direkt an der Regulation kontraktile Vorgänge beteiligt. Ein Zusammenhang zwischen Fehlfunktionen in LIM-Proteinen und der Entwicklung hypertropher und dilatativer Kardiomyopathien konnte in vielen Organismen, darunter auch Mensch und Maus, gezeigt werden (Hein et al. 2000, Cowling et al. 2011, Knoll et al. 2011).

LIM-Proteine werden je nach Struktur, Vorkommen und Bindungspartner in verschiedene Gruppen eingeteilt. *Nuclear LIM-only* Proteine wie die nukleäre LMO und LHX-Proteinfamilien sind ausschließlich im Zellkern lokalisiert, stellen zumeist Transkriptionsfaktoren dar und sind damit essentiell für die Steuerung der Embryonalentwicklung (Hobert and Westphal 2000). LIM-Proteine mit Kinase-Aktivität der MICAL- und LIM-Kinase Familie (LIMK) sind in der Lage, ihre Interaktionspartner zusätzlich zu phosphorylieren und deren Funktion durch diese direkte Modifikation zu beeinflussen (Edwards and Gill 1999). Eine große, heterogene Gruppe stellen die Aktin-assoziierten LIM-Proteine dar, der ein Großteil aller Zinkfinger-Proteine zugeordnet wird. Sie werden aufgrund ihrer Assoziation zum Aktin-Zytoskelett in diese Gruppe eingeordnet, sind aber ebenso in der Lage, in den Nukleus zu translozieren (Dawid et al. 1998). Im Vordergrund dieser Arbeit steht das Cystein-reiche Protein 4 (CRP4). CRP4 bzw. die Familie der Cystein-reichen LIM-Proteine (s. Kapitel 1.4) werden zu den sogenannten *LIM-only* Proteinen gezählt. *LIM-only* Proteine erhielten diese Bezeichnung, weil annähernd das gesamte Protein aus LIM-Domänen und somit aus Zinkfingern besteht. Diese Proteine sind in vielen Zellkompartimenten lokalisiert, u.a. im Nukleus und an zytoskelettalen Strukturen. *LIM-only* Proteine unterscheiden sich zwar in der Anzahl ihrer LIM-Domänen, weisen aber insgesamt einen hohen Grad an Homologie auf (Kadmas and Beckerle 2004).

### 1.4 Cystein-reiche LIM-Proteine (CRPs)

Die Familie der Cystein-reichen LIM-Proteine besteht aus vier Mitgliedern, die einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen: CRP1 mit seiner genetischen Bezeichnung *Csrp1* (Liebhaber et al. 1990), CRP2 bzw. *Csrp2* (Weiskirchen and Bister 1993), CRP3/MLP bzw. *Csrp3* (Arber et al. 1994) und CRP4, das mit *Crip2* einen von der Nomenklatur der anderen Cystein-reichen Proteine abweichenden Gennamen trägt (Okano et al. 1993, Zhang et al.

2007). Alle Vertreter dieser Proteinfamilie bestehen aus zwei LIM-Domänen, die wiederum zwei Zinkfingerstrukturen beinhalten, gefolgt von einem Glycin-reichen Abschnitt (s. Kapitel 1.4.3, Abb. 1.9). Zwischen den LIM-Domänen befindet sich eine flexible Gelenkregion, dem vierten Zinkfinger folgt das nukleäre Translokationssignal (Louis et al. 1997). Abb. 1.8 zeigt ein *Alignment* der Aminosäureabfolge der Cystein-reichen LIM-Proteine.



**Abb. 1.8: Vergleich der Aminosäuresequenz der Cystein-reichen LIM-Proteine.**

Schwarz unterlegte Aminosäuren implizieren die Übereinstimmung der jeweiligen Aminosäure von CRP4 mit mindestens einem weiteren Vertreter der CRP-Familie. Grau unterlegte Aminosäuren markieren übereinstimmende Aminosäuren innerhalb CRP1-3. Die zinkfingerbildenden Strukturen umspannen große Teile der murinen CRP-Proteine. Rot markiert ist die RPKTS-Sequenz als putative Phosphorylierungsstelle der cGKI. Modifiziert nach Huber et al. (2000). Weitere Details im Text.

CRP4 besteht aus 208 Aminosäuren, was ein Molekulargewicht von 23 kDa ergibt. Somit besitzt CRP4 im Vergleich zu den anderen Vertretern der Proteinfamilie ein etwas größeres Molekulargewicht. CRP4 unterscheidet sich zudem in der Aminosäuresequenz im zweiten und vierten Zinkfinger sowie außerhalb der konservierten LIM-Domänen von den anderen Vertretern der Proteinfamilie. Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal von CRP4 ist die RPKTS-Sequenz (s. Kapitel 1.4.3 Abb. 1.9). Diese befindet sich in der Verbindungsregion zwischen den beiden LIM-Domänen und stellt ein Erkennungsmotiv für eine putative Phosphorylierung durch cGMP- bzw. cAMP-abhängige Proteinkinasen dar (Huber et al. 2000). Die physiologischen Funktionen der einzelnen Mitglieder dieser LIM-Familie werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

### 1.4.1 CRP1 und CRP2/SmLIM

CRP1 und CRP2 zeigen innerhalb der Cystein-reichen LIM-Proteine die größte Homologie. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz dieser Proteine beträgt ungefähr 80% (Weiskirchen et al. 1995). Beide Proteine werden überwiegend in Glattmuskelzellen und Fibroblasten exprimiert, wo sie wichtige Kofaktoren für die Entwicklung und Differenzierung darstellen. Aus diesem Grund wird CRP2 auch als *smooth muscle* LIM-Protein (SmLIM) bezeichnet (Yet et al. 1998). CRP1 und CRP2 sind vor allem an fokalen Adhäsionsplaques lokalisiert. Sie interagieren mit  $\alpha$ -Actinin und Zyxin und fungieren daher als Regulatoren der Zytoarchitektur. (Jain et al. 1996, Pomies et al. 1997). Des Weiteren sind CRP1 und CRP2 in der Lage, durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der GATA- und SRF-Familie die Expression glattmuskelspezifischer Gene zu steuern (Beckerle 1997, Chang et al. 2003). Die Deletion eines dieser LIM-Proteine scheint sich nicht negativ auf die Gefäßmorphologie per se auszuwirken, was die Vermutung aufkommen ließ, dass diese Proteine füreinander kompensieren können. CRP1 und CRP2 sind zudem in der Bildung einer Neointima nach experimenteller Gefäßverletzung involviert. Glattmuskelzellen von CRP2-defizienten Mäusen zeigen ein gesteigertes Migrationsverhalten, das von einer verstärkten intimalen Hyperplasie begleitet wird (Wei et al. 2005), CRP1-defiziente Mäuse sind jedoch vor der übermäßigen Bildung einer Neointima geschützt. Der duale Knockout zeigte bezüglich der intimalen Hyperplasie einen intermediären Phänotyp, der ungefähr dem des CRP1-Wildtyps entsprach (Lilly et al. 2010). CRP1 wird vor allem während der embryonalen Herzentwicklung stark exprimiert, postnatal jedoch finden sich kaum nennenswerte Proteinmengen im Myokard (Henderson et al. 1999). CRP2 konnte in adulten Kardiomyozyten nachgewiesen werden, seine Deletion führt zu moderaten Veränderungen in der Myozytenarchitektur und einer milden Hypertrophie auf Zellebene (Sagave et al. 2008).

### 1.4.2 CRP3/MLP

CRP3, ebenso bekannt als Muskel-LIM-Protein, ist der einzige Vertreter der Cystein-reichen LIM-Proteine, der ausschließlich in Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert wird (Schneider et al. 1999). Es sind verschiedene Punktmutationen für CRP3/MLP beschrieben, die vor allem in den LIM-Regionen strukturelle Veränderungen verursachen und beim Menschen zum klinischen Vollbild einer dilatativen Kardiomyopathie führen (Geier et al. 2003). Auch ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsstatus von CRP3/MLP und dem Stadium einer Herzinsuffizienz scheint zu bestehen: je niedriger die CRP3/MLP-Proteinmengen, desto ausgeprägter stellen sich die klinischen Symptome dar (Zolk et al. 2000). Mäuse mit einer globalen Deletion von CRP3/MLP zeigen schon von Geburt an Symptome einer DCM und sind kaum überlebensfähig (Arber et al. 1994). CRP3/MLP ist in Kardiomyozyten vornehmlich in Form von Multimeren an Z-Scheiben lokalisiert, dient dort der Organisation des Zytoskeletts und fungiert als Bindeglied zwischen Sarkolemma und dem kontraktilem Apparat. Es wurden aber auch Interaktionen mit Proteinen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels beschrieben, wie etwa Calcineurin und Phospholamban (Knoll et al. 2002, Antoons et al.

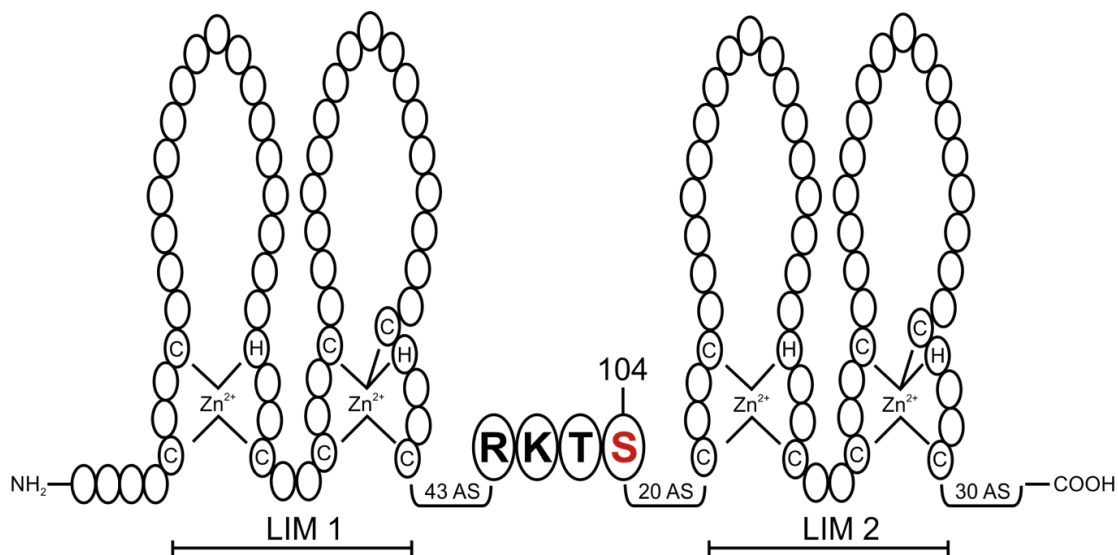


2006, Heineke et al. 2010). CRP3/MLP ist aber nicht nur ein Struktur-, sondern auch ein Signalprotein: nach hypertrophen Stimuli wie mechanischer Dehnung, TAC oder adrenerger Stimulation mit Phenylephrin ist ein großer Teil des in der Zelle vorhandenen CRP3/MLP im Zellkern vorzufinden und induziert die Expression typischer Hypertrophie-assoziiierter Gene wie ANP und BNP (Boateng et al. 2007, Boateng et al. 2009). Andere Autoren konnten zusätzlich ein Eingreifen von CRP3/MLP in den Ang II-Signalweg nachweisen: eine durch CRP3/MLP-Deletion hervorgerufene DCM kann durch gleichzeitige Ablation des AT<sub>1</sub>R annähernd auf Wildtyp-Niveau abgeschwächt werden (Yamamoto et al. 2007), während eine Überexpression von CRP3/MLP bei Infusion von Ang II jedoch keinen Benefit zeigt (Kuhn et al. 2012).

### 1.4.3 CRP4

Innerhalb der Proteinfamilie der Cystein-reichen LIM-Proteine ist über CRP4 bislang am wenigsten bekannt. Auch in vielen Übersichtsartikeln wird CRP4 nicht erwähnt oder fälschlicherweise noch als CRP2 bezeichnet, wodurch es insbesondere zu Verwechslungen mit CRP2/SmLIM (s. 1.4.1) kommen kann (Yet et al. 1998). Darüber hinaus wurde CRP4 seit der Erstbeschreibung (Okano et al. 1993) immer wieder unterschiedlich benannt. So haben verschiedene Autoren CRP4 u.a. als *Estradiol-Stimulated Protein/ESP1* (Karim et al. 1996), *Heart LIM-Protein/HLP* (Yu et al. 2002) und CRP2 (Huber et al. 2000) bezeichnet. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Nomenklatur folgt dagegen den Empfehlungen von Zhang et al. (Zhang et al. 2007). Da CRP4 neben der recht hohen Homologie zu den *Csrp*-kodierten Proteinen auch strukturelle Ähnlichkeit zu TLP (Thymus-LIM-Protein) und weiteren LIM-Proteinen aufweist (Birkenmeier and Gordon 1986, Weiskirchen et al. 1995, Kirchner et al. 2001), ist eine eindeutige und übereinkommende Zuordnung in der Literatur bisher nicht erfolgt. Beim Menschen findet man das für CRP4 kodierende *Crip2*-Gen auf Chromosom 14, bei der Maus auf Chromosom 12 (Karim et al. 1996). Das Gen besteht aus 7 Exons, die resultierende Proteinsequenz unterscheidet sich zwischen den beiden Organismen in nur 12 Aminosäuren (Huber et al. 2000). CRP4 weist eine breite Gewebesdistribution auf: hohe Proteinmengen sind vor allem in Herz, Gefäßen und Lunge zu finden, aber auch im Gehirn, in der Niere, in Leber, Milz und Magen sowie im Darm wird CRP4 exprimiert (Okano et al. 1993). Über physiologische Funktionen ist bis dato jedoch sehr wenig bekannt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu seinen Schwesterproteinen CRP1-3 wird angenommen, dass CRP4 ebenfalls in Wachstum und Entwicklungsprozessen sowie der Regulation des Zytoskeletts involviert ist. Im frühen Embryonalstadium findet man große Mengen an CRP4 zunächst nur in mesodermalen Herzanlagen, in späteren Entwicklungsphasen auch in Gefäßen und im Rückenmark (Yu et al. 2002). Im Gegensatz zu vielen anderen LIM-Proteinen kommt es hier wahrscheinlich zu keiner postnatalen *Downregulation*, so konnte auch in adulten murinen Herzen eine starke Expression von CRP4 in Myokard, Endokard und den Koronarien ermittelt werden (Wei et al. 2011).

Huber et. al gelang es, CRP4 als neuen Interaktionspartner der cGKI im neuromuskulären System des Dünndarms zu identifizieren: sowohl die Kolokalisation von CRP4 mit der Kinase in Glattmuskelzellen der Mukosa und enterischen Neuronen der Ratte als auch die cGKI-abhängige Phosphorylierung von CRP4 am Serin-104 (s. Abb. 1.9) des RKTS-Motivs konnte gezeigt werden. Diese Phosphorylierung ist überdies hochspezifisch für Serin-104, denn ein Austausch dieses Serins gegen Alanin unterbindet diese Modifikation (Huber et al. 2000). Primäre Phosphorylierungsexperimente mit rekombinantem CRP4, radioaktiv markiertem Phosphor und verschiedenen cGK-Isoformen zeigten außerdem eine basale Phosphorylierung von CRP4 durch beide Isoformen der cGKI, cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$ . Diese konnte durch Zugabe von cGMP noch um ein Vielfaches gesteigert werden. Für die cGKI2 ist CRP4 nur unter cGMP-stimulierten Bedingungen ein Substrat, diese Isoform trägt somit nicht zur basalen Phosphorylierung von CRP4 bei. Eine Phosphorylierung von CRP4 durch die PKA scheint nicht stattzufinden (Huber et al. 2000). In intakten Zellen z.B. der Aorta erkennt ebenso nur die cGKI diese Phosphorylierungsstelle (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. P. Ruth, unpublizierte Daten)



**Abb. 1.9: Topologie von CRP4.**

CRP4 besteht aus zwei LIM-Domänen mit insgesamt vier Zinkfingerstrukturen. In der Gelenkregion zwischen den LIM-Domänen befindet sich das RKT S-Motiv. Diese Aminosäuresequenz stellt eine putative Phosphorylierungsstelle für cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen dar. In intakten Zellen wird Serin-104 jedoch nur durch die cGKI phosphoryliert. Das Schema wurde modifiziert nach Huber et al. (2000). Weitere Erläuterungen im Text.

Ein nukleäres Translokationssignal ermöglicht es auch CRP4, in den Zellkern von Glattmuskelzellen zu translozieren, den  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) Promotor und somit die Expression von glattemuskelspezifischen Genen zu aktivieren. Wie die meisten LIM-Proteine interagiert CRP4 aber nicht direkt mit den entsprechenden DNA-Elementen, vielmehr vermittelt CRP4 über seine Zinkfinger die Bindung an SRF und GATA6 und stabilisiert so die Anordnung der Transkriptionsfaktoren in der entsprechenden Promotorregion. Eine Kofaktorentransfektion mit cGKI und nachfolgende Stimulation mit cGMP-Analoga erhöhten die Bindungsfähigkeit von SRF an den Promotor und die Expression

glattmuskelspezifischer Gene um ein Vielfaches. Zhang et. al konnten im Rahmen dieser Experimente auch zeigen, dass der dritte Zinkfinger von CRP4 für die Bindung der Kinase essentiell ist, eine nachfolgende Phosphorylierung von CRP4 könnte den Komplex dann so ausrichten, dass neben SRF und GATA6 auch noch die Bindung weiterer Kofaktoren ermöglicht wird. Sowohl eine Deletion des dritten und vierten Zinkfingers, als auch ein siRNA-induzierter *Knockdown* von CRP4 führte zu einer Verringerung der Transkriptionsaktivität, die auch durch eine Retransfektion der Kinase nicht rekonstituiert werden konnte (Zhang et al. 2007). Es wurde schon länger vermutet, dass die cGKI die Expression glattmuskelspezifischer Gene wie  $\alpha$ -Aktin oder Calponin zu regulieren vermag. Hierbei könnte CRP4 das fehlende Verbindungsglied zwischen der Kinase und dem Transkriptionsapparat bilden (Hofmann and Wegener 2013). Daher könnte die Interaktion bzw. Phosphorylierung von CRP4 durch die cGKI auch in der phänotypischen Modulation von Glattmuskelzellen - gekennzeichnet durch den Übergang von einem differenzierten und „kontraktilen“, zu einem dedifferenzierten „synthetischen“ Phänotyp - involviert sein, und letztlich auch bei Gefäßkrankheiten eine Rolle spielen (Hofmann and Wegener 2013).

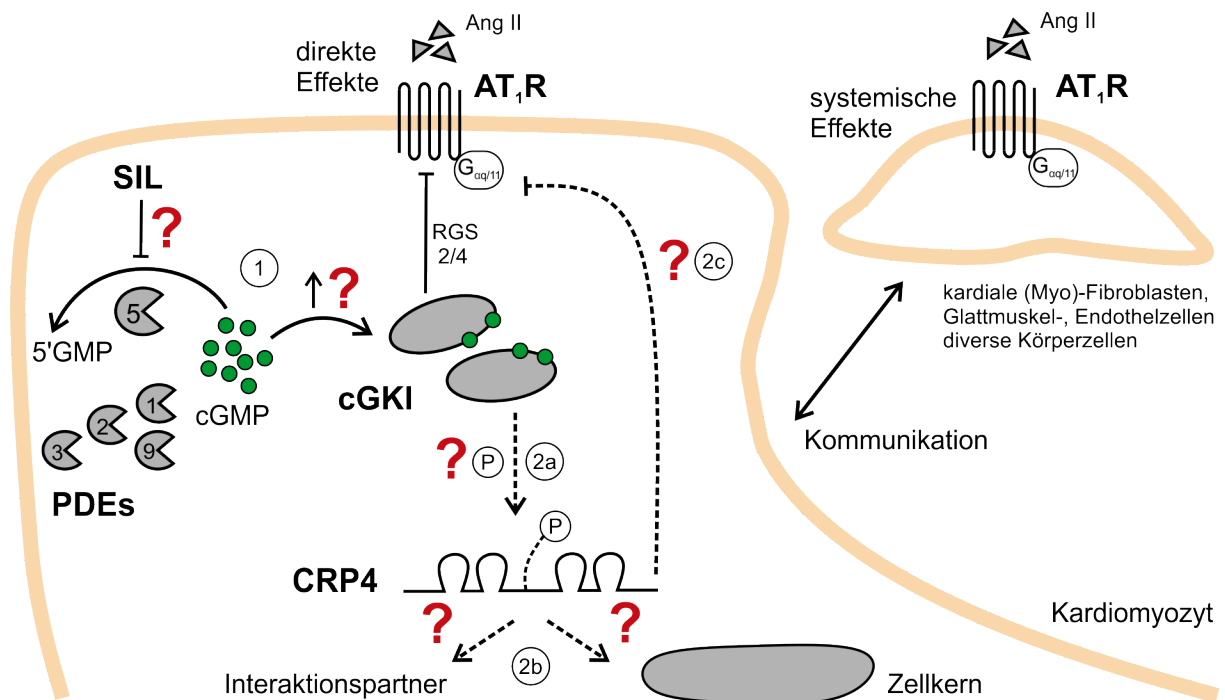
Der Phosphorylierungszustand von CRP4 scheint auch bei der Wahrnehmung von inflammatorischem Schmerz eine wichtige Rolle zu spielen, denn CRP4-defiziente Mäuse zeigen ein erhöhtes Schmerzempfinden gegenüber nozizeptiven Reizen (Schmidtke et al. 2008). Im Rückenmark, genauer in den Laminae I und II des Hinterhorns wurde darüber hinaus eine Kolo-kalisation von CRP4 und cGKI beschrieben. Unter physiologischen Bedingungen, wenn CRP4 demnach nicht oder nur in geringem Ausmaß phosphoryliert vorliegt, vermittelt es einen inhibitorischen Effekt auf die Schmerzweiterleitung. Eine intrathekale Injektion von cGMP-Analoga bewirkt eine cGKI-abhängige Phosphorylierung von CRP4. Dadurch kommt es zu einer Entkopplung der Inhibition und zu einer verstärkten Schmerzweiterleitung in Wildtyp-Tieren. CRP4-defiziente Tiere scheinen vor dieser Hyperalgesie geschützt zu sein. Auf die Entstehung und Wahrnehmung von akuten und neuropathischen Schmerzen hat CRP4 jedoch keinen Einfluss (Schmidtke et al. 2008). Die hier geschilderten Ergebnisse zur Bedeutung von CRP4 für die Nozizeption wurden mit der vom hiesigen Arbeitskreis generierten CRP4-Knockout Mauslinie generiert. Aktuell liefert nur diese Studie Erkenntnisse zur *in vivo* Relevanz von CRP4. Zahlreiche *in vitro*-Untersuchungen (Huber et al. 2000, Zhang et al. 2007) lassen aber vermuten, dass CRP4 als cGMP-Effektor auch im kardiovaskulären System von Bedeutung ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher die von Schmidtke et al. eingeführte Mauslinie hinsichtlich ihres kardialen Phänotyps, insbesondere die Funktion von CRP4 in der Entstehung und Progredienz kardialer Hypertrophie untersucht (s. Kapitel 1.5).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Das pathophysiologische Herzmuskelwachstum ist ein Aspekt vieler Krankheitsbilder des Herz-Kreislaufsystems und die Behandlungsmöglichkeiten sind bis dato limitiert. Folglich ist es von enormer Wichtigkeit, die Mechanismen der krankhaften Anpassung des Herzens an langfristige Stresssituationen weiter aufzuklären und neue Therapiestrategien zu entwickeln. Eine Vielzahl von Studien lässt vermuten, dass der cGMP/cGKI-Signalweg in Kardiomyozyten protektive, antihypertrophe und antifibrotische Effekte vermittelt, sofern der wachstumsfördernde Stimulus über  $G_{\alpha q}$ -abhängige Signaltransduktionswege, initiiert wird (Westermann et al. 2012, Frantz et al. 2013, Patrucco et al. 2014). Beispielsweise signalisiert das Neurohormon Ang II als Komponente des lokalen RAAS in Herzmuskelzellen über  $G_{\alpha q}$ -gekoppelte  $AT_1$ -Rezeptoren und ist hierbei ein entscheidender Faktor der kardialen Gewebeumbauprozesse im Rahmen einer Hypertrophieentwicklung. Darüber hinaus führen Ang II/ $AT_1$ R über vasokonstriktorische und renale Wirkungen zu einer Blutdruckerhöhung und damit zu krankhaftem Herzmuskelwachstum. Aufgrund der pleiotropen Effekte von Ang II im kardiovaskulären System ergibt sich die Frage, in welchen Zelltypen cGMP/cGKI als potentielle Gegenspieler von Ang II/ $AT_1$ R ihre Effekte beim maladaptiven *Remodeling* des Herzmuskels ausüben, d.h. inwiefern für die gegenseitige Beeinflussung der Signalwege neben Kardiomyozyten auch Fibroblasten, Endothel- und Glattmuskelzellen von Bedeutung sind. Um die Rolle des kardiomyozytären cGMP/cGKI-Signalwegs für die Ang II-induzierte Herzhypertrophie *in vivo* zu untersuchen, wurde in dieser Studie ein Mausmodell mit einer kardiomyozytenspezifischen Überexpression des humanen  $AT_1$ R verwendet (Paradis et al. 2000). Diese  $\alpha$ MHC- $AT_1R^{tg/+}$ -Mäuse entwickeln unabhängig vom Blutdruck und endogener Ang II-Spiegel eine Myokardhypertrophie. Die progredient entstehenden kardialen Defekte werden also ausschließlich durch die amplifizierte Ang II/ $AT_1$ R-Signaltransduktion in den Herzmuskelzellen hervorgerufen. Das  $\alpha$ MHC- $AT_1R^{tg/+}$ -Mausmodell scheint damit gut geeignet zu sein, um zu überprüfen, inwiefern der PDE5-Hemmstoff Sildenafil über eine Erhöhung intrakardialer cGMP-Konzentrationen und Aktivierung kardiomyozytärer cGKI protektiv wirkt und *in vivo* das Ang II/ $AT_1$ R-induzierte kardiale *Remodeling* direkt verhindern kann.

Des Weiteren ist bisher vergleichsweise wenig über die der cGKI nachgeschalteten Substrate im Herzen bekannt. CRP4 wurde bereits in Glattmuskelzellen als Interaktionspartner der cGKI identifiziert (Zhang et al. 2007). Aufgrund der hohen Homologie von CRP4 zu seinem Schwesterprotein CRP3/MLP liegt die Vermutung nahe, dass auch CRP4 im Myokard exprimiert wird und somit ähnliche Funktionen in Herzmuskelzellen ausübt wie CRP3/MLP. CRP4 könnte daher ebenfalls bei der Entstehung einer Myokardhypertrophie beteiligt sein, denn für CRP3/MLP sind bereits Mutationen beschrieben, die zu hypertrophen bzw. dilatativen Kardiomyopathien führen. Um die möglichen Funktionen von kardialem CRP4 zu erforschen, wurden in der vorliegenden Arbeit CRP4-WT und CRP4-KO Wurfgeschwister analysiert (Schmidtko et al. 2008). Im Vordergrund standen dabei Untersuchungen zur Expression von CRP4 im Myokard, zu Herzfunktion und Morphologie sowie die Identifikation von CRP4-Interaktionspartnern unter

physiologischen Bedingungen und in unterschiedlichen Ang II- bzw. AT<sub>1</sub>R-induzierten Herzhypertrophie-Modellen. Ein wesentlicher Aspekt der Arbeiten diente dabei der experimentellen Erörterung der wichtigen Frage, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen cGMP/cGKI und CRP4 sowie der Ausbildung bzw. dem Fortschreiten hypertropher Herzerkrankungen besteht. Nachfolgend sind in Abb. 1.10 die verschiedenen Ziele der Dissertation schematisch zusammengefasst.



**Abb. 1.10: Schematische Darstellung der Fragestellungen dieser Dissertationsarbeit.**

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit sollten neue Erkenntnisse zur Bedeutung von cGMP, der cGKI und des putativen cGKI-Effektorproteins CRP4 für die Entstehung sowie Progression der Angiotensin II- bzw. AT<sub>1</sub>R-induzierten Herzhypertrophie gewonnen werden. So war es ein Ziel zu eruieren, ob der PDE5-Hemmstoff SIL cGMP-abhängig vor den pro-hypertrophen Effekten des Ang II/AT<sub>1</sub>R-Signalwegs in Herzmuskelzellen schützt (1). Hierfür wurden die kardialen *Remodeling*-prozesse in einem transgenen Mausmodell mit kardiomyozytenspezifischer Amplifikation des Ang II/AT<sub>1</sub>R-Signalwegs untersucht. Um auch die biologischen Funktionen von kardialem CRP4 zu verstehen sowie letztlich dessen Relevanz für das maladaptive Herzwachstum *in vivo* aufzuklären, wurde die Dynamik des CRP4-Interaktoms in gesunden sowie hypertrophen Herzen bei systemisch bzw. zellspezifisch gesteigerter Ang II/AT<sub>1</sub>R-Signaltransduktion in CRP4-WT Mäusen mit CRP4-KO Wurfgeschwistermäusen verglichen (2b). Schlussendlich sollten die hier geplanten Experimente auch aufzeigen, inwiefern kardiales CRP4 eine Zielstruktur von cGMP/cGKI (2a) ist und damit als Gegenspieler von maladaptiven Effekten des Ang II/AT<sub>1</sub>R-Signalwegs im Herzen wirkt (2c). AT<sub>1</sub>R: Angiotensin II Rezeptor Subtyp1; Ang II: Angiotensin II; 5'GMP: Guanosin-5'-monophosphat; cGMP: zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat; cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase I; SIL: Sildenafil; PDE: Phosphodiesterase; CRP4: Cystein-reiches Protein 4; RGS: *Regulator of G-protein signaling*. Weitere Erläuterungen im Text.

## 2 Material

### 2.1 Mauslinien

Stammbezeichnung	Genetische Bezeichnung	Herkunft
CRP4	129-Crip2 <sup>tm/Ruth</sup>	Prof. Ruth, Tübingen
$\alpha$ MHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup>	BI6-Tg <sup><math>\alpha</math>MHC-AT1R/Nemer</sup>	Prof. Nemer, Ottawa
red cGES-DE5	FVB-Tg <sup><math>\alpha</math>MHC-red cGES-DE5/Nikolaev</sup>	Prof. Nikolaev, Hamburg
C57/BI6	BI6	Charles River
FVB	FVB	Charles River

#### 129-Crip2<sup>tm/Ruth</sup>

Die CRP4-Mauslinie (genetische Bezeichnung: 129-Crip2<sup>tm/Ruth</sup>) wurde am hiesigen Institut mit Hilfe der Cre/loxP-Technik generiert und etabliert. Die verwendete Knockout-Strategie bestand in der Deletion des Großteils des CRP4-Gens, nämlich Exon 2-7. Dies resultiert in einem vollständigen Verlust an funktionsfähigem CRP4-Protein (Schmidtko et al. 2008).

#### BI6-Tg <sup>$\alpha$ MHC-AT1R/Nemer</sup>

Die transgenen  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse exprimieren den humanen AT<sub>1</sub>R unter Kontrolle des myozytären  $\alpha$ MHC-Promotors. Dies führt zu einer ca. 200-fach gesteigerten Expression des Rezeptors und einer blutdruckunabhängigen Entwicklung einer Myokardhypertrophie (Paradis et al. 2000). Die  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere wurden freundlicherweise von Frau Prof. Mona Nemer (University of Ottawa, Kanada) zur Verfügung gestellt.

#### FVB-Tg <sup>$\alpha$ MHC-red cGES-DE5/Nikolaev</sup>

Diese Tiere exprimieren den red cGES-DE5-Sensor in Kardiomyozyten unter Kontrolle des  $\alpha$ MHC-Promotors (Gotz et al. 2014). Dies erlaubt die direkte Messung von cGMP in intakten, lebenden Myozyten mittels FRET (Förster-Resonanzenergietransfer). Die  $\alpha$ MHC-red cGES-DE5-Tiere wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Viacheslav Nikolaev (Institut für Experimentelle Herz-Kreislaufforschung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt.

#### BI6/FVB

Genetisch unveränderte Tiere mit C57/BI6- oder FVB-Hintergrund wurden mit  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren (C57/BI6) sowie  $\alpha$ MHC-red cGES-DE5-Tieren (FVB) im Sinne einer Erhaltungszucht verpaart.

## 2.2 Geräte

Gerät	Gerätebezeichnung, Hersteller
Absauganlage (Zellkultur)	Membran-Vakuumpumpe, Laboport
Analysenwaage VWR-124	Sartorius
Autoklav	VX-55, Systec
	ELV 3870, Tuttnauer
Brutschrank	WTB, Binder
	Hera Cell, Heraeus
Detektionssystem (Western Blot-Analyse)	EttanDige Imager, GE-Healthcare
Druckkatheter (Blutdruckmessung)	TA11ETA-F10, DataScience Int.
Echokardiograph für Kleintiere	Vevo 2100, VisualSonics
Eismaschine	6213, Ziegler
Elektrodenplatten Western Blot	30034507, Scie-Plas
Elektrophoresekammer (Genotypisierung)	Sub-cell, BioRad
Elektrophoresekammer (Western Blot)	Mini Protean, BioRad
Fluoreszenzmikroskop	Axiolmager Z1, Zeiss
Geldokumentationsanlage	BioDoc Analyze, Biometra
Gewebehomogenisator	Dispergieraggregat 1130, Kinematica
Heizblock	Thermomixer Compact, Eppendorf
	Thriller Thermo Incubator, Peqlab
Heizplatte mit Temperaturkontrolle (OP)	TCAT-2LV Controller, Physitemp
Isofluran-Absauganlage	LAS, Groppler
Isofluran-Narkoseeinheit	0258- Narkoseeinheit, Völker
Kryotom (Anfertigung Gewebeschnitte)	Microm HM, Thermo Scientific
Kühlzentrifugen	Centrifuge 5417 R, Eppendorf
	Mikro 220, Hettich
	X1R Multifuge, Heraeus
Langendorff-Perfusionsanlage	Harvard Apparatus
Lichtmikroskop (Histologie)	Axiovert 200, Zeiss
Lichtmikroskop (Zellkultur)	2x Mikroskop DM IL LED, Leica
	Wilovert 30, Hund
Magnetische Heizplatte	50383, Heidolph
Mehrfachdispenser	Handy StepS, Brand
Messschieber (Tibiae-Vermessung)	Digitaler Schieblehre, Mitutoyo
Mikrotiterplatten-Photometer	Modell Sunrise, Tecan
Mikrowelle	MWG 800 FiF
Mobile Tierhaltungssysteme	Luftstromschränke Uniprotect, Bioscape
PCR-Maschinen	Mastercycler, Eppendorf
	MastercyclerGradient, Eppendorf
pH-Meter	pH 540 GLP, WTW
	pH-Meter 761 Calimatic, Knick
Photometer	Nanophotometer, Implen
	BioPhotometer, Eppendorf
Pipetten (10, 20, 200, 1000 µl)	Pipetman, Gilson
Pipetten (8-Kanal; 200, 1000 µl)	ResearchPro, Eppendorf
Pipettierhilfe	Accu jet pro, Brand
Präparierscheren, Pinzetten	FST
Präzisionswaage BP2100S	Sartorius
qRT-PCR Maschine	Opticon FD-3200, MJ Research

## Material

<b>Gerät</b>	<b>Gerätebezeichnung, Hersteller</b>
Reagenzglasrotator	3025, GFL
Reinstwasseraufbereitungsanlage	Purelab flex, Elga Milli-Q Biocell, Millipore
Rektalsonde zur Temperaturüberwachung	MLT 1404, AD Instruments
Scansystem für histologische Präparate	<i>MIRAXDesk</i> -Scanner, Zeiss
Schlauchpumpe (Isolation Kardiomyozyten)	Ismatec
Schüttler	Unimax 1010, Heidolph Duomax 1030, Heidolph
Stereolupe (Organpräparation, Pumpen-OP)	EZ5, Leica
Stereolupe (Transmitter-OP)	M80, Leica
Sterilwerkbank	Safe 2020, Thermo Scientific Herasafe, Heraeus
Strom/Spannungsquelle	EV 231, Consort Standard Power Pack, P15, BioRad
Taschenwaage	LS2000H, G&G
Telemetriesystem	DataScience Int.
Vakuumpumpe	Concentrator 5301, Eppendorf
Vortex	Genie 2 G560E, Scientific Industries
Wärmelampe	Infrarotlampe, Beurer
Wasserbad	SW22, Julabo
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D, Eppendorf Centrifuge 5417 C, Eppendorf Micro 220R, Hettich

## 2.3 Software

<b>Software</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
Axio Vision Rel 4.8	Histologie (Auswertung, Visualisierung)	Zeiss
Dataquest A.R.T.3.1	Auswertung Telemetrie-Messungen	DataScience Int.
EttanDige Imager 1.0	Western Blot (Scan-Software)	GE-Healthcare
GSA Image Analyser	Histologie (Auswertung, Visualisierung)	GSA
ImageQuant TL 7.0	Quantifizierung Western Blot	GE-Healthcare
Magellan 7	Auswertung Enzym-Immunoassay	Tecan
Microsoft Office	Routine-Arbeiten (Statistik etc.)	Microsoft
<i>MIRAXViewer</i>	Histologie (Auswertung, Visualisierung)	Zeiss
OpticonAnalysis 1.4	Quantifizierung qRT-PCR	MJ Research
Perseus	Auswertung Proteomik	MaxQuant
Primer 3 (Freeware)	Primer-Design (qRT-PCR)	Centerline Software
VevoStrain	Auswertung Echokardiographie	VisualSonics



## 2.4 Substanzen, Lösungen, Puffer, Kitsysteme, Verbrauchsmaterial

Alle gängigen Standardchemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen und entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad für molekularbiologische Analysen. Sämtliche Lösungen und Puffer wurden mit autoklaviertem und deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) hergestellt. Übliche Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Stripetten sowie sämtliche Gefäße für die Zellkultur wurden von Multimed (Kirchheim), Corning-Fisher (Kaiserslautern), Sarstedt (Nümbrecht) oder Greiner Bio-One (Frickenhausen) erworben. Sämtliche Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG (Ebersberg) bezogen.

### 2.4.1 Genotypisierung

#### DNA-Isolierung und PCR

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
10x Taq-Puffer	11435094001	Roche
dNTPs (Nukleotide)	K039.1	Carl Roth
Ethanol (100%)	32205	Sigma-Aldrich
High Pure PCR Preparation Kit	11796828001	Roche
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
Taq DNA-Polymerase	11435094001	Roche

#### Primer zur Genotypisierung

Mauslinie	Primerbezeichnung	Sequenz
CRP4	For 1	AGGCTTTCCATTGGGATGTG
	For 2	ACAGATGGAATCCATGGAGGA
	Rev	GCGCGGTCTAGTGGGCAT
αMHC-AT <sub>1</sub> R <sup>tg/+</sup>	P1 (22-54)	ACCATCTTCAGTAGAGTTG
	P2 (19-147)	ACCCTTACCCACATAGAC
	P3 (20-387)	GCCTGCTGTCCCTTCAGCTC
	P4 (20-388)	CCAGTCACGTTCCCTATCCT
red cGES-DE5	For	TGACAGACAGATCCCTCCTAT
	Rev	GGATGCTCAGGTAGTGGTT

→ Die Oligonukleotid-Lyophilisate wurden in deionisiertem und autoklaviertem (dH<sub>2</sub>O) gelöst und auf eine Zielkonzentration von 4 µM eingestellt.

**Agarose-Gelelektrophorese**

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Agarose	840004	Biozym Scientific
Borsäure	6943.3	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
DNA-Marker (2-Log DNA-Ladder)	32000-S	New England Biolabs
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	8043.2	Carl Roth
Ethidiumbromid	E1510	Sigma-Aldrich
Ficoll 400	CN90.3	Carl Roth
Tris	5429.3	Carl Roth
Xylencyanol	X4126	Sigma-Aldrich

<b>0,5 M EDTA pH 8,0</b>	
EDTA x 2H <sub>2</sub> O	108 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 8,0 einstellen	

<b>10x TBE-Puffer</b>	
Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	40 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
1x TBE: 1:10 verdünnen	

<b>Agarosegel 2%</b>	
Agarose	2 g
1x TBE-Puffer	100 ml

<b>6x Gel-Ladepuffer (6x Dye)</b>	
Ficoll	9 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	12 ml
10x TBE-Puffer	30 ml
Bromphenolblau (55 mg/ml)	1,35 ml
Xylencyanol (50 mg/ml)	1,5 ml

<b>DNA-Längenstandard</b>	
6x Dye	20 µl
2-Log DNA-Ladder	10 µl
dH <sub>2</sub> O	90 ml

## 2.4.2 *In vivo*-Versuche

### Versuchsspezifische Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Alzet Minipumpen	1007	Charles River
Angiotensin II	A9525	Sigma-Aldrich
Ascorbinsäure	7506	Sigma-Aldrich
Bepanthen-Augensalbe	PZN 01578681	Roche
Cleanisept-Desinfektionstücher	PZN 1885992	Schumacher GmbH
Druckkatheter zur Blutdruckmessung	TA11ETA-F10	DataScience Int.
Einweg-Skalpelle	12072800	FeatherSafety Razor
Enthaarungscreme (Veet for men)	PZN 4916836	Reckitt Benckiser
Essigsäure (100%)	4738.5	Carl Roth
Ethilon II 5-0 (Wundverschluss)	EH7823	Ethicon
Gefäßdehnungspinzette	00276-13	FST
Isofluran	220/96	Aventis
Isoprenalin	I.768	Sigma-Aldrich
Kanülen (20G; 0,4 x19 mm; Lsg.-Entnahme)	301300	BD Bioscience
Kanülen (27G; 0,4 x19 mm; Karotiseröffnung)	302200	BD Bioscience
Katheterhalter	00574-11	FST
Leukofix 2,25 cm x 5m	1698592	BSN Medical
Leukosilk 1,25 cm x 5m	00626219	BSN Medical
Natriumchlorid-Lösung (steril 0,9%)	PZN 2159621	Fresenius Kabi
Octenisept	PZN 7463832	Schülke
Perma-Hand Seide 7.0 (Wundverschluss)	EH7464G	Ethicon
Präzisionswischtücher	AA64.1	Kimberly-Clark
Protein-LoBind Tubes	0030108.116	Eppendorf
Resorba-Seide 7.0/0.5 (Karotisligator)	R101	Resorba
RNAse ZAP	R 2020-250	Sigma-Aldrich
Rotlichtlampe	616.00	Beurer
Sildenafilcitrat	82714520	Molekula
Spritzen (verschiedene Größen)	diverse	BD Bioscience
Spritzenfilter	P666.1	Carl Roth
Ultraschallgel	4011	Sonogel
Wattestäbchen	PZN 6141575	Heinz Herenz
Zitronensäure	6490.1	Carl Roth

#### Isoprenalin-Injektionslösung (2,65 µg/100µl)

Isoprenalin	26,5 mg
ISO-Lösemittel (LM) (0,02% Ascorbinsäure)	100 ml
→ 1:10 mit LM verdünnen	

#### Ang II-Stimulationslösung (500 µg/100 µl)

Angiotensin II	5 mg
NaCl (0,9%, steril)	1 ml
1 M Essigsäurelösung	50 µl

### 2.4.3 Organentnahme und Zellkultur

#### Ausgangssubstanzen und Materialien zur Organentnahme und zur Herstellung der Tyrode-Lösung

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
1 ml Spritze	7250415	BD Bioscience
8-Br-cGMP (Stock 100 mM)	B 004-50E	BioLog
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	7902	Sigma-Aldrich
Glucose BioXtra	G7528	Sigma-Aldrich
HEPES	H3375	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	P5405	Sigma-Aldrich
Kanülen (25G; 0,9 x40 mm; Organspülung)	300600	BD Bioscience
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	63138	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	S5886	Sigma-Aldrich
PBS-Lösung	14190094	life technologies
Pinzetten	diverse	FST
RNase ZAP	R2020	Sigma-Aldrich
Scheren	diverse	FST
Wägeschalen (41x41x8 mm)	1878.2	Carl Roth
Wägeschalen (89x89x25 mm)	1884.1	Carl Roth

#### *In vitro*-Stimulationsexperimente

Tyrode-Lösung	
NaCl	818 mg
HEPES	119 mg
Glucose	180 mg
KCl (0,5 M)	1 ml
MgSO <sub>4</sub> (0,12 M)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> (1 M)	200 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml
→ auf pH 7,4 einstellen	

## Materialien, Ausgangssubstanzen und Lösungen zur Kardiomyozytenisolation

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
2,3-Butandion-Monoxim (BDM)	B0753	Sigma-Aldrich
4-Well Kammern	354104	BD Bioscience
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	S5886	Sigma-Aldrich
CM-Fetales Kälberserum (FCS)	10099141	life technologies
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	30412	Sigma-Aldrich
Glucose BioXtra	G7528	Sigma-Aldrich
Heparin	PZN 3170642	Ratiopharm
HEPES	H3375	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	P5405	Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	60339	Sigma-Aldrich
Kaliumphosphat, monobasisch (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5655	Sigma-Aldrich
Kollagenase Typ II (337 U/mg)	4176	Cell Systems
L-Glutamin (200 mM)	25030-024	life technologies
Laminin Stock-Lösung	354232	BD Bioscience
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	63138	Sigma-Aldrich
Minimal Essential Medium (MEM)	21575-022	life technologies
Natriumchlorid (NaCl)	S5886	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	S5761	Sigma-Aldrich
Pasteurpipetten ungestopft	4522	Carl Roth
PBS-Lösung	14190094	life technologies
Penicillin G	P 3032	Sigma-Aldrich
Perma-Hand Seide (5/0)	K880H	Ethicon
Phenolrot	P5530	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	A8806	Sigma-Aldrich
Sterilfilter (Nalgene 0,2 µm, 150 ml)	10762732	Thermo Scientific
Sterilfilter (Nalgene 0,2 µm, 500 ml)	10578471	Thermo Scientific
Taurin	T0625	Sigma-Aldrich
Trypsin (10x)	15090046	life technologies
Zellsieb (100 µm Maschenweite)	352360	BD Bioscience

## Pufferlösungen zur Kardiomyozytenisolation

Perfusionspuffer (Stock)		Perfusionspuffer pH 7,46	
NaCl	13,2 g	Stock Perfusionspuffer	1960 ml
KCl	700 mg	BDM (500 mM)	40 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	164 mg	Glucose	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	214 mg	→ auf pH 7,46 einstellen	
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	600 mg	→ steril filtrieren	
Phenolrot	24 mg		
NaHCO <sub>3</sub>	2,02 g		
KHCO <sub>3</sub>	2,02 g		
HEPES	4,766 g		
Taurin	7,5 g		
dH <sub>2</sub> O	ad 2000 ml		
→ Steril filtrieren			

## Material

---

---

### Verdaupuffer

Perfusionspuffer pH 7,46	900 ml
Kollagenase	15 mg
Trypsin (10x)	5 ml
CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	112,5 µl
→ Steril filtrieren	

---

---

### Stop-Puffer 2

Perfusionspuffer pH 7,46	171 ml
FCS (100%)	9 ml
CaCl <sub>2</sub> (10 mM)	225 µl
→ Steril filtrieren	

---

---

### Aussaatmedium

ME-Medium	227,5 ml
FCS (100%)	12,5 ml
BDM (500 mM)	5 ml
Penicillin (10000 U/ml)	2,5 ml
L-Glutamin (200 mM)	3,5 ml
→ unter Sterilwerkbank	
→ 2-4 h vor Gebrauch in 2%	
CO <sub>2</sub> -Inkubator equilibrieren	
→ max. 4 Tage lagern (4°C)	

---

---

### Stop-Puffer 1

Perfusionspuffer pH 7,46	54 ml
FCS (100%)	6 ml
CaCl <sub>2</sub> (10 mM)	75 µl
→ Steril filtrieren	

---

---

### Laminin-Lösung (10 µg/ml)

Laminin-Stock (2 mg/ml)	0,05 ml
Steriles PBS	9,95 ml
→ immer frisch herstellen	

---

---

### Kulturmedium

ME-Medium	245 ml
BSA (100 mg/ml)	250 µl
Penicillin (10000 U/ml)	2,5 ml
L-Glutamin (200 mM)	2,5 ml
→ unter Sterilwerkbank	
→ 2-4 h vor Gebrauch in 2%	
CO <sub>2</sub> -Inkubator equilibrieren	
→ max. 4 Tage lagern (4°C)	

---

## Fibroblasten-Kultur

---

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-GlutaMAX)	10566	life technologies
Fetales Kälberserum (FCS)	10279	life technologies
ITS Mediumzusatz (100x)	13146-5	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin (PenStrep)	15140	life technologies

---

---

### Fibroblasten-Kulturmedium

DMEM	500 ml
ITS	5 ml
PenStrep	5 ml
FCS	50 ml
→ bei 4°C lagern	

---

## 2.4.4 Histologie

### Versuchsspezifische Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
1N HCl-Maßlösung	K025.1	Carl Roth
Aceton	9372.4	Carl Roth
Aluminiumfolie	2596.1	Carl Roth
Ammoniak (30-33%)	P093.2	Carl Roth
Aquatex Eindeckmedium	363123S	VWR
Deckgläser 20x60 High Precision	LH26.1	Carl Roth
DePeX Eindeckmedium	HX069485	VWR
Direct Red 80	365548	Sigma-Aldrich
Einbettmedium NEG50	6502	Thermo Scientific
Eosin G (0,5%)	X883.1	Carl Roth
Essigsäure (100%)	3738.5	Carl Roth
Ethanol (100%)	32205	Sigma-Aldrich
Feste Pikrinsäure	239801	Sigma-Aldrich
Fettstift (Hydrophobic Barrier Pen)	H-4000	Vector Laboratories
Formaldehydlösung (35%)	4979.1	Carl Roth
Gesättigte wässrige Pikrinsäure	P6744	Sigma-Aldrich
Hämatoxylin nach Harris	X903.2	Carl Roth
Hoechst	33258	Sigma-Aldrich
Klingen (Kryotom)	MX35	Thermo Scientific
Levamisol	SP-500	Vector Laboratories
Eselnormalserum (NDS)	017-000-121	Dianova
Objektträger Superfrost	J1800AMNZ	Menzel
Paraformaldehyd (PFA)	0335.2	Carl Roth
PBS	14190094	life technologies
PermaFluor	TA-030-FM	Thermo Scientific
Saccharose	4621.2	Carl Roth
Toluol	7115.1	Carl Roth
Triton X-100	3051.2	Carl Roth
Xylol	9713.3	Carl Roth

### Fixieren der Gewebe und Zellen

PFA 2%	
PFA	15 g
PBS	ad 750 ml

PFA 4%	
PFA	30 g
PBS	ad 750 ml

→ Auf 60°C erhitzen und rühren bis eine klare Lösung entsteht.

### Permeabilisierungslösungen

Triton X-100 0,3%	
Triton X-100	1,5 ml
PBS	500 ml

Triton X-100 0,1%	
Triton X-100	0,5 ml
PBS	500 ml

## Material

### NDS-Lösungen zur Absättigung unspezifischer Bindestellen

<b>NDS 10%</b>		<b>NDS 1,5%</b>	
NDS	500 µl	NDS	75 µl
PBS	ad 5000 µl	PBS	ad 5000 µl

### Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung

<b>0,1 M Tris-HCl pH 8,2</b>	
Tris	12,1 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 8,2 einstellen	

<b>Färbekit (AP-Färbung)</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>	
Vectastain ABC-AP-Kit Standard Alkaline Phosphatase (Arbeitslösung)	AK 5000	Vector laboratories	
Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrat Kit III (AP-Substrat)	10279	Vector laboratories	
<b>ABC-AP-Arbeitslösung</b>		<b>AP-Substrat-Lösung</b>	
Reagenz A	50 µl	Reagenz 1	100 µl
Reagenz	50 µl	Reagenz 2	100 µl
PBS	5 ml	Reagenz 3	100 µl
→ 30 min im Dunkeln inkubieren		Tris-HCl (0,1 M, pH 8,2)	5 ml

→ 50 µl entsprechen 1 Tropfen, 100 µl entsprechen 2 Tropfen des jeweiligen Reagenz aus dem entsprechenden Färbekit.

### Verwendete Antikörper für die IHC/IF

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti CRP4	Kaninchen	1:2000, 1:100	Pharmakologie AK Ruth
Biotinylierter Anti- Kaninchen IgG	Ziege	1:500	Vector laboratories (#BA-1000)
Anti Kaninchen IgG (IF)	Ziege	1:500	Dianova

<b>Eindeckmedium für die IF</b>	
Hoechst	5 µl
PermaFluor	5 ml
→ bei 4°C im Dunkeln lagern	



<b>Bouin-Fixierlösung</b>	
Pikrinsäurelösung	150 ml
Formaldehydlösung (35%)	50 ml
Essigsäure (100%)	10 ml

<b>Sirius-Rot Färbelösung</b>	
Direct Red 80	250 mg
Pikrinsäurelösung	225 ml
Feste Pikrinsäure	50 mg
dH <sub>2</sub> O	25 ml

## 2.4.5 RNA-Analytik

### Versuchsspezifische Materialien und Substanzen

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
96-Lochplatte (Low Multiwell)	MLL-9601	BioRad
Chloroform	372978	Sigma-Aldrich
DEPC-H <sub>2</sub> O	T143	Carl Roth
DNase I	04716728001	Roche
Ethanol (100%)	32205	Sigma-Aldrich
Folie zum Abkleben der Platte (Microseal B)	MSB-1001	Bio-Rad
iScript cDNA Synthesis-Kit	170-8891	BioRad
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
Küvetten zur Konzentrationsbestimmung	613101	Greiner Bio-One
peqGold RNAPure (Aufreinigung)	30-1010	Peqlab
Primer	variabel	Eurofins
SYBR Green Supermix	170-8882	BioRad

### Primer für die qRT-PCR

<b>Zielgen</b>	<b>Sequenz</b>
ANP	TGTACAGTGCGGTGTCCAAC GGGGCATGACCTCATCTTCT
AT <sub>1</sub> R <sub>(human)</sub>	ACAGTATCATCTTTGTGGTGGGA GGCCACAGTCTTCAGCTTCA
BNP	TCCTCTGGGAAGTCCTAGCC GCCATTTCTCCGACTTTTC
cGKI	GGCGATGTGGGGTCACTGGTGT CCATGGTGCAGAGCTTCACGCC
CnA	TGCTGCCATACTTCGGCGGG GCCATGGATGTCACCACACACTGTA
CNP	AAGGTCCCGAGAACCCCG GCTGCCTGGAGTCTTGTCAC
Col1A1	GAGGAACTTTGCTTCCCAGA ACCACGAGGACCAGAAGGAC
Col1A2	GTCTGTTGGAGCTGCTGGCCCAT GCAGCACCAGGAAGCCAGTCAT
Col3A1	GGTCCTCCAGGAGAAAATGG GTGCACCAGAATCACCCCTTG

Material

Zielgen	Sequenz
CRIP1	ATCGTCCCTGCCTGAAGTGT CCCAAACATGGCGGAGTAGC
CRP1	CATGAGGAAGCCCCTGGAC GACCGCCTGGCTACAGCG
CRP2	CCAGAGATGCTCAACCTC ACACGGAATCCCCACAVVT
CRP3	TGAGAAGGTCATGGGAGGTG AGCTCCCCATCCTTGTTCAGT
CRP4	ACGATGGCCAGCCCTACT TAGCTGCCACAGCACCA
CTGF	AGGGCCTCTTCTGCGATTTT TACACCGACCCACCGAAGAC
Fn1	CGGAGAGAGTGCCCCTACTAC GACCCGCATCGTGTCTGGA
GC-A	TTGGTGGGCAGCCTCTCTC CCGCCACAACCTCTGAGACCA
GC-B	GCAGGACAATCGAACCCAGG GGTTCTCGGTATGTGATCACC
HPRT	CATTATGCCGAGGATTTGGA CCTTCATGACATCTCGAGCA
MMP9	GGAGTTCTCTGGTGTGCCCT ACACGCCAGAAGAATTTGCCA
PDE1C	GAAAGCATGGGACCTGCACC GAGGAGAAAATGGCAGCCCC
PDE2A	TATCGACATTGCTGGCCTGC CTCCCCATCTAGCAGGTAGGT
PDE3A	CAAAGTGCCCCTGACCTGTC CTGAGGGTCCATCAGCAGGA
PDE5A	GGAACACCATCATTTTGACCAGT AGAGGCCACTGAGAATCTGGT
SERCA2	CTGCTGCATGGTGGTTCAT TCCACTCCATCGAAGTCTGG
TIMP1	CCACCCACAGACAGCCTTCT CGCTGGTATAAGGTGGTCTCG
$\alpha$ -MHC	TGCTGACAGATCGGGAGAAT TGCTGGCAAAGTACTGGATG
$\alpha$ -SMA	AGAGGCACCACTGAACCCTA GCATAGAGGGACAGCACAGC
$\beta$ -MHC	GCCAAGACAGTTCGGAATGA TCTGCAGATGCCAACTTTCC

→ Die Oligonukleotid-Lyophilisate wurden in dH<sub>2</sub>O gelöst und auf eine Zielkonzentration von 2  $\mu$ M eingestellt.

## 2.4.6 Proteinanalytik

### Versuchsspezifische Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Acrylamidlösung (RotiphoreseGel)	3029.2	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592.2	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
Complete Mini-Tabs	11836170001	Roche
Coomassie-Brilliant-BlueG250	3862.2	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	6908.1	Carl Roth
EGTA	E3889	Sigma-Aldrich
Essigsäure (100%)	3738.5	Carl Roth
Filterpapiere (0,35 mm)	CL67.1	Carl Roth
Glycerin	3783.1	Carl Roth
Glycin	3908.3	Carl Roth
Hamilton-Spritze zur Probenapplikation	X035	Carl Roth
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
Methanol	4627.5	Carl Roth
Milchpulver	T145.3	Carl Roth
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	K305	Carl roth
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	3957.2	Carl Roth
Nonidet-P40	74385-1	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	6367.2	Carl Roth
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 1	P0044-5	Sigma-Aldrich
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	P5726-5	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure (84,5%)	6366.1	Carl Roth
Proteinmarker IV	27-2110	PeqLab
PVDF-Membran (Blot, Immobilon Millipore)	T831.1	Carl Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	8076.2	Carl Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	5136.2	Carl Roth
Sterilfilter	BT25	Sarstedt
Tetramethylethyldiamid (TEMED)	263.3	Carl Roth
Tris	5429.3	Carl Roth
TrueBlotBeads	00-8000-25	Biomol
Tween 20	9127.1	Carl Roth
UV-Küvetten	0030106300	Eppendorf
$\beta$ -Mercaptoethanol	4227.1	Carl Roth
$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	A2504	Sigma-Aldrich

### Herstellung von Proteinlysaten und Konzentrationsbestimmung

1 M Tris-HCl pH 8,3		200 mM PMSF	
Tris	121,14 g	PMSF	348,4 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	Ethanol (100%)	10 ml
→ auf pH 8,3 einstellen		→ Lagerung bei -20°C	

## Material

---

---

### SDS-Lysepuffer

Tris-HCl (1 M, pH 8,3)	210 µl
SDS (10%)	670 µl
β-Mercaptoethanol	170 µl
PMSF (200 mM)	20 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml

---

---

### Bradford-Lösung

Coomassie-Brilliant-BlueG250	100 mg
Phosphorsäure (84,5%)	100 ml
Ethanol (100%)	50 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

---

---

### 4x Laemmli

SDS	2,25 g
Tris	1,2 g
Glycerin	20 ml
Bromphenolblau	6 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
→ auf pH 6,7 einstellen	

---

---

### 4x Laemmli mit DTT

4x Laemmli	1,5 ml
DTT (1 M)	75 µl

---

## Gelelektrophorese

---

### 1,8 M Tris-HCl pH 8,8

Tris	
dH <sub>2</sub> O	
→ auf pH 8,8 einstellen	

---

---

### 0,6 M Tris-HCl pH 6,8

Tris	
dH <sub>2</sub> O	
→ auf pH 6,8 einstellen	

---

---

### Trenngel 7,5 %

Acrylamid (Rotiphorese)	4,3 ml
Tris-HCl (1,8 M, pH 6,8)	3,6 ml
dH <sub>2</sub> O	8,5 ml
SDS (10%)	167 µl
TEMED	20 µl
APS (30%)	66,6 µl

---

---

### Trenngel 10 %

Acrylamid (Rotiphorese)	5,7 ml
Tris-HCl (1,8 M, pH 6,8)	3,6 ml
dH <sub>2</sub> O	7,4 ml
SDS (10%)	167 µl
TEMED	20 µl
APS (30%)	66,6 µl

---

---

### Trenngel 17,5 %

Acrylamid (Rotiphorese)	9,7 ml
Tris-HCl (1,8 M, pH 6,8)	3,6 ml
dH <sub>2</sub> O	3,4 ml
SDS (10%)	167 µl
TEMED	12 µl
APS (30%)	56,6 µl

---

---

### Sammelgel 5 %

Acrylamid (Rotiphorese)	1,66 ml
Tris-HCl (0,6 M, pH 6,8)	1,0 ml
dH <sub>2</sub> O	7,3 ml
SDS (10%)	100 µl
TEMED	20 µl
APS (30%)	33,2 µl

---

→ Die Mengen sind für jeweils 4 Gele berechnet

**10x Elphor**

Tris	3150 g
Glycin	720 g
SDS	50 g
dH <sub>2</sub> O	ad 5000 ml
→ auf pH 8,3 einstellen	

→ 1x Elphor: 1:10 mit dH<sub>2</sub>O verdünnen

**Coomassie-Färbelösung**

Coomassie-Brilliant-BlueG250	1,5 g
Methanol	455 ml
Essigsäure (100%)	90 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Coomassie-Entfärber**

Methanol	300 ml
Essigsäure (100%)	100 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Western Blot****Anodenpuffer I**

Tris	36,3 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 10,4 einstellen	

**Anodenpuffer II**

Tris	3,6 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 10,4 einstellen	

**Kathodenpuffer**

Tris	3,0 g
6-Aminocapronsäure	5,8 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 7,6 einstellen	

**10x TBST**

Tris	24,2 g
NaCl	164,6 g
Tween 20	10 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 2000 ml
→ auf pH 8,0 einstellen	

1x TBST: 1:10 mit dH<sub>2</sub>O, steril filtrieren

**Blockierungslösung**

Milchpulver	5 g
1x TBST	ad 100 ml

**AK-Verdünnungslösung**

1x TBST	95 ml
BSA	5 g
NaN <sub>3</sub> (10%)	500 µl

## Material

### Verwendete Primär-Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti cGKI <sub>α/β</sub>	Kaninchen	1:500	Prof. Hofmann, München
Anti Crip1	Kaninchen	1:750	Abgent (#AP4707b)
Anti CRP3/MLP	Kaninchen	1:1500	Proteintech (#1072-1-AP)
Anti CRP4	Kaninchen	1:2000	Pharmakologie AK Ruth
Anti GAPDH	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling (#2118)
Anti Moesin	Kaninchen	1:200	Upstate Bioscience (#07-121)
Anti HSP 60	Kaninchen	1:200	Santa Cruz (#sc13966)
Anti COX IV	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling (#4844)
Anti Mybpc3	Kaninchen	1:500	Proteintech (#19977-1-AP)
Anti p-VASP (Ser239)	Maus	1:500	Enzo (#ALX-804-240)
Anti Phospho (Ser/Thr)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling (#9621)
Anti Troponin I	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling (#4002)
Anti Vinculin	Kaninchen	1:200	Santa Cruz (#sc5573)
Anti α-Actinin	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich (#SAB2100039)

### Verwendete Fluorophor-gekoppelte Sekundär-Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Mouse Cy 3 ECL Plex	Ziege	1:1000	GE Healthcare (#PA43009)
Anti-Rabbit Cy 5 ECL Plex	Ziege	1:2500	GE Healthcare (#PA45011)

### Co-Immunpräzipitation

IP-Lysepuffer		IP-Waschpuffer	
Tris HCl (1 M, pH 7,4)	0,3 ml	Tris HCl (1 M, pH 7,4)	0,3 ml
NaCl (4 M)	475 µl	NaCl (4 M)	475 µl
NP 40 (10%)	500 µl	NP 40 (10%)	100 µl
EGTA (0,1 M)	500 µl	EGTA (0,1 M)	500 µl
Phosphatase-Inhibitor I	100 µl	Phosphatase-Inhibitor I	100 µl
Phosphatase-Inhibitor I	100 µl	Phosphatase-Inhibitor I	100 µl
1 Tablette Complete Mini		1 Tablette Complete Mini	
dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml	dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml

### IP-Ladepuffer (2x)

Tris HCl (1 M, pH 8,3)	2 ml
SDS	3 g
Glycerol (100%)	5 ml
Bromphenolblau	6 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

→ kurz vor Gebrauch 950 µl IP-Ladepuffer mit 50 µl 1M DTT-Lösung versetzen und mit den entsprechenden IP-Lysaten 1:1 verdünnen.

### 2.4.7 Bestimmung von cGMP

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
cGMP EIA Kit	Cay581021-96	Cayman Chemical Company
<i>Bestandteile des Kits:</i>		
cGMP EIA-Probenpuffer (10x) → mit dH <sub>2</sub> O 1:10 verdünnen	400060	
cGMP EIA-Antiserum	481022	
cGMP AChE Tracer	481020	
cGMP EIA-Standard	481024	
Polysorbat 20	400035	
cGMP EIA-Waschpuffer (400x) → mit dH <sub>2</sub> O 1:10 verdünnen plus 1 ml Polysorbat 20	400062	
96-Lochplatte	400004	
Folie zum Abkleben der Platte	400012	
Ellmann's Reagenz	400050	

## 3 Methoden

### 3.1 Methoden der Mauszucht

#### 3.1.1 Tierhaltung

Alle Versuchstiere wurden in der Abteilung Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmakologie des Instituts für Pharmazie der Universität Tübingen gemäß den tierschutzrechtlichen Bestimmungen gezüchtet. Die Mäuse wurden in den S1-Tierhaltungsräumen unter kontrollierten Bedingungen bei  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  Raumtemperatur und  $55 \pm 5\%$  Luftfeuchtigkeit in 2-er oder 3-er Gruppen in ihren Käfigen in einem offenen SPF-Haltungssystem bei einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten (Makrolon Typ II). Außerdem hatten die Mäuse jederzeit freien Zugang zu standardisiertem Futter und Wasser *ad libitum*. Tiere, die sich in einem Versuch befanden, wurden in mobilen Luftstromschränken (Uniprotect) unter denselben Bedingungen gehalten. Die durchgeführten Tierversuche waren von der zuständigen Tierschutzbehörde (Regierungspräsidium Tübingen) unter Beachtung der deutschen Tierschutzgesetze genehmigt.

#### 3.1.2 Verpaarung der Versuchstiere

Die Zucht der Mäuse erfolgte in Dauerverpaarungen von einem Männchen mit 1-2 weiblichen Tieren in speziell dafür ausgelegten Zuchtkäfigen (Makrolon Typ III). Empfehlenswert war in diesem Zusammenhang ein Mindestalter der Elterntiere von 6 (Weibchen) bzw. 8 Wochen (Männchen). Für eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse sollten die späteren Versuchstiere idealerweise Wurfgeschwister sein. Nach Bestimmung ihres Genotyps (s. 3.2) wurden die Nachkommen im Alter von 3-4 Wochen von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt.

#### 129-Crip2<sup>tm/Ruth</sup>

Zur Generierung der CRP4-WT (Genotyp: CRP4<sup>+/+</sup>) und CRP4-KO (Genotyp: CRP4<sup>-/-</sup>) Wurfgeschwister für die Experimente zur Untersuchung der Funktion von kardialem CRP4 wurden heterozygote Elterntiere (Genotyp: CRP4<sup>+/-</sup>) verpaart. Aus diesen Verpaarungen resultieren die erwarteten Zahlenverhältnisse der Genotypen in der Nachkommenschaft von 50% CRP4<sup>+/-</sup>, 25% CRP4<sup>+/+</sup>, sowie 25% CRP4<sup>-/-</sup>. Für die *in vivo*-Experimente (s. 3.3) wurden nur männliche Nachkommen verwendet. Diese wurden im Alter von 10-15 Wochen den Versuchen zugeführt. Untersuchungen zum Gendosiseffekt wurden zudem mit heterozygoten Wurfgeschwistertieren (CRP4-HET; Genotyp: CRP4<sup>+/-</sup>) durchgeführt. Für



Zellkultur-basierte Experimente (s. 3.4.3 und 3.4.5) wurden weibliche Geschwistertiere im Alter von 6-10 Wochen herangezogen.

#### **BI6-Tg <sup>$\alpha$ MHC-AT1R/Nemer</sup>**

Für die chronische SIL-Behandlung wurden transgene  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse und deren WT-Wurfgeschwister verwendet. Zum Aufbau einer Zuchtlinie (sogenannte *Foundertiere*) wurden  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere mit C57/BI6-Mäusen im Sinne einer Erhaltungszucht kontinuierlich verpaart. Sowohl männliche als auch weibliche Tiere wurden im Alter von 60 Tagen der SIL-Behandlung (s. 3.3.1) zugeführt. Für Untersuchungen des generellen Phänotyps der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse bezüglich Hypertrophie, Fibrosierung und der Rolle des cGMP/cGKI-Signalweges im transgenen Tiermodell wurden  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse und deren WT-Wurfgeschwister im Alter von 60, 120 und 160 Tagen miteinander verglichen (s. 4.1).

#### **129-Crip2<sup>tm/Ruth</sup> x BI6-Tg <sup>$\alpha$ MHC-AT1R/Nemer</sup>**

Die Generierung dieser Doppelmutanten ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO) erfolgte über mehrere Verpaarungsschritte. Zunächst wurden CRP4-KO (Genotyp: CRP4<sup>-/-</sup>) mit  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-transgenen Tieren verpaart. Aus diesen Kreuzungen resultierende F1-Tiere mit dem Genotyp  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup> x CRP4<sup>+/-</sup> wurden als Eltern für die Zucht der eigentlichen Versuchstiere verwendet. Hierfür wurden  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup> x CRP4<sup>+/-</sup>-Mäuse mit heterozygoten CRP4-Tieren (Genotyp: CRP4<sup>+/-</sup>) verpaart. Die Doppelmutanten der F2-Generation basierten somit auf einem *mixed*-Hintergrund (75% Sv129 und 25% C57/BI6). Für die Experimente zum progredienten Herzwachstum und der Herzfunktion der Doppelmutanten (s. 4.11) wurden 400 Tage alte, männliche Tiere folgender Genotypen miteinander verglichen:  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup> x CRP4<sup>+/+</sup>, sowie  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup> x CRP4<sup>-/-</sup>.

#### **FVB-Tg <sup>$\alpha$ MHC-red cGES-DE5/Nikolaev</sup>**

$\alpha$ MHC-red cGES-DE5-Tiere sollten verwendet werden, um die cGMP-Spiegel in Kardiomyozyten von transgenen  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren zu messen. Zunächst wurden  $\alpha$ MHC-red cGES-DE5-Tiere mit reinen FVB-Tieren im Sinne einer Erhaltungszucht und zur Generierung weiterer Elterntiere verkreuzt.

#### **FVB-Tg <sup>$\alpha$ MHC-red cGES-DE5/Nikolaev</sup> x BI6-Tg <sup>$\alpha$ MHC-AT1R/Nemer</sup>**

Um die cGMP-Spiegel in Kardiomyozyten von Tieren der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Linie messen zu können, wurden diese mit den sensortragenden  $\alpha$ MHC-red cGES-DE5-Tieren verpaart. Die aus dieser Kreuzung resultierenden Tiere der F1-Generation ( $\alpha$ MHC-red cGES-DE5/ $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup> und  $\alpha$ MHC-red cGES-DE5/WT) konnten direkt den FRET-Messungen zugeführt werden (s. 3.4.4).

## 3.2 Genotypisierung der Versuchstiere

Bevor sie den jeweiligen Versuchen zugeordnet werden konnten, musste von allen Tieren routinemäßig der Genotyp bestimmt werden. Im Alter von 2-4 Wochen wurden diese zunächst mit einem Ohrclip versehen. Anschließend wurde bei jeder Maus eine Biopsie entnommen, die aus einem etwa 1-2 mm langen Stück der Schwanzspitze bestand. Aus diesem Biopsat konnte DNA isoliert, durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert werden.

### 3.2.1 DNA-Isolierung aus Schwanzspitzenbiopsien

Die Isolierung der DNA aus den Mausschwänzen für die Genotypisierung erfolgte mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* der Firma Roche (s. 3.2.1). Hierbei wurde die Gewebebiopsie mit 200 µl *Tissue Lysis Buffer* und 40 µl Proteinase K versetzt und über Nacht (alternativ mindestens 3 Stunden) bei 55°C unter kräftigem Schütteln (550 U/min) inkubiert. Durch den Puffer werden Zellmembrane zerstört, die Proteinase K baut in ihrer Funktion als Endo- und Exopeptidase Proteine des Zelllysats ab und inaktiviert im Zusammenspiel mit EDTA endogene DNAsen. Nach mechanischer Zerkleinerung des verdauten Gewebes mit sterilen Pipettenspitzen wurden 200 µl Bindepuffer und 100 µl Isopropanol hinzu pipettiert. Durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm wurden die zellulären Bestandteile der Proben sedimentiert. Die DNA im Überstand wurde anschließend in ein neues Polypropylen-Filterröhrchen überführt. Diese enthalten kleine Silica-Kügelchen, an die Nukleinsäuren in Gegenwart von Guanidin, welches im Bindepuffer enthalten ist, hochaffin binden. Während der folgenden Waschschriffe mit zweimal je 500 µl Waschpuffer (1 min, 8000 rpm) verblieb die DNA auf der Säulenmatrix, während Verunreinigungen eluiert und verworfen wurden. Die Retention der DNA wird durch Zugabe von 200 µl Elutionspuffer (70°C) aufgelöst. Dieser destabilisiert durch die hohe Tris-Konzentration (10 mM) die Wechselwirkungen zwischen der Silica-Säule und der DNA, sodass diese durch einen erneuten Zentrifugationsschritt (1 min, 8000 rpm) von der Säule gelöst werden konnte. Die eluierten Nukleinsäuren konnten kurzfristig bei 4-8°C gelagert werden, bei späterer Weiterverarbeitung empfahl sich die Aufbewahrung bei -20°C.

### 3.2.2 Amplifikation der DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven enzymatischen Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte (Mullis and Faloona 1987). Der Ablauf der PCR ist ähnlich einer natürlichen Replikation. Eine DNA-Polymerase synthetisiert einen komplementären Strang zum gewünschten Abschnitt der DNA. Um eine Vervielfältigung zu ermöglichen, müssen die Sequenzen, die diesen Abschnitt flankieren, bekannt sein. Im ersten Schritt der PCR wurden bei 94°C die Wasserstoffbrückenbindungen und somit die Basenpaarungen der doppelsträngigen DNA gelöst. Anschließend erfolgte bei 57°C das sogenannte *Annealing*. Hierbei hybridisierten zwei kurze Oligonukleotide, die Primer, an die

flankierenden Sequenzen der nun einzelsträngig vorliegenden DNA. Gemäß dem Primerdesign konnten die jeweiligen genetischen Veränderungen der verschiedenen Mauslinien (s. 2.1) nachgewiesen werden. Ein Primer hybridisierte an das 3'-Ende der Zielsequenz auf dem kodierenden Strang (*Forward-Primer*), der andere an jenes des Komplementärstrangs (*Reverse-Primer*). Durch Zugabe der Primer im Überschuss wurde eine Rehybridisierung der Einzelstränge verhindert. Ausgehend von der durch die Primer markierte DNA-Matrize synthetisierte nun eine DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung die Komplementärstränge mit den zugegebenen Desoxyribonukleotiden (dNTPs) als Bausteine. Hierfür wurde die hitzestabile DNA-Polymerase I des Eubakteriums *Thermus aquaticus* mit einem Temperaturoptimum von 72°C verwendet. Die Vervielfältigung der spezifischen DNA-Abschnitte wird als Elongation bezeichnet. Der beschriebene Kreislauf aus Denaturierung, *Annealing* und Elongation durch simple Temperaturänderungen wurde ca. 30 mal wiederholt. Da auch alle neu synthetisierten DNA-Stränge wieder als Matrize dienten, wurde das gewünschte DNA-Fragment in jedem Zyklus exponentiell verdoppelt. Die gesamte Reaktion wurde in 500 µl fassenden Eppendorf PCR-Gefäßen unter Zusatz von 10x Taq-Puffer (Roche) für eine optimale Aktivität der Polymerase (pH-Wert über 8 und freie Magnesium-Ionen) in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler) durchgeführt. Sämtliche PCRs für die Nachweise der unterschiedlichen Genotypen wurden nach demselben Schema pipettiert (dargestellt für eine Probe) und konnten mit demselben Programm durchgeführt werden:

Pipettierschema		PCR-Programm	
dH <sub>2</sub> O	38,8 µl	Initiale Denaturierung (94°C)	3 min
Vorwärtsprimer 1 (4 µM)	1 µl	Denaturierung (94°C)	30 sec
Vorwärtsprimer 2 (4 µM)	1 µl	Primeranlagerung (57°C)	30 sec
Rückwärtsprimer (4 µM)	1 µl	Elongation (72°C)	30 sec
(jeder zusätzliche Primer)	1 µl	→ Wdh. 30 Zyklen	
dNTPs (10 mM/Nukleotid)	1 µl	Finale Elongation (72°C)	3 min
10x Taq-Puffer	5 µl	Kühlung (4°C)	max. 1 d
Taq-Polymerase	0,2 µl		
Isolierte Biopsat-DNA	3 µl		

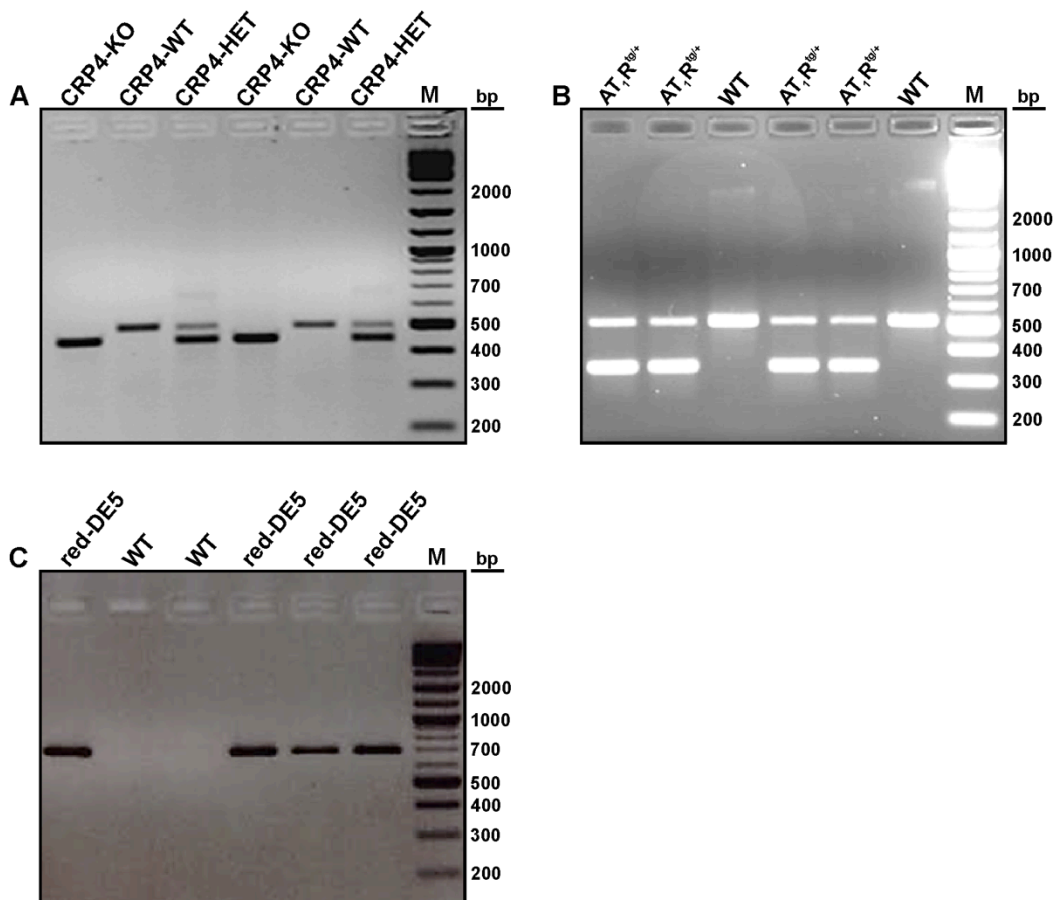
### 3.2.3 Detektion der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend im elektrischen Feld aufgetrennt. Hierbei macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, dass die Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats von Nukleinsäuren negativ geladen sind. Ihre Laufrichtung ist somit zum Pluspol (Anode) gerichtet. Die DNA-Moleküle wandern mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zu ihrer Größe ist, durch das Agarosegel. Kleinere Fragmente legen demnach eine längere Strecke im als Molekularsieb fungierenden Agarosegel zurück als größere Fragmente. Der Elektrophorese-Puffer (1x TBE, Tris-Borat-EDTA Puffer, s. 2.4.1), der einen pH-Wert von 8,0 aufweist und das Gel überschichtet, gewährleistet den polyanionischen Zustand der DNA und somit auch die Wanderung im Gel. Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen wurde ein Längenstandard (2-Log DNA-Ladder)

## Methoden

aufgetragen, der DNA-Fragmente mit definierten Größen enthält. Durch Gegenüberstellung der resultierenden Banden im Agarosegel konnte die Größe der DNA-Fragmente beurteilt werden.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 2%ige Agarosegele verwendet. Zu deren Herstellung wurde hochreine Agarose in 1x TBE-Puffer (s. 2.4.1) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, auf einem Magnetrührer auf ca. 50°C abgekühlt, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid auf eine finale Konzentration von 0,1 µl/ml versetzt, in einen Gelschlitten gegossen und bei Raumtemperatur ungefähr 20 min zum Polymerisieren stehen gelassen. In dieser Zeit konnten die PCR-Proben mit dem 6-fach konzentrierten Ladebuffer im Verhältnis 5:1 versetzt werden. Dessen hohe Viskosität bedingte, dass die Mischung in den ausgesparten Geltaschen verblieb und nicht in den Elektrophorese-Puffer diffundierte. Die Wanderung der im Laufpuffer enthaltene Farbstoffe Bromphenolblau (ca. 100 bp) und Xylencyanol (ca. 800 bp) gaben Anhaltspunkte, an welcher Stelle im Gel sich Banden mit entsprechender Größe befanden (s. Abb. 3.1). Bei angelegten Spannungen zwischen 80 V und 130 V dauerte die Elektrophorese ca. 1-2 Stunden. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA. So konnte diese durch Bestrahlen mit UV-Licht sichtbar gemacht und die Banden den entsprechenden Versuchstieren (s. 2.1) zugeordnet werden.



**Abb. 3.1: Genotypisierung und Identifizierung der Versuchstiere.**

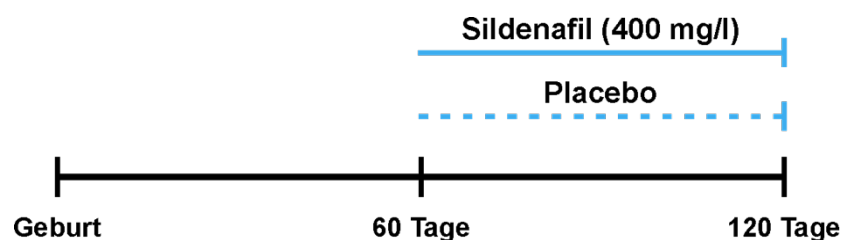
Repräsentative Bilder nach Auftrennung der PCR-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese zur Identifizierung der jeweiligen Versuchstiere. (A) CRP4-Mauslinie, (B) αMHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mauslinie und (C) red cGES-DE5-Sensor-tragende Mäuse (hier red-DE5 abgekürzt). Weitere Erläuterungen im Text.

Die PCR-Strategie, die dem Nachweis von CRP4 zugrunde liegt, basiert auf dem spezifischen Nachweis der Exons 2-7, die bei CRP4-defizienten Mäusen deletiert wurden (Schmidtko et al. 2008). Ein Amplifikat mit einer Größe von 500 Basenpaaren (bp) dient der Identifizierung des CRP4-WT Allels, während der Nachweis des CRP4-KO Allels durch eine Bande von 421 bp erfolgte. Das  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R-Transgen konnte durch ein PCR-Fragment mit einer Größe von ca. 350 bp detektiert werden, eine zusätzlich DNA-Bande von ca. 520 bp diente als interne Kontrolle zur Überprüfung der PCR. Tiere, die den red cGES-DE5 in ihrem Genom integriert hatten, wurden durch ein Signal bei knapp 700 bp identifiziert (s. Abb. 3.1).

### 3.3 In-vivo Versuche

#### 3.3.1 Sildenafil-Behandlung

Die Verabreichung des PDE5-Hemmstoffes Sildenafil (SIL) erfolgte *ad libitum* mit dem Trinkwasser. Um trotz der hohen Metabolisierungsrate von SIL im murinen Organismus ausreichende Wirkspiegel zu erreichen, wurde die Dosis auf 100 mg/kg/d festgelegt (Takimoto et al. 2005, Patrucco et al. 2014). Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 20 g und einem Wasserkonsum von 5 ml pro Tag, ergibt sich daraus eine SIL-Konzentration von 400 mg/l. Mit diesem Behandlungsregime beträgt die durchschnittliche Plasmakonzentration von SIL 70 nM (Adamo et al. 2010). Um den Wirkstoff zu lösen bzw. eine verfrühte Ausfällung von SIL zu verhindern, wurde der pH-Wert mit Zitronensäure auf 4,5 herabgesetzt. Zur weiteren Erhöhung der Löslichkeit wurden Leitungs- und deionisiertes Wasser im Verhältnis 60:40 verwendet. Die Tiere der unbehandelten bzw. Placebo-behandelten Gruppe erhielten exakt dasselbe Trinkwasser nur ohne Wirkstoffzusatz. Um eine kontinuierliche Behandlung zu gewährleisten, wurde die Lösung alle vier Tage frisch zubereitet.  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse sowie deren WT-Geschwistertiere wurden ab ihrem 60. Lebenstag für weitere 60 Tage entweder mit SIL oder Placebo-Flüssigkeit behandelt (s. Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Schema der Sildenafil-Behandlung.**

Die Gabe des PDE5-Hemmstoffes Sildenafil erfolgte *ad libitum* im Trinkwasser ab dem 60. Lebenstag für weitere 60 Tage in einer Dosierung von 400 mg/l. Weitere Erläuterungen im Text.

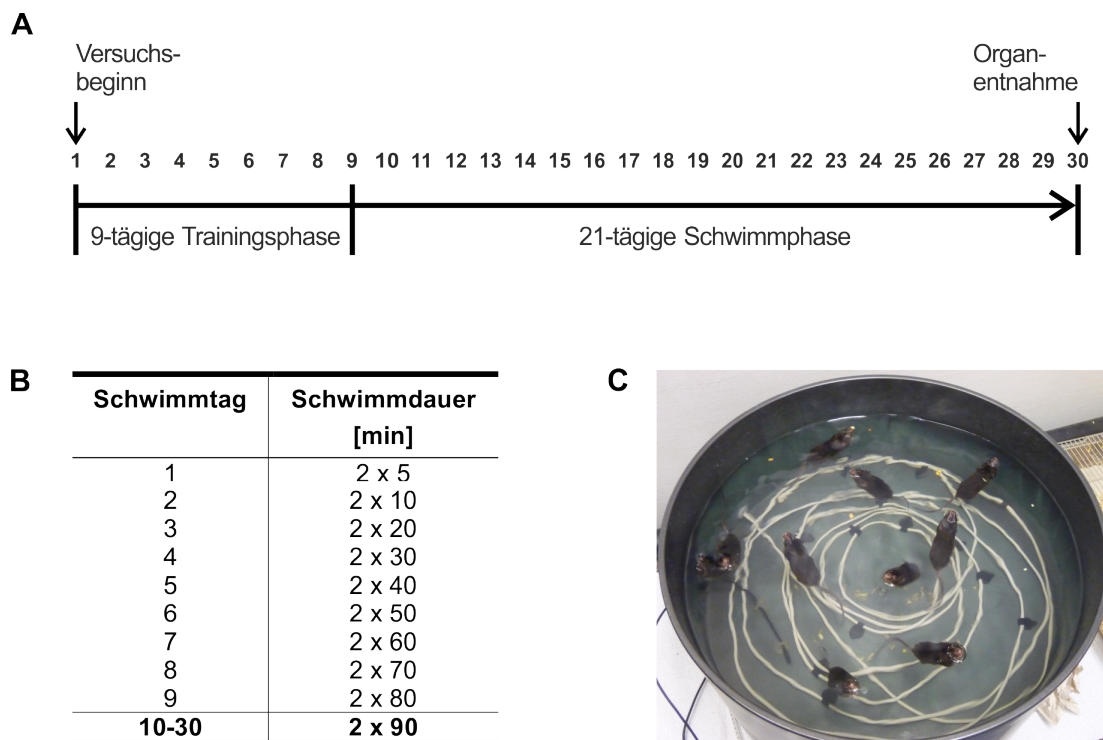
Der Beginn der SIL-Behandlung wurde auf den 60. Lebenstag festgelegt, da der AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist Losartan zu diesem Zeitpunkt das Fortschreiten der kardialen Umbauprozesse in  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäusen verzögern konnte (Paradis et al. 2000). Während

der Behandlung wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten und ihr Gewicht wöchentlich dokumentiert. Nach Beenden der SIL-Applikation und dem Erreichen des 120. Lebensstages wurden die Tiere geopfert, das Herz entnommen (s. 3.4.1) und für histologische (s. 3.5) und proteinbiochemische Untersuchungen (s. 3.7) sowie zur RNA-Analytik (s. 3.6) aufbereitet. Bei zwei Kohorten wurde außerdem mittels Echokardiographie eine Untersuchung der Herzfunktion vorgenommen (s. 3.3.5).

### **3.3.2 Induktion physiologischer Herzhypertrophie durch Schwimmtraining**

Ein physiologisches Myokardwachstum wurde in männlichen CRP4-WT und CRP4-KO Tieren durch ein körperliches Training in Form von Schwimmen induziert. Diese Methode ist in der kardiovaskulären Forschung sehr gut etabliert (Heineke et al. 2010): So sind die Tiere in diesen Experimenten - im Gegensatz zu Versuchen mit Laufrädern, bei denen die Mäuse gemäß ihrer Motivation trainieren - während der gesamten Versuchszeit in Bewegung. Dies führt zu geringeren Schwankungen innerhalb der Versuchsgruppe, sowie zu einer hohen Reproduzierbarkeit und laborübergreifender Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Für die Schwimmexperimente wurde ein rundes Behältnis mit einer Fläche von 2000 cm<sup>2</sup> und einer Tiefe von 15 cm verwendet (s. Abb. 3.3). Dies entspricht den Vorgaben des National Heart Lung and Blood Institute (NHLBI), eine dem National Institute of Health (NIH) zugehörige Division für Herz-Kreislaufkrankungen (<http://cardiogenomics.med.harvard.edu/groups/proj1/pages>). Um die Tiere keinem zusätzlichen Stress auszusetzen, wurde das Wasser für die Experimente beheizt und die Temperatur über die gesamte Versuchsdauer konstant bei 30-32°C gehalten. In einer Versuchsreihe schwammen maximal 12 Mäuse gleichzeitig in dem Becken. Die physischen Interaktionen zwischen den Tieren beim Schwimmen in einer Gruppe sind durchaus erwünscht, so waren diese ständig in Bewegung und die Phasen, in denen die Mäuse bewegungslos gleiten, das sog. *Floaten*, konnten verringert werden. Vor Beginn des Experiments wurden die Tiere im Experimentierraum an einen „umgekehrten“ Tag-Nacht-Rhythmus gewöhnt. Hierfür wurden mit Hilfe einer Zeitschaltuhr die Hell- und Dunkelphasen alle zwei Tage um je eine Stunde verschoben. Auf diese Weise konnten die Experimente in der Aktivitätsphase der Mäuse, also im Dunkeln, stattfinden. Das Versuchsprotokoll startet mit zweimal täglichem Schwimmen über 5 min. In der anschließenden „Trainingsphase“ wurde ab dem 2. bis zum 10. Tag die Schwimmdauer sukzessive in 10-Minuten-Schritten Tag für Tag gesteigert (Kaplan et al. 1994). Dies ermöglicht eine langsame und kontinuierliche Adaptation der Tiere an das Schwimmtraining bei initial möglichst niedrigen Belastungen. Nach dieser „Trainingsphase“ folgten weitere 20 Tage über die volle Schwimmdauer von zweimal täglich 90 min (s. Abb. 3.3). In dieser Zeit sollte sich das physiologische Herzwachstum der nun gut trainierten Mäuse etablieren. Die Literatur beziffert die durchschnittliche Zunahme der Herzmasse mit diesem Protokoll auf 16,5% (Kaplan et al. 1994). An jedem Versuchstag betrug die Zeit zwischen den Trainingseinheiten, in der sich die Tiere erholen konnten, mindestens vier Stunden. Der Experimentator verweilte über die gesamte Dauer aller Schwimmeinheiten neben dem Becken und beobachtete die Tiere fortwährend. Nach jeder Schwimmphase wurden die Tiere mit einem saugfähigen Zellstofftuch vorsichtig getrocknet und in ihre Käfige

zurückgesetzt. Das Trocknen wurde mittels wärmenden Rotlichtlampen unterstützt. Auch hier wurde das Körpergewicht zweimal in der Woche kontrolliert. Nach Beenden der Schwimmversuche wurden die Herzen der Tiere entnommen, das Ausmaß der Hypertrophie bestimmt (s. 3.4.1) und die Herzen gegebenenfalls weiter aufgearbeitet.



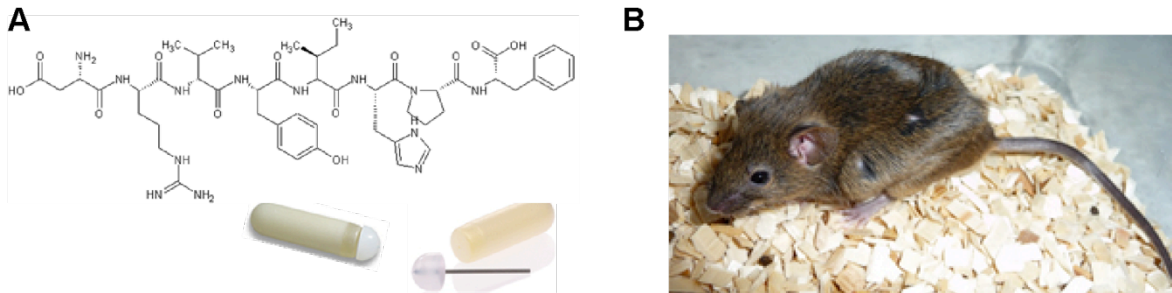
**Abb. 3.3: Schwimmversuche zur Induktion einer physiologischen Herzhypertrophie.**

(A) Zeitstrahl über den Ablauf des Experiments. (B) Der 9-tägigen Gewöhnungsphase folgten weitere 21 Tage Schwimmen über 2x täglich 90 min gemäß einem etablierten Protokoll (Kaplan et al. 1994). (C) Beheizbares Behältnis zur Durchführung der Schwimmexperimente. Weitere Details im Text.

### 3.3.3 Angiotensin II-Applikation mittels osmotischer Minipumpen

Ein pathophysiologisches Herzmuskelwachstum von CRP4-WT, CRP4-HET und CRP4-KO Tieren (männlich, 10-15 Wochen alt) wurde durch kontinuierliche, subkutane Applikation des Peptidhormons Ang II in einer wachstumspromovierenden Dosis von 2 mg/kg/d (gelöst in 0,9% NaCl/0,01 M Essigsäure, s. 2.4.2) stimuliert (Nakayama et al. 2010, Patrucco et al. 2014). Die Kontrolltiere beider Genotypen erhielten NaCl. Die Applikation erfolgte über eine 7-tägige Dauerinfusion mittels osmotischer Minipumpen (s. Abb. 3.4). Diese wurden durch einen kleinen Hautschnitt in die Maus eingesetzt. Fortan wurde das Arzneistoffreservoir durch Einströmen von interstitiellem Wasser durch eine semipermeable Membran zusammengedrückt und die Wirkstofflösung in einer vorbestimmten Flussrate von 0,5  $\mu$ l/h kontinuierlich an das Versuchstier abgegeben. Im Gegensatz zu Injektionen gewährleistet diese Methode gleichbleibende Blutspiegel und eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Theeuwes and Yum 1976). Die exakte Dosierung von Ang II wurde dem entsprechenden Körpergewicht des jeweiligen Tieres in Intervallen von 0,5 g durch Verdünnung einer Stammlösung mit dem Lösemittel angepasst. Von der entsprechenden

Ang II-Lösung wurden 115 µl hergestellt und in die osmotischen Minipumpen mit einem Fassungsvermögen von 100 µl mit Hilfe des mitgelieferten Kanülensystems eingefüllt. Um eine Adsorption des Peptidhormons Ang II an Kunststoffoberflächen von herkömmlichen Reaktionsgefäßen zu vermeiden, wurde die Ang II-Lösung in speziellen Polymerbeschichteten Reaktionsgefäßen hergestellt (Protein-LoBind Tubes, Eppendorf).



**Abb. 3.4: Ang II-Infusion mittels osmotischer Minipumpen.**

(A) Strukturformel von Ang II. Die osmotischen Minipumpen wurden mit einer Ang II-Lösung (500 µg/100 µl) befüllt. Die kontinuierliche Abgabe dieses pro-hypertrophen Neurohormons an das Versuchstier erfolgte über 7 Tage (B) Operierte Maus kurz nach der Implantation der Pumpe. Weitere Erklärungen im Text.

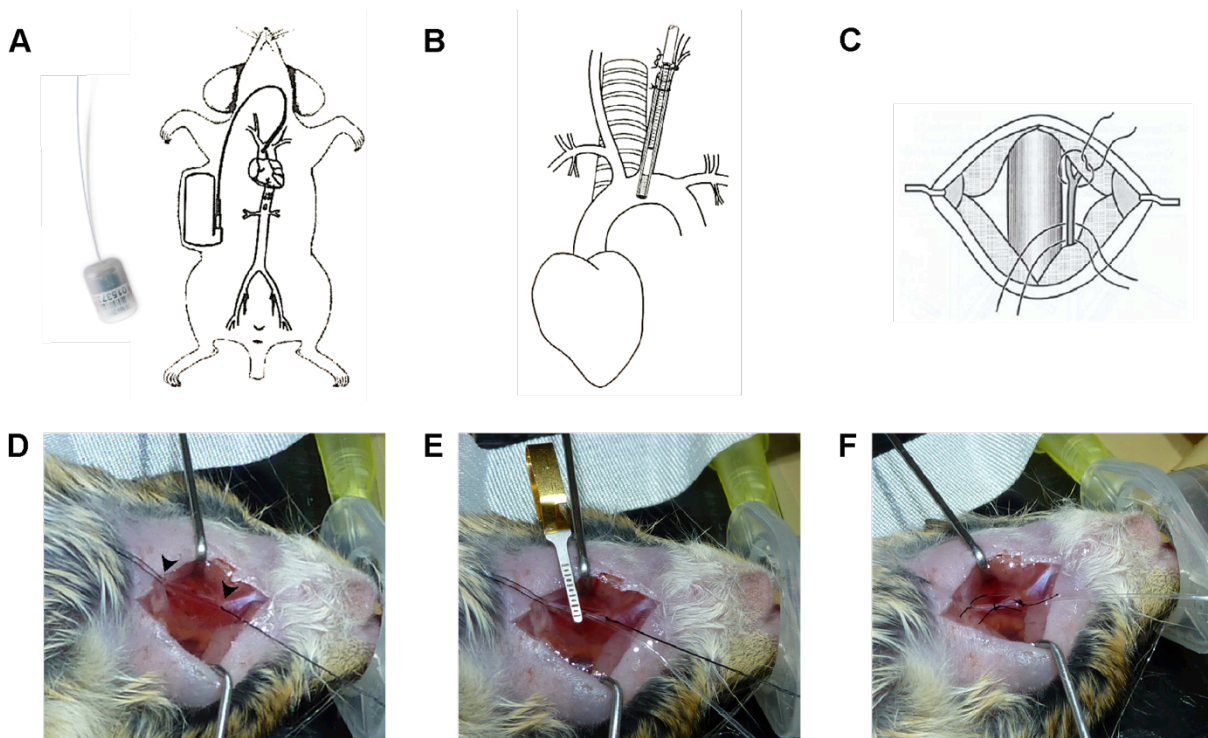
Es folgte eine Inhalationsnarkose, bestehend aus einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch, das erfahrungsgemäß eine sehr gute Steuerung von Dauer und Tiefe der Narkose ermöglicht. Als Anästhesieapparat wurde ein Narkosekreissystem mit integriertem Ventilator und einem vorgeschalteten Verdampfer für Isofluran verwendet und über eine Maske der Maus appliziert. Ein angestrebter Isofluran-Anteil von 1-2% zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde über die gesamte Dauer der Operation konstant gehalten. Eine Trachealintubation war hierfür nicht nötig. Für die Dauer des Eingriffs (ca. 10 min) wurde die Körpertemperatur der Maus über einen beheizten OP-Tisch bei 37°C gehalten. Nach Erreichen der erforderlichen Narkosetiefe (Aussetzen der Lid- und Zwischenzehenreflexe) wurde eine geeignete Stelle am Rücken zwischen den Flanken desinfiziert und ein kleiner Hautschnitt gesetzt. Dieser eröffnete nur Fell und Haut und ist ca. 1-1,5 cm lang. Wenn bei diesem Vorgehen die Haut des Tieres zusätzlich mit einer Pinzette leicht angehoben wurde, konnte eine Verletzung von tieferliegenden Muskelschichten durch den Schnitt ausgeschlossen werden. Die mit Ang II bzw. NaCl befüllten osmotischen Minipumpen wurden mittels sterilen Handschuhen entnommen, mit der vorbereiteten Lösung befüllt und mit dem Dispenser in Kopfrichtung der Maus eingesetzt. Anschließend wurde die Wunde vollständig mit bis zu fünf Einzelknopfnähten verschlossen und im Sinne einer Entzündungsprävention erneut desinfiziert. Bis zum Erwachen wurden die Tiere in ihren Haltungskäfigen durch eine Wärmelampe vor Hypothermie geschützt. Nach circa 45-60 min hatten sich die Mäuse vollständig von der Narkose erholt, was an ihrer lokomotorischen Aktivität beobachtet werden konnte.



### 3.3.4 Radiotelemetrische Blutdruckmessung

Ein Telemetrie-gestütztes Meßsystem erlaubt parallel die Aufzeichnung des systolischen und diastolischen Blutdrucks sowie der Herzfrequenz und der lokomotorischen Aktivität. Im Gegensatz zur nicht-invasiven Tail-Cuff-Plethysmographie, die für valide Ergebnisse täglich neu angewendet werden muss, werden die Mäuse insgesamt weniger gestresst, denn Katheter und Sender werden in einer einmaligen Operation eingesetzt und liefern über einen langen Zeitraum sehr genaue und reproduzierbare Messwerte (Van Vliet et al. 2000). Das Narkoseregime hierbei war analog zur Implantation der Minipumpen (s. 3.3.3). Um ein Austrocknen der Cornea unter Narkose zu verhindern, wurden die Augen der Mäuse mit einer dünnen Schicht Dexpanthenol-haltiger Augensalbe bedeckt. Das Tier wurde anschließend in Rückenlage auf einem beheizten OP-Tisch bei 37°C fixiert, wobei eine Überstreckung vermieden werden sollte. Die Temperaturkontrolle erfolgte über eine Rektalsonde. Nach Feststellen der erforderlichen Narkosetiefe durch völliges Ausbleiben der Lid- und Zwischenzehenreflexe wurde das Fell im Brustbereich mit einem Skalpell entfernt und die Haut desinfiziert. Anschließend erfolgte die ventrale Inzision, submandibulär beginnend bis zum Sternum, was ungefähr einer Länge von 2,5 cm entsprach. Die linke *Arteria carotis communis* und *Arteria carotis externa* wurden im Bereich der Bifurkation vorsichtig von umliegenden Gefäßen und Nervenbahnen freipräpariert. Der Zugang erfolgte hierbei nach vorsichtigem Teilen der beiden Hälften der *Glandula mandibularis* zwischen dem *Musculus sternohyoideus* und dem *Musculus sternomastoideus*, wobei der *Nervus vagus* so gut wie möglich geschont wurde. Während der gesamten Operation musste durch ausreichend NaCl in der OP-Region ein Austrocknen verhindert werden. Die nun freiliegende *Arteria carotis communis* wurde vorsichtig untertunnelt und mit 7/0 Seide (Resorba) unterhalb der Bifurkation irreversibel ligiert. Ungefähr 0,8-1 cm proximal zur ersten Ligatur, wurde eine zweite, reversible Ligatur gesetzt. Hierbei wurde der vorgefertigte Knoten jedoch nicht vollständig zugezogen, sondern vielmehr der Faden mittels einer Bulldogklemme festgehalten und so weit gespannt, bis der Blutfluss derart unterbrochen war, dass der Gefäßabschnitt innerhalb der Ligaturen nicht mehr pulsierte (s. Abb. 3.5). Mit einer sterilen, an der Spitze um 90° gebogenen Kanüle (27G; 0,4 x 19 mm) wurde in der Mitte des isolierten Gefäßabschnitts ein medianer Schnitt gesetzt und der Druckkatheter des Transmitters mit Hilfe eines Katheterhalters vorsichtig eingeführt und mit einer atraumatischen Mini-Bulldogklemme transient fixiert. Durch gleichzeitiges Lösen der Klemme und Vorschieben des Katheters wurde dieser anschließend zu seiner optimalen Position im Aortenbogen vorgeschoben. Der vorgefertigte Knoten der vorübergehenden zweiten Ligatur wurde nun endgültig verschlossen und alle Bulldogklemmen entfernt. Zwei weitere Knoten dienten der zusätzlichen Fixierung des Katheters an der *Arteria carotis communis*. Mittels einer stumpfen Schere wurde im rechten Flankenbereich zwischen den Vorder- und Hinterläufen seitlich eine Tasche geschaffen, die zur Volumensubstitution und Reibungsverminderung mit 1 ml steriler NaCl-Lösung befüllt werden konnte. Darin wurde auch die Sendeeinheit des Transmitters platziert. Anschließend wurden die Speicheldrüsen wieder in ihre ursprüngliche Position gebracht und die Wunde mit einer ausreichenden Anzahl an Einzelknopfnähten vollständig verschlossen. Nach Reinigung der Naht mit NaCl und Desinfektion der Wunde,

verweilen die Tiere schon während der Aufwachphase wieder in ihrem Heimatkäfig, gewärmt von einer Rotlichtlampe. Um ein gegenseitiges Eröffnen ihrer frischen OP-Nähte zu verhindern, wurden die Tiere nach jeder durchgeführten Operation einzeln gehalten. Das telemetrische Datenerfassungssystem erlaubt ohnehin nur die Aufzeichnung von einem Blutdrucksignal pro Käfig. Außerdem könnten physische Interaktionen zwischen den Tieren die Daten verfälschen.



**Abb. 3.5: Operation zur Implantation telemetrischer Blutdruckmesskatheter.**

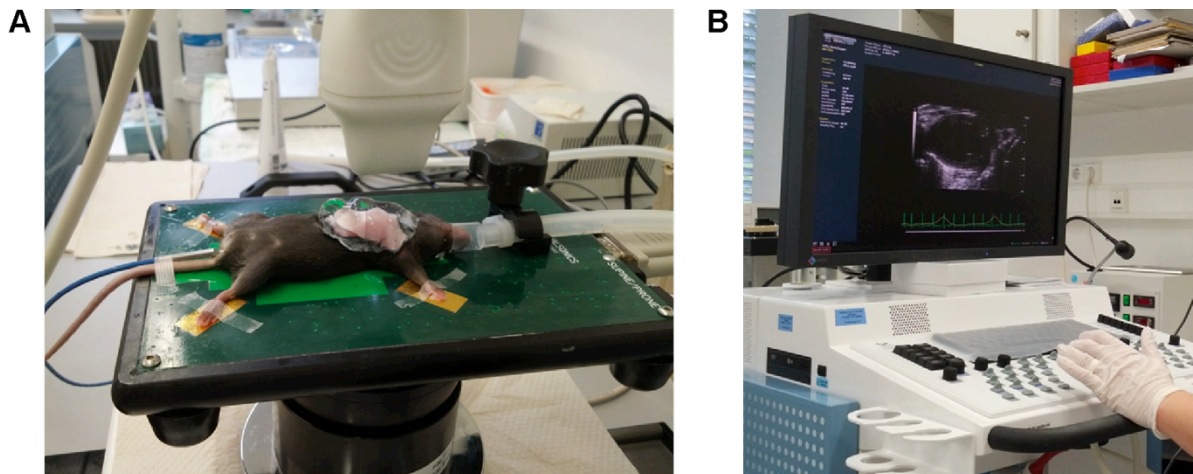
(A) Druckkatheter zur telemetrischen Blutdruckmessung und Schema zur Platzierung der Sendeeinheit des Telemetriesensors. (B) Position des Druckkatheters im Aortenbogen. (C) Bifurkation der *Arteria carotis communis* mit permanenter Ligatur (oben). Von der Bifurkation aus wurde der Katheter in Herzrichtung in das Gefäß gelegt. Hierfür wurde eine transiente Ligatur (unten) benötigt. Weitere Details im Text. (D) Die permanente Ligatur der Karotis (rechter Knoten) und eine vorübergehende Abschnürung der Blutzufuhr (linker Knoten) erlauben das Einbringen des Druckkatheters. Die Ligaturen sind durch Pfeilspitzen dargestellt. (E) Durch vorsichtiges Lösen einer atraumatischen Bulldogklemme wird der Druckkatheter zum Aortenbogen vorgeschoben. (F) Der Katheter ist bereits platziert und wird mit insgesamt drei Knoten an der *Arteria carotis communis* befestigt. Die Abbildungen A-C wurden dem Handbuch der Firma DataScience entnommen.

Nach Ablauf einer mindestens 7-tägigen Regenerationsphase und abgeschlossener Wundheilung konnten verlässliche Blutdruckdaten bestimmt werden. Die implantierten Transmitter wurden mittels Magnetinduktion eingeschaltet und die Käfige auf Daten-Empfangsplatten gestellt, die mit einem PC-gesteuerten Receiver verbunden sind. Während der Messungen, die für die Tiere unbemerkt abliefen, wurden die Daten über den Sender in 5-minütigen Intervallen viermal pro Stunde übertragen. Die relevanten Parameter konnten somit kontinuierlich in der Hell- (8-20 Uhr) und Dunkelphase (20-8 Uhr) mit dem Dataquest A.R.T.3.1 Software-Paket aufgenommen werden. Die Basalmessungen wurden über einen Zeitraum von drei Tagen durchgeführt. Darüber hinaus wurde der Anstieg des Blutdrucks während der 7-tägigen Ang II-Dauerinfusion aufgezeichnet. Hierzu wurden die Messungen

sofort nach Implantation der osmotischen Minipumpen (s. 3.3.3) im selben Intervall fortgeführt.

### 3.3.5 Echokardiographische Bestimmung der Herzfunktion

Mittels nicht-invasiver Echokardiographie sollten zusätzlich Erkenntnisse über die Herzfunktion von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren sowie Mäusen der CRP4-Linie  $\pm$  Ang II und von Doppelmantanten aus der Verpaarung dieser zwei Mauslinien ( $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$ ;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$ , s. 3.1.2) gewonnen werden. Untersuchungen der Herzgröße, Wanddicke, Verkürzungsfraction und Auswurfleistung sind etablierte Parameter, um Rückschlüsse auf eine eventuelle Funktionseinschränkung des Herzens zu ziehen. Die Ultraschalluntersuchungen wurden mit einem Echokardiograph für Kleintiere an der Medizinischen Klinik (Abteilung Innere Medizin III / Kardiologie und Kreislaufkrankungen des Universitätsklinikums Tübingen) durchgeführt. Das Ultraschallgerät für diese Untersuchungen wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gawaz zur Verfügung gestellt.



**Abb. 3.6: Messung der Herzfunktion mittels nicht-invasiver Echokardiographie.**

Die Messung erfolgte an einem Echokardiograph für Kleintiere (Vevo 2100, VisualSonics). (A) Fixierung der narkotisierten Maus auf einem beheizbaren Tisch. (B) Hardware und Software zur Echtzeit-Aufzeichnung und Auswertung der erhaltenen Filmsequenzen.

Unter volatiler Isofluran-Narkose wurden die Tiere auf einem beheizbaren, mit EKG-Elektroden ausgestatteten OP-Tisch bei  $37^{\circ}\text{C}$  fixiert (s. Abb. 3.6 A) und die Körpertemperatur (mittels Rektalsonde) sowie der Puls ständig überwacht. Letztgenannter sollte für reproduzierbare Messungen zwischen 300 und 350 Schlägen in der Minute betragen. Um eine störungsfreie und hochauflösende Untersuchung zu gewährleisten, wurde das Fell im Brustbereich mit einer Enthaarungscreme entfernt. Nach Auftragen des handwarmen Ultraschallgels wurde mit Hilfe eines 30-MHz-Schallkopfes zunächst der Brustkorb abgefahren, bis das Herz auf dem Monitor sichtbar wurde (s. Abb. 3.6 B). Für valide und reproduzierbare längsaxiale Messungen erfolgte eine exakte Ausrichtung des linken Ventrikels: Durch Feinjustierung des beweglich OP-Tisches sowie des Schallkopfes musste das Herz so ausgerichtet werden, dass sowohl die Aortenklappe als auch der Apex in seiner vollen Dimension im zweidimensionalen B-Mode (*brightness modulation*) dargestellt wurde.

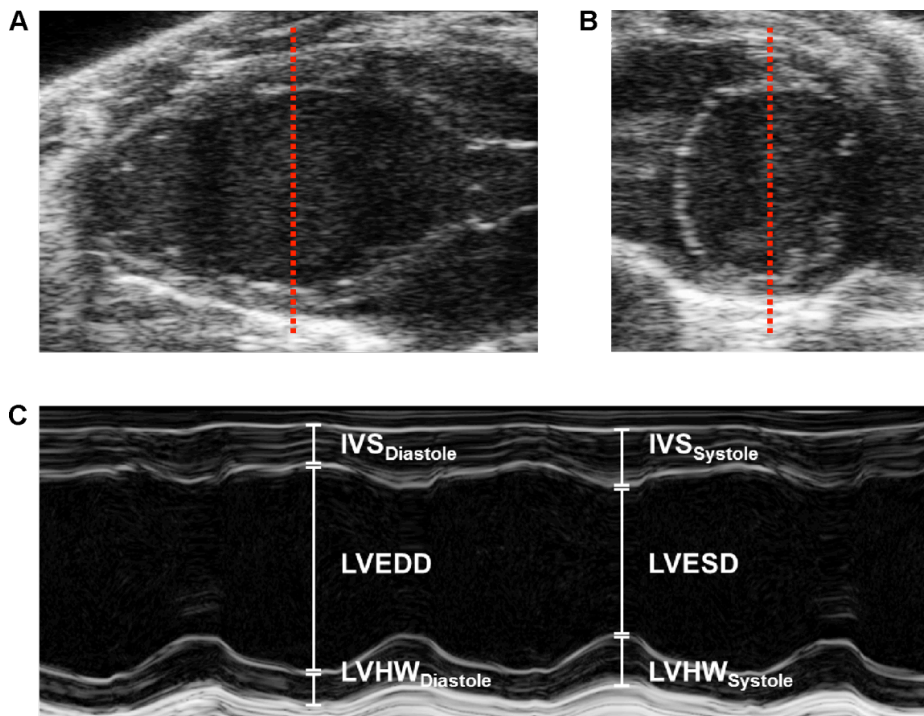
## Methoden

Erst dann konnte die exakte Ausmessung der Kammerdimensionen im M-Mode (*time motion*) durchgeführt werden. Hierbei erzeugt der Schallkopf, bevorzugt in der Mitte des linken Ventrikels, einen einzigen Strahl mit hoher Pulsrepetitionsfrequenz und daher hoher zeitlicher Auflösung. Reflektierende Strukturen dieses eindimensionalen Strahls werden auf dem Bildschirm entlang der vertikalen Achse dargestellt, die horizontale Achse stellt die Zeitachse dar. Durch eine Drehung des Schallkopfes um 90° wurden ebenso Aufnahmen der Querachse angefertigt. Nach der circa 15-minütigen Untersuchung wurden die Mäuse vom Ultraschallgel gereinigt und verweilten bis zum Erwachen unter einer wärmenden Rotlichtlampe. Die Messungen wurden für jede Achse in drei verschiedenen Positionen durchgeführt. Hierzu wurde der OP-Tisch mit der Maus immer schräger gestellt. Zur Auswertung wurden pro Position jeweils drei Stellen der erhaltenen Filmsequenz herangezogen. Auf diese Weise können die Wanddicken des interventrikulären Septums (IVS), das die rechte und linke Herzkammer voneinander trennt, sowie die linksventrikuläre Hinterwand (LVHW) und die Kammerdimensionen in Systole und Diastole vermessen werden (s. Abb. 3.7). Hieraus lassen sich wiederum sämtliche Parameter zur Charakterisierung der Herzfunktion wie die Verkürzungsfraction (%FS, *Fractional Shortening*) sowie die Auswurffraction (%EF, *Ejection Fraction*) errechnen:

$$FS (\%) = (LVEDD - LVESD) / LVEDD$$

$$EF (\%) = (EDV - ESV) / EDV$$

(LVEDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVESD: Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser; EDV: Enddiastolisches Volumen; ESV: Endsystolisches Volumen)



**Abb. 3.7: Auswertung der echokardiographischen Messungen.**

B-Mode-Aufnahmen der (A) Längsachse und (B) Querachse zur exakten Ausrichtung der Herzen. Der Doppler (rote Linie) wurde in der Mitte platziert und die Aufnahmen im M-Mode weitergeführt. (C) Die M-Mode-Sequenzen dienen der Vermessung der Kammerdimensionen (IVS: Interventrikuläre Septumsdicke; LVEDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVESD: Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser; LVHW: Linksventrikuläre Hinterwanddicke).

Zur Untersuchung des akuten Kontraktionsverhaltens nach einem sympathomimetischen Stimulus wurde den Tieren am Ende der dritten längsaxialen Messung 100 µl einer Isoprenalin-Lösung injiziert (0,1 mg/kg; s. 2.4.2). Bei Erreichen der höchsten Pulsfrequenz (350 Schläge/min) wurde die maximale Kontraktion mittels M-Mode Aufnahmen bestimmt.

## **3.4 Organentnahme und Zellkultur**

### **3.4.1 Organpräparation und Bestimmung der kardialen Hypertrophie**

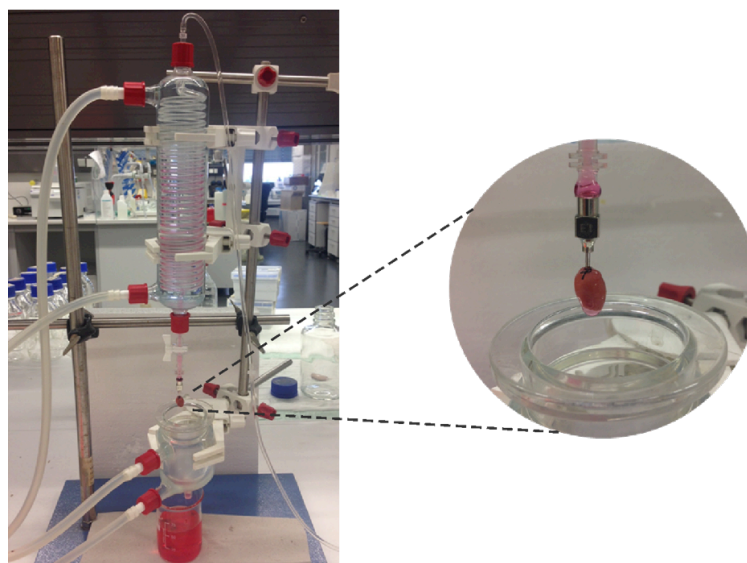
Sämtliche Versuchstiere wurden durch Inhalation von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) eingeschläfert. Dies geschah in deren vertrautem Haltungskäfig durch langsames, kontinuierliches Einleiten von CO<sub>2</sub> bei geschlossenem Käfigdeckel, was dazu führte, dass die Maus zunächst in eine tiefe Bewusstlosigkeit fällt. Sobald der Tod des Tieres eingetreten war, wurde zunächst das Körpergewicht bestimmt, dann erfolgte sogleich die Organentnahme. Hierbei wurde der Thorax eröffnet, das Herz freipräpariert, entnommen und unter einer Stereolupe in eiskalter isotonscher, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) von anhaftendem Bindegewebe befreit. Um Blutreste und mögliche Thromben in den Ventrikeln zu entfernen, wurde das Herz retrograd über die Aorta mit einer 1 ml Spritze und dünner Kanüle (25G; 0,5x16 mm) gespült, transversal halbiert, auf einem fusselreien Tuch vorsichtig getrocknet und anschließend auf einer Analysenwaage gewogen. Das Ausmaß der kardialen Hypertrophie wurde durch das Verhältnis des Herzgewichts zum Körpergewicht (HG/KG) determiniert. Da für weitere Versuche nur die Ventrikelmasse Verwendung fand, wurden die Vorhöfe abgetrennt. Entsprechend der weiteren Versuchsplanung wurde das Herz entweder sofort weiterverarbeitet oder in zwei bzw. drei gleichgroße Stücke geteilt. Für spätere RNA (s. 3.6) und Protein-Untersuchungen (s. 3.7) wurde das Gewebe in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Herzgewebe im Bereich des Papillarmuskels wurde teilweise für histologische Untersuchungen in PFA fixiert und weiterverarbeitet (s. 3.5). Bei offensichtlichen Unterschieden bezüglich des Körpergewichts innerhalb der Versuchsgruppen musste das Herzgewicht zusätzlich auf die Tibialänge normiert werden. Dazu wurde das Kniegelenk oberhalb des Schienbeinkopfes durchtrennt und die rechte Tibia entnommen. Diese wurde 20 min gekocht, was das Freilegen des Knochens erheblich erleichterte. Anschließend wurde die Tibialänge mit einem digitalen Messschieber festgestellt. Das Hypertrophieausmaß wurde bestimmt, indem das Herzgewicht auf die Tibialänge normalisiert wurde (HG/TL). Zusätzlich wurden im Laufe dieser Arbeit auch Lunge, Niere und Aorten entnommen. Für die Entnahme der Aorten wurde das Herz mit einer Pinzette angehoben und entlang der Wirbelsäule bis zur Höhe der Leber mit einer gebogenen Schere geschnitten. Anschließend musste die Aorta mit feinen Pinzetten von Bindegewebe, Blut und venösen Gefäßen freipräpariert werden.

### 3.4.2 *In vitro*-Stimulationsexperimente

Um zu untersuchen, ob CRP4 auch im Herzen ein Substrat der cGKI ist, wurde in einem *in vitro*-Experiment die cGKI-Phosphorylierungsaktivität durch Zugabe des membrangängigen cGMP-Analogons 8-Br-cGMP (Schwede et al. 2000) stimuliert. Hierzu wurden CRP4-WT und CRP4-KO Herzen direkt nach der Entnahme, dem Spülen und der Abtrennung der Vorhöfe (s. 3.4.1) transversal in zwei Hälften geteilt und in jeweils 3 ml Tyrode-Lösung (s. 2.4.3) in kleine Zellkulturschalen (3 cm Durchmesser) gegeben. Es folgte eine weitere Zerkleinerung der Herzhälften mit einer Augenschere. In jeweils eine Schale pro Genotyp wurde 8-Br-cGMP in einer finalen Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zugegeben und alle Schälchen in einen Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt. Nach 30 min erfolgten die Überführung der Herzstücke in jeweils 300  $\mu\text{l}$  SDS-Lysepuffer (s. 2.4.6) und die Extraktion der kardialen Proteine wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Western Blot (s. 3.7.4 und 3.7.6) sollte mit phosphospezifischen Antikörpern eine mögliche Phosphorylierung des Serin-104 von CRP4 gezeigt werden. Diese Antikörper (s. 2.4.6) detektieren Serin- und Threonin-Reste, die durch sogenannte AGC-Kinasen (*Arginin-directed-kinases*) phosphoryliert wurden. Hierzu gehören neben der cGKI aber auch PKA, PKC sowie AKT/PKB (Kemp and Pearson 1990). Wichtig hierbei ist ein Arginin-Rest 3 Positionen vor dem zu phosphorylierenden Serin. Dies ist bei der RKTS-Sequenz von CRP4 erfüllt.

### 3.4.3 Isolation und Kultivierung muriner Kardiomyozyten

Für die Isolation und Kultivierung adulter Herzmuskelzellen wurden durchschnittlich 8-10 Wochen alte weibliche Mäuse verwendet. Dieser Isolation liegt das AfCs Protokoll PP00000125 zugrunde. Um Thrombenbildung zu verhindern, wurde die Blutgerinnung mit 250 I.E. Heparin (i.p. in PBS) herabgesetzt. Die Isolierung erfolgte nach der Langendorff-Methode, wobei das Herz bei 37°C retrograd perfundiert wurde (s. Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: Langendorff-Perfusionsanlage zur Isolation von Kardiomyozyten.**

Das Herz wird über die Aorta an ein Kanülensystem angeschlossen und retrograd mit Kollagenase- und Trypsin-haltigem Puffer durchspült. Weitere Details im Text.

Nach Entnahme des Herzens und der Entfernung des Bindegewebes in handwarmem PBS wurde das Herz vorsichtig über die Aorta an die Perfusionskanüle angeschlossen, mit Seide (5/0) festgeknotet und über einen Adapter mit der Perfusionsanlage verbunden. Während des Spülens mit Perfusionspuffer blähte sich das Herz bei optimal erfolgter Perfusion auf seine dreifache Größe auf. Nach 4 min wurde der Perfusionspuffer gegen einen Kollagenase- und Trypsin-haltigen Verdaupuffer (s. 2.4.3) ausgetauscht. Die Flussrate der Pumpe betrug konstant 2,5 ml/min. Nach ungefähr 15 min war das Herz soweit verdaut, dass die Kardiomyozyten vereinzelt werden konnten. Das Herz wurde von der Perfusionsanlage entfernt und in 2,5 ml Verdaupuffer (wurde vor Zugabe der Kollagenase abgenommen) in eine kleine Petrischale gelegt. Nach Abtrennung der Vorhöfe wurde das Herz mit Hilfe feiner Pinzetten vorsichtig auseinander gezupft. Alle weiteren Schritte erfolgten unter der Sterilwerkbank. Durch vorsichtiges Homogenisieren mittels Stripetten (2 ml und 5 ml, jeweils 3 min) konnten zusätzliche Myozyten aus dem Zellverbund herausgelöst werden. Um Gewebetrümmer abzutrennen, wurde die Zellsuspension anschließend über ein Zellsieb mit 100 µm Maschenweite gegeben, mit 2,5 ml Stop 1-Lösung versetzt, für weitere 3 min mittels 5 ml-Stripette resuspendiert und für 10 min in einem 50 ml-Falcontube unter der Sterilwerkbank stehen gelassen. In dieser Zeit setzte sich ein Teil der Myozyten ab. Der Überstand wurde in ein 15 ml-Falcontube überführt und bei 960 rpm zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand enthält kardiale Fibroblasten. Dieser konnte, sofern er nicht weiterverarbeitet wurde (s. 3.4.5), verworfen werden. Das entstandene Pellet wurde in 4,5 ml Stop 2-Lösung resuspendiert und auf das erste Pellet überführt. Mit weiteren 4,5 ml Stop 2-Lösung wurde zunächst das 15 ml-Falcon gespült und anschließend auch zur Zellsuspension des ersten Pellets gegeben. Die nun reine Myozytensuspension wurde nach sorgfältigem Homogenisieren zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Reinduktion in 10 cm-Petrischalen überführt. Im Abstand von 4 min wurden zweimal jeweils 100 µl einer 10 mM sowie 30 µl und 50 µl einer 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Schalen verteilt. Die Zellsuspension wurde erneut in ein 50 ml-Falcontube überführt und 12 min stehen gelassen. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und bei 960 rpm zentrifugiert (1 min). Das neu entstandene Pellet wurde weiterverarbeitet, indem es mit 2 ml Aussaatmedium resuspendiert und auf das erste Pellet im 50 ml-Falcontube überführt wurde, wo eine erneute Homogenisierung mit 2 ml Aussaatmedium erfolgte. Zur Kultivierung der Kardiomyozyten wurden Laminin-beschichtete Vierkammersysteme aus Glas verwendet (s. 2.4.3). Je nach Ausbeute wurde die Myozytensuspension auf 3-6 Kammern ausgesät und in den Brutschrank bei 2%  $\text{CO}_2$ -Begasung gestellt. Nach einer Stunde waren die Zellen adhärent, sodass ein Wechsel zum Kulturmedium durchgeführt werden konnte, indem die Zellen theoretisch bis zu 24 Stunden belassen werden konnten. Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurde jedoch nach 2 Stunden vorsichtig das Medium abgezogen und die Zellen für 10 min mit 4% PFA fixiert (s. 2.4.4), dreimal mit PBS gewaschen und ebenso in PBS bei 4°C für maximal 3 Tage gelagert.

Für die Experimente zur RNA-Isolierung aus Kardiomyozyten wurden folgende Abweichungen vorgenommen: Die Zellsuspension wurde nach Resuspendieren in Stop 2-Lösung nochmals zentrifugiert und wiederum in 4,5 ml Stop 2 resuspendiert. Nach erneutem

Zentrifugieren sollten alle Fibroblasten eliminiert sein und das entstandene Pellet wurde sofort für die Gewinnung von RNA weiterverarbeitet (s. 3.6.1).

### 3.4.4 FRET-Messungen in isolierten Kardiomyozyten

Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ermöglicht die Messung der cGMP-Spiegel in intakten, lebenden Kardiomyozyten von  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Tieren, die zusätzlich den red cGES-DE5-Sensor exprimieren, und deren Wurfgeschwister-Kontrolltieren. Diese Analysen wurden in Hamburg im Labor von Prof. Viacheslav Nikolaev am Institut für Experimentelle Herz-Kreislaufforschung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf von Dr. Hariharan Subramanian durchgeführt. Die Isolation der Myozyten erfolgte prinzipiell nach demselben Protokoll (s. 3.4.3), gewisse laborspezifische Unterschiede bezüglich der verwendeten Kollagenase oder Inkubationszeiten waren allerdings möglich. Um cGMP-Signale zu ermitteln, wurden die isolierten Zellen mit 1  $\mu$ M CNP stimuliert. Diese Prästimulation war nötig, da die basale cGMP-Konzentration in Kardiomyozyten mit 10 nmol/l sehr gering ist. Die Fluoreszenzintensitäten des Donors (T-Sapphire) und des Akzeptorfluorophors (Dimer2, RFP) konnten anschließend mit einem dafür spezifizierten Mikroskop und geeigneten Filtern (Till Photonics) bei 405 nm detektiert und über die Zeit dargestellt und quantifiziert werden. Das zugrunde liegende Prinzip ist eine cGMP-induzierte Änderung der Fluoreszenzintensität, die mit einem detektierbaren Farbwechsel von grün zu rot einhergeht. Ein Anstieg des FRET-Signals impliziert letztlich ein Ansteigen der cGMP-Konzentration (Gotz et al. 2014).

### 3.4.5 Isolation und Kultivierung kardialer Fibroblasten

Um aus einer Maus sowohl Kardiomyozyten als auch Fibroblasten zu gewinnen, wurde der Überstand nach dem primären Zentrifugationsschritt der Myozytenisolation (s. 3.4.3) weiter verarbeitet. Dieser enthält kardiale Fibroblasten und wurde 7 min bei 1400 rpm sedimentiert, in Medium für die Fibroblastenkultur (s. 2.4.3) resuspendiert und in Petri-Schalen mit einem Durchmesser von 10 cm für ungefähr zwei Wochen bei 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, hierbei wurden stets die gesamten 10 ml ausgetauscht. Nach Erreichen einer Konfluenz von ungefähr 90% konnten die Zellen geerntet werden: Das Medium wurde abgezogen und die Schalen zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde je 1 ml Trypsin pro Schale zugegeben. Nach ungefähr 5 min konnten die Fibroblasten durch leichtes Klopfen an die Zellkulturschale abgelöst werden. Mit 12 ml frischem Medium wurde die Aktivität des Trypsins gestoppt, die Zellen sogleich in ein 15 ml-Falcontube überführt und zentrifugiert (1400 rpm, 7 min). Der Überstand konnte verworfen werden, das resultierende Pellet wurde in 1,3 ml PBS resuspendiert und erneut sedimentiert. Nach Abziehen des letzten Überstandes wurde mit der RNA-Isolation fortgefahren (s. 3.6.1).



## 3.5 Histologie

### 3.5.1 Einbetten der Gewebe und Anfertigung von Kryoschnitten

Nach der Organentnahme wurde das Segment, welches für histologische Untersuchungen bestimmt war, zunächst für 4 Stunden in 2%iger Paraformaldehydlösung (PFA) im Kühlraum (4°C) auf einem Schüttler inkubiert. Hierbei kommt es zur chemischen Quervernetzung der Proteine, die somit in ihrem jeweiligen Zustand zum Zeitpunkt der Entnahme fixiert werden. Auf diese Weise wird darüber hinaus eine Proteindegradation verhindert. Nach dreimaligem Waschen für je 20 min in PBS wurde das Gewebe in PBS-Saccharoselösungen mit aufsteigenden Konzentrationen überführt. Dies dient als Gefrierschutz, denn die gleichzeitig erfolgende osmotische Entwässerung wirkt einer möglichen morphologischen Zerstörung durch eingelagertes und gefrierendes Wasser entgegen. Die Gewebe wurden für eine Stunde in 5%ige Saccharoselösung überführt und anschließend über Nacht in 10%iger Lösung inkubiert. Zuletzt erfolgte eine Inkubation für mindestens weitere 24 Stunden in 20%iger Saccharoselösung. Mittels Aluminiumfolie wurden einseitig offene Gefäße geformt, in die das glykolhaltige Einbettmedium (s. 2.4.4) gefüllt wurde und welches kurz bei -80°C angefroren wurde. Anschließend wurden die fixierten Herzscheiben bzw. Aortenabschnitte mittig eingetaucht und komplett mit glykolhaltigem Einbettmedium überschichtet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. An einem Kryotom wurden bei durchschnittlich -25°C 8 µm feine Serienschnitte angefertigt, auf Superfrost-Objektträger aufgeschmolzen und etwa 3 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Sofern die Schnitte nicht unmittelbar histologischen Färbungen zugeführt wurden, erfolgte die längerfristige Lagerung bei -20°C.

### 3.5.2 Immunhistochemie von CRP4

Mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC) ist es möglich, Proteine mittels spezifischer Antikörper in Gewebeschnitten sichtbar zu machen. Prinzipiell binden Primärantikörper mit hoher Affinität an ein bestimmtes Epitop des zu detektierenden Proteins, diese wiederum werden von Sekundärantikörpern erkannt, die gegen spezifische konservierte Strukturen des jeweiligen Organismus gerichtet sind, in dem die Primärantikörper generiert wurden. Für die letztliche Visualisierung ist meist der Sekundärantikörper mit einem Detektionssystem versehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels des *Vectastain-ABC-Kits* (s. 2.4.4) die Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung an Gefrierschnitten von Herzen und Aorten aus CRP4-WT und CRP4-KO Tieren durchgeführt. Zusätzlich wurden Herzen von CRP4-HET Mäusen angefärbt. Generell wurden die Schnitte (s. 3.5.1) 30 min vorher aufgetaut und zum späteren Verbleib der Farbe- und Waschlösungen (je 1 ml) auf den Objektträgern mit einem Fettstift (s. 2.4.4) umrandet. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Permeabilisierung der Gewebeschnitte mit einer 0,3%igen Triton X-100-Lösung in PBS. Die gesamte Färbeprozedur erfolgte in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit einer Blockierungslösung, bestehend aus 10% Eselnormalseum (NDS) in PBS (s. 2.4.4), für eine Stunde abgesättigt. Es folgte eine

Übernacht-Inkubation in der Primärantikörperlösung mit einer Verdünnung des CRP4-Antiserums von 1:2000 (Herzen) bzw. 1:1000 (Aorten) in 1.5% NDS/PBS bei 4°C im Kühlraum. Jeweils ein Objektträger wurde ohne die spezifischen Antikörper inkubiert und diente somit als Negativkontrolle für mögliche Hintergrundfärbungen. Am nächsten Morgen wurden die Objektträger fünfmal gewaschen, wobei alle 5 min die PBS-Lösung gewechselt wurde. Anschließend erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit biotinylierten Sekundärantikörpern (s. 2.4.4) bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach erneuten Waschschritten mit PBS (5 x 6 min) wurde die ABC-Arbeitslösung, die den Avidin-Biotin-Enzym Komplex enthält, für weitere 30 min auf die Schnitte gegeben. Diese wurde bereits 30 min zuvor hergestellt und im Dunkeln gelagert. Der Komplex mit dem gekoppelten Enzym bindet in dieser Zeit aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin an die biotinylierten Sekundärantikörper. Nach abermaligem Waschen (4 x 10 min) folgte die Zugabe des AP-Substrates. Dieses besteht aus BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) in Verbindung mit NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) und wird von der Alkalischen Phosphatase zu einem blauen Indigo-Farbstoff umgesetzt. Die Farbreaktion wurde nach 15-20 min (je nach Farbentwicklung) durch Leitungswasser (3 x 2 min) gestoppt. Zur Minimierung der Hintergrundfärbung wurde dem AP-Substrat Levamisol als Inhibitor von endogenen kardialen Phosphatasen in einer Endkonzentration von 3,75 mM zugesetzt. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte luftblasenfrei mit 150 µl Aquatex-Einbettmedium (s. 2.4.4) überschichtet und über Nacht bei 4°C ausgehärtet. Repräsentative Aufnahmen aller Konditionen und Gewebe wurden an einem inversen Lichtmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss) erstellt.

### 3.5.3 Immunfluoreszenz von CRP4

Die Immunfluoreszenz (IF) ist eine spezielle Methode der Immunhistochemie. Hierbei sind die Sekundärantikörper meist direkt an Fluorophore gekoppelt, sodass eine Amplifizierung des Signals durch verschiedene Zwischenschritte entfällt. In Verbindung mit einem hochauflösenden Mikroskop, welches bei entsprechender Wellenlänge die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe anregt, ist es möglich, die subzelluläre Lokalisation eines bestimmten Proteins zu ermitteln. In diesem Fall sollte mittels IF-Färbungen das Expressionsmuster von CRP4 in Kardiomyozyten ermittelt werden. Die isolierten Herzmuskelzellen wurden nach Fixierung mit 4% PFA (10 min) und anschließendem Waschen mit PBS (800 µl; 2 x 5 min) in ihren jeweiligen abgetrennten Kammern auf den Glasobjektträgern weiter verarbeitet. Die Konzentration der Triton X-100-Permeabilisierungslösung betrug für die isolierten Kardiomyozyten aber nur 0,1% (s. 2.4.4). Die Blockierung unspezifischer Bindestellen erfolge mit 10% NDS/PBS. Die Inkubation mit CRP4-Antikörpern (1:2000) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach Abziehen der Primärantikörperlösung am darauffolgenden Tag und anschließenden Waschschritten (5 x 5 min) erfolgte die Inkubation in Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:500, s. 2.4.4) für eine Stunde im Dunkeln. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) wurden die Präparate in 100 µl einer PermaFluor-Hoechst-Lösung eingebettet (s. 2.4.4). Hoechst interkaliert mit der DNA und dient somit als Kernfärbung. Die Aufnahme repräsentativer Bilder erfolgte für beide Genotypen mit denselben Einstellungen an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiomager Z1, Zeiss).

### 3.5.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Routinemethode für morphologische Untersuchungen, mit der verschiedene Zellstrukturen dargestellt werden können. Hierbei bewirkt basisches Hämatoxylin aufgrund seiner hohen Affinität zu Nukleinsäuren eine blau bzw. lila Anfärbung von Zellkernen und ribosomalen Strukturen, Eosin als saurer Farbstoff lässt zytoplasmatische Proteine, Mitochondrien und Kollagen rötlich bis pink erscheinen (Fischer et al. 2008). Die Gefrierschnitte (s. 3.5.1) wurden 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut, die anschließende Färbung in speziellen Trögen konnte simultan für 10 Objektträger durchgeführt werden. Hierzu wurden die Präparate zunächst in verschiedene Ethanol-Lösungen mit absteigender Konzentration (100%, 90%, 70% und 50%) für jeweils 2 min eingetaucht. Diese Rehydrierung wäre per se bei Kryoschnitten nicht nötig, jedoch führte sie zu einem schöneren Gesamtergebnis. Nach dreimaligem Waschen in gereinigtem, deionisiertem Wasser (je 2 min) wurden die Schnitte für 5 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung nach Harris (s. 2.4.4) getaucht und unmittelbar danach zweimal für jeweils 2 min in Leitungswasser gewaschen. Für die vollständige Entwicklung der Kernfärbung wurden die Schnitte ebenso kurz in 0,1%ige Ammoniaklösung eingetaucht und für weitere 5 min in Leitungswasser überführt. Für die folgenden 10 min erfolgte eine Inkubation in saurer Eosin-Y-Lösung (0,1%). Fünf sich anschließende Waschschritte (je 2 min) in Leitungswasser und der folgende Wasserentzug in 80- bzw. 100%igem Ethanol (je 2 min) führten zur finalen Ausdifferenzierung der Färbung der zytosolischen Fraktion. Nach anschließender 5-minütiger Dehydrierung mit Toluol konnten die Schnitte in DePeX-Medium, einer Mischung aus Xylenen und Phthalaten (s. 2.4.4), eingebettet werden. Überschüssiges DePeX wurde mit Waschbenzin entfernt. Nach vollständiger Aushärtung der Objektträger konnten lichtmikroskopische Aufnahmen erstellt werden (Axiovert 200M, Zeiss). Alternativ wurde mit Hilfe eines *MIRAXDesk*-Scanners am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Anleitung von Dr. Jan Sperveslage eine Digitalisierung der Feinschnitte vorgenommen.

### 3.5.5 Sirius-Rot Färbung

Die Sirius-Rot Färbung dient der Visualisierung von Extrazellulärmatrix. Da der Farbstoff *Direct Red 80* selektiv an Kollagenfasern bindet und diese rot anfärbt, können in Gewebeschnitten von Herzen fibrotische Areale detektiert und quantifiziert werden. Gesundes, nicht-fibrotisches Gewebe dagegen ist gelb dargestellt (De Heer et al. 2000). Vor der eigentlichen Färbung wurden die Objektträger mindestens 24 Stunden in Bouin-Lösung, einer Mischung aus Pikrinsäure und Formalin (s. 2.4.4), fixiert. Die anschließende Inkubation in der Pikrinsäure-haltigen Sirius-Rot Lösung dauerte 1,5 Stunden. In der Zwischenzeit wurden 4 Färbekammern mit 0,01 N Salzsäure bereit gestellt. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen, wurden die Objektträger nur kurz in die ersten zwei Kammern getaucht. In den folgenden zwei Kammern verweilten die Präparate jeweils zwei Minuten, bevor sie in gereinigtes, deionisiertes Wasser überführt wurden (2 x 2 min). Im Anschluss wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanol-Konzentration (50%, 70%, 90%) für

jeweils zwei min kontinuierlich dehydriert. Nach dreimaligem Eintauchen der Präparate in 100%igen Ethanol erfolgte die finale Dehydrierung mit Xylol (2 x 2 min). Um eine exakte Quantifizierung der Farbverläufe zu gewährleisten, sollte das anschließende Einbetten der getrockneten Schnitte mit DePeX luftblasenfrei erfolgen. Die Sirius-Rot gefärbten Herzen wurden ebenfalls in der Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen mit dem *MIRAXScan*-System aufgenommen (s. 3.5.4).

### 3.5.6 Bestimmung der Kardiomyozytengröße

Die Vermessung der Myozytenquerschnittsfläche diente zur Determinierung der Hypertrophie auf zellulärer Ebene. Dies wurde bei den lichtmikroskopisch fotografierten HE-gefärbten Herzen aus der SIL-Versuchsreihe ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere und deren WT-Wurfgeschwister  $\pm$  SIL) mit Hilfe der mitgelieferten Axio Vison Software 4.8.1 durchgeführt. Die Herzen der CRP4-Mauslinie (WT und KO  $\pm$  Ang II) lagen digitalisiert vor und konnten mit der *MIRAXViewer*-Software ausgemessen werden, was durch die Möglichkeit der Zoom-Funktion in alle möglichen Regionen eine erhebliche Zeitersparnis bedeutete. Unabhängig von der verwendeten Software wurden Myozyten mit mittig liegendem Zellkern im Bereich des Papillarmuskels umrandet und vermessen, was longitudinal angeschnittene Zellen am Rand des Herzens ausschloss. Die jeweilige Software rechnete die Pixel mit Hilfe eines Größenstandards direkt in das Flächenmaß ( $\mu\text{m}^2$ ) um. Pro Tier wurden auf drei unabhängig gefärbten Objektträgern aus der jeweiligen Serie mindestens 40 Zellen zur Mittelwertbildung vermessen. Zur Bestimmung der Myozytenfläche frisch isolierter Herzmuskelzellen von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren und deren WT-Wurfgeschwister wurden lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt und die gesamte Kardiomyozytenfläche bestimmt.

### 3.5.7 Quantifizierung kardialer Fibrosierung

Zur Quantifizierung der Myokardfibrose sind sowohl die Sirius-Rot gefärbten Schnitte der SIL-Versuchsreihe ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere und deren WT-Wurfgeschwister  $\pm$  SIL) als auch der CRP4-Mauslinie (WT und KO  $\pm$  Ang II) mit dem *MIRAXScan*-System aufgenommen worden. Mit Hilfe der zugehörigen Software wurden die Herzen vergrößert und ausgeschnitten. Zur Quantifizierung des Fibroseausmaß wurde die *GSA Image Analyser*-Software verwendet. Hierbei wurden die fibrotischen, Sirius-Rot gefärbten Areale (s. 3.5.5) bestimmt und in Relation zur gesamten Herzfläche gesetzt. Der fibrotische Anteil wurde prozentual dargestellt.

## 3.6 RNA-Analytik

Mittels quantitativer Echtzeit-PCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) kann durch geschickte Wahl spezifischer Primer prinzipiell zu jedem Zeitpunkt der mRNA-Gehalt von sämtlichen Geweben oder Zellen bestimmt werden. Hierfür wird RNA isoliert und in cDNA (*copy-DNA*) umgeschrieben, die anschließend zur quantitativen Bestimmung eingesetzt wird. Untersuchungen zum mRNA-Gehalt wurden sowohl in Geweben von Gesamtherzen als auch in isolierten kardialen Myozyten (s. 3.4.3) sowie kardialen Fibroblasten (s. 3.4.5) vorgenommen .

### 3.6.1 Isolierung von RNA

Das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte Herzgewebe wurde je nach Größe mit einem angemessenen Volumen peqGOLD RNAPure-Lösung versetzt (a: Placebo-behandelte Herzen von CRP4-WT und CRP4-KO Tieren sowie Herzen von WT-Wurfgeschwister der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere  $\pm$  SIL: 600  $\mu\text{l}$ ; b:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere  $\pm$  SIL, sowie CRP4-WT und CRP4-KO Herzen + Ang II: 750  $\mu\text{l}$ ). Das Gewebe wurde sogleich mit einem Hand-Dispergiergerät ca. 2 min auf höchster Stufe homogenisiert. Das in peqGOLD enthaltene Guanidinisothiocyanat verursacht die Lyse der Zellen, während Phenol zur späteren Aufnahme der RNA dient (Chomczynski and Sacchi 2006). Zum Lösen der Proteinfraction wurde das Gemisch anschließend mit 120  $\mu\text{l}$  (a) bzw. 150  $\mu\text{l}$  (b) Chloroform versetzt, gründlich gevortext und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) wurde die oberste, wässrige Phase, die die RNA enthält, vorsichtig abgenommen und mit 420  $\mu\text{l}$  (a), bzw. 525  $\mu\text{l}$  (b) Isopropanol versetzt. Hierbei sollte eine Kontamination mit DNA aus der Interphase vermieden werden. Das Reaktionsgefäß wurde über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. In dieser Zeit kam es zur Ausfällung der RNA. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 13000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 800  $\mu\text{l}$  eines Gemisches aus Ethanol und DEPC-Wasser im Verhältnis 3:1 gewaschen. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt und das Pellet bis zur vollständigen Trocknung bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser und 10-minütiger Inkubation bei  $56^{\circ}\text{C}$  unter leichten Schüttelbewegungen sollte das Pellet wieder vollständig gelöst sein. DEPC (Diethylpyrocarbonat) ist ein Hemmstoff von diversen RNasen und schützt die RNA somit vor ihrer Degradation.

Bei der RNA-Isolation aus den erhaltenen Zellpellets der Präparationen von kardialen Myozyten (s. 3.4.3) und Fibroblasten (s. 3.4.5) wurden jeweils 500  $\mu\text{l}$  PeqGOLD verwendet und die Zellen durch 2-minütiges Auf- und Abpipettieren lysiert. Ansonsten wurde nach demselben Schema verfahren wie im vorherigen Abschnitt bereits erläutert. Das getrocknete Pellet wurde aufgrund der üblicherweise geringeren RNA-Konzentration in Zelllysaten aber nur in 30  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser gelöst.

### 3.6.2 DNase Behandlung

Durch den obligaten DNase-Verdau konnte genomische DNA, die später möglicherweise die qRT-PCR stören würde, entfernt werden. Ein Teil der gelösten RNA (20 µl) wurde mit DEPC-Wasser (2,5 µl) und DNase I (2 µl) versetzt und vermischt. Innerhalb der folgenden 30 min wurde die genomische DNA bei 30°C unter zwischenzeitlichem Schütteln degradiert. Ein darauffolgendes Erhitzen dieses Reaktionsansatzes bei 80°C (5 min) führte zur Inaktivierung der DNase. Anschließend wurde die Konzentration der gelösten RNA mit Hilfe eines Nanophotometers (Implen) bestimmt. Für sämtliche Proben wurde die Konzentration der RNA auf 0,1 µg/µl eingestellt. Eine kurzfristige Lagerung konnte bei 4°C erfolgen, ansonsten sollte RNA immer bei -20°C aufbewahrt werden.

### 3.6.3 Erststrang cDNA-Synthese

Zur Erzeugung von cDNA wurde das iScript-cDNA-Synthese-Kit von Biorad verwendet. In Kombination mit dem im Kit enthaltenen Enzym Reverse Transkriptase (RT) wurde RNA in cDNA umgeschrieben, erst dann konnte sie für die Echtzeit-PCR eingesetzt werden. Für jede Probe wurde zusätzlich eine Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase (-RT) angefertigt. Zur Generierung von cDNA wurden nachfolgendes Pipettierschema (dargestellt für eine Probe) und Temperaturprogramm verwendet:

Pipettierschema		Programm für die cDNA-Synthese	
5x iScript	4 µl	Primeranlagerung (25°C)	5 min
Reverse Transkriptase	1 µl	Reverse Transkription (42°C)	30 min
RNA (0,1 µg/µl)	5 µl	Inaktivierung RT	5 min
DEPC-H <sub>2</sub> O	10 µl	Kühlung (4°C)	max. 1 d

Die letzte Synthese von cDNA wurde in einem Eppendorf Mastercycler durchgeführt: In den ersten fünf Minuten erfolgte bei 25°C die Anlagerung der Primer, die für die Umschreibung der gesamten RNA nötig sind. Im verwendeten Mastermix sind dies Oligo-dT-Nukleotide (Desoxythymidine komplementär zum Poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNA), sowie Random-Hexamer-Oligonukleotide (6 zufällig zusammengesetzte Nukleotide). In den darauffolgenden 30 min schrieb die Reverse Transkriptase bei 42 °C die mRNA in cDNA um, bevor sie anschließend bei 85°C inaktiviert wurde (5 min). Die entstandene cDNA wird sogleich auf eine finale Konzentration von 0,01 µg/µl eingestellt - dies entspricht einer 1:10 Verdünnung mit DEPC-Wasser - und bei -20°C gelagert.

### 3.6.4 Quantitative Real-Time-PCR

Auch bei der quantitativen Bestimmung der cDNA erleichterte ein Mastermix die Versuchsdurchführung. Der SYBR Green Supermix (Biorad) enthält neben dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green eine für die qRT-PCR geeignete Taq-Polymerase und

dNTPs sowie spezielle Puffersysteme und Stabilisatoren. Letztlich müssen nur Primer und die zu untersuchende cDNA zugegeben werden. Die benötigten Primerpaare wurden mit Hilfe der frei zugänglichen Software Primer 3 entworfen, wobei die Schmelztemperatur zwischen 58°C und 64°C liegen sollte. Für eine effiziente Anlagerung der Primer durfte deren Länge nicht mehr als 23 bp betragen. Die Größe des erhaltenen PCR-Produkts sollte aufgrund der relativ kurzen Reaktionszeiten der qRT-PCR zwischen 70 und 120 bp liegen. Folgende Tabellen zeigen einen beispielhaften Reaktionsansatz und das fortwährend verwendete PCR-Programm des Opticon-Cyclers.

<b>Pipettierschema</b>		<b>qRT-PCR Programm</b>	
SYBR Green Supermix	10 µl	Initiale Denaturierung (98°C)	1 min
Vorwärtsprimer	3 µl	Denaturierung (98°C)	5 sec
Rückwärtsprimer	3 µl	Primeranlagerung (58°C)	15 sec
cDNA (0,01 µg/µl)	2 µl	Elongation (72°C)	30 sec
DEPC-H <sub>2</sub> O	2 µl	Fluoreszenzmessung	
		→ Wdh. 40 Zyklen	
		Schmelzkurvenerstellung:	
		0,5°C Schritte 58°C - 95°C	je 1 sec
		Kühlung (4°C)	max. 1 d

Die Analyse der mRNA erfolgte in 96-Lochplatten. Jede Probe wurde mindestens als Duplikat aufgetragen (sowohl +RT, als auch -RT). Der im Mastermix enthaltene Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green bindet mit hoher Affinität an doppelsträngige DNA, wodurch seine Fluoreszenzintensität auf das 1000-fache ansteigt (Jiang et al. 2014). Der Gehalt an qRT-PCR Produkt nahm nach jedem Amplifikationszyklus exponentiell zu und konnte von dem Opticon-Cycler in Echtzeit detektiert werden. Die graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität gegen die Zyklenzahl ergibt einen sigmoidalen Kurvenverlauf, für den ein bestimmter Schwellenwert bestimmt werden musste, bei dem die Kurve ihren linearen Bereich überschritt. Der Schnittpunkt des Graphen und des Schwellenwertes ließ direkt auf die Zykluszahl schließen, bei der sich die entstandene Fluoreszenz signifikant von der Hintergrundfluoreszenz unterschied. Dieser Wert, auch als Ct-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet, wurde sowohl für das Zielgen, als auch für ein sogenanntes „Haushaltsgen“ bestimmt, dessen Expression unabhängig von genetischen oder pharmakologischen Manipulationen immer konstant blieb. Die jeweilige mRNA-Menge wurde letztlich immer relativ zum internen Standard angegeben und die  $\Delta$ Ct-Werte unter Annahme der Verdopplung der cDNA-Menge in jedem Zyklus durch folgende Formel bestimmt:

$$\Delta Ct = 2^{(Ct(\text{Interner Standard}) - Ct(\text{Zielsequenz}))}$$

Mit den  $\Delta$ Ct-Werten konnten nun die relativen mRNA Mengen unterschiedlicher Genotypen bzw. Behandlungen direkt miteinander verglichen werden. Um Kontaminationen durch genomische DNA auszuschließen und die Spezifität der Primer zu bestätigen, wurden die Proben zusätzlich auf ein 3%iges Agarosegel aufgetragen (s. 3.2.3).

## **3.7 Proteinbiochemische Methoden**

Im Rahmen der Proteinanalytik wurden in dieser Arbeit Proteine nach diversen Behandlungen auf unterschiedlichste Weise aufgearbeitet und dargestellt. Zur routinemäßigen Auftrennung gemäß ihrer Größe wurden die Proteinlysate einer SDS-Gelelektrophorese zugeführt und mittels Western Blot analysiert. Zusätzlich wurden Stimulationsexperimente (s. 3.4.2) und Co-Immunpräzipitationen zur Identifikation von CRP4-Interaktionspartnern vorgenommen.

### **3.7.1 Proteinextraktion**

Ein Großteil der aufzuarbeitenden Proben waren zuvor entnommen, schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert worden (s. 3.4.1). Um genügend Protein aus Aorten isolieren zu können, wurden jeweils drei Gefäße gleichzeitig verarbeitet. Für die Gewinnung von Proteinlysaten aus Herzgewebe wurde zumeist der apikale Teil verwendet. Je nach Größe des Gewebestücks wurden diese mit 350-800  $\mu\text{l}$  SDS-Lysepuffer (s. 2.4.6) versetzt. SDS (Sodiumdodecylsulfat) als anionisches Tensid dient der Denaturierung von Proteinen. Der zusätzlich enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken zu freien Thiolen und unterstützt ebenfalls den Denaturierungsprozess. PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) als unspezifischer Inhibitor von Serinproteasen verhindert die Proteindegradation. Mit einem Gewebehomogenisator wurden die Proben für 2 min aufgeschlossen. Das Lysat wurde anschließend bei  $95^{\circ}\text{C}$  zur vollständigen Denaturierung erhitzt, durch Vortexen auf niedriger Stufe gründlich gemischt und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die isolierten Proteine befanden sich nun im Überstand, dieser wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und, sofern keine Weiterverarbeitung erfolgte, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.7.2 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde die von Marion Bradford entwickelte Methode herangezogen (Bradford 1976). Diese basiert auf hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit kationischen Aminogruppen basischer Seitenketten von Proteinen. Im sauren pH-Bereich führt dies zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm (rot) zu 595 nm (blau), was photometrisch erfasst werden kann. Zunächst wurden 95  $\mu\text{l}$  deionisiertes Wasser in einer Küvette vorgelegt, 5  $\mu\text{l}$  Proteinlysate hinzugefügt, mit 1 ml Bradford-Lösung versetzt und für 5 min im Dunkeln zur vollständigen Farbentwicklung inkubiert. Für den Nullabgleich am Nanophotometer wurden 5  $\mu\text{l}$  SDS-Lysepuffer (s. 2.4.6) zugegeben und ebenso verfahren. Die photometrische Vermessung erfolgte bei 595 nm gegen eine mit BSA erstellte Eichkurve. Um die Geltaschen in der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung gleichmäßig beladen zu können, wurden alle Proteine einer Versuchsreihe auf dieselbe Konzentration eingestellt. Die Aortenlysate wurden aufgrund der insgesamt niedrigen Proteinmenge der geringsten Konzentration angepasst. Herzlysate aus verschiedenen

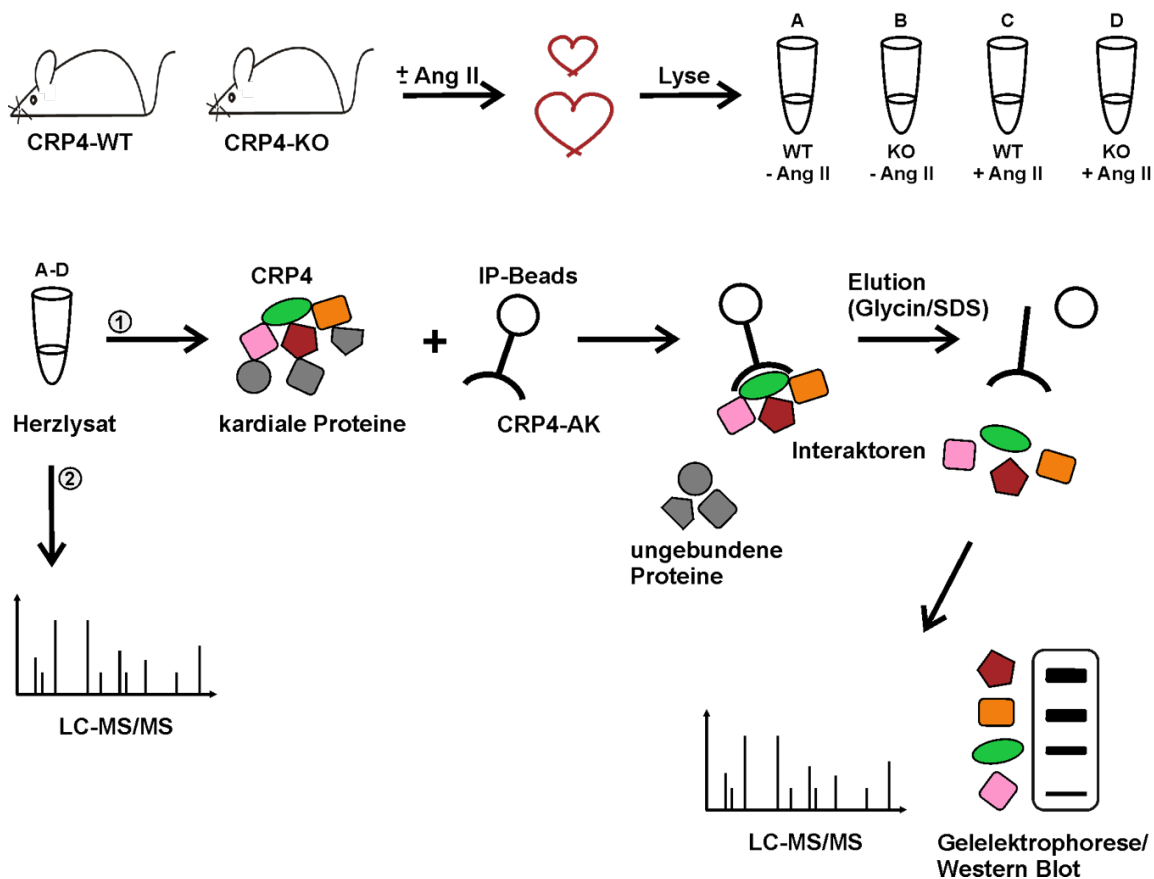


Kohorten und unterschiedlichen Behandlungen wurden für spätere Vergleichbarkeit zumeist auf eine Konzentration von 2 µg/µl eingestellt. Dies erfolgte durch Verdünnen der Lysate mit SDS-Lysepuffer und dem Probenpuffer 4x Laemmli, der zusätzlich DTT (Dithiothreitol) zur Denaturierung enthielt (s. 2.4.6). Außerdem ist in Laemmli der Farbstoff Bromphenolblau enthalten, dieser markiert später im Acrylamid-Gel die Lauffront der Proteine, zugesetztes Glycerin erhöht die Probedichte und forciert deren Absinken in die Geltaschen. Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden diese Proteinlysate, egal ob frisch hergestellt oder bei -80°C gelagert, zur erneuten Denaturierung 10 min bei 95°C gekocht. Nur so können Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Proteine gelöst, und Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen zerstört werden.

### 3.7.3 Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) ist eine biochemische Methode, bei der in einer klassischen Antigen-Antikörper-basierten Reaktion Proteine mitsamt ihren spezifischen Interaktionspartnern aus einem komplexen Proteingemisch angereichert und präzipitiert werden können. In dieser Arbeit lag der Fokus auf kardialen Bindungspartnern von CRP4. Für die Co-IPs bediente man sich aktivierter Agarosekügelchen, sogenannter IP-Beads, an die CRP4-Antikörper gekoppelt wurden. Konkret wurde das kardiale CRP4-Interaktom über die CRP4-gekoppelten IP-Beads zunächst im *Pull-down*-Verfahren konzentriert, anschließend konnten die Bindungspartner mittels LC-MS/MS (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung) identifiziert werden (s. Abb. 3.9). Der im folgenden Abschnitt beschriebene Versuchsansatz war jeweils für zwei Herzen ausgelegt. Es wurden immer ein CRP4-WT und ein CRP4-KO Herz parallel aufgearbeitet. Hierbei war es wichtig, dass die Herzen immer akut entnommen wurden, ein Einfrieren und Wiederauftauen war nicht möglich. Um spezifische Interaktionspartner in unterschiedlichen Zuständen zu identifizieren, wurden sowohl Präzipitationen von unbehandelten (bzw. NaCl-infundierten) als auch von hypertrophen Herzen nach 7-tägiger Ang II-Dauerinfusion (s. 3.3.3) angefertigt. Die gesamte Durchführung der Immunpräzipitation erfolgte auf Eis. Zunächst mussten die Agarosekügelchen vorbereitet werden, hierfür wurden 200-220 µl *TrueBlot* IP-Beads (TBB) in einem 15 ml-Falcontube mit 3 ml PBS gewaschen und bei 3000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmal wiederholt, das anschließende Resuspendieren der Beads erfolgte in 3 ml IP-Lysepuffer (s. 2.4.6). Zur Vorbereitung der CRP4-Antikörper gekoppelten IP-Beads wurde die Hälfte der TBBs (1,5 ml) mindestens eine Stunde bei 4°C mit 60 µl CRP4-Antiserum in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß auf dem Reagenzglasrotator befestigt und inkubiert. Die restlichen 1,5 ml TBBs wurden ebenfalls in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 10000 rpm in der Kühlzentrifuge auf 4°C sedimentiert und nach Verwerfen des Überstandes in 300 µl IP-Lysepuffer resuspendiert und auf Eis belassen. Diese „Wasch-Beads“ dienten später der Kontrolle bzw. dem Ausschließen unspezifischer Bindungen. In der Zwischenzeit wurden die Herzen entnommen, gespült, transversal halbiert, sowie die Aorta und Vorhöfe entfernt. Jedes Herz wurde in 900 µl IP-Lysepuffer für eine Minute auf höchster Geschwindigkeit mit einem Hand-Dispergiergerät homogenisiert. Zur Entfernung von Gewebetrümmern wurde 2 min bei 10000 rpm und 4°C

zentrifugiert. 500  $\mu$ l des Überstandes wurden abgenommen und mit je 150  $\mu$ l der vorbereiteten Wasch-Beads versetzt und 45 min bei 4°C auf einem Reagenzglasrotator inkubiert. Zu weiteren 50  $\mu$ l des Überstandes beider Genotypen wurden je 50  $\mu$ l SDS-Ladepuffer (s. 2.4.6) gegeben. Nach 10-minütigem Erhitzen bei 95°C erfolgte ein Schockfrieren in flüssigem Stickstoff mit anschließender Lagerung bei -80°C. Diese Proben stellen die Grundgesamtheit aller kardialen Proteine dar. Nun folgte die weitere Aufbereitung der CRP4-Antikörper gekoppelten IP-Beads durch 3-maliges Waschen mit je 500  $\mu$ l IP-Waschpuffer (s. 2.4.6) für 2 min bei 10000 rpm. Nach dem letzten Waschschrift konnten die Beads in 300  $\mu$ l IP-Waschpuffer resuspendiert werden. Anschließend wurden die WT- und KO-Herzlysate von den Wasch-Beads durch 5-minütige Sedimentation (10000 rpm, 4°C) getrennt, der Probenüberstand abgenommen und mit jeweils 150  $\mu$ l der CRP4-Antikörper gekoppelten IP-Beads versetzt. Während der folgenden Übernacht-Inkubation (4°C, rotierend) koppelt CRP4 inklusive Interaktionspartner an die CRP4-Antikörper auf den Beads.



**Abb. 3.9: Schematische Darstellung des Ablaufs der Co-Immunpräzipitation.**

Mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation sollten spezifische Interaktionspartner für CRP4 unter physiologischen Bedingungen (bzw. NaCl-Infusion) und nach 7-tägiger Ang II-Infusion identifiziert werden (1). Hierbei wurden kardiale Proteinlysate sämtlicher Konditionen (A-D) angefertigt. Diese wurden über Nacht mit aktivierten Agarosekügelchen inkubiert, die mit CRP4-Antikörpern gekoppelt waren (IP-Beads). Bei vorhandenem CRP4 (in CRP4-WT Lysaten) bindet CRP4 zusammen mit direkten und indirekten Interaktionsproteinen an die spezifischen CRP4-Antikörper auf den Agarosebeads. Der entstandene Proteinkomplex wurde nach diversen Waschschrift von ungebundenen Proteinen getrennt und die spezifischen CRP4-Interaktoren entweder mit 0,2 M Glycinpuffer für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse oder mit SDS-haltigem Probenpuffer (für anschließende Western Blot-Analysen) eluiert. (2) Von sämtlichen Probenlysaten wurden jeweils 100  $\mu$ l abgenommen, die nicht für die Co-IP verwendet wurden, sondern für eine vergleichende Proteomanalyse direkt der massenspektrometrischen Analyse zugeführt wurden.

Die restlichen Wasch-Beads wurden 3x mit je 500 µl IP-Waschpuffer für 2 min bei 10000 rpm gewaschen, nach Verwerfen des Überstandes mit 50 µl SDS-Ladepuffer versetzt, ebenso gekocht (95°C, 10 min) und schockgefroren. Am nächsten Tag wurden die Herzlysate mit den CRP4-Antikörper gekoppelten IP-Beads 5 min bei 10000 rpm sedimentiert. 50 µl des abgenommenen Überstandes wurden mit 50 µl SDS-Ladepuffer versetzt, gekocht und schockgefroren. Die sedimentierten IP-Beads, die nun alle potentiellen Bindungspartner von CRP4 enthalten, wurden anschließend vorsichtig 3x mit je 500 µl IP-Waschpuffer für 2 min gewaschen (10000 rpm, 4°C). Sofern die Präzipitate für eine Western Blot-Analyse vorgesehen waren, konnten diese sofort mit 50 µl SDS-Ladepuffer gemischt, gekocht (10 min, 95°C) und der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 3.7.4) zugeführt werden. Eine Lagerung bei -80°C war ebenso möglich. Das Kochen mit SDS löst Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen CRP4 und seinen Interaktoren, die dann unabhängig voneinander detektiert werden können. Um ein vorzeitiges Lösen der spezifischen Bindung zu verhindern, war im IP-Lyse- und IP-Waschpuffer kein SDS enthalten (Texier et al. 2014).

Waren die IP-Lysate zur Untersuchung im Massenspektrometer vorgesehen, erfolgte die Elution mit 150 µl eiskaltem 0,2 M Glycinpuffer. Bei 4°C erfolgte dies für 10 min unter leichtem Schütteln in einem gekühlten Thermocycler. Anschließend wurden die Beads eine Minute lang sedimentiert und der Überstand mit den Proteinkomplexen abgenommen und bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Um eine mögliche CRP4-abhängige Proteinregulation zu erfassen, wurden gleichzeitig auch Proteinlysate aus dem Gesamtherz untersucht. Hierfür wurden sofort nach dem Homogenisieren der Herzen am ersten Versuchstag jeweils 100 µl Proteinlysate abgenommen und sofort schockgefroren. Die Probenaufarbeitung, die einen tryptischen Verdau beinhaltet, und die nachfolgende massenspektrometrische Analyse der Interaktionspartner und der CRP4-abhängigen Proteinregulation wurde im Proteom-Forschungszentrum für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Tübingen in der Arbeitsgruppe von Dr. Karsten Boldt durchgeführt (Boldt et al. 2011).

### 3.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine gängige Methode zur Auftrennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld (Laemmli 1970). Die hierfür verwendeten Polyacrylamidgele entstehen durch Polymerisation von Acrylamid, das über Bisacrylamid zu einem dreidimensionalen Geflecht quervernetzt wird. Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS) als starker Radikalbildner fungiert als Polymerisationsinitiator für diese Quervernetzung, Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator beschleunigt diese. Die Zugabe von SDS bewirkt, dass Proteine negativ geladen werden und so ihre eigentliche Ladung maskiert wird. Die nun negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe weisen ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis auf und unterscheiden sich nur noch in ihrer Molekülmasse und werden gemäß dieser durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamid-Matrix aufgetrennt, wobei kleinere Proteine das Gel demnach zügiger durchwandern. Polyacrylamid-Gele sind meist vertikale Systeme, bei dem zuerst das eigentliche Trenngel und nach dessen Polymerisation das Sammelgel zwischen

zwei Glasplatten gegossen wird. Je nach Größe der zu detektierenden Proteine wurden Trenngele zwischen 7.5% und 17% Polyacrylamid gegossen (s. 2.4.6). Um ein verfrühtes Auspolymerisieren zu verhindern, musste das entsprechende Gemisch zügig eingefüllt werden. Eine Überschichtung des Trenngels mit Isopropanol bewirkte eine glatte Oberfläche und unterbindet den Kontakt mit Luftsauerstoff. Das Trenngel sollte mindestens eine Stunde auspolymerisieren können, bevor das 5%ige Sammelgel (s. 2.4.6) aufpipettiert wurde. Mit Hilfe von Kämmen wurden hier Aussparungen geschaffen, in die später die Proteinlysate mit Hilfe einer Hamilton-Spritze eingefüllt wurden (18-24  $\mu$ l). Das Sammelgel dient der Fokussierung der Proteine, damit diese vom selben Startpunkt aus in das Trenngel Richtung Anode einwandern können. Nach Überschichten der Gele, bzw. des Halterungssystems mit Elektrophorese-Puffer (1x Elphor, s. 2.4.6), wurde die Elektrophorese bei einer angelegten Spannung von 80 V gestartet und auf 120 V erhöht, sobald die Proteinbanden nach ca. 15 min aus dem Sammelgel ausgewandert waren. Anhand eines zusätzlich aufgetragenen Längenstandards (4  $\mu$ l) mit eingefärbten Proteinfragmenten definierter Größe von 10-170 kDa lässt sich der Verlauf der Elektrophorese verfolgen.

### **3.7.5 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen**

Mit Hilfe dieser Färbemethode können die aufgetrennten Proteine nach der SDS-PAGE angefärbt und somit sichtbar gemacht werden. Nach Abtrennung des Sammelgels wurde das Trenngel 20 min in der Coomassie-Färbelösung (s. 2.4.6) inkubiert. Die in dieser Zeit ablaufende Farbreaktion beruht auf demselben Prinzip wie für die Bradford-Proteinbestimmung bereits beschrieben (s. 3.7.2). Durch die Lösung des Farbstoffes in Essigsäure liegt er in seiner unprotonierten anionischen Sulfonatform vor, wodurch die Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein fixiert wird. Die zunächst vollständig blau gefärbten Gele wurden mit Entfärber-Lösung bis zur gewünschten Verringerung der Hintergrundfärbung gewaschen, sodass definierte, blau gefärbte Proteinbanden zum Vorschein kamen. Zu Dokumentationszwecken wurden die Gele in Folie eingeschweißt und digitalisiert. Die Nachweisgrenze für diese Art der Proteindetektion liegt im Bereich von 0,1-2  $\mu$ g Protein. In dieser Arbeit wurden Coomassie-Gele verwendet, um die Effektivität der Immunpräzipitation (s. 3.7.3) zu überprüfen.

### **3.7.6 Western Blot und Detektion der Proteine**

Der Western Blot dient der Übertragung von Proteinbanden aus einem Elektrophoresegel auf eine Trägermembran. Dadurch erhält man die Möglichkeit, Proteine zu konservieren, ohne ihre Immun- oder Enzymaktivität zu verlieren. Um die Proteine als exaktes Abbild der SDS-Polyacrylamidgele zu immobilisieren, wurde ein sogenannter Semi-Dry Blot durchgeführt. Nach ausreichender Wässerung der platinbeschichteten Trägerelektroden der Western Blot-Apparatur legte man auf die Anode drei Anodenpuffer I- und zwei Anodenpuffer II-getränkte Filterpapiere (s. 2.4.6). Die hydrophobe Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) wurde in Methanol equilibriert, kurz in Anodenpuffer II getaucht und auf die Filterpapiere gelegt.

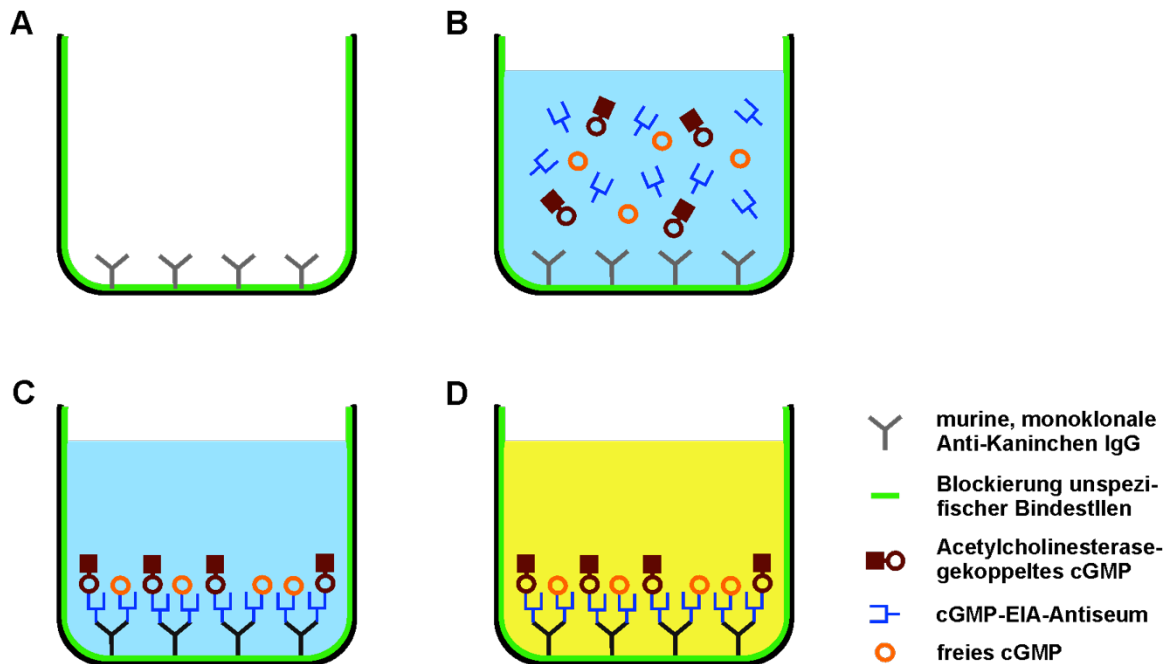
Sobald die Elektrophorese beendet war, wurde das Gel mit Hilfe eines Plastikschabers vorsichtig aus den Glasplatten entnommen und nach Abtrennen des Sammelgels luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Es folgten 5 Lagen Filterpapier, die zuvor in Kathodenpuffer getränkt waren. Die ebenfalls angefeuchtete Kathodenplatte wurde aufgelegt und die gesamte Apparatur mit einer vollständig befüllten 2 Liter-Flasche beschwert und an einen Stromgeber angeschlossen. Der Proteintransfer erfolgte für 60 min bei 60 mA gefolgt von weiteren 15 min bei 90 mA pro Gel. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde in 5%iger Milchpulverlösung in 1x TBS-T (s. 2.4.6) auf einem Schüttler blockiert. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min) in 1x TBS-T-Puffer wurde die Membran gegebenenfalls mit einem Skalpell zugeschnitten (z.B. um direkt die Ladungskontrolle parallel zu erhalten), die entstandenen Teile in die entsprechenden Antikörperlösungen in 50 ml-Falcontubes überführt, auf einem Reagenzglasrotator befestigt und über Nacht bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit binden Primärantikörper an spezifische Epitope der geblotteten Proteine auf der PVDF-Membran. Nach drei weiteren, 10-minütigen Waschschritten am Folgetag wurden die Membranstücke für eine Stunde in Sekundärantikörperlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Zur späteren Visualisierung der Proteinbanden sind diese an ein Fluorophor gekoppelt. Aufgrund der sich daraus ergebenden Lichtempfindlichkeit wurden die folgenden Wascheinheiten (5 x 5 min), sowie das Trocknen zwischen fusselfreien Tüchern im Dunkeln durchgeführt.

Zur Detektion der Proteinbanden wurde das *EttanDige Scan*-System mit zugehöriger Software verwendet, das die Fluorophore der entsprechenden Sekundärantikörper bei bestimmten Wellenlängen anregt. Sofern eine Quantifizierung der Proteinbanden nötig war, wurde das Programm *ImageQuant* verwendet. Hierbei konnte alle Banden eines Gels, auch wenn sie durchgeschnitten wurden, detektiert und aufeinander normalisiert werden. Sofern dies mit den Ladekontrollen auf dieselbe Weise durchgeführt wurde, kann für jede Probe seine relative Expression ermittelt werden, indem der normalisierte Wert des Zielproteins durch die normalisierte Expression des internen Standards geteilt wurde.

### 3.8 Bestimmung von cGMP

Zur Bestimmung der Konzentration von zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) in Homogenisaten von Herzen der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse und der CRP4-Mauslinie, sowie Aorten der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere wurde ein kommerziell erwerbliches Kitsystem der Firma *Cayman Chemical* verwendet (s. 2.4.7). Dem Nachweis des zyklischen Nukleotids lag hierbei ein kompetitiver Enzym-Immunoassay (EIA) zugrunde (Abb. 3.10). Dieser basiert auf der Konkurrenz um spezifische, aber zahlenmäßig limitierte cGMP-Bindungsstellen eines cGMP-Antiserums zwischen dem zu untersuchenden Analyten (freies cGMP) und einem Kompetitor, in diesem Falle Acetylcholinesterase-gekoppeltes cGMP. Während die Konzentration des Kompetitors unverändert ist, variiert die jeweilige cGMP-Konzentration der Herzlysate in Abhängigkeit der untersuchten Mauslinien und der Behandlung (SIL, Ang II). Ist beispielsweise wenig Analyt in einer Probe vorhanden, bindet vermehrt Acetylcholinesterase-gekoppeltes cGMP. Dieses setzt zunächst Acetylcholin zu Thiocholin um. Thiocholin

wiederum reagiert mit der zugegebenen 2-Nitrobenzoesäure (DTNB, Ellmans Reagenz) zu einem farbigen Produkt (5-thio-2-Nitrobenzoesäure), dessen Absorption fotometrisch bestimmt werden kann und sich demnach umgekehrt proportional zur tatsächlichen cGMP-Konzentration verhält. Je mehr cGMP also in einer Probe enthalten ist, desto geringer sind die tatsächlich messbaren Absorptionswerte (s. Abb. 3.10).



**Abb. 3.10: Ablauf des kompetitiven Enzym-Immunoassays (EIA) zur Bestimmung von cGMP.**

(A) Jede Aussparung der 96-Lochplatte war mit einer Blockierlösung abgesättigt und mit murinen, monoklonalen Antikörpern gegen spezifische IgG-Strukturen des Kaninchens ausgekleidet. (B) Nach Zugabe der Proben bzw. des Analyten (Herzlysate von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäusen und der CRP4-Mauslinie und Aorten von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren) wurde zusätzlich Acetylcholinesterase-gekoppeltes cGMP (Kompetitor) und das cGMP-EIA-Antiserum zugegeben. Die spezifischen cGMP-Antikörper des EIA-Antiserums binden an die monoklonalen Kaninchen IgGs. (C) Das zu detektierende cGMP in den Probenlysaten kompetitiert mit Acetylcholinesterase-gekoppeltem cGMP um die freien Bindungsstellen an den cGMP-Antikörpern des EIA-Antiserums. (D) Nach Zugabe von Ellmans Reagenz folgt Acetylcholinesterase-vermittelt die Bildung von 5-thio-2-Nitrobenzoesäure und damit der Farbumschlag. Die erhaltene Absorption (gelb) verhält sich umgekehrt proportional zur Konzentration des kardialen cGMPs in den Proben. Die Quantifizierung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer. Das Schema wurde modifiziert auf Grundlage der Versuchsanleitung des Herstellers (Cayman Chemical).

### 3.8.1 Probenaufbereitung

Die Herzen wurden nach dem üblichen Schema (s. 3.4.1) entnommen, und für eine spätere Normierung auf die Ventrikelmasse gewogen. Sogleich wurden die Herzen in 1 ml  $-20^\circ\text{C}$  kaltem 100%igem Ethanol mit einem Hand-Dispergiergerät homogenisiert und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Mit den parallel entnommenen Aorten der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere wurde genauso verfahren. Der cGMP-haltige Überstand wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zum Abdampfen des Ethanols folgte eine mindestens 2-stündige Vakuumzentrifugation. Das getrocknete, kristalline Pellet wurde in 115  $\mu\text{l}$  EIA-Puffer resuspendiert und konnte bis zur Weiterverarbeitung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

### 3.8.2 Durchführung des kompetitiven Enzym-Immunoassays

Der eigentliche Enzym-Immunoassay wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden Standardproben für die spätere Erstellung der Eichkurve angefertigt. Hierzu wurde der im Kit enthaltene cGMP-Standard in 1 ml EIA-Puffer gelöst und 100 µl hiervon mit weiteren 900 µl EIA-Puffer vermischt (S1). Für die Erstellung der Verdünnungsreihe (S2-S8) mit absteigenden cGMP-Konzentrationen wurde jeweils 500 µl aus jedem Reaktionsgefäß mit 500 µl vorgelegtem EIA-Puffer aus dem folgenden Gefäß vermischt. Anschließend wurde die mitgelieferte, mit IgG-Antikörpern überzogene 96-Lochplatte mit den nötigen Reagenzien, Standardlösungen und den Lysat-Proben in Duplikaten belegt (s. Tab. 3.1). Hierbei mussten 3 Aussparungen für den Nullabgleich unbefüllt bleiben (Blk; *Blank*), 2 weitere Aussparungen wurden nur mit EIA-Puffer und dem Kompetitor (Acetylcholinesterase-gekoppeltes cGMP) befüllt. Diese repräsentieren die unspezifischen Bindungen des Kompetitors (NSB; *non-specific binding*). Um die maximale Bindung ( $B_0$ ) des Kompetitors an das Antiserum (ohne Konkurrenz des freien cGMPs) zu detektieren, wurden in 3 weitere Löcher jeweils 50 µl EIA-Puffer, Kompetitor und cGMP-EIA-Antiserum eingefüllt. Die eigentlichen Proben (50 µl) wurden immer als Duplikate pipettiert und mit jeweils 50 µl Acetylcholinesterase-gekoppeltem cGMP (Kompetitor) sowie cGMP-EIA-Antiserum über Nacht, jedoch mindestens 18 Stunden bei Raumtemperatur unter einer Schutzfolie inkubiert.

Lösung	Blk	Nsb	$B_0$	Standard	Proben	TA
EIA-Puffer [µl]	-	100	50	-	-	-
Standard [µl]	-	-	-	50	-	-
Kompetitor [µl]	-	50	50	50	50	5*
cGMP-Antiserum [µl]	-	-	50	50	50	-
Probe [µl]	-	-	-	-	50	-

**Tab. 3.1: Pipettierschema des cGMP-EIAs.**

Die Tabelle zeigt das Pipettierschema zur Belegung der 96-Lochplatte des cGMP-EIAs. \*Die Zugabe von 5 µl Kompetitor (Acetylcholinesterase-gekoppeltes cGMP) zur Ermittlung der totalen Aktivität der Acetylcholinesterase erfolgte erst am Folgetag. Blk: Blank-Probe; Nsb: unspezifische (*non-specific binding*) des Kompetitors;  $B_0$ : maximale Bindung des Kompetitors, TA: Totale Aktivität der Acetylcholinesterase. Weitere Erklärungen im Text.

Am nächsten Tag wurde die Platte fünfmal mit Waschpuffer gespült. Eine vollständige Entleerung vor jedem Waschschrift wurde durch Ausklopfen der Platte auf einem Stapel Tücher sichergestellt. Zur letztendlichen Farbentwicklung wurden je 200 µl des frisch zubereiteten Ellmans-Reagenz aufpipettiert und die Platte aufgrund der Instabilität der Reaktionslösung im Dunkeln unter leichten Schüttelbewegungen inkubiert. In ein bislang freigehaltenes Loch wurden zusätzlich 5 µl Kompetitor pipettiert (s. Tab. 3.1), was die absolute Aktivität der Acetylcholinesterase impliziert. Innerhalb der folgenden 2 Stunden wurde alle 30 min die Absorption jeder Aussparung mit Hilfe eines Photometers (Tecan Sunrise) bei einer Wellenlänge von 405 nm ausgelesen. Für die Statistik wurden die Messungen verwendet, deren  $B_0$ -Werte nach Subtraktion der *Blanks* Absorptionen zwischen 0,3-1,0 aufwiesen. Dies war meist nach 120 min der Fall.

### 3.8.3 Auswertung des kompetitiven Enzym-Immunoassays

Die Auswertung des Assays erfolgte mit der Software *Magellan 7* (Tecan) und einer vom Hersteller zur Verfügung gestellten, vorprogrammierten Excel-Tabelle, in der die erhaltenen Rohdaten eingetragen werden konnten ([www.Caymanchem.com/analysis/eia](http://www.Caymanchem.com/analysis/eia)). Anschließend wurden von allen Werten die Nullwerte (Blk) subtrahiert. Die Mittelwerte der NSB und B<sub>0</sub>-Löcher, auch als gemittelter B<sub>0</sub>-Wert bezeichnet, wurde vom NSB-Wert abgezogen. Der so abgeleitete korrigierte B<sub>0</sub>-Wert ist um unspezifische Bindungen korrigiert. Zuletzt wurden alle Absorptionswerte der Proben und der Standardkurve durch den korrigierten B<sub>0</sub>-Wert dividiert. Mit Hilfe der *Magellan 7*-Software wurde eine cGMP-Standardkurve erstellt, anhand derer auf die tatsächliche cGMP-Konzentration der jeweiligen Herz- und Aortenlysate (in pmol) extrapoliert werden konnte. Diese mussten zu Normierungszwecken anschließend nur noch durch die Ventrikelgewichte, bzw. Aortengewichte dividiert werden.

### 3.9 Statistik

Die erhobenen Ergebnisse wurden in den Diagrammen als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Sofern keine geräte- bzw. versuchsspezifische Auswerteprogramme verwendet wurden, sind alle Statistiken mit *Microsoft Excel 2010* vorgenommen worden. Signifikanzberechnungen wurden mit Hilfe eines ungepaarten Student's t-test (unter Annahme gleicher SEMs) durchgeführt. Erhaltene p-Werte  $<0,05$  wurden als statistisch signifikant,  $<0,01$  als hoch signifikant und p-Werte  $<0,001$  als höchst signifikant betrachtet und mit der entsprechenden Anzahl an Sternen (\*) dargestellt (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ). Nicht signifikante Unterschiede  $p>0,05$  sind entweder gar nicht oder mit n.s. (nicht signifikant) gekennzeichnet.



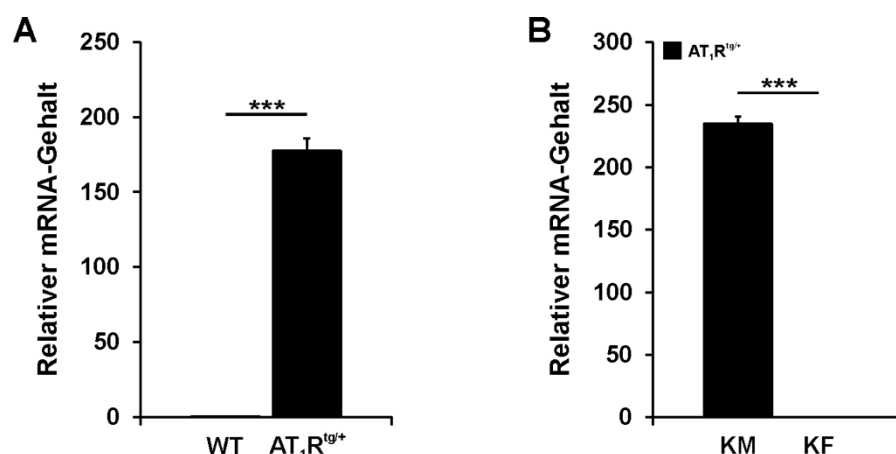
## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde schwerpunktmäßig die Rolle der cGKI und des cGMP/cGKI-Effektorproteins CRP4 bei der Entstehung und dem Fortschreiten hypertropher Herzerkrankungen untersucht. In früheren Studien wurden protektive Effekte von cGMP und der cGKI hauptsächlich im Kontext der Ang II-induzierten kardialen Hypertrophie beobachtet (Frantz et al. 2013, Patrucco et al. 2014). Das hierbei chronisch infundierte Neurohormon beeinflusst neben den Myozyten ebenso die Zellfunktion sämtlicher kardialer Zelltypen und bewirkt durch renovaskuläre Effekte unter anderem eine Erhöhung der Nachlast. Um ausschließlich die Bedeutung der kardiomyozytären cGKI bei einer verstärkten Ang II-Signalweiterleitung zu untersuchen, wurden im ersten Teil dieser Arbeit Mäuse verwendet, die eine spezifische Überexpression des humanen AT<sub>1</sub>R in Kardiomyozyten tragen (Paradis et al. 2000). Des Weiteren sollten mit Hilfe dieser  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere mögliche protektive Auswirkungen einer Erhöhung intrakardialer cGMP-Spiegel mittels SIL erörtert werden.

### 4.1 Kardialer Phänotyp der $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere

#### 4.1.1 Einfluss der AT<sub>1</sub>R-Überexpression auf Morphologie und Herzfunktion

Im  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mausmodell wurde die Sequenz des humanen AT<sub>1</sub>-Rezeptors für Ang II unter der Kontrolle des myozytären  $\alpha$ MHC-Promotors kloniert, was zu einer massiven Überexpression des Rezeptors spezifisch in Kardiomyozyten führt. Dies wurde bereits bei der Erstbeschreibung dieser Mauslinie gezeigt (Paradis et al. 2000). Mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR) sollten diese Ergebnisse zunächst bestätigt werden (s. Abb. 4.1).

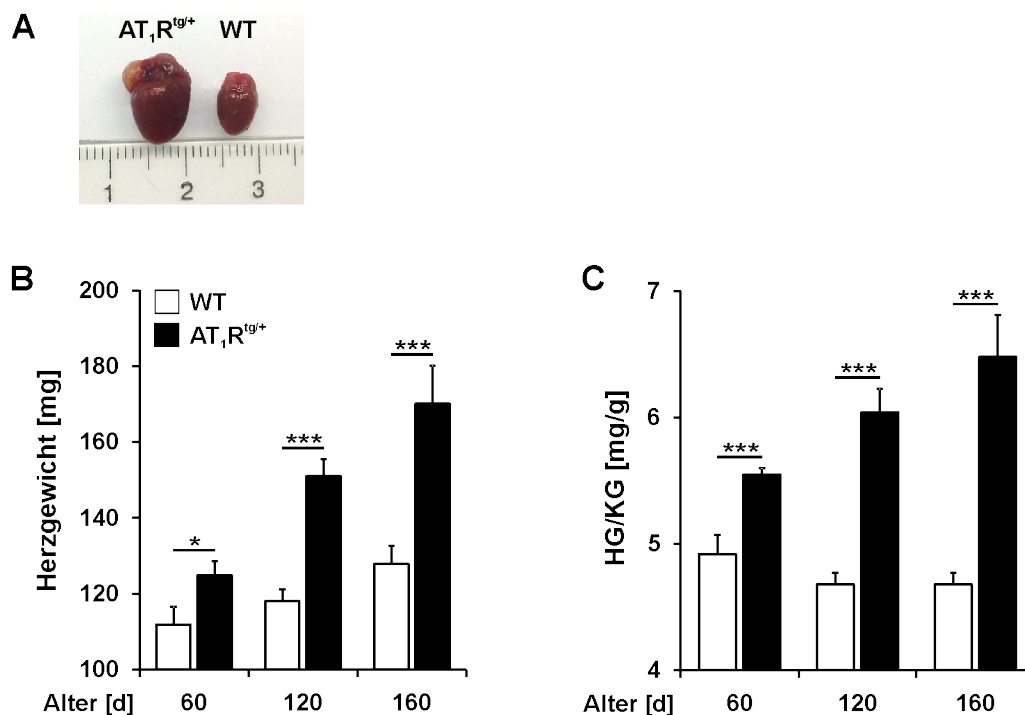


**Abb. 4.1: Kardiomyozytenspezifische Überexpression des humanen AT<sub>1</sub>R.**

Quantitative Analyse der mRNA-Transkripte zur Bestätigung der myozytenspezifischen Überexpression des humanen AT<sub>1</sub>R bezogen auf HPRT als Referenzgen in (A) Gesamtherzlysaten von 120 Tage alten transgenen  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäusen (n=5) und deren WT-Wurfgeschwister (n=9), sowie (B) isolierten kardialen Myozyten (KM) und Fibroblasten (KF) von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäusen aus 3 bzw. 5 Präparationen (\*\*\*p<0,001).

Obwohl sich die Generierung von spezifischen qRT-PCR Primern für den humanen AT<sub>1</sub>R aufgrund der hohen Sequenzhomologie zum entsprechenden murinen AT<sub>1</sub>R-Ortholog schwierig gestaltete, war eine sehr deutliche AT<sub>1</sub>R-Überexpression in Gesamtherzlysaten der transgenen Tiere ( $177,46 \pm 8,22$ ) im Vergleich zu ihren WT-Wurfgeschwistern ( $0,49 \pm 0,05$ ) erkennbar (s. Abb. 4.1 A). Die Expression des AT<sub>1</sub>R war in den transgenen Tieren somit mehr als 350-fach erhöht. Dieser Befund ist kongruent mit der Erstcharakterisierung dieser Mauslinie, hier hatten die Autoren eine ca. 200-fache Überexpression mittels Northern Blot beschrieben (Paradis et al. 2000). Des Weiteren bestätigen zellspezifische Expressionsanalysen in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten (s. Abb. 4.1 B), dass sich die Überexpression des AT<sub>1</sub>R in diesem transgenen Mausmodell primär auf den Kardiomyozyten beschränkt (Myozyten  $234,7 \pm 5,64$ ; kardiale Fibroblasten  $0,0048 \pm 0,0013$ ).

Um die von Paradis et al. beschriebene progrediente kardiale Hypertrophie zu verifizieren, die sich ab dem 60. Lebenstag manifestierte, wurden Herzen von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup> und WT-Tieren im Alter von 60, 120 und 160 Tagen entnommen und gewogen. Die Normierung des Herzgewichts auf das Körpergewicht ermöglichte es, potentielle Unterschiede in der Größe und dem Gewicht der Tiere sowie zwischen den Geschlechtern zu eliminieren (s. Abb. 4.2).



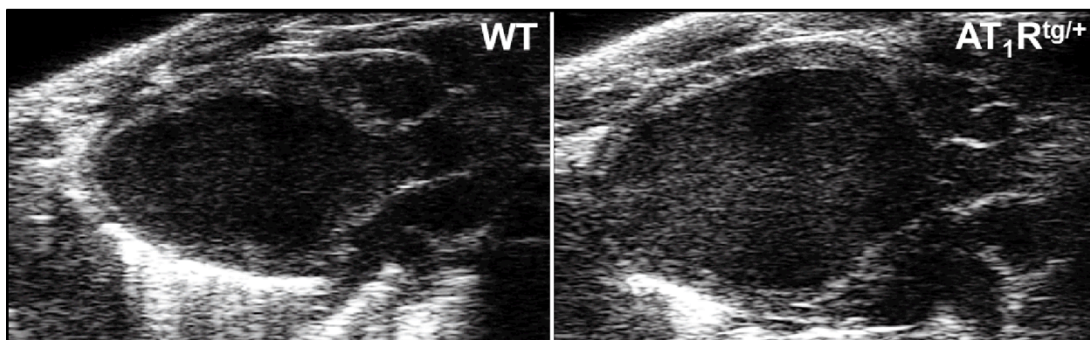
**Abb. 4.2: Progressive kardiale Hypertrophie in  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäusen.**

(A) Größenvergleich von repräsentativen Herzpräparationen aus 120 Tage alten WT- und  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren. In beiden Genotypen wurde (B) das absolute Herzgewicht und (C) das Verhältnis des Herzgewichts (HG) zum Körpergewicht (KG) im Alter von 60, 120 und 160 Tagen bestimmt. Die n-Zahlen betragen für 60 Tage alte WT-Tiere n=7 bzw. n=9 für die  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere; analog für 120 Tage: n=12 bzw. n=24, sowie für 160 Tage alte Mäuse: n=20, bzw. n=17. (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001).

Augenscheinlich nimmt das Herzgewicht mit zunehmendem Alter der Tiere generell zu, jedoch stieg die Herzmasse in den  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren rapider an und erreichte höhere Maximalwerte als in WT-Tieren (s. Abb. 4.2 B). Bereits ab dem 60. Lebenstag waren die

Herzgewichte der transgenen Tiere mit  $124,84 \pm 3,7$  mg gegenüber den WT-Kontrolltieren signifikant erhöht ( $111,84 \pm 4,8$  mg). Bis zum Erreichen des 120. Lebensstages stieg das Herzgewicht weiter an (WT  $118,05 \pm 3$  mg;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>  $151,05 \pm 4,4$  mg). Im Alter von 160 Tagen waren die Unterschiede sogar noch ausgeprägter (WT  $127,88 \pm 4,7$  mg;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>  $170,12 \pm 10,1$  mg). Ein ähnliches Bild ergab sich auch für die Normierung der Herzgewichte auf die Körpergewichte, zu jedem Zeitpunkt konnten hochsignifikante Unterschiede zwischen WT- und  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäusen ermittelt werden (s. Abb. 4.2 C). Auch hier wurde das progressive Fortschreiten der Erkrankung von Tag 60 (WT  $4,92 \pm 0,15$  mg/g;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>  $5,55 \pm 0,05$  mg/g) über Tag 120 (WT  $4,68 \pm 0,09$  mg/g;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>  $6,04 \pm 0,19$  mg/g) bis zur Endmessung am 160. Lebenstag (WT  $4,68 \pm 0,09$  mg/g;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>  $6,48 \pm 0,33$  mg/g) deutlich. Die Normierung auf das Körpergewicht war hier möglich, da keine Gewichtsunterschiede zwischen den Genotypen erkennbar waren (Daten nicht gezeigt).

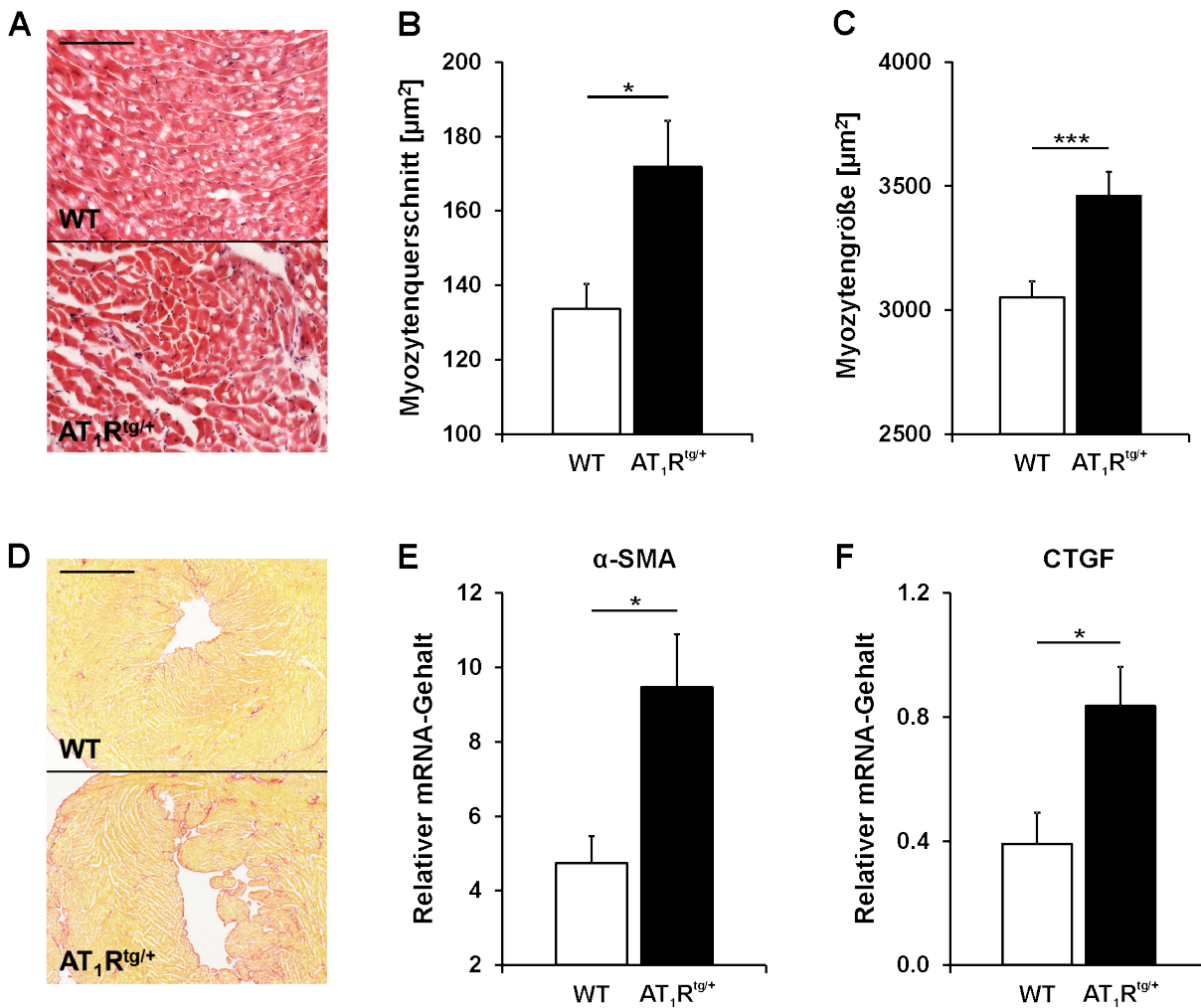
Die Echokardiographie erlaubt neben der Bestimmung der Herzfunktion (s. 4.2.3) auch eine Beschreibung kardialer Dimensionen und der Herzarchitektur. B-Mode Aufnahmen der Herzen (s. Abb. 4.3) zeigen ein deutlich vergrößertes Kammervolumen des linken Ventrikels in  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäusen. Darüber hinaus waren in den 120 Tage alten  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren bereits deutliche Kennzeichen einer Dilatation des linken Ventrikels erkennbar.



**Abb. 4.3: Echokardiographie von WT- und  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäusen.**

Dargestellt sind repräsentative B-Mode Aufnahmen von Herzen einer 120 Tage alten WT- (links) und einer  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Maus (rechts), aufgenommen unter 1,5%iger Isofluran-Narkose.

Im Rahmen der Reevaluation der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mauslinie wurde erstmals auch eine Quantifizierung der Kardiomyozytengröße und der Myokardfibrosierung durchgeführt (s. Abb. 4.4). Zur Bestimmung der Zellquerschnittsfläche als Parameter der myozytären Hypertrophie wurden Serienschritte der Herzen beider Genotypen einer HE-Färbung unterzogen. Die Flächen der Zellen im Bereich des Papillarmuskels mit zentral lokalisiertem Kern wurden durch Umranden der Myozyten bestimmt (s. 3.5.6). Es ergaben sich signifikant größere Myozytenquerschnittsflächen (s. Abb. 4.4 A, B) für die transgenen Tiere ( $171,92 \pm 12,3 \mu\text{m}^2$ ) verglichen mit den WT-Kontrolltieren ( $133,61 \pm 6,75 \mu\text{m}^2$ ). Dieser Befund ließ sich durch die Größenbestimmung von adulten Kardiomyozyten *in vitro* bestätigen (s. Abb. 4.4 C): Separierte  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Myozyten hatten ein unförmiges und zerklüftetes Aussehen, waren fragiler und mit einer Gesamtfläche von  $3460,5 \pm 96,7 \mu\text{m}^2$  auch signifikant größer als entsprechende WT-Myozyten ( $3052,5 \pm 63,8 \mu\text{m}^2$ ).



**Abb. 4.4: Bestimmung der myozytären Hypertrophie und der Myokardfibrosierung.**

(A) Lichtmikroskopische Aufnahme von 8  $\mu\text{m}$  dicken, HE-gefärbten Gefrierschnitten von Herzen 120 Tage alter WT und  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäusen zur Bestimmung der Kardiomyozytenareale. Signifikant größere Zellquerschnittsflächen bzw. Myozytengrößen für  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere konnten sowohl in (B) Gewebeschnitten aus 369 vermessenen Zellen von  $n=9$  WT-Tieren bzw. 438 Zellen aus Schnitten von  $n=11$   $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren, als auch in (C) frisch isolierten Kardiomyozyten ermittelt werden (WT: 154 Zellen;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ : 100 Zellen aus je drei unabhängigen Präparationen). (D) Repräsentative Sirius-Rot Färbungen zur Visualisierung der fibrotischen Herzareale (rot) im Bereich des Papillarmuskels, aufgenommen mit dem MIRAXScan-System (Zeiss). (E)  $\alpha\text{-smooth muscle actin}$  ( $\alpha\text{-SMA}$ ) und (F) *Connective tissue growth factor* (CTGF) als typische Marker für kardiale (Myo-) Fibroblasten waren in  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren ( $n=9$ ) im Vergleich zum WT ( $n=5$ ) nach Normalisierung auf HPRT signifikant erhöht (\* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$ ). Die Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu\text{m}$  (A) bzw. 1 mm (D). Die Sirius-Rot Färbung wurde in Zusammenarbeit mit Verena Schöttle im Rahmen eines Diplomarbeitprojektes angefertigt.

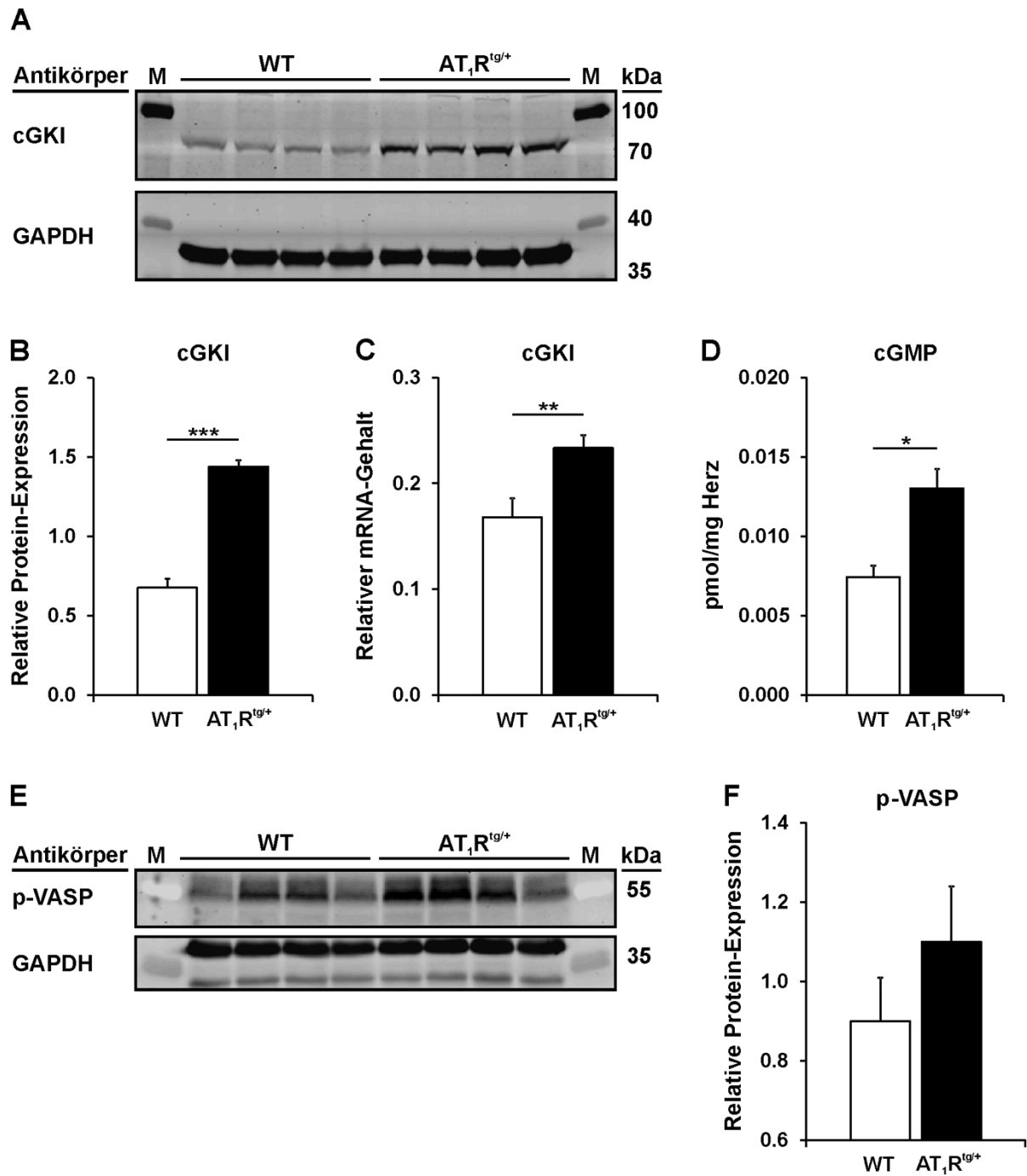
Eine Herzhypertrophie wird meist begleitet von einer Fibrosierung des Myokards (Kong et al. 2014). Die Sirius-Rot Färbung ist eine Methode zur Visualisierung der myokardialen Fibrose. Extrazelluläre Matrixkomponenten, insbesondere Kollagene, werden durch die Sirius-Rot Färbung sichtbar. Die primäre Ursache für das hypertrophe bzw. dilatative Herzwachstum der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere ist die amplifizierte  $\text{AT}_1\text{R}$ -Signaltransduktion im Kardiomyozyten, trotzdem zeigen die transgenen Tiere eine massive Akkumulation von fibrotischen Gewebsanteilen (s. Abb. 4.4 D). Paradis et al. vermuteten bereits, dass dieser Tatsache ein Absterben von Kardiomyozyten zugrunde liegt, die durch Fibroblasten ersetzt werden. Mit  $\alpha\text{-$

*smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA; s. Abb. 4.4 E) und *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF; s. Abb. 4.4 F) wurden daher die mRNA-Level von zwei typischen Markern für die Aktivität von Fibroblasten/Myofibroblasten bestimmt. Erwartungsgemäß waren die mRNA-Mengen dieser Marker in den transgenen Tieren signifikant hochreguliert ( $\alpha$ -SMA: WT  $4,75 \pm 0,706$ ;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>  $9,47 \pm 1,42$ ; CTGF: WT  $0,391 \pm 0,101$ ;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>  $0,836 \pm 0,127$ ).

#### 4.1.2 Expression und Funktion des cGMP/cGKI-Signalwegs in hypertrophen $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Herzen

Die initiale Charakterisierung (s. 4.1.1) bestätigte die im Rahmen der Erstbeschreibung dieses Mausmodells dargestellten Befunde zur kardialen Hypertrophie und der Myokardfibrosierung (Paradis et al. 2000). Orts- oder laborspezifische Abweichungen des Phänotyps konnten somit ausgeschlossen werden. Das  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mausmodell schien damit gut geeignet zu sein, um weitere Versuche zur Bedeutung des kardiomyozytären cGMP/cGKI-Signalwegs für das progrediente Herzwachstum vorzunehmen (s. Abb. 4.5).

In der jüngsten Vergangenheit wurden überzeugende Studien zur protektiven Rolle der cGKI bei kardialen *Remodeling*prozessen publiziert (Frantz et al. 2013, Patrucco et al. 2014). Dennoch gibt es bislang keine Untersuchungen zur Expression der Kinase auf Proteinebene bei Ang II-induzierter Herzhypertrophie. Die Quantifizierung von Western Blots mit cGKI-spezifischen Antikörpern ergab eine mehr als zweifach erhöhte cGKI-Proteinmenge in Gesamtherzlysaten von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäusen (s. Abb. 4.5 A, B). Diese signifikanten Unterschiede ließen sich durch Bestimmung der cGKI mRNA-Transkripte mittels qRT-PCR bestätigen (s. Abb. 4.5 C). In diesem Zusammenhang wurden außerdem die intrakardialen cGMP-Spiegel mittels Enzym-Immunoassay (s. 3.8) gemessen und auf das Herzgewicht normiert (s. Abb. 4.5 D). Interessanterweise fanden sich auch in den Gesamtherzlysaten von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren höhere Konzentrationen ( $0,01302 \pm 0,00123$  pmol/mg) des zyklischen Nucleotids als in Herzen von WT-Kontrolltieren ( $0,00745 \pm 0,00072$  pmol/mg). Es scheint, als ob der cGKI-Signalweg im Zuge eines Kompensationsmechanismus als Antwort auf eine verstärkte Ang II-induzierte Signaltransduktion hochreguliert ist. Ob die erhöhten cGMP-Spiegel und die verstärkte Expression der cGKI auch in einer gesteigerten Aktivität der Kinase münden, wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen phosphoryliertes VASP (*Vasodilator-stimulated Phosphoprotein*) ermittelt (Smolenski et al. 1998). VASP, ein zytoskelettales Protein, ist sowohl ein Substrat der PKA als auch der cGKI. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper erkennt die cGKI-vermittelte Phosphorylierung von VASP am Serin-239. Diese spezifische Phosphorylierung durch die cGKI wird häufig als Indikator für deren Aktivität verwendet (Smolenski et al. 1998). Tatsächlich war eine verstärkte Phosphorylierung von VASP in den Herzlysaten transgener Tiere detektierbar, jedoch wurde das statistische Signifikanzniveau im Vergleich mit den WT-Lysaten nicht erreicht (s. Abb. 4.5. E, F).



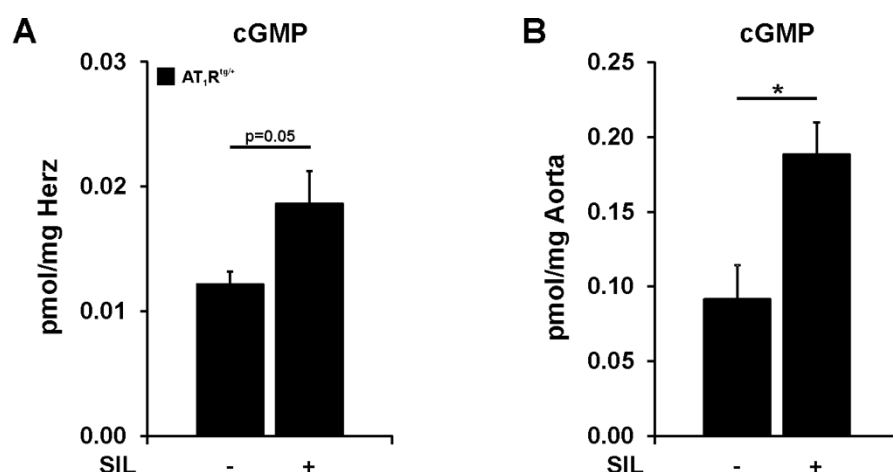
**Abb. 4.5: Kompensatorische Hochregulation des cGMP/cGKI-Signalwegs.**

(A) Repräsentativer Western Blot von Herzlysaten gleichaltriger Mäuse beider Genotypen. Es wurden jeweils 50 µg Protein pro Herzlysat eingesetzt. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) diente als Ladungskontrolle; zur Detektion der Kinase wurde der cGKI<sub>α/β</sub>-Antikörper verwendet (Lukowski et al. 2010). Ein Standard-Proteinmarker half bei der exakten Zuordnung der erhaltenen Proteinbanden. (B) Quantifizierung der analysierten Proteinproben von WT (n=8) und αMHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/tg</sup>-Mäusen (n=6) nach Normierung der Werte auf GAPDH als internen Standard (C) Statistische Auswertung der Mittelwerte der cGKI mRNA-Expression -normalisiert auf HPRT- in n=5 (WT) bzw. n=9 (αMHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/tg</sup>) Herzlysaten pro Genotyp. (D) Signifikant erhöhte cGMP-Mengen in Herzlysaten von αMHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/tg</sup>-Mäusen (n=3) verglichen mit WT-Hezen (n=4) nach Normierung auf das Ventrikelgewicht. (E) Western Blot zur Detektion der cGKI-spezifischen Phosphorylierungsstelle am Serin-239 von VASP und (F) die dazugehörige statistische Auswertung der erhaltenen Proteinbanden aus je 4 Herzlysaten pro Genotyp. Signifikanzniveaus: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Die Western Blots und die cGMP-Messung in dieser Abbildung wurden in Zusammenarbeit mit Verena Schöttle im Rahmen eines Diplomarbeitprojektes angefertigt.

## 4.2 Effekte von Sildenafil auf die kardialen Umbauprozesse im $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mausmodell

Die Hochregulation des cGMP/cGKI-Signalwegs (s. 4.1.2) deutet auf einen physiologisch wichtigen Kompensationsmechanismus bei Ang II-induzierter Herzhypertrophie hin. Dies führte zu Überlegungen, inwiefern sich eine zusätzliche Stimulation dieses Signalwegs positiv auf die Symptomatik einer bereits bestehenden Herzhypertrophie auswirken kann. Eine Reihe von Studien konnten in der jüngsten Vergangenheit mit einer Erhöhung der cGMP-Konzentration durch den PDE5-Hemmstoff Sildenafil (SIL) positive Effekte bezüglich des hypertrophen kardialen *Remodelings* zeigen (Takimoto et al. 2005, Westermann et al. 2012). Jedoch herrscht über den exakten kardialen Zelltyp, in dem SIL eine cGMP-Erhöhung bewirkt, nach wie vor große Unklarheit (Lukowski et al. 2014). Anhand des  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Modells lässt sich untersuchen, inwiefern SIL den pro-fibrotischen und pro-hypertrophen Effekten einer chronisch intensivierten Ang II/AT<sub>1</sub>R-Signaltransduktion in Kardiomyozyten entgegenwirken kann.

Hierzu wurden  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse und die entsprechenden WT-Wurfgeschwister in verschiedene Gruppen randomisiert. Die Versuchsgruppe erhielt insgesamt 60 Tage lang den PDE5-Hemmstoff SIL (400 mg/l) im Trinkwasser gelöst (Adamo et al. 2010), die Kontrollgruppe dagegen Placebo-Flüssigkeit mit demselben pH-Wert (s. 3.3.1). Als Zeitpunkt für den Behandlungsbeginn wurde der 60. Lebensstag gewählt, da das maladadaptive *Remodeling* im  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mausmodell zu diesem Zeitpunkt durch Gabe des AT<sub>1</sub>R-Antagonisten Losartan gestoppt bzw. rückgängig gemacht werden konnte (Paradis et al. 2000). Um die Effizienz der SIL-Behandlung zu überprüfen, wurde eine kleine Gruppe von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren nach einer Woche SIL bzw. Placebo für kardiale und vaskuläre cGMP-Messungen geopfert (s. Abb. 4.6).



**Abb. 4.6: cGMP-Spiegel in Herzen und Aorten von SIL-behandelten  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren.**

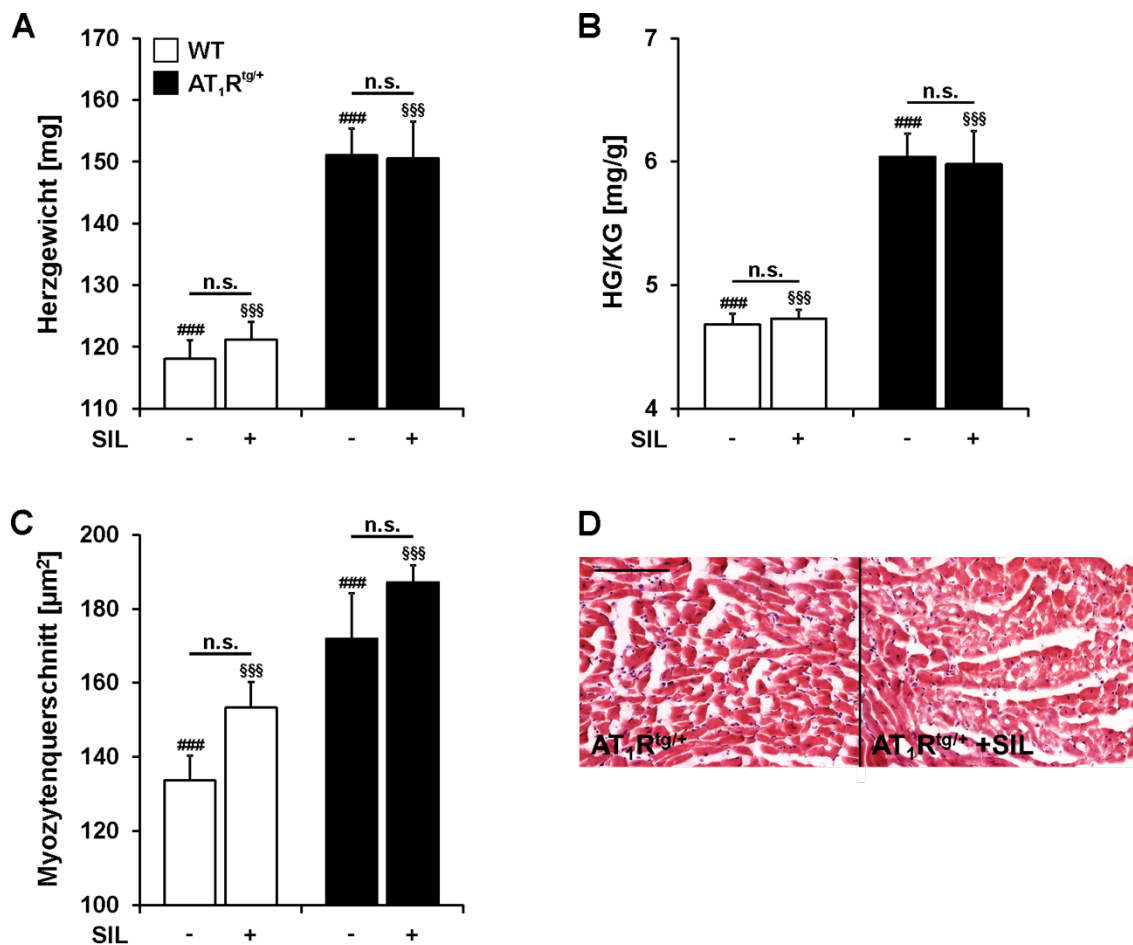
Die einwöchige SIL-Behandlung führte in (A) Herzen und (B) Aorten von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren zu einem signifikanten Anstieg der cGMP-Konzentration (\* $p < 0,05$ ). Verwendete Tierzahlen: Placebo-behandelt:  $n=8$  (Herz),  $n=3$  (Aorta), SIL-behandelt:  $n=10$  (Herz),  $n=4$  (Aorta).

Die im Vergleich zu WT-Herzen bereits basal erhöhten kardialen cGMP-Spiegel der Placebo-behandelten transgenen Tiere ( $0,01218 \pm 0,001$  pmol/mg und Abb. 4.5 D) waren durch das chronische SIL-Fütterungsprotokoll nochmal signifikant steigerbar ( $0,01864 \pm 0,0026$  pmol/mg, s. Abb. 4.6 A). Von einigen Versuchstieren wurde zusätzlich die Aorta für weitere cGMP-Bestimmungen entnommen. Auch in den Gefäßen ließ sich durch SIL annähernd eine Verdopplung der cGMP-Konzentration von  $0,0915 \pm 0,0228$  pmol/mg auf  $0,1882 \pm 0,00215$  pmol/mg erreichen (s. Abb. 4.6 B). Die generell zehnfach höhere vaskuläre cGMP-Konzentration stimmt mit den erwarteten Werten überein und bestätigt damit die Verlässlichkeit der hier durchgeführten Methode. Die Expression der cGKI-Proteinmenge sowie die Abundanz der AT<sub>1</sub>R-mRNA wurden durch das SIL-Fütterungsprotokoll dagegen nicht beeinflusst (s. Anhang, Abb. 7.1 A-C).

### 4.2.1 Einfluss von Sildenafil auf die kardiale Hypertrophie

Nach 60 Tagen SIL- bzw. Placebo-Behandlung wurden die Versuchstiere geopfert. Das Ausmaß des kardialen *Remodelings*, sowie der Einfluss von SIL auf den progressiven Herzphänotyp der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere wurde anhand histologischer und biochemischer Parameter bestimmt. Die Herzgewichte, die auf das Körpergewicht normalisierten Werte, sowie die Myozytenquerschnittsflächen der Placebo-behandelten  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>- und WT-Tiere in Abb. 4.7 entsprechen derer, die bereits bei der Reevaluation des Mausmodells unter 4.1.1 gezeigt wurden und signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen darlegten. Die chronische SIL-Gabe hatte weder Auswirkung auf die Herzgewichte (Abb. 4.7 A) der transgenen- (Placebo  $151,05 \pm 4,38$  mg; SIL  $150,55 \pm 5,99$  mg) noch der WT-Tiere (Placebo  $118,05 \pm 3,01$  mg; SIL  $121,21 \pm 2,83$  mg). Das Körpergewicht aller Mäuse wurde während der SIL- bzw. Placebo-Behandlung wöchentlich dokumentiert (s. Anhang, Abb. 7.1 D). Da die SIL-Gabe das Körpergewicht nicht erkennbar beeinflusste, konnten auch hier die Herzgewichte auf die Körpergewichte normiert werden (Abb. 4.7 B). Analog der isolierten Herzgewichte war auch nach der Normierung kein Benefit durch die SIL-Gabe erkennbar (WT: Placebo  $4,68 \pm 0,09$  mg/g; SIL  $4,73 \pm 0,07$  mg/g;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>: Placebo  $6,04 \pm 0,19$  mg/g; SIL  $5,98 \pm 0,27$  mg/g). Die initiale Charakterisierung der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mauslinie zeigte überdies eine Hypertrophie auf myozytärer Ebene, charakterisiert durch signifikant vergrößerte Myozytenquerschnittsflächen (s. Abb. 4.4 B). Vergleicht man diese nun mit den Querschnittsflächen der Herzmuskelzellen von SIL-behandelten Tieren, so wird deutlich, dass SIL keinen hemmenden Einfluss auf myozytäre Wachstumsprozesse ausübt (s. Abb. 4.7 C, D). Vielmehr führte die SIL-Gabe zu einer moderaten, aber nicht signifikanten Zunahme der Myozytenquerschnittsflächen (WT: Placebo  $133,61 \pm 6,75$   $\mu\text{m}^2$ ; SIL  $153,34 \pm 6,84$   $\mu\text{m}^2$ ;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>: Placebo  $171,92 \pm 12,29$   $\mu\text{m}^2$ ; SIL  $187,19 \pm 4,56$   $\mu\text{m}^2$ ).



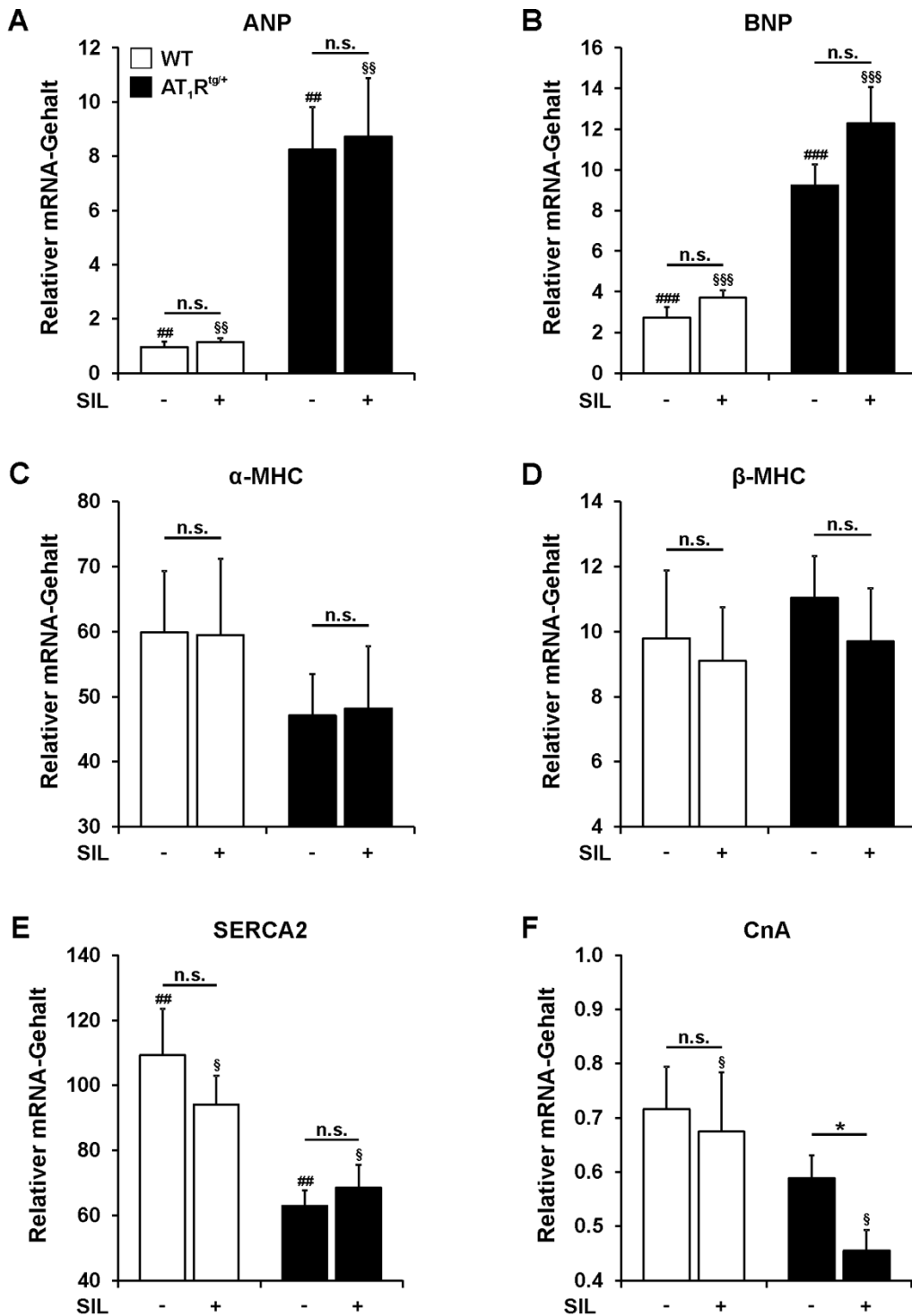


**Abb. 4.7: SIL mildert das Ausmaß der Hypertrophie von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren nicht.**

SIL zeigte keine Effekte auf das (A) Herzgewicht und (B) das normalisierte Herzgewicht innerhalb der behandelten Genotypen (WT n=17;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$  n=22). (C) Moderate, nicht signifikante Zunahme der Myozytenquerschnittsflächen unter SIL-Therapie in beiden Genotypen. Analysiert wurden in der SIL-Gruppe 336 Zellen von insgesamt n=9 WT- sowie 485 Zellen aus Schnitten von n=12  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren. Die Werte für die Darstellung der Placebo-behandelten Gruppen beider Genotypen in den Schaubildern A-C wurden aus Abb. 4.4 übernommen. # und § vergleichen Tiere  $\pm$  SIL zwischen den Genotypen (###p<0,001; §§§p<0,001). (D) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme von HE-färbten Kryoschnitten von transgenen Tieren  $\pm$  SIL. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Eine weitere Erhöhung des kardialen cGMPs durch die chronische SIL-Behandlung konnte somit keine Reduktion der Herzmasse herbeiführen. Dies schließt per se einen Einfluss auf molekularer Ebene, z.B. in der Modulation der Expression des fetalen Genprogramms nicht aus. Aus diesem Grund wurden die mRNA-Level verschiedener Hypertrophiemarker mittels qRT-PCR untersucht (s. Abb. 4.8). Die Expression der natriuretischen Peptide ist im Zuge hypertropher Umbauprozesse des Herzens regelhaft stark erhöht (Volpe et al. 2014). Auch in dem hier untersuchten Hypertrophiemodell ist ein deutlicher Anstieg der Expression von ANP und BNP in den  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Herzen erkennbar. In Übereinstimmung mit den histologischen Daten (s. Abb. 4.7) hatte SIL keinen Einfluss auf die Expressionsänderungen dieser natriuretischen Peptide (s. Abb. 4.8 A, B). Bezeichnend für Änderungen auf transkriptioneller Ebene bei kardialer Hypertrophie sind auch Verschiebungen im Expressionsstatus von bestimmten Isoformen der schweren Myosinketten. Meist lässt sich dabei beobachten, dass die Expression der „adulten“  $\alpha$ -Isoform ( $\alpha$ -MHC) zugunsten der

„fetalen“  $\beta$ -Isoform ( $\beta$ -MHC) abnimmt (Frey and Olson 2003). Eine ähnliche Tendenz ergab sich für die Expression der  $\alpha$ -MHC Isoform in den transgenen Tieren (s. Abb. 4.8 C). Für die  $\beta$ -MHC-Expressionslevel waren dagegen keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen (s. Abb. 4.8 D). In keiner der hier untersuchten Konstellationen hatte SIL einen signifikanten Effekt auf das Expressionsverhältnis der  $\alpha$ - und  $\beta$ -MHC (s. Abb. 4.8 C, D). Als weiteres Kennzeichen des kardialen *Remodelings* ließ sich in  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Herzen, verglichen mit gesunden WT-Herzen, eine deutliche Herunterregulation der SERCA2-mRNA feststellen. Durch die SIL-Behandlung war es allerdings nicht möglich, die herzspezifische SERCA2-Expression in den  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Herzen zu rekonstituieren (s. Abb. 4.8 E).



**Abb. 4.8: Untersuchungen zur Genexpression verschiedener Hypertrophiemarker.**

Quantitative Expressionsanalyse verschiedener Hypertrophiemarker von 120 Tage alten WT- und  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäusen  $\pm$  SIL. (A) Atriales natriuretisches Peptid (ANP), (B) *Brain natriuretic peptide* (BNP), (C)  $\alpha$ -Isoform der schweren Myosinkette ( $\alpha$ -MHC), (D)  $\beta$ -Isoform der schweren Myosinkette ( $\beta$ -MHC), (E) herzspezifische sarkoplasmatische und endoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2), (F) Calcineurin A (CnA). Verwendete Tierzahlen: Placebo-behandelt: n=5 (WT) bzw. n=9 ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>), SIL-behandelt: n=8 (WT) bzw. n=11 ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>). HPRT diente als Referenzgen. \*bedeutet einen signifikanten Unterschied innerhalb der Genotypen, # und § vergleichen Tiere  $\pm$  SIL zwischen den Genotypen (\*p<0,05; §p<0,05 §§p<0,01; §§§p<0,001; ##p<0,01; ###p<0,001).

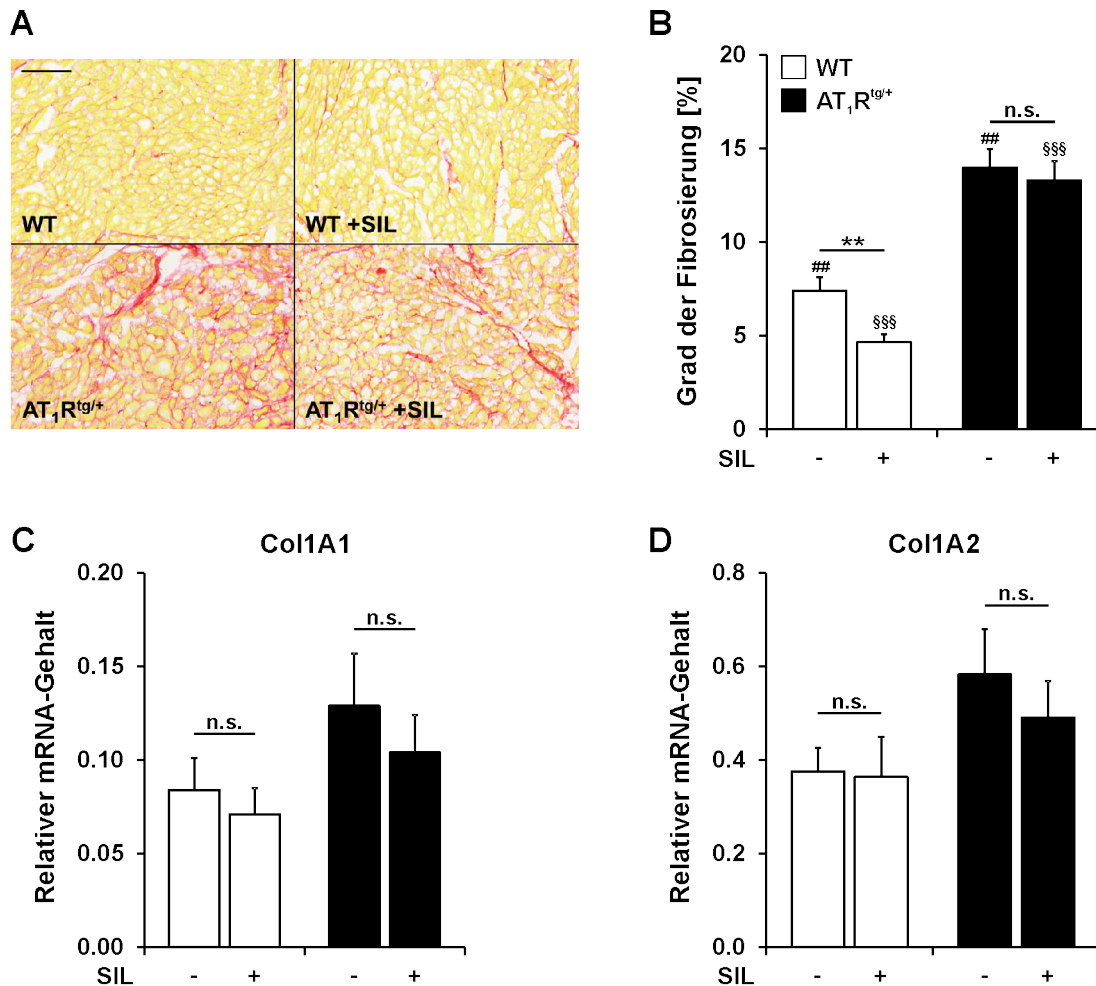
Der einzige signifikante SIL-Effekt auf transkriptioneller Ebene war eine Reduktion der Expression der Phosphatase CnA in Herzen von behandelten  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren, auch wenn per se die Expression von CnA durch die amplifizierte Ang II/AT<sub>1</sub>R-Signaltransduktion insgesamt nicht erhöht war (s. Abb. 4.8 F). SIL war in früheren Studien in der Lage, in hypertrophen Herzen die CnA-Proteinlevel zu senken, was als Indiz für eine Regulation des fetalen Genprogrammes gewertet wurde (Nagayama et al. 2009).

**4.2.2 Einfluss von Sildenafil auf die kardiale Fibrosierung**

In vorangegangenen Arbeiten wurde insbesondere über ausgeprägte antifibrotische Effekte einer SIL-Therapie berichtet. So konnten Patrucco et al. zeigen, dass die Gabe von SIL eine Ang II-induzierte Myokardfibrosierung nur bei intaktem cGMP/cGKI-System reduzieren kann. Dies führte zu der Annahme, dass möglicherweise die cGKI in Fibroblasten bzw. Myofibroblasten diese Effekte vermittelt. Insbesondere da die PDE5, als primäres Arzneistofftarget von SIL, abundant in Fibroblasten/Myofibroblasten exprimiert wird (Patrucco et al. 2014). In weiteren Studien zeigte SIL neben einer Reduktion der Myokardfibrosierung zusätzliche hemmende Effekte auf das Kardiomyozytenwachstum. Die Autoren dieser Studien schrieben beide Effekte der kardiomyozytären cGKI bzw. PDE5 zu (Takimoto et al. 2005, Westermann et al. 2012).  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse zeigen massive fibrotische Einlagerungen, obwohl der primäre Stimulus für den progressiven Herzphänotyp in der amplifizierten Ang II-Signaltransduktion im Kardiomyozyt begründet ist (Paradis et al. 2000). Fibroblasten sind hierbei nicht durch eine exogene Ang II-Zufuhr betroffen. Möglicherweise nehmen sie den Platz von abgestorbenen Kardiomyozyten ein oder werden durch *Crosstalk* mit den Herzmuskelzellen in ihrer Proliferation bzw. der Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen beeinflusst. Auf das Myozytenwachstum von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäusen war kein hemmender Einfluss von SIL erkennbar (s. Abb. 4.7 C). Ob der PDE5-Hemmstoff seine antifibrotische Wirkung auch in diesem speziellen Hypertrophiemodell ausübt, wurde in Abb. 4.9 untersucht.

Zur Visualisierung und Quantifizierung der myokardialen Fibrose wurden erneut Sirius-Rot Färbungen angefertigt (s. Abb. 4.9 A). Die histologischen Färbungen im Bereich des Papillarmuskels und die Quantifizierung der fibrotischen Areale zeigen eindeutig, dass der Anteil des fibrotischen Gewebes von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäusen durch SIL nicht reduziert werden konnte (Placebo 13,99  $\pm$  0,98%; SIL 13,29  $\pm$  1,04%). Erstaunlicherweise war dagegen eine leichte, aber signifikante Reduktion des fibrotischen Gewebsanteils in den WT- Herzen durch die SIL-Behandlung zu beobachten (Placebo 7,41  $\pm$  0,7%; SIL 4,66  $\pm$  0,41%,

(s. Abb. 4.9 B). Die histologischen Befunde zum Ausmaß der Fibrosierung wurden durch Expressionsanalysen der Kollagen-Isoformen Col1A1 und Col1A2 auf mRNA-Ebene ergänzt (s. Abb. 4.9 C, D). Weder in den WT- noch in den  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Herzlysaten vermochte SIL die Kollagenmenge zu verringern.

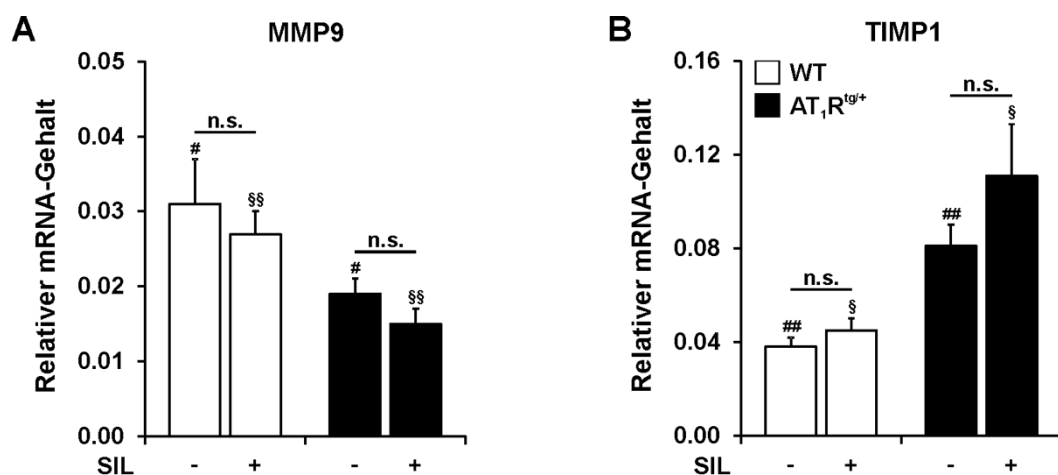


**Abb. 4.9: Keine Reduktion der kardialen Fibrosierung durch SIL.**

(A) Repräsentative Aufnahmen (MIRAXScan-System, Zeiss) von Sirius-Rot gefärbten Kryoschnitten im Bereich des Papillarmuskels 120 Tage alter Tiere beider Genotypen  $\pm$  SIL. (B) Ausmaß der fibrotischen Gewebsanteile (rot) im Vergleich zu nicht betroffenen Arealen (gelb) nach Quantifizierung mittels GSA-Imager Software von n=6 (WT Placebo-behandelt) bzw. n=9 (WT+SIL) und je n=8 ( $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+} \pm$  SIL) Tieren. # und § verdeutlichen signifikante Unterschiede im Fibrosierungsgrad zwischen den Genotypen (## p<0,01; §§§ p<0,001), \*\*: SIL zeigte nur einen antifibrotischen Effekt in den WT-Hezen (\*\*p<0,01). (C) Quantitative mRNA-Analysen der Fibrosemarker Kollagen-Typ 1A1 (Col1A1) und (D) Kollagen-Typ 1A2 (Col1A2) ergaben keine signifikanten Änderungen für die hier untersuchten Konditionen nach Normierung auf HPRT in n=5-11 Herzen zwischen den Genotypen  $\pm$  SIL. Der Maßstabsbalken in (A) entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Die Sirius-Rot Färbung wurde in Zusammenarbeit mit Verena Schöttle im Rahmen eines Diplomarbeitprojektes angefertigt.

Durch die Histologie wurden die Befunde von Paradis et al. bezüglich der massiven Myokardfibrosierung eindeutig reproduziert. Jedoch waren die Kollagenmengen in den Gesamtherzlysaten der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere unabhängig von der pharmakologischen Behandlung nicht signifikant erhöht (s. Abb. 4.9 C, D). Dies war insofern überraschend, da die mRNA typischer Fibrosemarker in hypertrophen Zuständen generell verstärkt gebildet wird (Villarreal and Dillmann 1992). Diese Diskrepanz könnte darauf zurückzuführen sein,

dass in diesem genetischen Modell die Kollagensynthese zu einem früheren Zeitpunkt verstärkt abläuft, oder durch das Absterben von Kardiomyozyten langsam und kontinuierlich Fibroblasten bzw. Extrazellulärmatrix substituiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Kollagenumsatz bzw. die Umgestaltung der Extrazellulärmatrix aufgrund einer Imbalance zwischen Matrix-degradierenden Metalloproteinasen (MMPs) und deren gewebsspezifische Inhibitoren (TIMPs) verändert ist (Mishra et al. 2013). Tatsächlich zeigten sich Unterschiede im Expressionsprofil der mRNA von MMP9 und TIMP1 in Gesamtherzlysaten von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren (s. Abb. 4.10). So war eine signifikante Abnahme der mRNA-Menge der ECM-degradierenden MMP9 in Herzen von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren ( $0,019 \pm 0,002$ ) im Vergleich zu WT-Herzen ( $0,031 \pm 0,006$ ) erkennbar (s. Abb. 4.10 A). Im Gegensatz dazu war der kardiale mRNA-Gehalt von TIMP1 in den transgenen Tieren ( $0,081 \pm 0,009$ ) signifikant gegenüber den WT-Tieren ( $0,038 \pm 0,004$ ) erhöht (s. Abb. 4.10 B). Diese Hinweise auf einen veränderten Kollagen-Turnover könnten die Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen im  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mausmodell erklären (s. Abb. 4.9 A, B). In Übereinstimmung mit den histologischen Befunden waren die Expressionsänderungen von MMP9 und TIMP1 ebenfalls SIL-unabhängig.



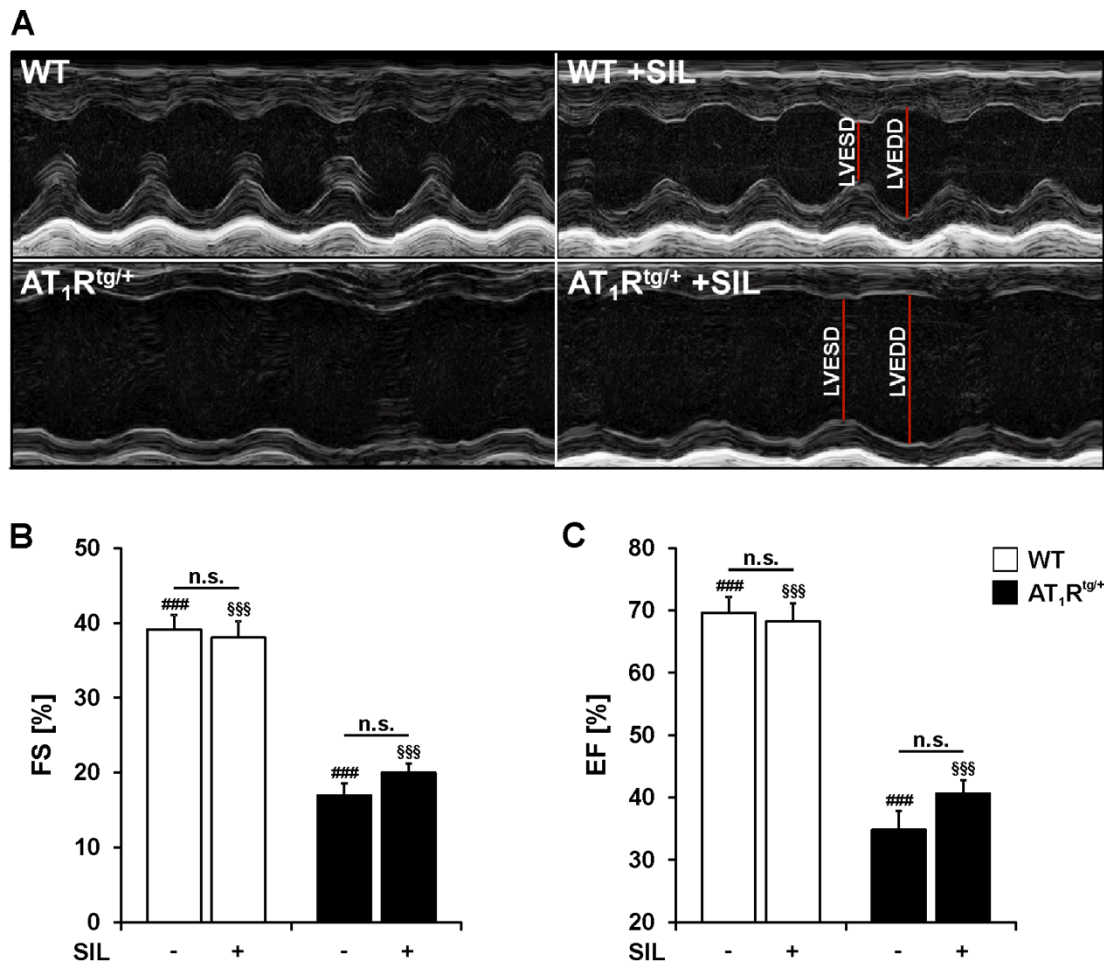
**Abb. 4.10: Expressionsanalyse von Faktoren des ECM-Umbaus.**

(A) Signifikant erniedrigte Expression von MMP9, sowie (B) erhöhte Werte für TIMP1 in Herzen von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren (n=8) verglichen mit WT-Wurfgeschwistern (n=6) unabhängig von SIL, veranschaulicht durch # und § (<sup>#</sup>p<0,05; <sup>##</sup>p<0,01; <sup>§</sup>p<0,05; <sup>§§</sup>p<0,01). Innerhalb der betrachteten Genotypen zeigte SIL keinen Effekt auf die RNA-Expression. HPRT diente als Referenzgen.

### 4.2.3 Einfluss von Sildenafil auf die Herzfunktion

Mit dem  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mausmodell war es bislang nicht möglich, protektive Effekte von SIL auf das Ausmaß der kardialen Hypertrophie und der Fibrosierung, die in früheren Studien (Takimoto et al. 2005, Westermann et al. 2012) beschrieben wurden, zu reproduzieren (s. 4.2.1 und 4.2.2). Da SIL in verschiedenen experimentell erzeugten Herzerkrankungen in der Lage war, die Pumpfunktion zu verbessern oder gar wieder herzustellen (Takimoto et al. 2005, Adamo et al. 2010), wurden zusätzlich echokardiographische Messungen zur Evaluation der Herzfunktion durchgeführt (s. Abb. 4.11). Entgegen der allgemeinen Auffassung, dass NO/cGMP sowohl die basale als auch die Katecholamin-stimulierte

Kontraktilität auf Kardiomyozytenebene herabsetzen kann (Brady et al. 1993, Borlaug et al. 2005), gibt es Studien, die sogar einen positiv inotropen Effekt für SIL in hypertrophierten Herzen beschreiben (Nagendran et al. 2007). Dies ist möglicherweise einer Kompartimentierung der PDE5 oder einem *Crosstalk* zwischen cGMP und cAMP und der Aktivierung der PKA geschuldet (Vila-Petroff et al. 1999, Takimoto et al. 2007).



**Abb. 4.11: SIL führt nicht zu einer Wiederherstellung der Herzfunktion.**

(A) Repräsentative Ausschnitte von M-Mode Aufnahmen des linken Ventrikels 120 Tage alter Tiere in der Längsachse zeigen vergrößerte Kammerdimensionen der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Herzen unabhängig von SIL; # und § vergleichen hierbei die unterschiedlichen Genotypen. Die endsystolischen (LVESD) und enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) des linken Ventrikels dienen zur Berechnung des linksventrikulären Pumpvermögens, determiniert durch (B) die Verkürzungsfraction (%FS, *Fractional Shortening*) und (C) die Auswurfraction (%EF, *Ejection Fraction*) in n=5 (WT ± SIL) und n=11 ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup> Placebo), bzw. n=9 ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup> SIL) Tieren (###p<0,001; §§§p<0,001).

Durch die Darstellung der echokardiographischen Messungen im M-Mode ist der dilatative Phänotyp der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse anhand der ausgedünnten Ventrikelwände und des insgesamt vergrößerten Kammerdurchmessers erneut erkennbar (s. Abb. 4.11 A). Zudem ist die Differenz zwischen endsystolischem (LVESD) und enddiastolischem Durchmesser (LVEDD) des linken Ventrikels gering, was eine stark verminderte Kontraktionsfähigkeit der Herzen von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>Tieren impliziert, denn diese Parameter sind entscheidende Faktoren für die Berechnung der Verkürzungs- (%FS, *Fractional Shortening*) und der Auswurfraction (%EF, *Ejection Fraction*). Im Vergleich zu den WT-Herzen, die mit Werten

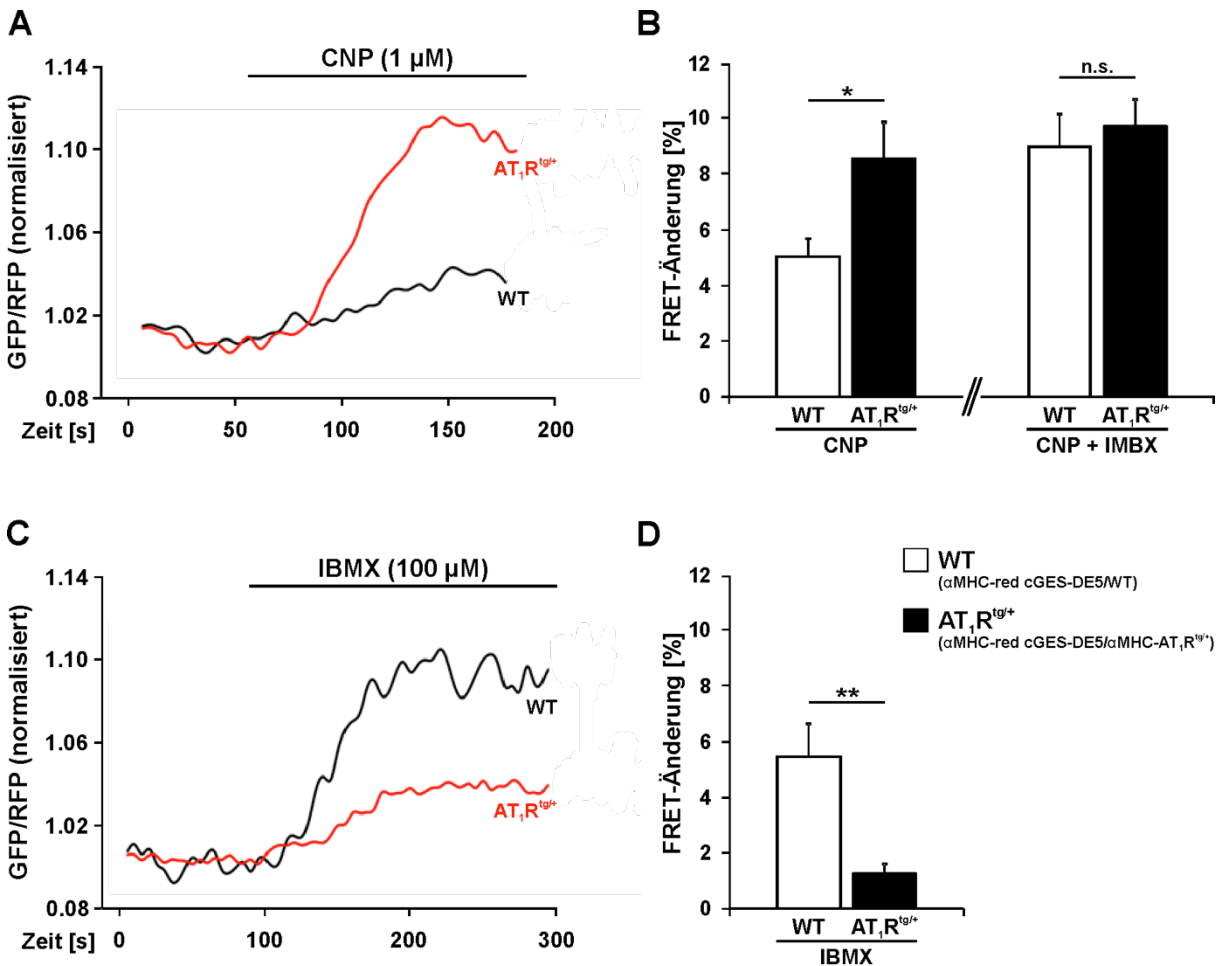
von  $39,13 \pm 1,96\%$ , sowie  $69,64 \pm 2,56\%$  für die Verkürzungsfraction bzw. Auswurfraction im Normbereich liegen, war in den  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren eine deutliche Verschlechterung der Herzfunktion zu beobachten (%FS:  $16,97 \pm 1,57\%$ , %EF:  $34,86 \pm 2,99\%$ ). Die verminderte Pumpfunktion konnte gleichwohl nicht durch SIL rekonstituiert werden (s. Abb. 4.11 B, C). Zwar war ein geringer SIL-Effekt in den transgenen Tieren zu beobachten, da die Werte für die Verkürzungsfraction ( $20,01 \pm 1,19\%$ ) und die Auswurfraction ( $40,69 \pm 2,11\%$ ) leicht anstiegen, diese marginale Verbesserung erreichte jedoch keine statistische Signifikanz im Vergleich zur Placebo-Gruppe der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere.

### 4.3 Rolle der PDEs für den kardialen cGMP-Turnover in $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäusen

Die spezifische Überexpression des  $\text{AT}_1\text{R}$  in Kardiomyozyten führt zu einem progressiven Herzphänotyp, charakterisiert durch Hypertrophie, Fibrosierung und massiv verschlechterter Herzfunktion (s. 4.1.1 und 4.1.2; Paradis et al. 2000). Die  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäuse sind zudem völlig insensitiv gegenüber einer 60-tägigen SIL-Therapie. Weder Myozytengröße, Fibrosierung, noch die Herzfunktion waren durch den PDE5-Hemmstoff beeinflussbar (s. 4.2.1-4.2.3), obwohl SIL in Gesamtherzlysaten eine signifikante Erhöhung der cGMP-Spiegel herbeiführte (s. 4.2). Eine Trennung der Zellkompartimente und nachfolgende cGMP-Messung zur exakten Lokalisation des cGMP-Anstiegs mittels ELISA war methodisch nicht möglich. Die initial erhobenen Daten bestätigen aber, dass der cGMP/cGKI-Signalweg ein wichtiger Kompensationsmechanismus bei einer intensivierten Ang II/ $\text{AT}_1\text{R}$ -Signaltransduktion darstellt. So waren die Expression der cGKI und die kardialen cGMP-Spiegel von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäusen unabhängig von der SIL-Behandlung bereits erhöht (s. 4.1.2.). Die gesteigerten kardialen cGMP-Spiegel könnten einerseits auf eine vermehrte Bildung, aber auch auf eine veränderte cGMP-Degradation zurückzuführen sein. Der cGMP-Abbau wird durch PDEs reguliert (Movsesian et al. 2009). Ob die amplifizierte kardiomyozytäre Ang II-Signaltransduktion zu Veränderungen in der Expression oder Aktivität verschiedener PDEs führt, wurde nachfolgend mittels Expressionsanalysen und FRET-Messungen untersucht (s. Abb. 4.12 und Abb. 4.13).

Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ermöglicht eine intrazelluläre Messung von cGMP in intakten, lebenden Zellen. Für diesen Zweck wurden transgene Tiere, die den red cGES-DE5-Biosensor für cGMP in Kardiomyozyten exprimieren, mit  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäusen verpaart (s. 3.1.2). Der Sensor besteht aus einem Donor- (T-Sapphire) und einem Akzeptor-Fluorophor (Dimer2, RFP). Die Bindung von cGMP führt zu einem Anstieg im FRET-Signal und zu einer Farbänderung von grün zu rot. Diese Emissionsänderungen konnten mit unterschiedlichen Filtern detektiert und quantifiziert werden (Gotz et al. 2014). Für die FRET-Messungen wurden frisch isolierte Kardiomyozyten von Doppelmutanten ( $\alpha\text{MHC-red cGES-DE5}/\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ ) und WT-Kontrolltieren, die nur den Sensor tragen ( $\alpha\text{MHC-red cGES-DE5}/\text{WT}$ ), verwendet (s. Abb. 4.12). Die zytosolische cGMP-Konzentration in Kardiomyozyten ist mit 10 nmol/l sehr gering, daher muss für validierte und reproduzierbare

Aussagen eine Prästimulation, z.B. mit CNP, erfolgen (Gotz et al. 2014). Im  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mausmodell wurden keine Veränderungen im Expressionslevel für GC-B, dem Rezeptor für CNP, festgestellt (s. Anhang, Abb. 7.2 B), daher können unterschiedliche cGMP-Spiegel in den verschiedenen Genotypen nicht auf eine CNP-Prästimulation zurückgeführt werden.



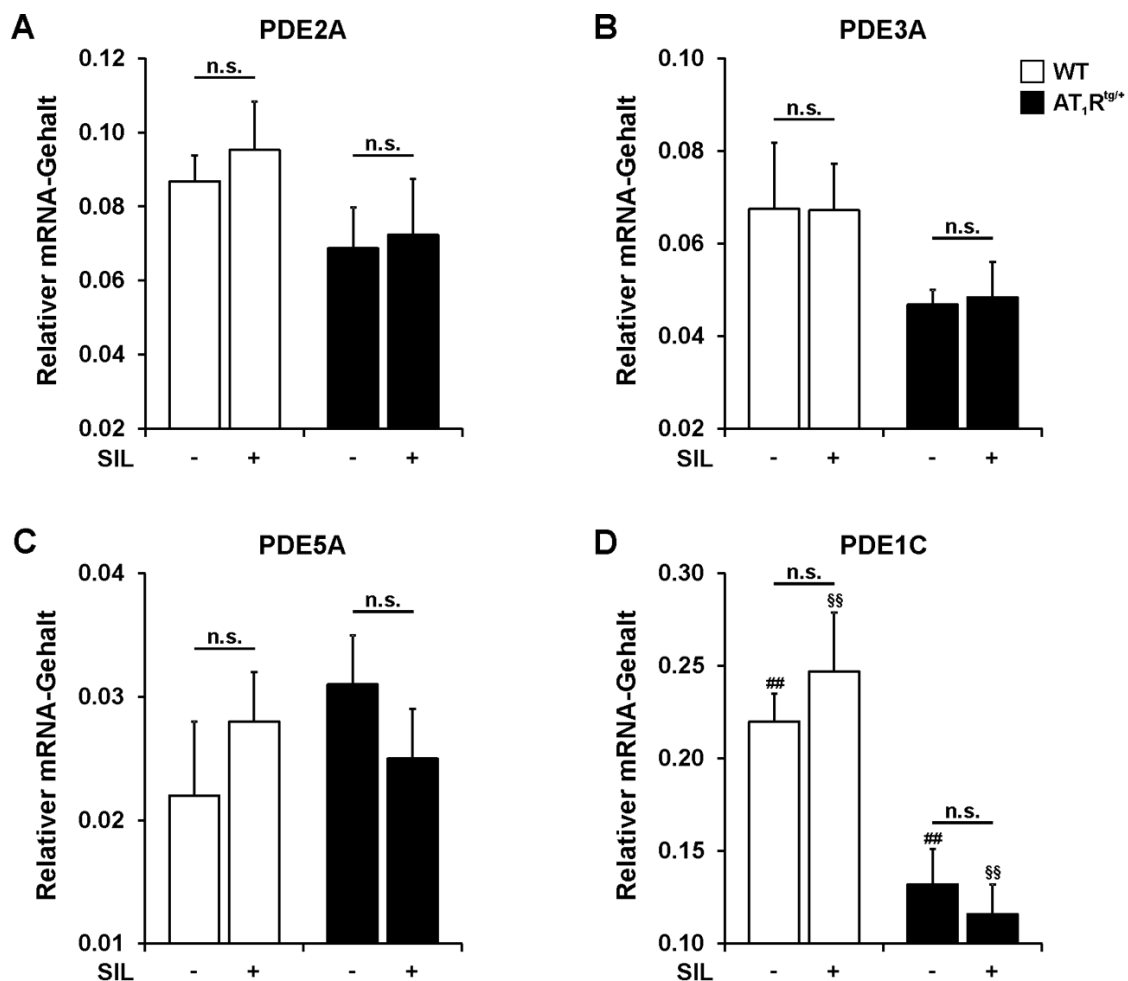
**Abb. 4.12: FRET-Messungen an isolierten Kardiomyozyten.**

(A) Repräsentative FRET-Aufnahmen einer cGMP-Messung nach CNP-Prästimulation in isolierten Kardiomyozyten nach Normalisierung des GFP zu RFP-Signals zeigen einen signifikanten Anstieg der cGMP-Konzentration in Myozyten von AT<sub>1</sub>R-transgenen, sensortragenden Tieren ( $\alpha$ MHC-red cGES-DE5/ $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>, rot) verglichen mit Myozyten von Tieren ohne AT<sub>1</sub>R-Überexpression ( $\alpha$ MHC-red cGES-DE5/WT, schwarz). (B) Statistische Auswertung der Mittelwerte von Messungen an n=9 WT- bzw. n=7  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Myozyten. Eine zusätzliche Stimulation mit dem unspezifischen PDE-Hemmer IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) bewirkte einen Angleich der cGMP-Spiegel in WT-Kardiomyozyten auf das Niveau von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Zellen. (C) Repräsentative Spuren und (D) Quantifizierung der prozentualen Änderung des FRET Signals nach alleiniger Hemmung sämtlicher PDEs mit IBMX. Das Ausmaß der FRET-Änderung deutet auf signifikant höhere cGMP-Spiegel in den WT-Myozyten (n=6) verglichen mit  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Myozyten (n=5) hin. (\*p<0,05; \*\*p<0,01). Die FRET-Messungen wurden von Hariharan Subramanian und Viacheslav Nikolaev durchgeführt (Experimentelle Herz-Kreislaufforschung, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Die primären Ergebnisse der cGMP-Messung mittels ELISA konnten erwartungsgemäß durch die FRET-Messung bestätigt werden. Kardiomyozyten von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren zeigten im Vergleich zu WT-Myozyten nach CNP-Stimulation eine ca. 40% gesteigerte Bildung von cGMP (s. Abb. 4.12 A und linker Teil von Abb. 4.12 B). Interessanterweise



konnten die cGMP-Konzentrationen durch anschließende Zugabe von 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) als unspezifischen PDE-Hemmstoff vor allem in den WT-Myozyten weiter erhöht werden. Ein weiterer Anstieg der cGMP-Spiegel in Kardiomyozyten aus  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Herzen mit IBMX war dagegen nur schwach ausgeprägt (s. Abb. 4.12 B, rechter Teil). Die basal signifikant unterschiedlichen cGMP-Spiegel wurden durch diesen unspezifischen PDE-Hemmstoff somit nivelliert, was auf eine annähernd maximale Hemmung verschiedener PDEs in den hypertrophen Herzen von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren bereits unter unstimulierten Bedingungen hindeutet. Eine alleinige Stimulation der Kardiomyozyten mit IBMX ohne CNP-Prästimulation resultierte in einem steilen Anstieg der cGMP-Konzentration in Kardiomyozyten aus WT-Tieren, während für die cGMP-Spiegel von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Myozyten nur ein moderater Anstieg zu verzeichnen war (Abb. 4.12 C). Dementsprechend zeigt die statistische Auswertung eine annähernd vierfach erhöhte FRET-Änderung in WT-Myozyten nach IBMX-Stimulation (Abb. 4.12 D). Die FRET-Messungen implizieren, dass PDEs in der Regulation der cGMP-Spiegel im  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Hypertrophie-modell beteiligt sind, und durch das progressive Herzwachstum Änderungen in der Aktivität und/oder der Expression verschiedener PDEs induziert werden. Um diese These weiter zu verfolgen, wurden nachfolgend quantitative mRNA-Analysen von cGMP-sensitiven bzw. cGMP-hydrolysierenden PDEs in Gesamtherzlysaten angefertigt (s. Abb. 4.13).



### **Abb. 4.13: Expressionsanalyse kardialer PDEs.**

Quantitative mRNA-Expressionsanalysen mittels qRT-PCR zeigten moderate, nicht signifikant veränderte mRNA-Mengen nach Normierung auf HPRT als Haushaltsgen für (A) PDE2A, (B) PDE3A und (C) PDE5A. (D) Statistisch signifikant reduzierte mRNA-Level für PDE1C in Gesamtherzlysaten von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren. SIL führte in keinem Fall zu relevanten Änderungen in der Höhe der PDE-mRNA-Expression. Verwendete Tierzahlen: Placebo-behandelt: n=5 (WT), n=9 ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>), SIL: n=8 (WT), n=11 ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>). # und § verdeutlichen signifikante Unterschiede der mRNA-Mengen zwischen den Genotypen (<sup>##</sup>p<0,01; <sup>§§</sup>p<0,01).

Sowohl die mRNA-Level von PDE2A (s. Abb. 4.13 A) als auch von PDE3A (s. Abb. 4.13 B), sind in Gesamtherzlysaten von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren im Vergleich zu WT-Lysaten leicht erniedrigt, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Die SIL-Behandlung führte zu keinen Veränderungen in der Expressionshöhe von PDE2A und PDE3A. Geringere kardiale mRNA-Mengen waren für PDE5, dem Haupteffektor von SIL, zu ermitteln. Die Gabe des PDE5-Hemmstoffes wiederum änderte nichts an der PDE5-Expression (s. Abb. 4.13 C). Der mengenmäßig größte Anteil aller untersuchten mRNA-Transkripte für cGMP-hydrolysierende PDE-Isoformen im Herz wurde für die PDE1C ermittelt (s. Abb. 4.13 D). Interessanterweise konnte eine signifikante Abnahme der Transkripte für die cGMP- und cAMP-hydrolysierende PDE1C in Herzen von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren ( $0,132 \pm 0,019$ ) verglichen mit Herzen von WT-Tieren ( $0,22 \pm 0,015$ ) detektiert werden. Dieser signifikante Unterschied blieb auch nach der SIL-Gabe bestehen bzw. vergrößerte sich noch etwas (s. Abb. 4.13 D).

Die bislang in der vorliegenden Arbeit mit dem  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Hypertrophiemodell erhobenen Daten können folgendermaßen zusammengefasst werden: (1) Die myozyten-spezifische Überexpression des humanen AT<sub>1</sub>R führt unabhängig vom Blutdruck und endogenen Ang II-Spiegeln zu kardialer Dysfunktion. (2) Sowohl cGKI-Proteinlevel als auch kardiale cGMP-Spiegel sind kompensatorisch hochreguliert. (3) Eine SIL-Therapie zeigte keinen Benefit bezüglich Myozytenwachstum, Fibrosierung und Herzfunktion. (4) Der kardiale Phänotyp von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäusen ist mit Änderungen in der kardialen Ausstattung und/oder Aktivität unterschiedlicher PDEs verknüpft.

Die Hochregulation der cGKI ist zweifelsohne einer der interessantesten Befunde in diesem Krankheitsmodell und unterstreicht nochmals die Wichtigkeit dieses gegenregulierenden Signalwegs bei einer Ang II-induzierten Herzhypertrophie. Bislang sind in Kardiomyozyten nur wenige Interaktionspartner der cGKI bekannt (s. 1.2.4), sodass die Identifikation neuer Substrate insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung und Prävention hypertropher Herzerkrankungen von enormer Wichtigkeit ist. Mit CRP4 wurde kürzlich ein neuer Effektor der cGKI in Spinalganglien und glatten Muskelzellen beschrieben (Huber et al. 2000, Schmidtko et al. 2008). CRP4 zeigt eine hohe Homologie zu CRP3/MLP, Fehlfunktionen in CRP3/MLP münden in unterschiedlichen Ausprägungen hypertropher oder dilatativer Kardiomyopathien (Knoll et al. 2002). Nachfolgend soll deshalb die Rolle von kardialem CRP4 und ein mögliches Zusammenspiel mit der cGKI im gesunden und hypertrophen Herzmuskel erörtert werden.

## 4.4 Rolle des kardialen CRP4 in unterschiedlichen Hypertrophie-Modellen

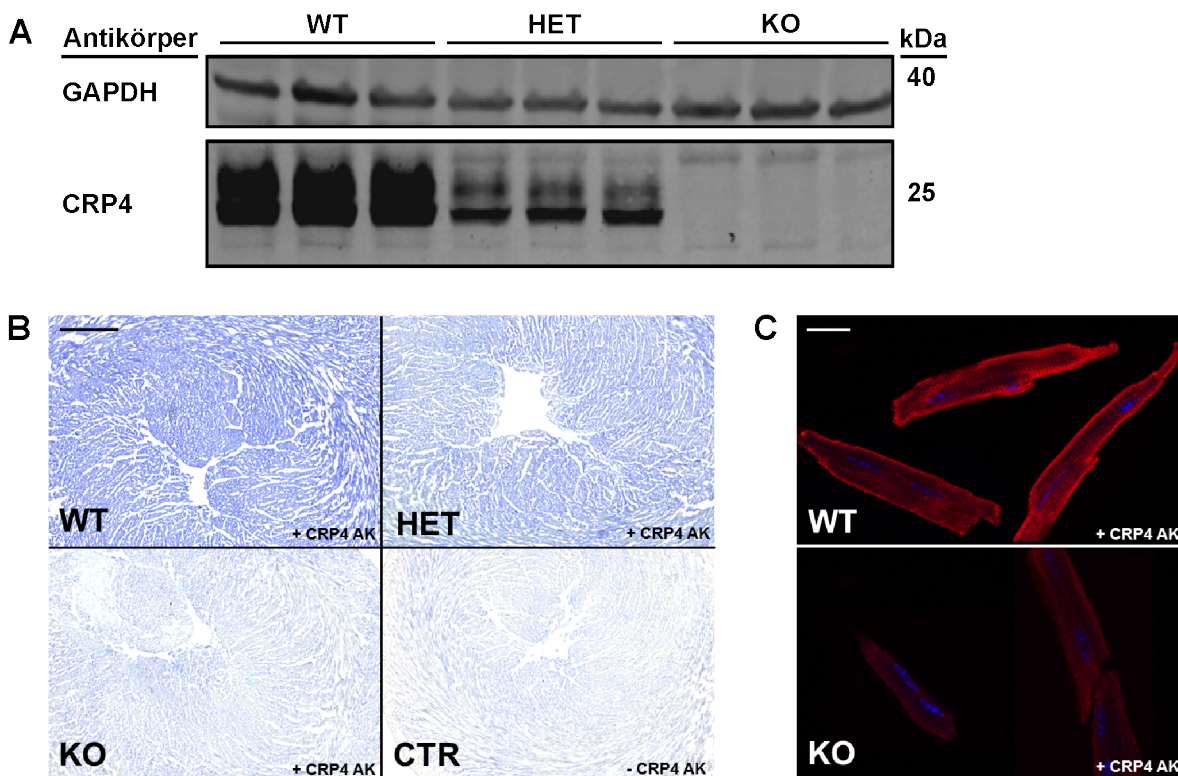
Die CRP4-Knockout Mauslinie wurde im Arbeitskreis Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie erfolgreich generiert und etabliert (Schmidt et al. 2008). Die Erzeugung von CRP4-WT (Genotyp: CRP4<sup>+/+</sup>) und CRP4-KO (Genotyp: CRP4<sup>-/-</sup>) Wurfgeschwister für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente erfolgte durch Verpaarung von heterozygoten Elterntieren (Genotyp: CRP4<sup>+/-</sup> s. 3.1.2). Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen in der Nachkommenschaft entsprach den Erwartungen. Phänotypisch zeigten die CRP4-defizienten Nachkommen keine Auffälligkeiten und waren zudem fertil. Die Deletion von CRP4 scheint somit weder einen Einfluss auf die Embryogenese noch auf offensichtliche physiologische Funktionen im *adulten* Organismus zu haben. Die Lebenserwartung von CRP4-KO Mäusen und deren WT-Wurfgeschwistertieren war ebenso identisch (Daten nicht gezeigt). Das CRP4-Mausmodell ist damit gut geeignet, um die pathophysiologischen Funktionen des kardialen CRP4-Proteins im Ganztiermodell zu untersuchen. Funktionale Unterschiede zwischen den Genotypen sollten sich somit explizit auf das Fehlen von CRP4 zurückführen lassen.

In dieser Dissertationsarbeit wurde primär die Funktion von kardialem CRP4 untersucht. Hierbei sollten Erkenntnisse über CRP4 im gesunden und hypertrophen Myokard gewonnen werden. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, inwiefern CRP4 auch im Herzmuskel ein Substrat der cGKI darstellt. Da der cGKI protektive Effekte bei Ang II-induzierter Herzhypertrophie zugeschrieben werden (Frantz et al. 2013), wurde untersucht ob CRP4 als möglicher cGKI-Interaktor ebenso in dieses neurohumoral-induzierte Herzmuskelwachstum involviert ist. Zunächst wurde die Auswirkung einer CRP4-Deletion auf das hypertrophe Wachstum des Herzmuskels im Ganztiermodell nach Ang II-Infusion untersucht. Um etwaige hormonelle Einflüsse auszuschließen, wurden diese *in vivo*-Versuche nur mit männlichen Tieren durchgeführt, deren Alter 10-15 Wochen betrug.

### 4.4.1 Expression von CRP4 im Herzmuskel

Mittels unterschiedlicher Methoden war CRP4 im Herzmuskel von adulten Mäusen nachweisbar (s. Abb. 4.14). Der aus Gesamtherzlysaten angefertigte Western Blot (Abb. 4.14 A) zeigt im CRP4-WT eine hohe Expression des LIM-Proteins. Die bei einem erwarteten Molekulargewicht von ca. 23 kDa sichtbare Proteinbande war in den Herzlysaten von heterozygoten Tieren deutlich reduziert und in CRP4-KO Herzen nicht detektierbar. Die Änderung der CRP4-Proteinabundanz in den Herzen heterozygoter Tiere spricht für einen Gendosiseffekt, der auch in Alkalischer Phosphatase (AP)-Färbungen in Feinschnitten des Myokards deutlich wurde (Abb. 4.14 B). Diese immunhistochemischen Nachweise verdeutlichen außerdem die hohe Spezifität der hier verwendeten CRP4-Antikörper. Zusätzlich konnte nach Vereinzeln der Zellen und nachfolgenden Immunfluoreszenz-Färbungen die genaue Lokalisation von CRP4 in den Kardiomyozyten ermittelt werden (Abb. 4.14 C). Große Mengen des LIM-Proteins finden sich am Membranbereich der

Herzmuskelzellen und entlang der Z-Scheiben, die das Sarkomer als kontraktile Einheit zu beiden Seiten begrenzen und die Aktin-Filamente verankern (Luther 2009).



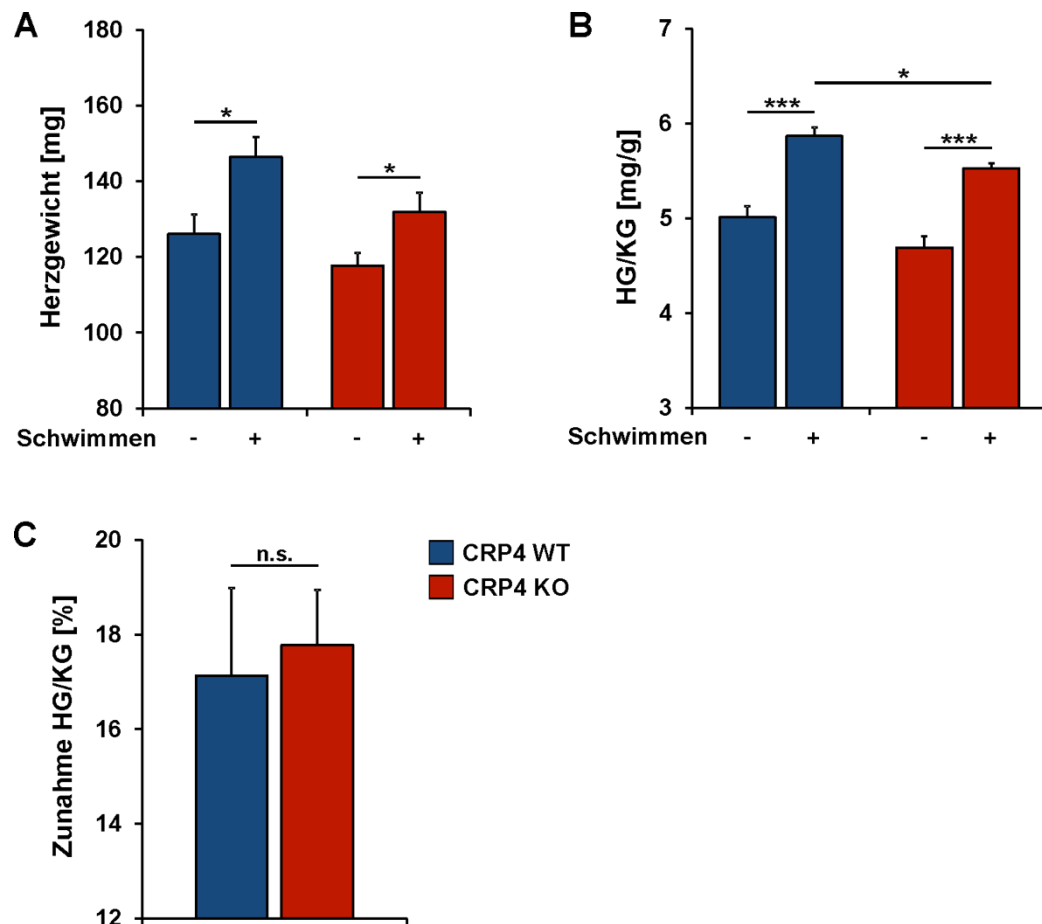
**Abb. 4.14: Nachweis der CRP4-Expression im Herzmuskel.**

(A) Western Blot zur spezifischen Detektion von CRP4 in Gesamtherzlysaten von WT-, HET- und KO-Mäusen. Die Spezifität des CRP4-Antikörpers wird durch das Fehlen einer Proteinbande in den Herzlysaten der CRP4-KO Tiere deutlich. Der GAPDH-Nachweis (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) bestätigt eine gleichmäßige Beladung des Gels. (B) Lichtmikroskopische Aufnahme immunhistochemischer CRP4-Färbungen an 8 µm dicken Gefrierschnitten. Die blaue Farbe entsteht durch das Umsetzen des AP-Substrats und indiziert die Expression von CRP4. Die Intensität der Färbung im CRP4-KO Myokard entspricht der Kontrolle (CTR) ohne Primärantikörper. (C) Immunfluoreszenz-Färbungen zur Lokalisation von CRP4 (rot) in isolierten Kardiomyozyten. Die mit Hoechst gegengefärbten Zellkerne erscheinen blau. Die Maßstabsbalken entsprechen 500 µm (B) bzw. 20 µm (C).

#### 4.4.2 CRP4 bei physiologischem Herzmuskelwachstum nach körperlichem Ausdauertraining

Ein reversibles, physiologisches Wachstum des Herzmuskels ist typischerweise bei Ausdauersportlern zu finden und wird als wichtiger Adaptationsmechanismus betrachtet. Die exakten Signalwege, die eine physiologische Hypertrophie von einer maladaptiven Hypertrophie abgrenzen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt (Dorn 2007). Es gibt sogar Hinweise, dass das lokale RAAS auch bei physischer Belastung für die Entstehung einer linksventrikulären Herzhypertrophie von Bedeutung ist (Oliveira et al. 2009). Da die Funktion von CRP4 im Herzmuskel bis dato völlig ungeklärt ist, wurde zunächst untersucht, ob sich die Ablation des Proteins schon bei körperlicher Anstrengung negativ auf das Herzmuskelwachstum auswirkt. Diese physiologische Herzhypertrophie wurde durch

körperliche Belastung mittels Schwimmen induziert (s. 3.3.2). Hierzu durchliefen die Tiere eine 9-tägige Trainingsphase, in der die Schwimmzeit von Tag zu Tag erhöht wurde. Ab dem 10. bis zum 30. Tag schwammen die Tiere zweimal täglich 90 Minuten lang. Am Ende des Versuchs wurde das Ausmaß des physiologischen Herzwachstums im Vergleich zu Kontrolltieren, die kein Schwimmtraining absolviert hatten, bestimmt (s. Abb. 4.15).



**Abb. 4.15: Ausmaß der physiologischen Herzhypertrophie nach 4-wöchigem Ausdauertraining.** Körperliche Anstrengung durch Schwimmen führt sowohl bei CRP4-WT als auch bei CRP4-KO Tieren zu einem signifikanten Anstieg des (A) absoluten Herzgewichts und (B) des Verhältnisses des Herzgewichts (HG) zum Körpergewicht (KG). (C) Die prozentualen Änderungen im HG/KG-Verhältnis im Bezug zu nicht-schwimmenden Tieren bestätigt, dass es keinen signifikanten Unterschied im Ausmaß der physiologischen Herzhypertrophie zwischen den Genotypen gibt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von n=5 Tieren pro Genotyp und Kondition (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001).

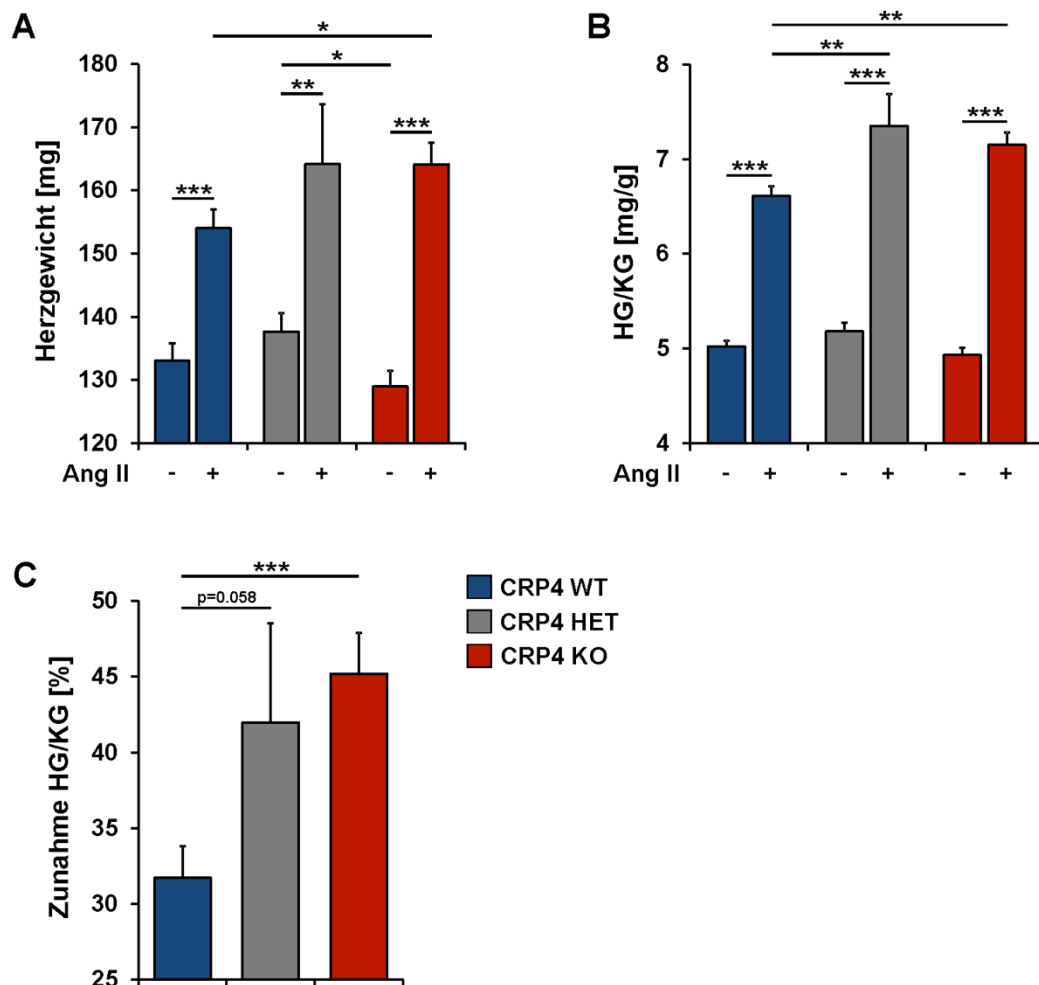
Das Ausdauertraining führte in beiden Genotypen zu einem signifikanten Anstieg der Herzmasse, wobei die mittleren Herzgewichte der CRP4-KO Tiere mit  $131,98 \pm 4,997$  mg etwas niedriger waren als die der Wildtypen ( $146,50 \pm 5,124$  mg). Dieser Gewichtsunterschied war auch zwischen den Herzen der CRP4-KO Kontrolltiere ( $117,76 \pm 3,337$  mg) und deren CRP4-WT Geschwistertieren ( $126,08 \pm 5,219$  mg) sichtbar (s. Abb. 4.15 A). Diese Tendenz erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Die Normierung der Herzgewichte auf das Körpergewicht ergab erwartungsgemäß hochsignifikante Unterschiede zwischen den schwimmenden und den nicht-schwimmenden Tieren der jeweiligen Genotypen (s. Abb. 4.15 B). Für die normierten Mittelwerte der Versuchsgruppen, die eine

physiologische Hypertrophie als Folge der körperlichen Anstrengungen entwickelten, ergaben sich moderate Unterschiede für die HG/KG-Verhältnisse der CRP4-KO Tiere ( $5,53 \pm 0,05$  mg/g) gegenüber der Wildtypen ( $5,87 \pm 0,09$  mg/g), die knapp das Signifikanzniveau erreichten (Abb. 4.15 B). Als entscheidender Parameter für die Adaptation der Herzen an die körperliche Anstrengung wurde die relative Zunahme des HG/KG-Verhältnisses zwischen schwimmenden und nicht-schwimmenden Tieren innerhalb der Genotypen ermittelt (s. Abb. 4.15 C). Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen CRP4-WT und CRP4-KO Tieren (CRP4-WT:  $17,13 \pm 1,86\%$ ; CRP4-KO:  $17,78 \pm 1,17\%$ ). Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit bereits publizierten Daten überein, die unter Verwendung desselben Schwimmprotokolls erhoben wurden. Hierbei wurde eine durchschnittliche Zunahme der HG/KG-Werte von 16% beschrieben (Kaplan et al. 1994). Insgesamt bestätigen die hier erhobenen Befunde diesen Versuchsansatz als valide Methode zur Induktion der physiologischen Herzhypertrophie.

### 4.4.3 Rolle von CRP4 in Angiotensin II-induzierter kardialer Hypertrophie

Bei der physiologischen Adaptation des Herzmuskels an die körperlichen Belastungen durch das Ausdauertraining ergaben sich für Mäuse mit CRP4-Defizienz keine Auffälligkeiten (s. 4.4.2). Im Folgenden wurde daher die Anpassung der Herzfunktion und Herzgeometrie im Kontext erhöhter Ang II-Plasmaspiegel untersucht (s. Abb. 4.16). Es ist hinreichend bekannt, dass Ang II über verschiedene Mechanismen (s. 1.1.5) krankhafte kardiale Umbauprozesse induziert. Die kontinuierliche Infusion von Ang II über 7 Tage mittels implantierter osmotischer Minipumpen ( $2$  mg/kg/d, s. 3.3.3) führte erwartungsgemäß in allen Genotypen zu einer Herzmuskelhypertrophie. Sowohl die absoluten, als auch die normierten Herzgewichte waren im Vergleich zu den entsprechenden NaCl-behandelten Kontrollgruppen signifikant erhöht (s. Abb. 4.16 A, B). Die Werte für das durchschnittliche Herzgewicht nach Ang II-Stimulation betrugen für CRP4-KO Tiere  $164,10 \pm 3,44$  mg bzw.  $164,18 \pm 9,41$  mg für CRP4-HET Herzen. CRP4-WT Tiere hingegen erreichen nur eine durchschnittliche Herzmasse von  $154,01 \pm 2,94$  mg (s. Abb. 4.16 A). Dabei wurde anhand der etwas kleineren Gruppe an untersuchten heterozygoten Tieren ersichtlich, dass diese keine intermediäre Stellung im Sinne eines Gendosiseffektes einnehmen, wie es anhand der Untersuchungen zur Proteinexpression (s. 4.4.1) zu erwarten war: Trotz einem vorhandenen CRP4-Allel zeigten CRP4-HET Herzen nach Ang II-Stimulation einen annähernd identischen Hypertrophiegrad verglichen mit CRP4-KO Herzen. Bereits die Basalgewichte der CRP4-HET Herzen unterschieden sich signifikant von CRP4-KO Herzen, die sich erneut, auch im Vergleich zu CRP4-WT-Tieren leichter darstellten (s. Abb. 4.16 A). Durch die Normierung auf das Körpergewicht nivellierten sich die Unterschiede zwischen den Genotypen in den NaCl-behandelten Gruppen. Auch die HG/KG-Verhältnisse der Ang II-behandelten Kohorten lagen jeweils signifikant über denen der NaCl-infundierten Kontrolltiere (s. Abb. 4.16 B). Des Weiteren wurden in dieser Darstellung die Unterschiede zwischen den Ang II-behandelten Genotypen besonders deutlich. Im Vergleich zu CRP4-WT Tieren ( $6,61 \pm 0,10$  mg/g) waren die normierten HG/KG-Werte für CRP4-KO ( $7,15 \pm 0,10$  mg/g) und CRP4-HET Tiere ( $7,35 \pm 0,34$  mg/g) signifikant erhöht (s. Abb. 4.16 B). Aufgrund der leicht erniedrigten normierten Basalwerte der CRP4-KO Tiere, wurden die HG/KG-Werte der Ang II-behandelten Kohorten

zusätzlich auf die HG/KG-Mittelwerte des jeweiligen Genotyps unter Basalbedingungen bezogen und als prozentuale Änderung dargestellt (s. Abb. 4.16 C). Diese Darstellung verdeutlicht das enorme Myokardwachstum in CRP4-defizienten Tieren. Die prozentuale Zunahme der HG/KG-Verhältnisse betrug für CRP4-KO Tiere  $45,19 \pm 2,70\%$ , für CRP4-HET Tiere  $41,19 \pm 6,52\%$ , sowie  $31,72 \pm 2,06\%$  für CRP4-WT Tiere.

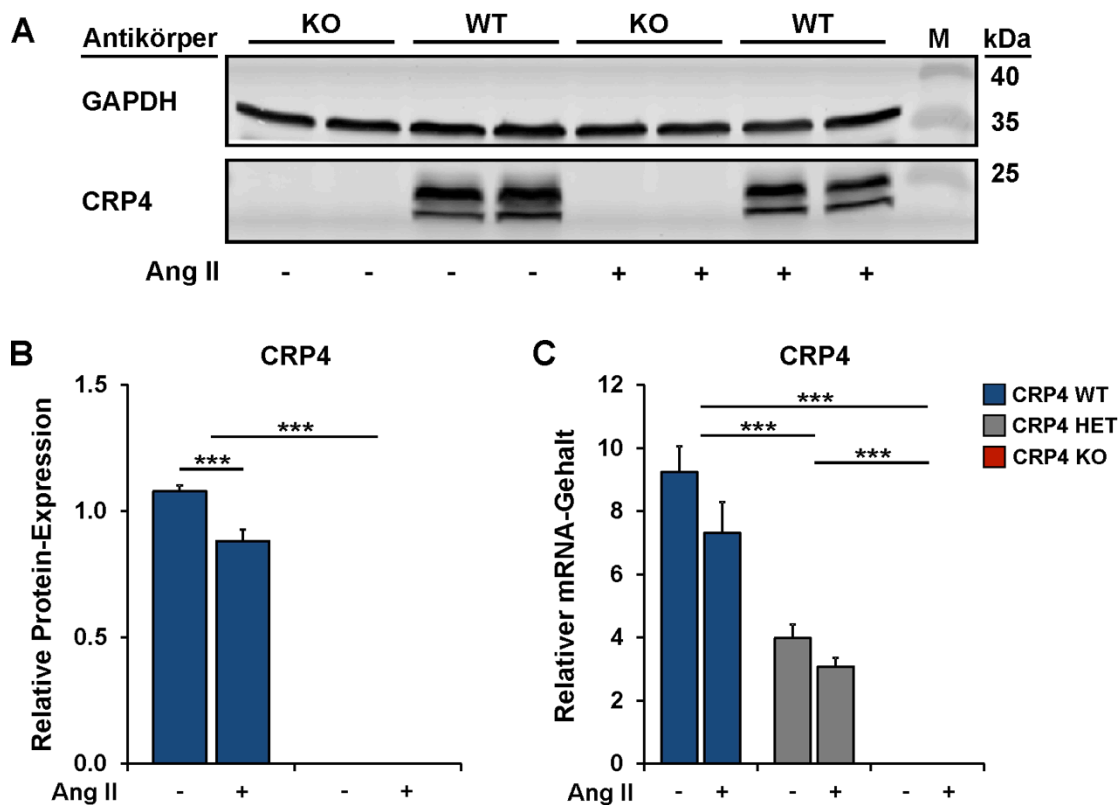


**Abb. 4.16: Erhöhtes Hypertrophieausmaß in CRP4-defizienten Herzen nach Ang II-Infusion.**

Die Behandlung mit Ang II resultierte in allen drei Genotypen in einer signifikanten Zunahme des (A) absoluten Herzgewichts, (B) des auf das Körpergewicht normierten Herzgewichts (HG/KG) sowie (C) des prozentualen Anstiegs der HG/KG-Werte verglichen mit einer NaCl-Infusion. Dabei ist das Ausmaß der Hypertrophie in allen Darstellungen in CRP4-KO und CRP4-HET Mäusen ausgeprägter als in CRP4-WT Mäusen. Folgende Tierzahlen wurden verwendet: NaCl: n=28 (WT), n=15 (HET), n=25 (KO); Ang II: n=28 (WT), n=12 (HET), n=31 (KO) (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Im Gegensatz zu den für das physiologische Myokardwachstum nach körperlicher Belastung erhobenen Daten (s. 4.4.2), belegen die Ang II-Stimulationsexperimente, dass sich das Fehlen von CRP4 bei der Manifestation einer neurohumoral-induzierten, pathophysiologischen Herzhypertrophie nachteilig auswirkt. Offensichtlich ist kardiales CRP4 wichtig, um dem Ang II-stimulierten Herzwachstum entgegenzuwirken. In diesem Kontext wurde anschließend untersucht, ob der pro-hypertrophe Stimulus per se zu Veränderungen in der Expression von CRP4 führt (s. Abb. 4.17). Für das Schwesterprotein CRP3/MLP wurde über eine verringerte Proteinexpression bei schwerer Herzinsuffizienz berichtet (Zolk et al. 2000). Tatsächlich war

eine moderate, aber statistisch signifikante Abnahme der auf GAPDH normalisierten CRP4-Proteinexpression in WT-Herzen nach Ang II-Infusion zu beobachten (basal:  $1,079 \pm 0,022$ ; Ang II:  $0,882 \pm 0,043$ ). In Herzlysaten von CRP4-KO Mäusen waren erwartungsgemäß keine CRP4-Signale zu detektieren (s. Abb. 4.17 A, B). In hochprozentigen Acrylamid-Gelen - in diesem Experiment betrug die Acrylamid-Konzentration 17,5% - wird CRP4 meist als Doppelbande detektiert (s. Abb. 4.17 A). Möglicherweise handelt es sich bei der oberen Bande um phosphoryliertes bzw. durch posttranslationale Modifikation verändertes CRP4, dessen molekulare Masse dadurch erhöht wird, aber dennoch von den CRP4-Antikörpern detektiert werden kann. Auch unterschiedliche Spleißvarianten von CRP4 sind nicht ausgeschlossen. Mittels spezifischer Primer wurde zusätzlich der CRP4 mRNA-Gehalt von Ang II- und NaCl- stimulierten Herzen untersucht. Ähnlich der Proteinexpression (s. Abb. 4.14 A) war auch bei der Analyse der CRP4-mRNA ein Gendosiseffekt zu beobachten, so war die Anzahl der CRP4 mRNA-Transkripte in Herzen von heterozygoten Mäusen über die Hälfte reduziert (s. Abb. 4.17 C). Der CRP4-mRNA Gehalt in Gesamtherzlysaten von Ang II-behandelten CRP4-HET und CRP4-WT Mäusen wurde durch die Infusion nur marginal gesenkt, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (s. Abb. 4.17 C).



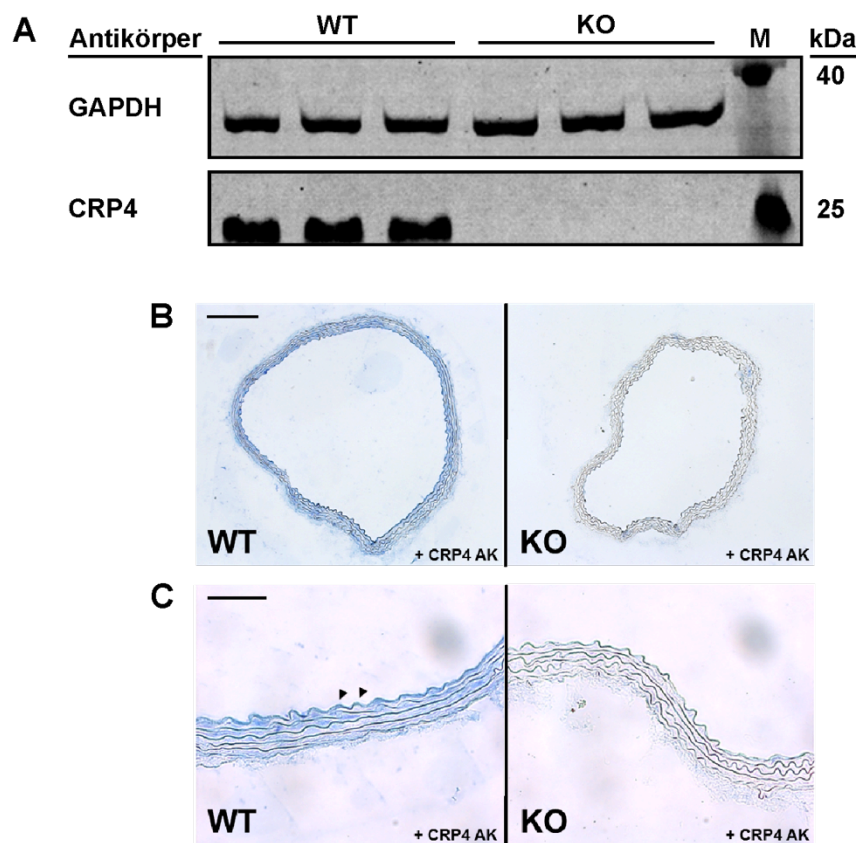
**Abb. 4.17: Expressionsmuster von CRP4 nach Stimulation mit Ang II.**

(A) Repräsentativer Immunoblot zur Darstellung der CRP4-Proteinmengen  $\pm$  Ang II in CRP4-WT und CRP4-KO Herzlysaten. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) diente als Ladungskontrolle und wurde für die (B) Quantifizierung der CRP4-Proteinbanden von insgesamt n=8-12 Tieren pro Genotyp  $\pm$  Ang II aus 5 Einzelexperimenten herangezogen. (C) Quantitative mRNA-Analyse der CRP4-Transkripte nach Normalisierung auf HPRT von n=9-12 Herzen pro Genotyp und Kondition. Für CRP4-KO Herzen waren keine Signale detektierbar, was die hohe Spezifität des verwendeten Antiserums bzw. der Primer unterstreicht (\*\* $p < 0,001$ ).



## 4.5 Untersuchungen zur vaskulären Expression von CRP4

Ang II ist bekanntermaßen ein stark vasokonstriktorisch wirkendes Neurohormon mit pleiotropen Effekten auf unterschiedliche Organsysteme (Herz, Niere, etc.). Das Herzmuskelwachstum im Ang II-Infusionsmodell wird durch Stimulation des lokalen RAAS, der Aktivierung von AT<sub>1</sub>R auf Kardiomyozyten sowie durch die Ang II-bedingte Erhöhung der Nachlast beeinflusst. Da CRP4 in Glattmuskelzellen als Effektor des cGMP/cGKI-Signalwegs beschrieben wurde (Huber et al. 2000), stellt sich die Frage, inwiefern die vasorelaxierende Wirkung von endogenen, cGMP-erhöhenden Substanzen (z.B. NO und natriuretische Peptide) CRP4-abhängig sind. Da die Ablation von CRP4 die Blutdruckregulation per se beeinflussen könnte, war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit wichtig, (1) die vaskuläre CRP4-Expression zu verifizieren und (2) Blutdruckmessungen ( $\pm$  Ang II) durchzuführen, um die Auswirkung eines veränderten Gefäßtonus auf das Ausmaß der kardialen Hypertrophie abschätzen zu können. Zunächst sollte die Expression von CRP4 in Glattmuskelzellen der Aorta mittels spezifischer CRP4-Antikörper im Western Blot und durch immunhistochemische Methoden bestätigt werden (s. Abb. 4.18).



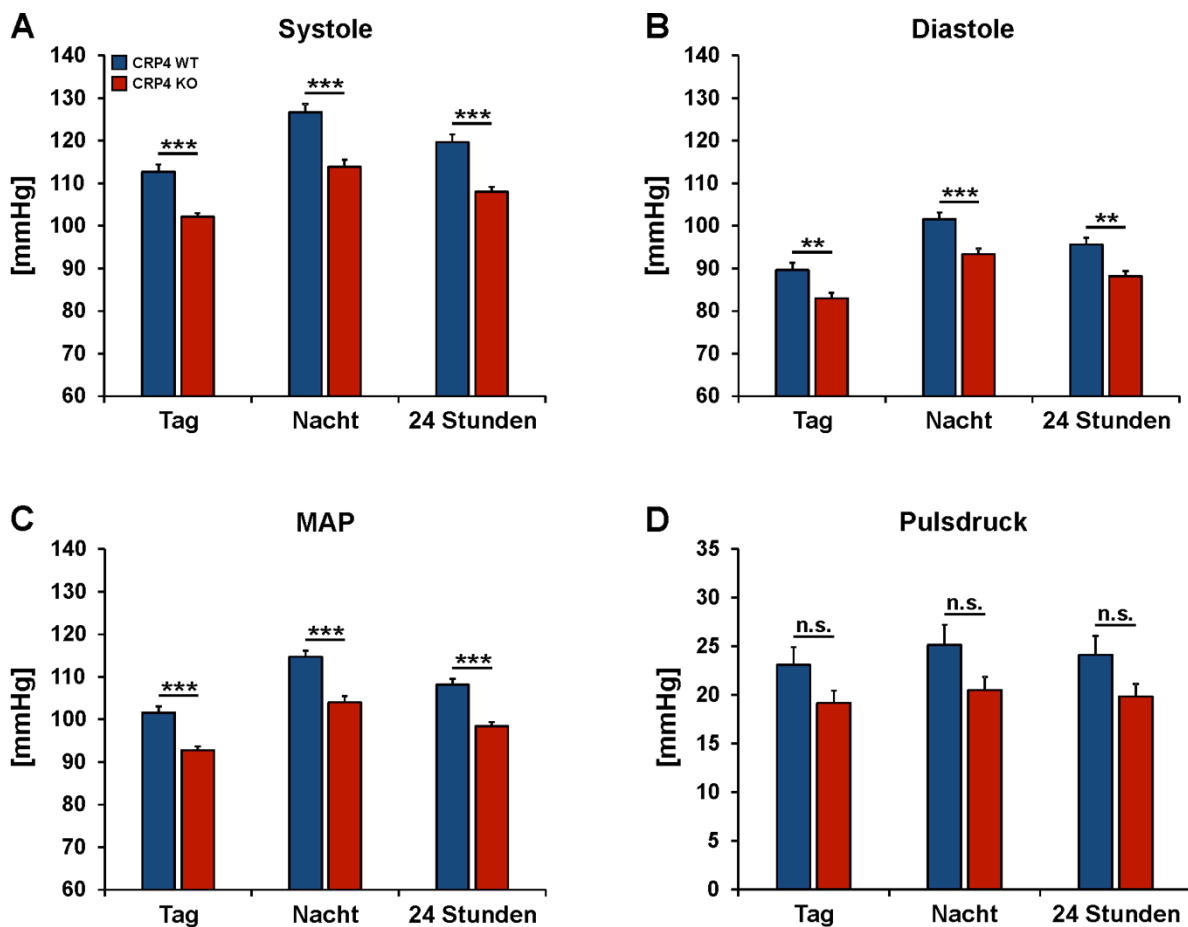
**Abb. 4.18: Expression von CRP4 in der Aorta.**

(A) Repräsentativer Immunoblot zum Nachweis von CRP4 in Aortenlysaten von CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen aus jeweils  $n=9$  Tieren pro Genotyp. Jede Geltasche wurde mit den Proteinmengen von drei Aorten beladen, GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) diente als Ladungskontrolle. (B) AP-Färbung zur Detektion von CRP4 in Gefrierschnitten von Aortenringen. (C) Bei entsprechender Vergrößerung war auch eine starke CRP4-Expression im Endothel detektierbar (Pfeilspitzen). Die Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu$ m (B) bzw. 50  $\mu$ m (C). Die AP-Färbung wurde in Zusammenarbeit mit Michael Majer im Rahmen eines Diplomarbeitprojektes angefertigt.

Sowohl im Immunoblot der Aortenlysate (Abb. 4.18 A), als auch in immunhistochemisch angefärbten Feinschnitten der CRP4-WT Aorta (Abb. 4.18 B), konnte CRP4 zweifelsfrei detektiert werden. In vergrößerten Bildausschnitten fällt zudem auf, dass CRP4 nicht nur in Glattmuskelzellen, sondern auch im Endothel exprimiert wird (Abb. 4.18 C). Erwartungsgemäß war CRP4 in die Proteinproben und Gewebeschnitten von CRP4-KO Tieren nicht nachweisbar.

#### 4.5.1 Radiotelemetrische Blutdruckmessung

Für die Erfassung des Blutdrucks wurde ein Telemetrie-gestütztes Meßsystem verwendet. Mit dieser Technik kann der Blutdruck über einen langen Zeitraum kontinuierlich und mit einer hohen Genauigkeit aufgezeichnet werden. Die Blutdrucktransmitter wurden operativ eingesetzt (s. 3.3.4). In den darauffolgenden 7 Tagen konnten sich die Tiere vollständig von der Operation erholen. Zur Erhebung der basalen Blutdruckwerte von 10-15 Wochen alten männlichen CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen wurden über drei Tage kontinuierliche Messungen in 15-minütigen Intervallen à 5 Minuten aufgezeichnet (s. Abb. 4.19).

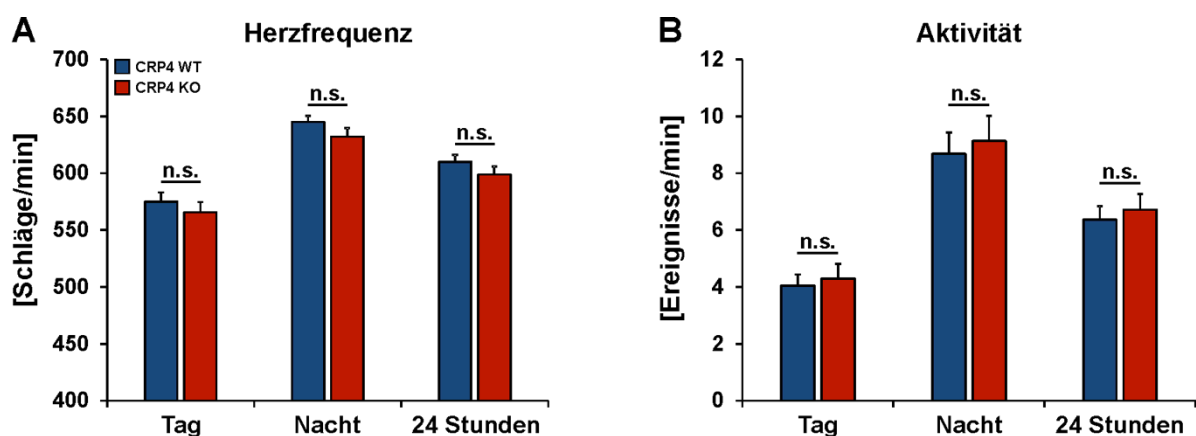


**Abb. 4.19: Telemetrische Blutdruckmessungen an CRP4-WT und CRP4-KO Tieren.**

Mittelwerte der radiotelemetrischen Blutdruckmessung zur Ermittlung der (A) Systole, (B) der Diastole, (C) des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) sowie (D) des Pulsdruckes in jeweils n=9 Tieren pro Genotyp. Sowohl die Tages- und Nachtwerte als auch die 24 Stunden-Mittelwerte zeigten signifikant erniedrigte Drücke in CRP4-KO Tieren (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Da CRP4 in Glattmuskelzellen als Effektorprotein der cGKI identifiziert wurde (Zhang et al. 2007), wäre es denkbar, dass die cGKI zur Vermittlung der Vasorelaxation auf CRP4 als Adapterprotein angewiesen ist. Der Verlust von CRP4 könnte in erhöhtem Gefäßwiderstand und somit erhöhten Blutdruckwerten resultieren. Interessanterweise war ein gegenteiliger Effekt zu beobachten: CRP4-defiziente Tiere sind hypoton (s. Abb. 4.19). Alle mittels Telemetrie untersuchten Parameter (systolischer Blutdruck, diastolischer Blutdruck sowie der mittlere arterielle Blutdruck, MAP) waren sowohl in der Hell-als auch in der Dunkelpphase in CRP4-defizienten Tieren reduziert (s. Abb. 4.19). Im Zeitraum von 24 Stunden betrug der systolische Blutdruck der CRP4-KO Tiere  $108,01 \pm 1,13$  mmHg und lag damit über 10 mmHg unter den systolischen Drücken der CRP4-WT Mäuse ( $119,69 \pm 1,78$  mmHg; s. Abb. 4.19 A). Signifikante Unterschiede waren auch für die diastolischen Werte erkennbar (CRP4-KO  $88,18 \pm 1,15$  mmHg; CRP4-WT  $95,61 \pm 1,56$ ; s. Abb. 4.19 B). Der Mittlere arterielle Blutdruck (MAP) berechnet sich näherungsweise aus der Summe des diastolischen Drucks und dem Drittel des Differenzdrucks zwischen Systole und Diastole. Für die 24-Stunden-Werte des MAP ergaben sich ebenfalls Abweichungen von annähernd 10 mmHg zwischen CRP4-KO ( $98,42 \pm 0,96$  mmHg) und CRP4-WT Mäusen ( $108,14 \pm 1,36$  mmHg; s. Abb. 4.19 C). Keine signifikanten Änderungen waren dagegen für die Pulsdrücke zu verzeichnen (s. Abb. 4.19 D). Dieser Parameter veranschaulicht die Differenz zwischen systolischem und diastolischem Druck und wird als Maß für die Elastizität von Blutgefäßen angesehen, ein Anstieg dieses Parameters korreliert mit einer erhöhten Steifigkeit der Gefäße (Mackenzie et al. 2002). Die Pulsdruck-Werte der CRP4-defizienten Tiere ( $19,84 \pm 1,30$  mmHg) lagen hier unter den Werten der CRP4-WT Mäuse ( $24,11 \pm 1,95$  mmHg), erreichten aber keine statistische Signifikanz (s. Abb. 4.19 D).

Des Weiteren wurde auch die Herzfrequenz sowie die lokomotorische Aktivität telemetrisch erfasst (s. Abb. 4.20). Die Analyse dieser Parameter ist wichtig, da Aktivität und Herzfrequenz den Blutdruck und damit auch die Interpretation der Rolle von CRP4 für die Blutdruckregulation beeinflussen können.



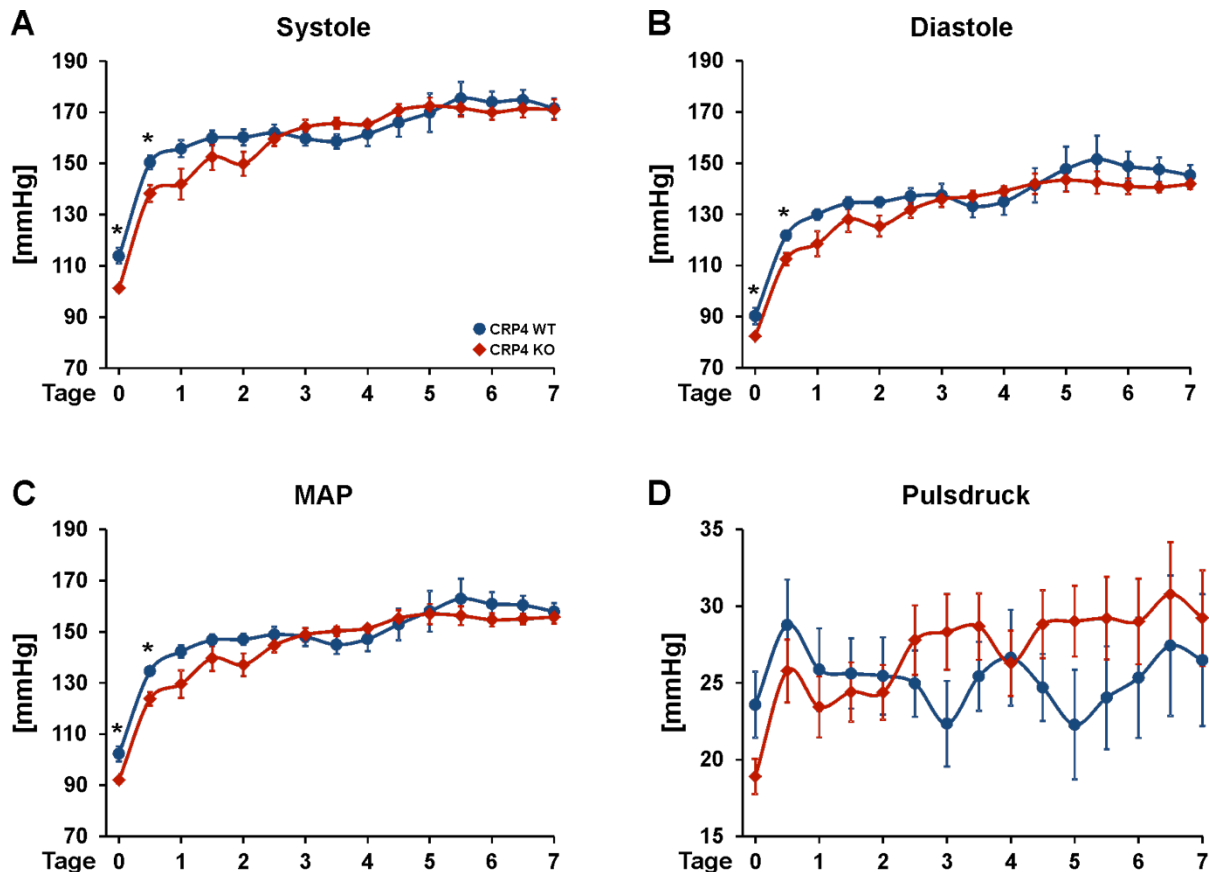
**Abb. 4.20: CRP4 ist nicht in die Regulation der Herzfrequenz und der Aktivität involviert.**

Die Analyse der (A) Herzfrequenz und (B) der lokomotorischen Aktivität resultierte zu keiner Tageszeit in Unterschieden zwischen den gezeigten Genotypen (jeweils n=9 Tiere).

Über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden waren keine Unterschiede in der Herzfrequenz zwischen CRP4-WT ( $610,14 \pm 6,05$  Schläge/min) und CRPP4-KO Mäusen ( $598,93 \pm 7,12$  Schläge/min) zu ermitteln (s. Abb. 4.20 A). Die Aktivität ist ein Maß für die Häufigkeit der Bewegungen der Tiere in einer bestimmten Zeitspanne. Auch hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen (s. Abb. 4.20 B), sodass eine Verzerrung der basalen Blutdruckmessungen durch die Schlagfrequenz oder die lokomotorische Aktivität ausgeschlossen werden konnte.

#### 4.5.2 Blutdruckmessung während der 7-tägigen Ang II-Infusion

Im Folgeexperiment sollte untersucht werden, wie sich die Blutdruckkurven der CRP4-WT und CRP4-KO Mäuse während der 7-tägigen Infusion von Ang II entwickeln. Nach Beendigung der Basalmessungen wurden die osmotischen Minipumpen implantiert und die Messungen nach dem bereits eingeführten Schema (s. 4.5.1) fortgeführt (s. Abb. 4.21).



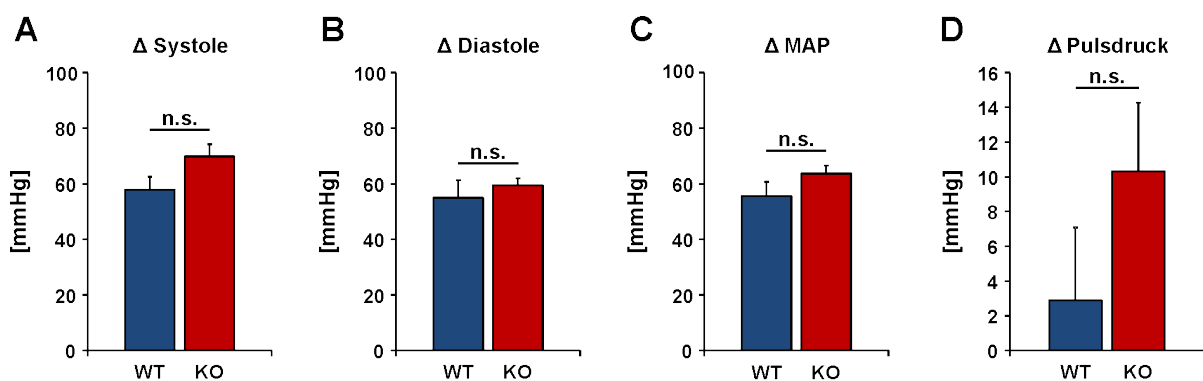
**Abb. 4.21: Blutdruckverlaufskurve während der 7-tägigen Ang II-Infusion.**

Dargestellt sind die Mittelwerte der Drücke in den Hell- (Zahlenwerte auf der X-Achse) und Dunkelphasen (keine Zahlenwerte auf der X-Achse) für (A) Systole, (B) Diastole, (C) MAP (mittlerer arterieller Blutdruck) und (D) Pulsdruck von CRP4-WT (n=8) und CRP4-KO Mäusen (n=9) während der 7-tägigen Ang II-Infusion. Die Werte zum Zeitpunkt Null entsprechen den letzten Tageswerten der Basalmessungen direkt vor der Implantation der osmotischen Minipumpen (\*p<0,05).

Die signifikanten Druckunterschiede unter Basalbedingungen (s. 4.5.1) nivellierten sich bereits nach dem ersten Tag der Ang II-Infusion. In dieser Zeitspanne war erwartungsgemäß

für beide Genotypen der stärkste Blutdruckanstieg zu verzeichnen. Die Blutdruckverlaufskurven für die Systole, die Diastole sowie den MAP verliefen von Tag 2 an für beide Genotypen nahezu identisch (s. Abb. 4.21 A-C). Etwas uneinheitlicher und mit stärkeren Schwankungen behaftet stellte sich der Pulsdruck dar. Der Pulsdruck der CRP4-KO Tiere lag ab dem zweiten Tag durchgehend oberhalb der CRP4-WT Tiere, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (s. Abb. 4.21 D).

Da CRP4-KO Tiere unter physiologischen Bedingungen einen niedrigeren Blutdruck aufweisen (s. 4.5.1), wurde zusätzlich untersucht, ob diese Tiere durch die Ang II-Gabe einem insgesamt stärkeren Blutdruckanstieg ausgesetzt sind als CRP4-WT Tiere. Daher wurde die Differenz der Basaldrücke und der Drücke nach 7-tägiger Ang II-Infusion bestimmt, was dem Gesamtanstieg des Blutdrucks durch die neurohumorale Stimulation entspricht (s. Abb. 4.22). Auch hier ergaben sich weder für Systole (s. Abb. 4.22 A), Diastole (s. Abb. 4.22 B), MAP (s. Abb. 4.22 C), noch für den Pulsdruck (s. Abb. 4.22 D) signifikante Unterschiede. CRP4-KO Tiere haben somit keinen Nachteil bezüglich der Unterschiede in der Blutdruckdifferenz vor und nach der Ang II-Dauerinfusion.

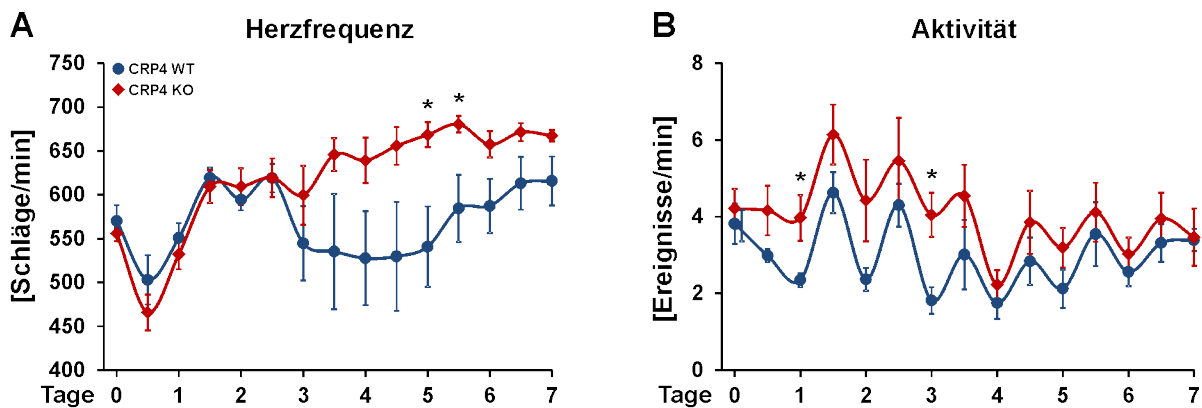


**Abb. 4.22: Gesamtanstieg des Blutdrucks nach 7-tägiger Ang II-Infusion.**

Dargestellt sind die Mittelwerte der Differenz zwischen den Drücken zu Beginn und am Ende der Ang II-Dauerinfusion für (A) Systole, (B) Diastole, (C) MAP (mittlerer arterieller Blutdruck) und (D) Pulsdruck. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für diese Parameter zwischen CRP4-WT (n=8) und CRP4-KO (n=9) Tieren.

Interessante Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten sich im Verlauf der chronischen Ang II-Infusion für die Herzfrequenz sowie für die körperliche Aktivität (s. Abb. 4.23). Die Herzfrequenz war bis zum dritten Tag nach Implantation der Minipumpen annähernd identisch, anschließend war ein starker Abfall in den CRP4-WT Tieren zu beobachten. Da die Frequenz der CRP4-KO Mäuse kontinuierlich anstieg, divergierten die Werte weiter auseinander (s. Abb. 4.23 A). So unterschieden sich beispielsweise die Herzfrequenz der CRP4-WT ( $529,79 \pm 61,98$ ) und CRP4-KO Tiere ( $655,77 \pm 21,63$ ) an Tag 4,5 um mehr als 100 Schläge/min. Die Frequenz der CRP4-KO Tiere war bis zum Ende der Ang II-Infusion konstant höher als die der CRP4-WT Tiere, deren Werte zwar wieder anstiegen, aber nicht das Niveau der CRP4-defizienten Mäuse erreichten (s. Abb. 4.23 A). Die Verlaufskurven der Herzfrequenz der CRP4-WT Tiere deuten auf einen endogenen kompensatorischen Mechanismus hin, der unter Ang II-Stimulation als entlastende Maßnahme für das Herz-

Kreislaufsystem eine Senkung der Herzfrequenz herbeiführt. Dieser scheint in den CRP4-defizienten Tieren nicht zu greifen. Die jeweiligen Mechanismen bzw. die beteiligten Organe wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Abweichungen bezüglich der Herzfrequenz hatten erstaunlicherweise keine Auswirkung auf den Verlauf des Blutdrucks, der, wie bereits in Abb. 4.21 veranschaulicht, in CRP4-WT und CRP4-KO Tieren über die gesamte Dauer der Ang II-Infusion identisch war. Bei Betrachtung der Verlaufskurve der lokomotorischen Aktivität wird deutlich, dass für CRP4-KO Mäuse unabhängig von der Tageszeit deutlich mehr Bewegungsabläufe aufgezeichnet wurden. So lag die Aktivitätsmusterkurve der CRP4-defizienten Tiere über die gesamte Dauer der Ang II-Infusion über dem der CRP4-WT Tiere. An Tag 1 und 3 nach der Implantation der Pumpen erreichte dieser Unterschied sogar statistische Signifikanz (s. Abb. 4.23 B). Da die lokomotorische Aktivität eine Determinante des Blutdrucks darstellt, ist sogar davon auszugehen, dass sich die Drücke von CRP4-KO Tieren bei vergleichbarer Aktivität zu den CRP4-WT Tieren auch während der Ang II-Infusion niedriger darstellen würden.



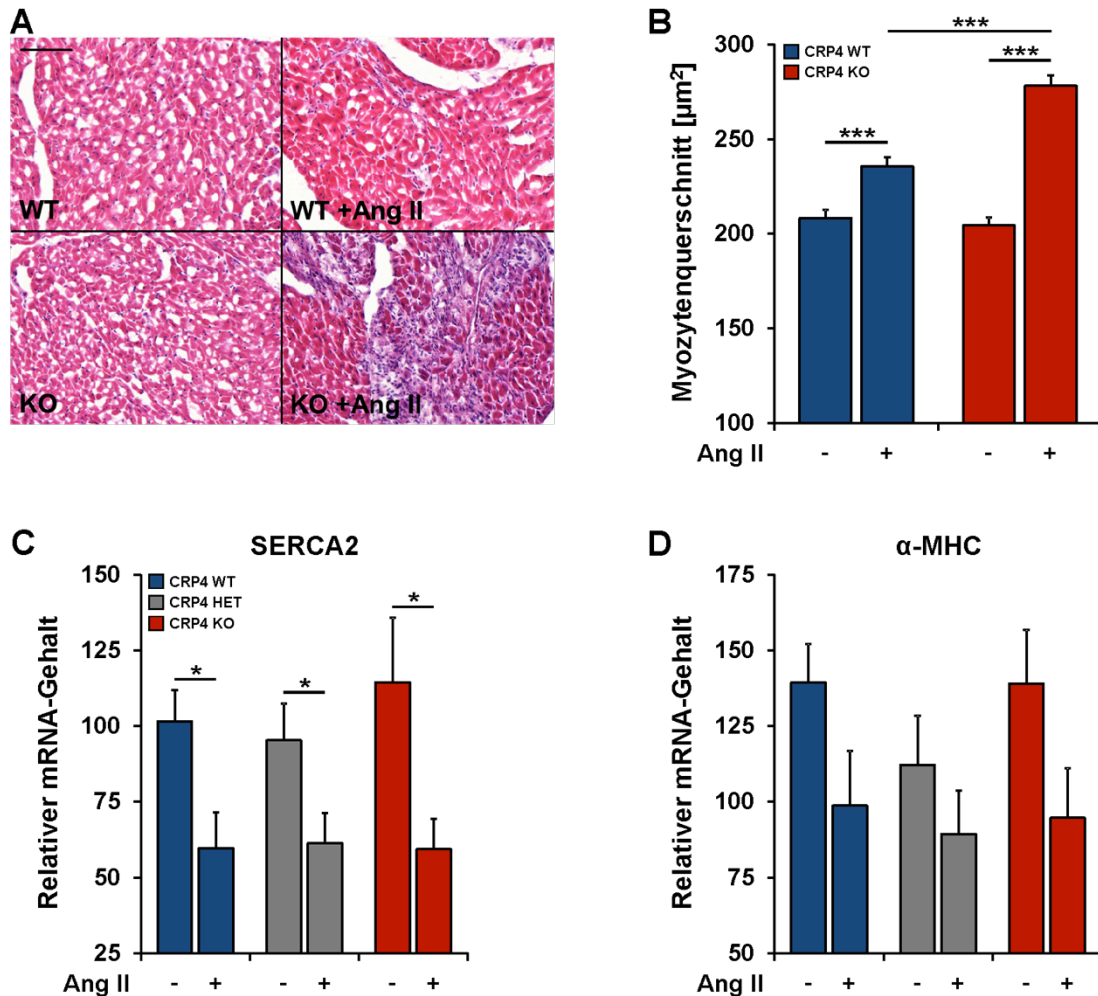
**Abb. 4.23: Herzfrequenz- und Aktivitätsverlauf während der 7-tägigen Ang II-Infusion.** Dargestellt ist die Entwicklung der mittleren (A) Herzfrequenz und (B) lokomotorischen Aktivität während der Infusion von Ang II in n=8 CRP4-WT und n=9 CRP4-KO Mäusen. Weitere Erläuterungen im Text (\*p<0,05).

Die telemetrischen Blutdruckmessungen verdeutlichen letztlich, dass sich die globale Deletion von CRP4 nicht nachteilig auf den Blutdruck auswirkt. So zeigten CRP4-KO Tiere unter physiologischen Bedingungen sogar eine Hypotonie (s. Abb. 4.19), die 7-tägige Messung während der Ang II-Infusion belegte bei sogar teilweise erhöhter lokomotorischer Aktivität und Herzfrequenz der CRP4-KO Tiere einen identischen Blutdruckverlauf zu den CRP4-WT Tieren (s. Abb. 4.21 und Abb. 4.23). Zu Beginn der Experimente wurde für CRP4-defiziente Mäuse ein größeres Ausmaß der kardialen Hypertrophie nach 7-tägiger Ang II-Stimulation ermittelt (s. 4.4.3). Ein gewisser Beitrag zum Phänotyp wird hierbei der Ang II-induzierten Erhöhung der Nachlast zugeschrieben. Da die Ablation von CRP4 keinen Einfluss auf den Blutdruck hatte, sind genotyp-bedingte Unterschiede in der Blutdruckregulation für die Entwicklung des kardialen Phänotyps ausgeschlossen. Die massive kardiale Hypertrophie der CRP4-defizienten Tiere ist somit explizit auf die lokale Ang II-Wirkung und auf das Fehlen von CRP4 im Myokard zurückzuführen.

## 4.6 Zelluläre und molekulare Effekte der Ang II-Infusion auf das kardiale Remodeling in CRP4-WT und CRP4-KO Tieren

Die primäre Analyse des pathophysiologischen Herzwachstums nach 7-tägiger Infusion von Ang II offenbarte eine massive Myokardhypertrophie der CRP4-defizienten Tiere (s. 4.4.3). Hypertrophe Umbauprozesse, die letztlich zu einer Zunahme der Herzmasse führen, beruhen auf einer Vielzahl molekularer Veränderungen in den Myozyten per se (s. 1.1.4), sowie einer übermäßigen Einlagerung von extrazellulären Matrixproteinen in das kardiale Interstitium (Frey and Olson 2003).

Im Folgenden sollten daher wachstumspromovierende Effekte von Ang II auf zellulärer und molekularer Ebene untersucht werden (s. Abb. 4.24). Die myozytären Wachstumsprozesse wurden an Gewebeschnitten von CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen  $\pm$  Ang II untersucht. Die hierfür angefertigten Gefrierschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt (s. 3.5.4), fotografiert und anschließend planimetrisch vermessen. In diese Messungen wurden ausschließlich Myozyten mit mittig gelegenem Zellkern eingeschlossen. Unter physiologischen bzw. unstimulierten Bedingungen waren keine Unterschiede in der Kardiomyozytenquerschnittsfläche zwischen CRP4-WT ( $208,28 \pm 4,30 \mu\text{m}^2$ ) und CRP4-KO Herzen ( $204,42 \pm 4,25 \mu\text{m}^2$ ) erkennbar (s. Abb. 4.24 A, B). Die einwöchige Dauerinfusion von Ang II führte erwartungsgemäß zu vergrößerten Zellquerschnittsflächen in beiden Genotypen. Jedoch war das Ausmaß der myozytären Hypertrophie in CRP4-KO Herzen mit einer durchschnittlichen Myozytenquerschnittsfläche von  $278,14 \pm 5,36 \mu\text{m}^2$  gegenüber den CRP4-WT Mäusen ( $235,54 \pm 4,69 \mu\text{m}^2$ ) signifikant erhöht (s. Abb. 4.24 A, B). Auf molekularer Ebene können kardiale Umbauprozesse anhand eines veränderten Expressionsmusters bestimmter mRNAs des fetalen Genprogramms nachgewiesen werden. Unter hypertrophen Wachstumsbedingungen ist gewöhnlich eine Herunterregulation der herzspezifischen SERCA2-Isoform zu beobachten, was zumeist mit einer verminderten Kontraktilität sowie einer gestörten Relaxation des Herzmuskels einhergeht (Mercadier et al. 1990). Tatsächlich war in allen drei untersuchten Genotypen die Zahl der kardialen SERCA2 mRNA-Transkripte nach der Ang II-Infusion im Vergleich zu den NaCl-behandelten Kontrolltieren reduziert. Die relativen SERCA2 mRNA-Mengen waren nach dem hypertrophen Ang II-Stimulus in allen untersuchten Genotypen aber nahezu identisch (s. Abb. 4.24 C). Ein ähnliches Bild ergab sich für die Quantifizierung der  $\alpha$ MHC-mRNA. Die Expression der kardialen  $\alpha$ MHC-Isoform ist in adulten Herzen in der Gegenwart von Hypertrophie-auslösenden Stimuli normalerweise reduziert (Miyata et al. 2000). Auch in dem hier untersuchten Hypertrophiemodell war eine deutliche, aber nicht-signifikante und vom Genotyp der Mäuse unabhängige Abnahme der  $\alpha$ -MHC Expression detektierbar (s. Abb. 4.24 D). Häufig ist kardiales *Remodeling* durch eine gegenläufige Veränderung im mRNA-Gehalt der fetalen  $\beta$ -MHC-Isoform gekennzeichnet. Die 7-tägige Ang II-Dauerinfusion hatte aber keinen Einfluss auf die Expression der  $\beta$ -MHC Isoform in den Herzen der CRP4-KO und CRP-WT sowie CRP4-HET Mäusen (Daten nicht gezeigt).

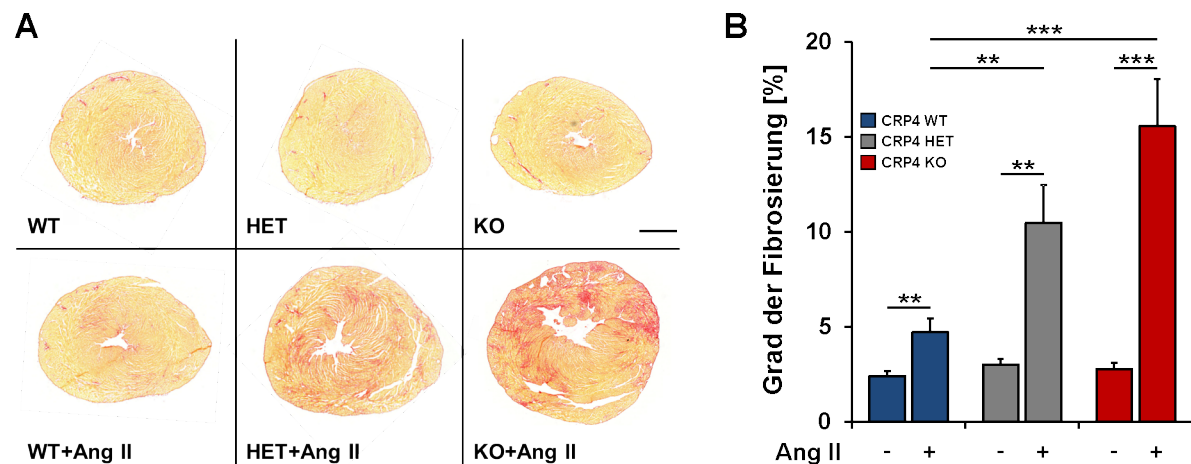


**Abb. 4.24: Erhöhtes Ausmaß zellulärer Hypertrophie in CRP4-KO Tieren nach Ang II-Infusion.** (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen repräsentativer HE-gefärbter Feinschnitte des Myokards von CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen ± Ang II. (B) Darstellung der Mittelwerte der planimetrischen Vermessung von n=345 (CRP4-WT), bzw. n=367 (CRP4-KO) Zellen aus Gewebeschnitten von jeweils 6 NaCl-behandelten Herzen pro Genotyp sowie n=489 (CRP4-WT), bzw. n=479 (CRP4-KO) Zellen aus Gewebeschnitten von jeweils 6 Ang II-behandelten Herzen pro Genotyp. Der chronische Ang II-Stimulus führt zu stark vergrößerten Querschnittsflächen von CRP4-KO Myozyten. Die mRNA Mengen von (C) SERCA2 (herzspezifische sarkoplasmatische und endoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-ATPase) und (D) α-MHC waren nach Ang II-Dauerinfusion deutlich bzw. sogar signifikant reduziert. Es waren aber keine genotyp-spezifischen Unterschiede erkennbar. HPRT diente als Referenzgen zur Normalisierung des mRNA-Gehalts. Folgende Tierzahlen wurden verwendet: NaCl-behandelt: n=11 (WT), n=9 (HET), n=10 (KO) Ang II: n=11 (WT), n=12 (HET), n=10 (KO). Der Maßstabsbalken in (A) entspricht 100 µm (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001).

Bei genauerer Betrachtung der Gewebeschnitte in Abb. 4.24 A fällt auf, dass insbesondere das Myokard der CRP4-KO Tiere nach chronischer Ang II-Infusion von helleren, kernreichen Arealen durchzogen wird. Diese Veränderungen im Interstitium deuten auf eine erhöhte Anzahl und Aktivität ECM-produzierender Myofibroblasten hin. Interstitielle Fibrose ist generell ein Merkmal von hypertrophen Umbauprozessen, einerseits als Ergebnis intensiver Kommunikation zwischen Myozyten und Fibroblasten (s. 1.1.3), aber auch durch direkte Wirkung des Hypertrophie-auslösenden Stimulus auf die Fibroblasten (Kakkar and Lee 2010). Eine direkte Wirkung von Ang II auf Fibroblasten/Myofibroblasten ist auch in dem hier untersuchten Infusions-Modell über die chronisch erhöhten Ang II-Spiegel gegeben. Um den



fibrotischen Gewebsanteil in den Herzen der Versuchstiere sichtbar zu machen, wurden Kryoschnitte mit Sirius-Rot angefärbt (s. 3.5.5). Mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogrammes (s. 3.5.7) wurde die in der Färbung rot erscheinende ECM-Fraktion, insbesondere die extrazellulären Kollagenfasern, quantifiziert (s. Abb. 4.25).



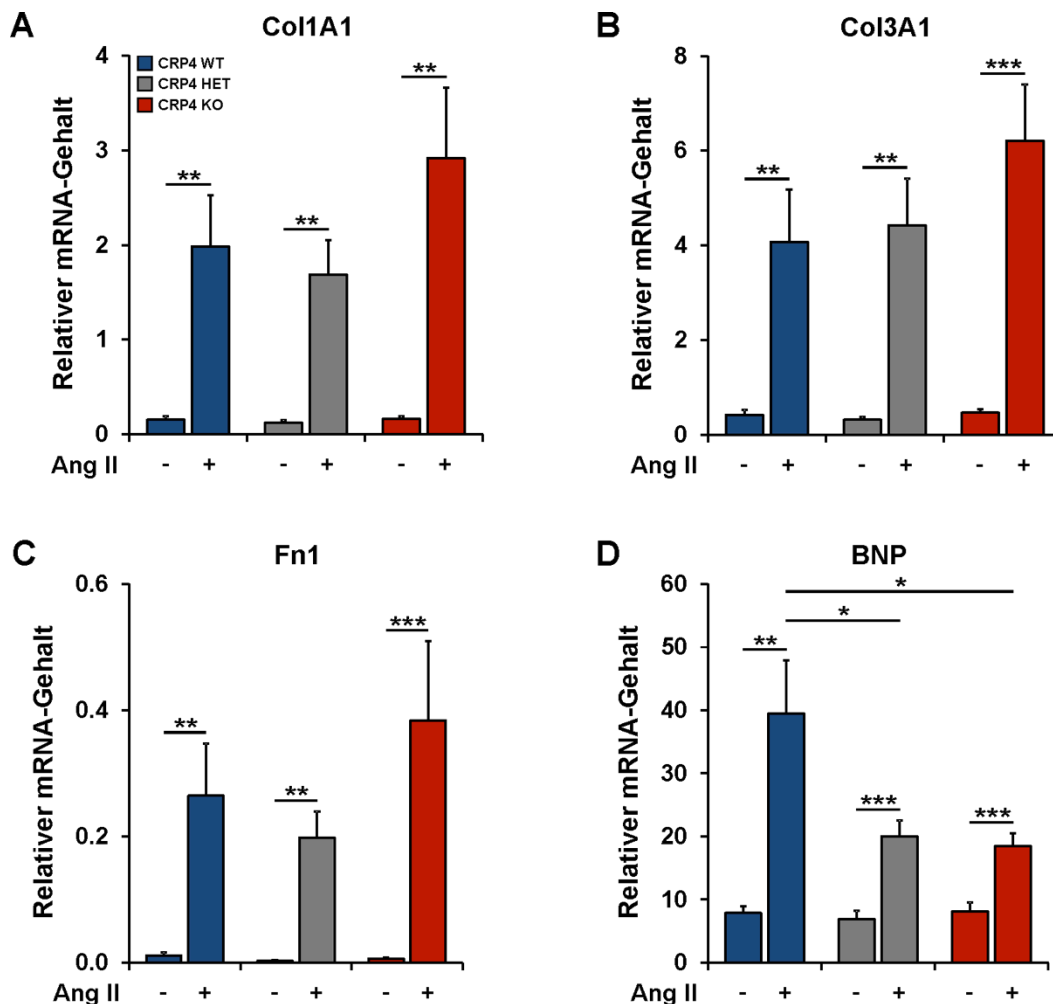
**Abb. 4.25: Ang II-induzierte kardiale Fibrosierung betrifft vor allem CRP4-defiziente Tiere.**

(A) Repräsentative *MIRAXScan*-Aufnahmen von Sirius-Rot gefärbten Kryoschnitten  $\pm$  Ang II im Bereich des Papillarmuskels zeigen eine fortschreitende Fibrosierung des Myokards bei teilweiser (CRP4-HET) oder vollständiger CRP4-Defizienz (CRP4-KO). (B) Quantifizierung der fibrotischen Gewebsanteile (rot) verglichen mit nicht betroffenen Herzregionen (gelb). Es wurden jeweils 3 Schnitte von insgesamt 3 verschiedenen Tieren pro Kondition und Genotyp gefärbt und ausgewertet. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Erwartungsgemäß war das Ausmaß der interstitiellen Fibrosierung in den unbehandelten Herzen aller Genotypen gering (CRP4-WT  $2,40 \pm 0,25\%$ ; CRP4-HET  $3,01 \pm 0,25\%$ ; CRP4-KO  $2,77 \pm 0,32\%$ ). Unter physiologischen Bedingungen waren fibrotische Veränderungen auf perivaskuläre Bereiche und die herzumgebende Bindegewebskapsel beschränkt (s. Abb. 4.25 A). Betrachtet man die durch chronische Ang II-Infusion akkumulierte Kollagenmenge in den Herzen, so lässt sich auch hier wieder der aus dem Gendosiseffekt (s. 4.4.1) resultierende intermediäre Phänotyp der CRP4-HET Mäuse feststellen. Die CRP4-WT Tiere entwickelten durch die Ang II-Behandlung eine Fibrosierung von  $4,71 \pm 0,70\%$  der gesamten Herzquerschnittsfläche (s. Abb. 4.25 B). Die Herzen heterozygoter Tiere jedoch offenbarten erneut eine stärkeres *Remodeling* nach chronischer Ang II-Stimulation. Mit  $10,46 \pm 2,01\%$  ergab sich für diesen Genotyp eine im Vergleich zum CRP4-WT signifikante Akkumulation von Kollagen. Die fibrotischen Gewebsanteile der CRP4-KO Tiere lagen mit durchschnittlich  $15,57 \pm 2,47\%$  nochmals deutlich höher (s. Abb. 4.25 B).

Die Untersuchungen der molekularen Effekte von Ang II auf das Myokard lassen den Schluss zu, dass die beobachtete Herzhypertrophie sowohl auf eine Vergrößerung der Kardiomyozyten als auch auf die ausgeprägte Myokardfibrosierung zurückzuführen ist. Die Grundlage dieser Umbauprozesse können Veränderungen in vielen pro- und antihypertrophen Faktoren und Signalwegen sein (Heineke and Molkentin 2006). Mittels quantitativer RT-PCR ist es möglich, die kardialen Umbauprozesse durch den Nachweis verschiedener Marker zu charakterisieren (Weber 1989). In diesem Zusammenhang wurde

zunächst die Expression der Kollagen-Isoformen Col1A1 und Col3A1 untersucht. Beide Fibroseindikatoren wurden erwartungsgemäß durch Ang II signifikant induziert (s. Abb. 4.26 A, B). Vergleicht man die Ang II-behandelten Gruppen untereinander, so wird deutlich, dass die Kollagen-Transkripte der CRP4-KO Herzen um circa 30% über denen der CRP4-WT Vergleichsgruppe liegen. Aufgrund der starken Schwankungen innerhalb der Genotypen erreichte dieser Unterschied aber keine statistische Signifikanz. Ähnliche Befunde ergaben sich für die Expressionsuntersuchungen zu Fibronectin (Fn1). Dieses Glycoprotein wird nach hypertrophem Stimulus verstärkt in den darauffolgenden drei Tagen gebildet und freigesetzt (Crawford et al. 1994). Auch nach 7-tägiger Ang II-Stimulation war in dem hier untersuchten Modell noch immer eine starke Induktion von Fn1-mRNA detektierbar (s. Abb. 4.26 C). Erneut war eine klare Tendenz zur Akkumulation von pro-fibrotischen Fn1-Gentranskripten in CRP4-KO Herzen ( $0,384 \pm 0,125$ ) im Vergleich zu CRP4-WT Herzen ( $0,265 \pm 0,083$ ) erkennbar.



**Abb. 4.26: Quantitative mRNA-Analyse verschiedener Fibrosemarker.**

Verstärkte Expressionsinduktion typischer Fibrosemarker wie (A) Kollagen-Typ 1A1 (Col1A1) und (B) Kollagen-Typ 3A1 (Col3A1) sowie (C) Fibronectin (Fn1) in Gesamtherzlysaten von CRP4-KO-Mäusen. (D) signifikant verringerte BNP-Spiegel in CRP4-defizienten Herzen (CRP4-KO und CRP4-HET) nach Ang II-Dauerinfusion in n=9-12 kardialen RNA-Proben pro Genotyp und Kondition nach Normierung auf HPRT (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

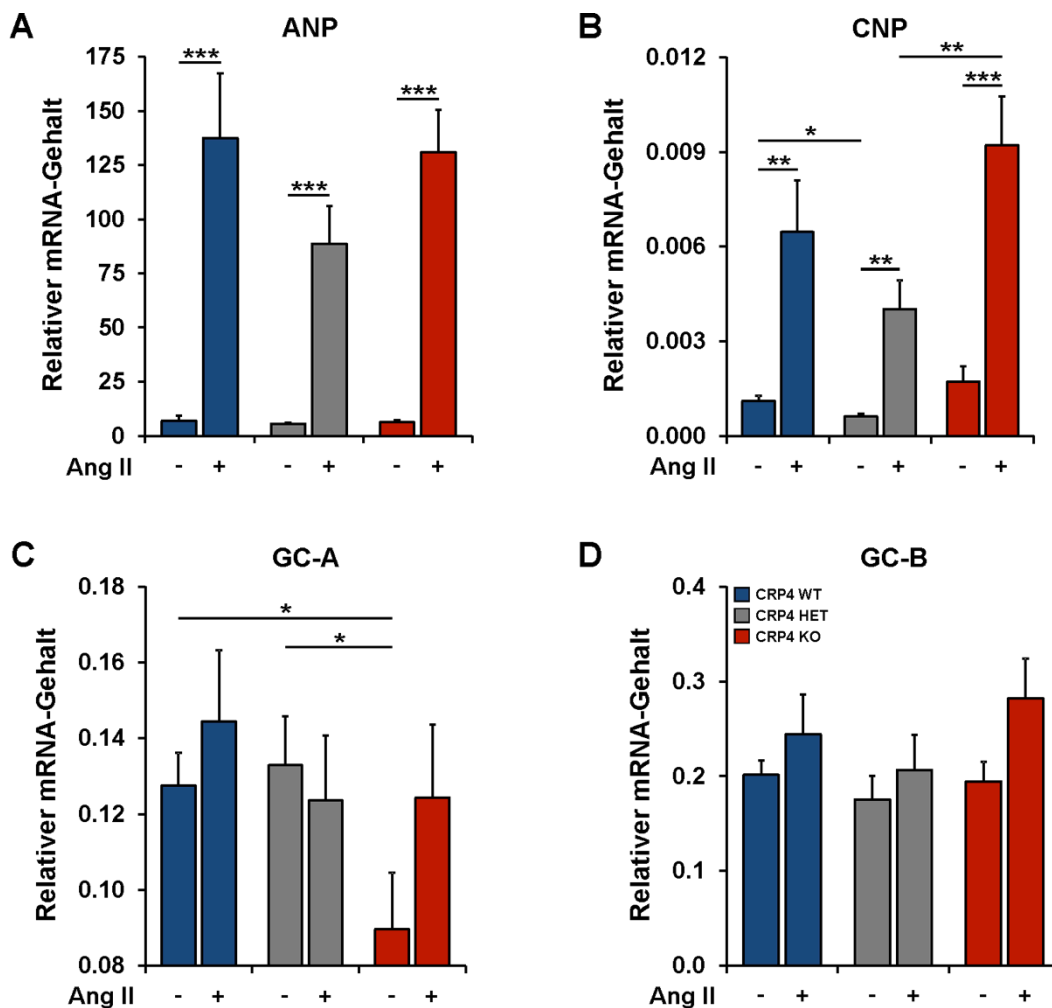
Ferner wurde die Expressionshöhe des natriuretischen Peptids BNP bestimmt (s. Abb. 4.26 D). BNP ist bekanntermaßen ein typisches Markerprotein des hypertrophie-induzierten fetalen Genprogramms. Klinisch korrelieren erhöhte Werte für BNP mit dem Schweregrad einer Herzinsuffizienz (Hanford et al. 1994). Unter hypertrophen Bedingungen wird BNP verstärkt exprimiert und fungiert als starker, parakrin wirkender antifibrotischer Faktor (Tamura et al. 2000). Herzen von CRP4-WT Tieren zeigen die erwartete Induktion der BNP-Expression ( $39,47 \pm 8,40$ ), wohingegen die BNP mRNA-Mengen der heterozygoten Tiere ( $20,01 \pm 2,54$ ) und der CRP4-KO Tiere ( $18,48 \pm 2,02$ ) um mehr als die Hälfte reduziert vorlagen (s. Abb. 4.26 D). Unter Basalbedingungen waren dagegen keine genotyp-spezifischen Unterschiede in der BNP-Expression detektierbar. Die Induktion der BNP-Expression scheint CRP4-abhängig reguliert zu sein. Somit fehlt nach Deletion von CRP4 ein wichtiger funktioneller Gegenspieler von Ang II bei der Myokardfibrosierung.

## **4.7 Untersuchungen zu CRP4-abhängigen Änderungen im kardialen cGMP/cGKI-Signalweg**

### **4.7.1 Expression der natriuretischen Peptide und natriuretischen Peptidrezeptoren im chronischen Ang II-Infusionsmodell**

BNP ist wie die weiteren natriuretischen Peptide ANP und CNP ein wichtiges Signalmolekül des cGMP/cGKI-Systems. Natriuretische Peptide bewirken in sämtlichen Zellen durch die Bindung an ihre Rezeptoren, die membranständigen Guanylatzyklen, einen Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration (Kuhn 2003). Die natriuretischen Peptide gelten generell als wichtige Komponenten eines gegenregulierenden Systems bei erhöhter RAAS-Aktivität (von Lueder et al. 2013). Aus diesem Grund wurde ebenfalls die Expression von ANP und CNP sowie deren Rezeptoren, GC-A, bzw. GC-B, untersucht (s. Abb. 4.27). Ähnlich der BNP-Expression (s. Abb. 4.26 D) waren unter physiologischen Bedingungen keine genotyp-spezifischen Unterschiede in den mRNA-Transkriptmengen von ANP zu erkennen (s. Abb. 4.27 A). Die basale Expression von CNP auf mRNA-Ebene war insgesamt sehr niedrig und lag nahezu an der Nachweisgrenze, wobei der mRNA-Gehalt von CNP in CRP4-HET Herzen signifikant reduziert war (s. Abb. 4.27 B). Die chronische Dauerinfusion von Ang II führte in allen Genotypen zu einem signifikanten Anstieg von ANP und CNP (s. Abb. 4.27 A, B). Auch dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur überein (Nishikimi et al. 2006). Die Tatsache, dass nur BNP in CRP4-defizienten Tieren (CRP4-KO und CRP4-HET) signifikant erniedrigt war (s. Abb. 4.26 D), deutet auf eine molekulare Verknüpfung von CRP4 und der Transkription dieses natriuretischen Peptids hin. Nachfolgend wurde der Expressionsstatus der partikulären Guanylatzyklen analysiert (s. Abb. 4.27 C, D). Unter physiologischen Bedingungen ergab die Quantifizierung der mRNA-Menge von GC-A, dem Rezeptor für ANP und BNP, signifikant verringerte Expressionslevel in Gesamtherzlysaten von CRP4-KO Tieren ( $0,089 \pm 0,015$ ) verglichen mit CRP4-WT Herzen ( $0,128 \pm 0,009$ ) und CRP4-HET Herzen ( $0,133 \pm 0,013$ ). Die Ang II-Dauerinfusion nivellierte alle Unterschiede in der GC-A mRNA-Menge zwischen den Genotypen (s. Abb. 4.27 C). Des Weiteren waren keine

genotyp- oder behandlungsbedingten Veränderungen der mRNA-Transkriptmengen für GC-B, dem Rezeptor für CNP, erkennbar (s. Abb. 4.27 D).

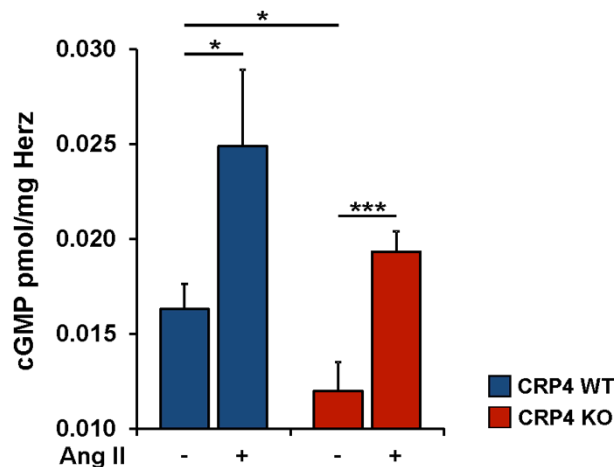


**Abb. 4.27: qRT-PCR Analyse von natriuretischen Peptiden und deren Rezeptoren.**

Quantitative Expressionsanalyse der natriuretischen Peptide (A) ANP, (B) CNP und deren membranständige Rezeptoren (C) GC-A sowie (D) GC-B in n=9-12 RNA-Proben aus Gesamtherzlysaten von CRP4-WT, CRP4-HET und CRP4-KO Mäusen  $\pm$  Ang II. HPRT diente als Referenzgen zur Normalisierung des mRNA-Gehalts. Nähere Erläuterungen im Text (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.7.2 cGMP-Messungen nach Angiotensin II-Infusion

Die partikuläre Guanylatzyklase GC-A fungiert als Rezeptor für ANP und BNP und katalysiert nach Bindung dieser Liganden die enzymatische Umwandlung von GTP zu cGMP und ist somit unter anderem für die Generierung dieses intrazellulären Botenstoffs verantwortlich (s. 1.2.1). Aufgrund der reduzierten BNP und GC-A mRNA-Expression wurden im Folgenden funktionelle Auswirkungen auf die intrakardialen cGMP-Spiegel in CRP4-KO Herzen untersucht, indem die Mengen des zyklischen Nukleotids in Gesamtherzlysaten von CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen  $\pm$  Ang II mittels Enzym-Immunoassay (EIA, s. 3.8) bestimmt wurden (s. Abb. 4.28).



**Abb. 4.28: Erniedrigte cGMP-Spiegel in CRP4-KO Herzen.**

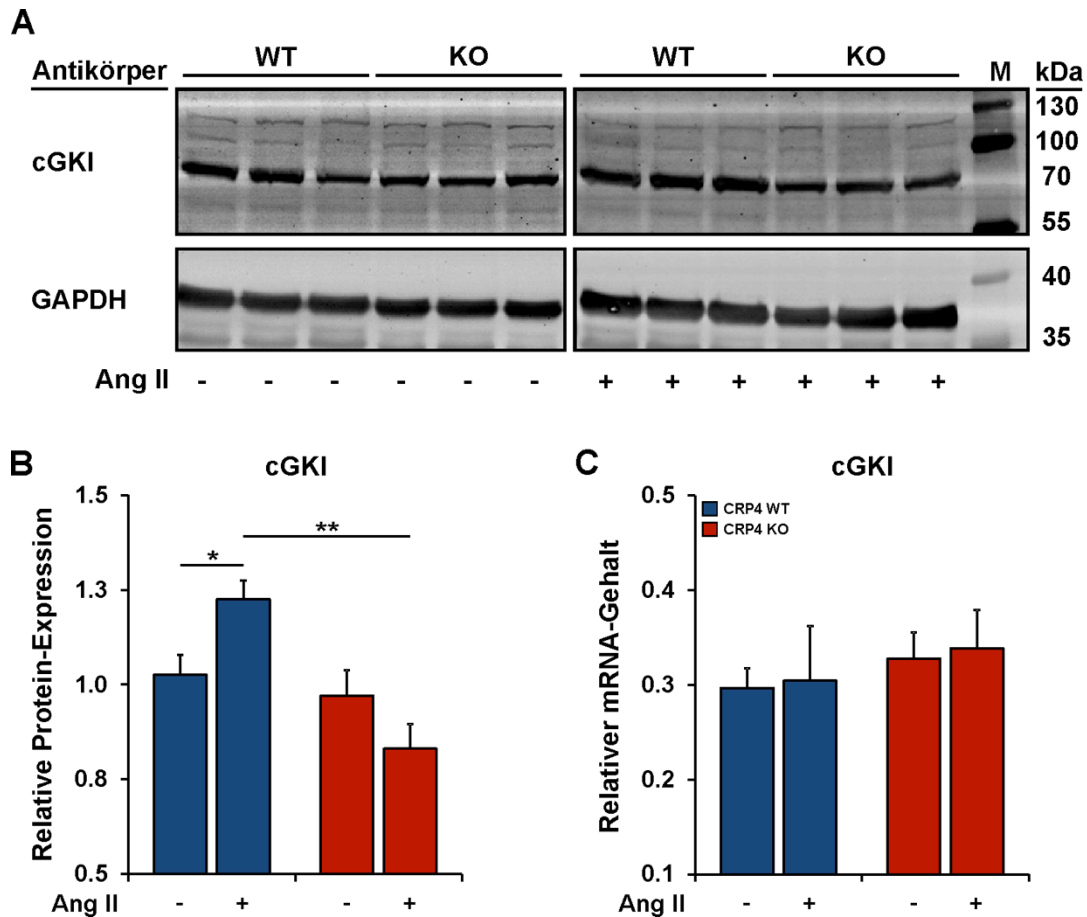
Dargestellt sind die Mittelwerte der cGMP-Konzentrationen nach 7-tägiger Ang II- bzw. NaCl-Infusion in CRP4-WT (n=9 bzw. 11) und CRP4-KO (n=11 bzw. 9) Gesamtherzlysaten nach Normierung auf das Ventrikelgewicht. Weitere Details im Text (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001).

Tatsächlich wurden signifikant erniedrigte cGMP-Spiegel in den Herzen von CRP4-KO Tieren ( $0,0119 \pm 0,0015$  pmol/mg) verglichen mit CRP4-WT Tieren ( $0,0163 \pm 0,0013$  pmol/mg) gemessen. Darüber hinaus war in beiden Genotypen ein deutlicher Anstieg der cGMP-Konzentration nach Ang II-Dauerinfusion erkennbar (s. Abb. 4.28). Diese Befunde zeigen deutliche Parallelen zu den vorangegangenen Versuchen mit den  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg/+}}$ -Tieren. Auch die kardiomyozytäre Überexpression des  $\text{AT}_1\text{R}$  führte über einen amplifizierten Ang II-Signalweg zu erhöhten kardialen cGMP-Spiegeln (s. 4.1.2). Die cGMP-Konzentration in Herzen von CRP4-KO Tieren ( $0,0193 \pm 0,0011$  pmol/mg) war überdies auch nach Ang II-Stimulation im Vergleich mit CRP4-WT Herzen ( $0,0249 \pm 0,0040$  pmol/mg) reduziert. Im Gegensatz zu den basalen cGMP-Spiegeln wurde hier das Signifikanzniveau aber nicht erreicht (s. Abb. 4.28).

#### 4.7.3 Untersuchungen zur cGKI-Expression nach Ang II-Behandlung

Nachfolgend wurde untersucht, ob die veränderten cGMP-Spiegel Auswirkungen auf den Expressionsstatus der cGKI haben (s. Abb. 4.29). In Herzen von unstimulierten bzw. NaCl-infundierten Mäusen waren in der Western Blot-Analyse keine genotyp-bedingten Unterschiede in der Expressionshöhe des cGKI-Proteins zwischen CRP4-WT ( $1,026 \pm 0,052$ ) und CRP4-KO Tieren ( $0,971 \pm 0,068$ ) detektierbar (s. Abb. 4.29 A, B). Die Infusion von Ang II führte zu einem geringen, aber signifikanten Anstieg der cGKI-Proteinmenge in CRP4-WT Herzen ( $1,226 \pm 0,049$ ). Dies ist ein weiteres Indiz für eine wahrscheinliche Kompensationsfunktion des cGMP/cGKI-Signalwegs bei Ang II-induzierter Herzmuskelhypertrophie und ebenfalls übereinstimmend mit der erhöhten cGKI-Proteinexpression im  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg/+}}$ -Mausmodell (s. 4.1.2). Im Gegensatz zu der erhöhten cGKI-Abundanz in CRP4-WT Proteinlysaten ergab die Quantifizierung der auf GAPDH normalisierten cGKI-Konzentrationen der CRP4-KO Herzen unter Ang II-Bedingungen eine eher gegenläufige Tendenz, d.h. unter der neurohumoralen Stimulation war weniger cGKI-Protein nachweisbar

als unter physiologischen Bedingungen ( $0,831 \pm 0,065$ ). Die Unterschiede bezüglich der cGKI-Proteinmenge zwischen den Genotypen nach Ang II-Infusion stellten sich demnach hochsignifikant dar (s. Abb. 4.29 A, B). Im Gegensatz zur Analyse der cGKI-Proteinlevel, wurden für die cGKI-mRNA weder genotyp- noch behandlungsspezifische Unterschiede beobachtet (s. Abb. 4.29 C).



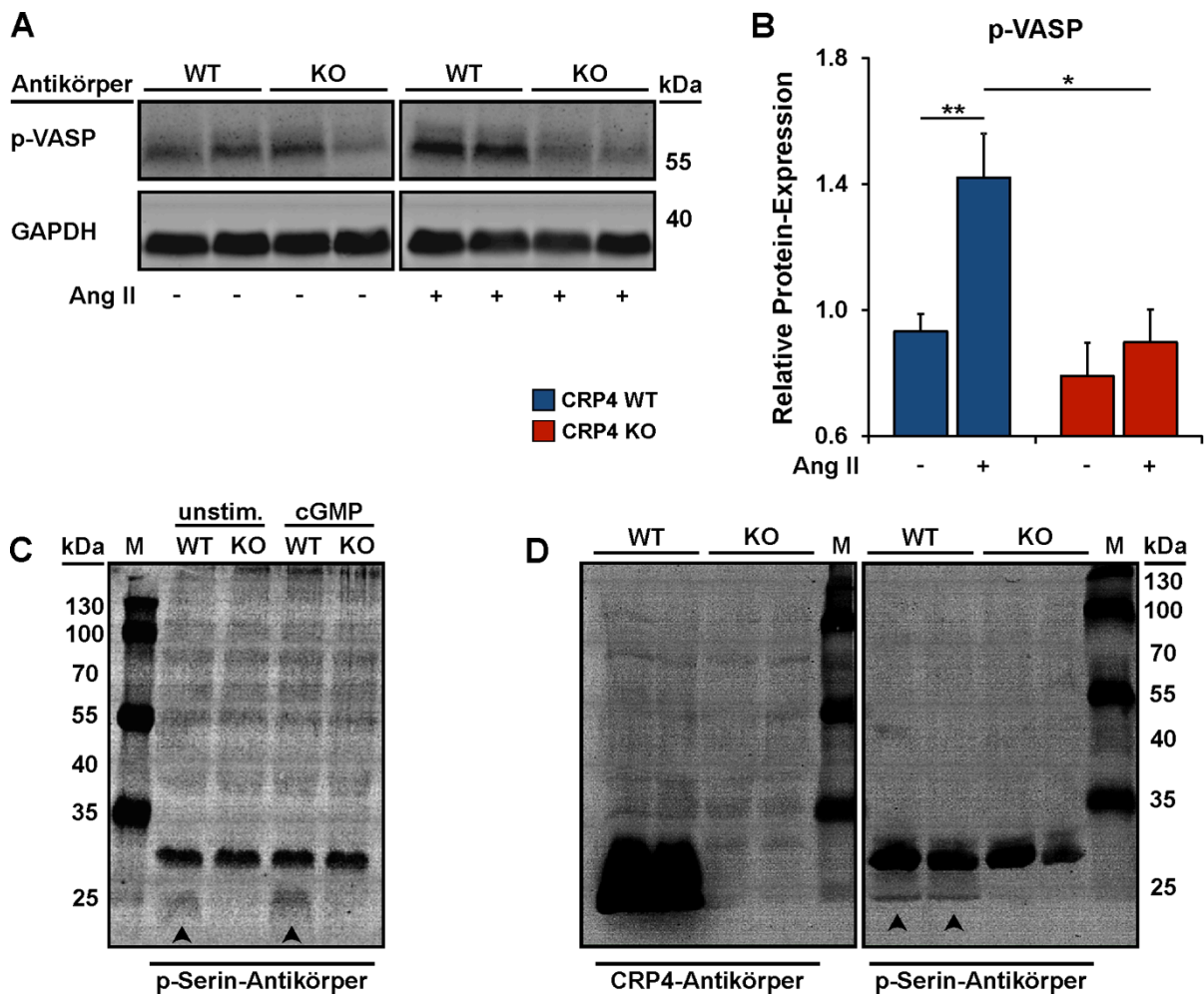
**Abb. 4.29: cGKI-Expression in CRP4-WT und CRP4-KO Herzen  $\pm$  Ang II.**

(A) Western Blot-Analyse zur Bestimmung der cGKI-Proteinmengen normiert auf GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase). (B) Die Quantifizierung der Proteinbanden von NaCl-behandelten CRP4-WT (n=5) und CRP4-KO (n=3) Tieren, sowie Ang II-behandelter Mäuse beider Genotypen (jeweils n=4) zeigte einen signifikanten Anstieg der cGKI-Proteinmenge nach Ang II-Stimulation ausschließlich in Gesamtherzlysaten von CRP4-WT Mäusen. (C) Keine Veränderungen im cGKI mRNA-Gehalt nach Analyse von jeweils n=9-12 vermessenen Proben der unterschiedlichen Genotypen  $\pm$  Ang II. HPRT diente als Referenzgen (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

#### 4.7.4 Untersuchungen zur Phosphorylierung von kardialen cGKI-Substraten in CRP4-WT und CRP4-KO Herzen

Die reduzierte cGMP-Konzentration (s. Abb. 4.28) sowie die geringeren cGKI-Proteinmengen (s. Abb. 4.29 A, B) in Herzlysaten von CRP4-defizienten Tieren implizieren auch funktionelle Konsequenzen, insbesondere für die Phosphorylierung cGMP/cGKI-abhängiger kardialer Zielproteine. Ein ubiquitäres cGKI-Substrat ist das Protein VASP. Die Phosphorylierung von VASP an Serin-239 (p-VASP) findet als gängiger Marker für die Aktivität der cGKI in zahlreichen Systemen Verwendung (Smolenski et al. 1998, Massberg et al. 1999, Lukowski

et al. 2008, Jennissen et al. 2012). Die basalen Phosphorylierungslevel von VASP in CRP4-WT ( $0,933 \pm 0,054$ ) und CRP4-KO ( $0,791 \pm 0,104$ ) Herzlysaten waren identisch (s. Abb. 4.30 A, B). Die Ang II-Infusion führte allerdings nur im CRP4-WT zu einem starken Anstieg der VASP-Phosphorylierung an Serin-239 ( $1,420 \pm 0,139$ ), während p-VASP in CRP4-KO Herzen nahezu unverändert blieb ( $0,898 \pm 0,102$ ).



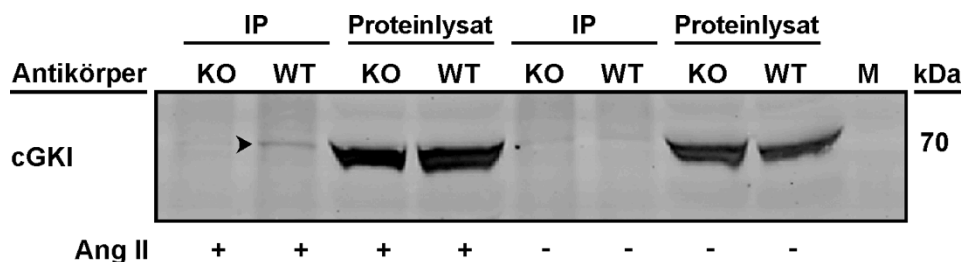
**Abb. 4.30: Phosphorylierung von VASP als Index für die Aktivität des cGMP/cGKI-Signalwegs.** (A) Repräsentativer Immunoblot zur Darstellung der VASP-Phosphorylierung an Serin-239 (p-VASP) als Marker der cGKI-Phosphorylierungsaktivität. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) zeigt eine gleichmäßige Beladung des Gels. (B) Die Quantifizierung der Proteinbanden von jeweils n=6-8 Proteinlysaten aus dem Gesamtherz von CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen  $\pm$  Ang II zeigt eine gesteigerte VASP-Phosphorylierung nach Ang II-Infusion im CRP4-WT Herz (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). (C) Repräsentativer Western Blot von Gesamtherzlysaten von CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen nach 30-minütiger Stimulation mit 8Br-cGMP und anschließender Detektion mittels P-Serin Antikörpern. Ausschließlich in CRP4-WT Herzlysaten (Pfeilspitzen) war eine Phosphorylierung bei 23 kDa, dem erwarteten Molekulargewicht von CRP4, erkennbar. (D) Eine Phosphorylierung bei 23 kDa konnte ebenso nur in CRP4-WT Herzen nach 7-tägiger Ang II-Infusion mittels P-Serin Antikörpern detektiert werden (Pfeilspitzen im rechten Teil der Abbildung). Im linken Teil des Blots wurden dieselben Proben aufgetragen und in CRP4-Antikörper inkubiert. Die Western Blots in (C) und (D) stellen ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens 3 Einzelexperimenten dar.

Diese Befunde implizieren, dass die effiziente Phosphorylierung von kardialen cGKI-Substraten möglicherweise CRP4-abhängig ist. Mittels Interaktionsstudien in Glattmuskelzellen konnte kürzlich gezeigt werden, dass CRP4 mit seinen Zinkfingern die

Kinase und anderen Proteine binden kann. Hierfür muss CRP4 selbst durch die cGKI an Serin-104 phosphoryliert werden (Huber et al. 2000, Zhang et al. 2007). Nachfolgend sollte deshalb eine mögliche Phosphorylierung von CRP4 untersucht werden. Die hierfür verwendeten P-Serin Antikörper (s. 3.4.2) detektieren u.a. phosphorylierte Serin-Reste unabhängig davon, welche Kinase diese Modifikation induziert hat (s. 3.4.2). Dennoch konnte nach Stimulation von Herzen aus CRP4-WT und CRP4-KO Tieren mit dem membrangängigen cGMP-Analogen 8Br-cGMP eine spezifische cGKI-Phosphorylierung detektiert werden (s. Abb. 4.30 C). Diese Signale waren nur im CRP4-WT auf einer Höhe von ca. 23 kDa zu sehen, was dem erwarteten Molekulargewicht von CRP4 entspricht. Des Weiteren war eine schwächere Phosphorylierung im unstimulierten CRP4-WT Herzlysate erkennbar. Sollte es sich bei diesen Proteinbanden tatsächlich um CRP4 handeln, läge das LIM-Protein sogar unter physiologischen Bedingungen im Herzen zum Teil phosphoryliert vor. Da die P-Serin Antikörper eine Vielzahl Serin- und Threonin-phosphorylierter kardialer Proteine erkennen, sind entsprechend etliche Nebenbanden im Western Blot zu erkennen. Die starken Phosphorylierungssignale, die mutmaßlich CRP4 entsprechen, waren jedoch in CRP4-KO Herzen nicht detektierbar (s. Abb. 4.30 C). Eine weitere Western Blot-Analyse wurde mit Herzen von CRP4-WT und CRP4-KO Tieren durchgeführt, welche die 7-tägige Ang II-Dauerinfusion erhalten hatten. Auch in diesen Proben war ein Phosphorylierungssignal der P-Serin Antikörper auf gleicher Höhe zur CRP4-Bande exklusiv in CRP4-WT Herzlysaten nachweisbar (s. Abb. 4.30 D). Dieser Befund impliziert, dass CRP4 in einer Ang II-induzierten kardialen Hypertrophie an Serin-104 phosphoryliert wird.

#### 4.7.5 Nachweis einer direkten Interaktion von cGKI mit CRP4 in Herzlysaten

Die verstärkte Phosphorylierungsaktivität der cGKI vor allem unter Ang II-stimulierten Bedingungen in CRP4-WT Herzen (s. Abb. 4.30 D) impliziert eine direkte Interaktion von cGKI und CRP4. Um diese Interaktion zu bestätigen, wurden Co-Immünpräzipitationsversuche (Co-IP) mit CRP4-Antikörpern gekoppelten Agarosebeads durchgeführt (s. 3.7.3). Tatsächlich konnte die cGKI als spezifischer Interaktionspartner von kardialem CRP4 nur in den aufgereinigten CRP4/CRP4-Antikörperkomplexen aus Ang II-behandelten CRP4-WT Herzlysaten mittels Western Blot identifiziert werden (s. Abb. 4.31).



**Abb. 4.31: Co-Immünpräzipitation der cGKI mit Agarosebeads-gekoppelten CRP4-Antikörpern.** Repräsentativer Western Blot zur Verifizierung der Interaktion von CRP4 und cGKI. Insbesondere in Herzen von Ang II-behandelten Tieren konnte die spezifische Interaktion bestätigt werden (Pfeilspitze). Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot von insgesamt 4 Einzelexperimenten. Weitere Erklärungen im Text.



Erwartungsgemäß war mit diesem Versuchsansatz die Co-Immunpräzipitation der cGKI in CRP4-defizienten Herzlysaten dagegen nicht möglich. Auch in den Präzipitaten von unstimulierten CRP4-WT Herzen gab es keine Hinweise auf die Interaktion von cGKI mit CRP4 (s. Abb. 4.31). Dass die Ang II-bedingte Interaktion explizit auf die hypertrophe Stimulation und nicht auf etwaige Unterschiede in der präzipitierten Proteinmenge zurückzuführen war, verdeutlicht ein repräsentativer Western Blot mit CRP4-Antikörpern im Anhang (s. Abb. 7.4 C). Hierbei wurden für beide Konditionen ( $\pm$  Ang II) dieselbe Menge CRP4-Protein aus den Proben präzipitiert. Somit waren auch für die nachfolgenden Co-IP Experimente keine Verfälschungen im Ausmaß der Anreicherung der durch CRP4 präzipitierten Interaktionspartner  $\pm$  Ang II zu erwarten.

#### **4.8 Massenspektrometrie-basierte Identifikation von kardialen CRP4-Interaktionsproteinen**

Durch die Bestätigung der Interaktion von cGKI und CRP4 mittels Co-Immunpräzipitation (s. Abb. 4.31) stellt sich die Frage nach weiteren Interaktionspartnern bzw., ob CRP4 neben der cGKI über seine Zinkfingerdomänen zu weiteren Protein-Protein-Interaktionen befähigt ist. Aufgrund des deutlichen kardialen Phänotyps der CRP4-defizienten Mäuse nach chronischer Ang II-Infusion (s. Abb. 4.16, Abb. 4.24, sowie Abb. 4.25) sollte die Identifikation neuer Interaktionspartner von CRP4 Aufschluss darüber geben, über welche Mechanismen CRP4 (und gegebenenfalls cGKI) die pro-fibrotischen und pro-hypertrophen Wachstumseffekte von Ang II im Herzmuskel antagonisiert. Darüber hinaus sind derzeit, abgesehen von der cGKI in Glattmuskelzellen (Huber et al. 2000, Zhang et al. 2007) und nach hypertropher Stimulation im Herz (s. Abb. 4.31), auch unter physiologischen Bedingungen keine direkten Interaktionspartner von CRP4 beschrieben. Die Identifikation des CRP4-Interaktoms sollte daher eine bessere proteinbiochemische Charakterisierung der Funktionen von CRP4 im Herzmuskel ermöglichen.

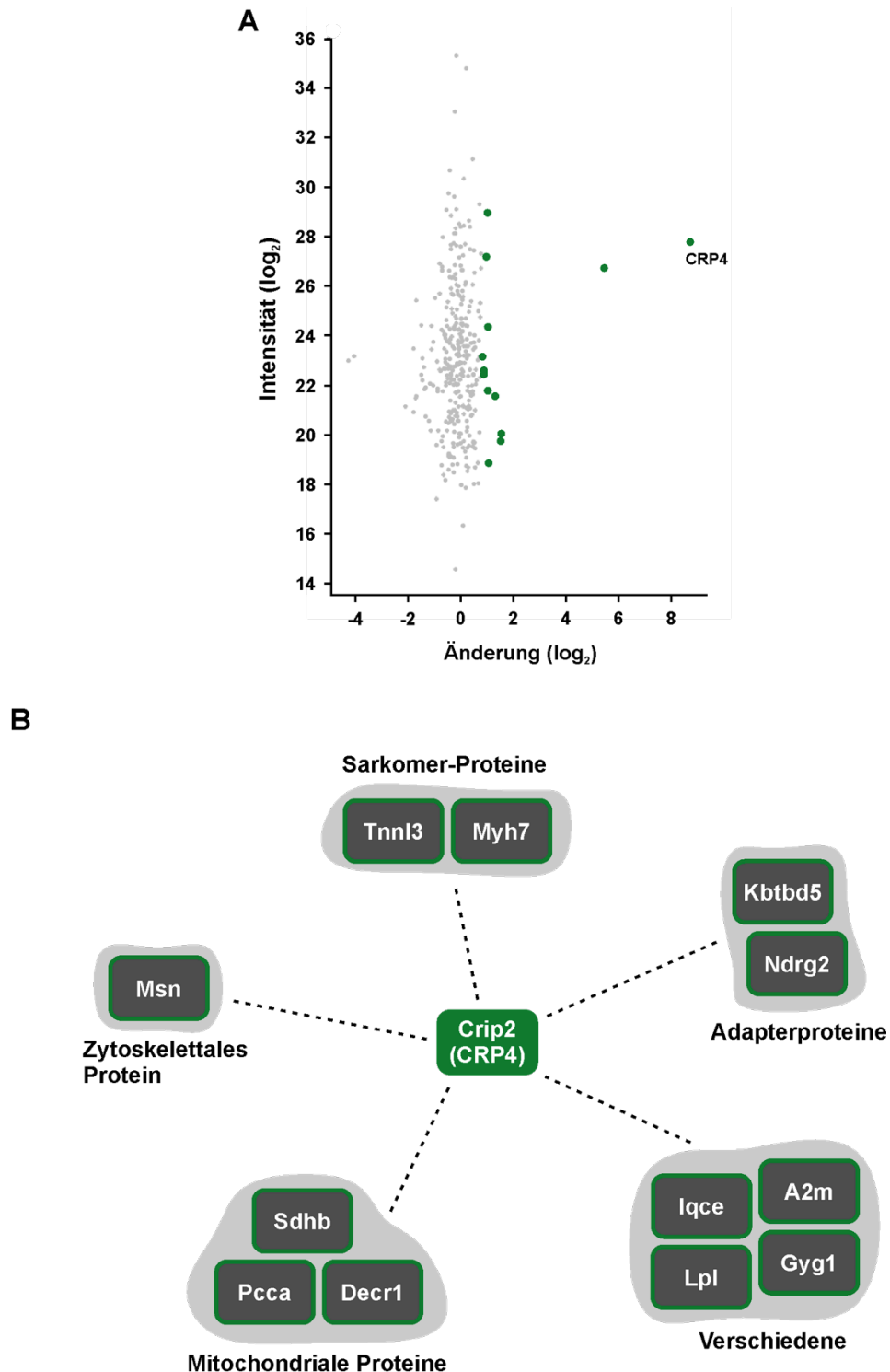
Die Massenspektrometrie ist eine bioanalytische Methode, um unter anderem Peptide in komplexen Proteingemischen durch ein Hochleistungsverfahren exakt zu identifizieren. Zunächst wurde erneut eine Co-Immunpräzipitation mit an Agarosebeads gekoppelten CRP4-Antikörpern durchgeführt. Die Proteinlysate aus dem Gesamtherz von CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen wurden über Nacht mit den Agarosebeads inkubiert. In dieser Zeit bindet CRP4 (sofern vorhanden) unter den hier verwendeten Puffer- bzw. Bindungsbedingungen (s. 2.4.6 und 3.7.3) zusammen mit direkten und indirekten Interaktionsproteinen an die spezifischen CRP4 Antikörper auf den Agarosebeads. Der entstandene Proteinkomplex wurde nach mehreren Waschschritten anschließend von den nicht gebundenen Proteinen im Lysat getrennt. Nach Elution mittels Glycin wurde das CRP4-Interaktom im Proteom-Forschungszentrum für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Tübingen (AG Dr. Karsten Boldt) massenspektrometrisch aufgetrennt und analysiert. Das Ziel dieser Experimente war letztlich, durch den direkten Vergleich von gesunden (bzw. NaCl-behandelten) sowie hypertrophen (bzw. Ang II-behandelten) Herzen der CRP4-WT bzw. CRP4-KO Tiere die

kontextspezifischen Änderungen sowie die Dynamik des CRP4-Interaktoms zu entschlüsseln.

#### **4.8.1 Identifikation des kardialen CRP4-Interaktoms unter physiologischen Bedingungen**

Zur massenspektrometrischen Identifizierung von kardialen Interaktionsproteinen wurden sowohl unter physiologischen als auch unter hypertrophen, Ang II-stimulierten Bedingungen (s. 4.8.2) jeweils 6 Herzen pro Genotyp und Behandlung einbezogen. Zu Beginn der LC-MS/MS basierten Identifizierung der CRP4-Interaktomsproteine wurden alle 24 Probenlysate (6x WT NaCl-stimuliert, 6x KO NaCl-stimuliert, 6x WT Ang II-stimuliert, 6x KO Ang II-stimuliert) parallel zunächst einem tryptischen Verdau unterzogen, ionisiert und in den verschiedenen Einheiten des LC-MS/MS-Systems gemäß ihrem Masse-Ladungsverhältnis aufgetrennt und detektiert. Die erhaltenen Peptidfragmente wurden den entsprechenden Interaktionsproteinen zugeordnet und zur Ermittlung der Abundanz signifikant angereicherter CRP4-Interaktoren zwischen den Genotypen verglichen. Diese Analyse und die Erstellung der Streudiagramme erfolgte mit der Software *Perseus* (MaxQuant).

Abb. 4.32 zeigt spezifische Interaktionspartner von CRP4 unter physiologischen Bedingungen. Grün markierte Punkte in dem Streudiagramm (s. Abb. 4.32 A) stellen hierbei all die Proteine aus sämtlichen LC-MS/MS-detektierbaren Proteinen (grau) dar, die im Vergleich zu den CRP4-KO Immunpräzipitationen nur in den CRP4-WT Proben signifikant angereichert waren und somit spezifische CRP4-Interaktoren darstellen. Hierbei wurden alle Interaktionspartner mit einem p-Wert kleiner 0,05 berücksichtigt (Eine detaillierte Aufstellung der gesamten Proteine im CRP4-WT/KO Immunpräzipitat ist im Anhang dargestellt, s. Tab. 7.1). Die Intensität (y-Achse) in den Streudiagrammen ist ein Maß für die Anzahl der Peptide, die für ein bestimmtes Protein in den IP-Lysaten mittels LC-MS/MS ermittelt wurden. Die Auswertung ergab für CRP4, dem primären Faktor des Interaktionsnetzwerks, die abundantesten Proteinmengen in der CRP4-WT Probe (Abb. 4.32 A, rechter Teil des Diagramms), was zugleich die Validität dieser Methode bestätigt. Des Weiteren wurden die identifizierten Proteine gemäß ihrer Funktion bzw. Lokalisation in verschiedene Gruppen eingeteilt (s. Abb. 4.32 B). Interessanterweise ließ sich in den CRP4-WT Proben eine signifikante Anreicherung von Proteinen des kontraktile Apparates (Troponin I und Myosin 7) sowie von Strukturproteinen des Zytoskeletts (Moesin) beobachten. Neben verschiedenen weiteren Interaktoren, deren Funktion im Herzen nur teilweise bekannt ist, wie beispielsweise Iqce, ein Protein mit EF-Hand-Motiven, wurden außerdem einige Adapterproteine sowie mitochondriale Proteine und Proteine des kardialen Stoffwechsels (Glycogenin1 und Lipoproteinlipase) als spezifische CRP4-Interaktoren identifiziert (s. Abb. 4.32 B)

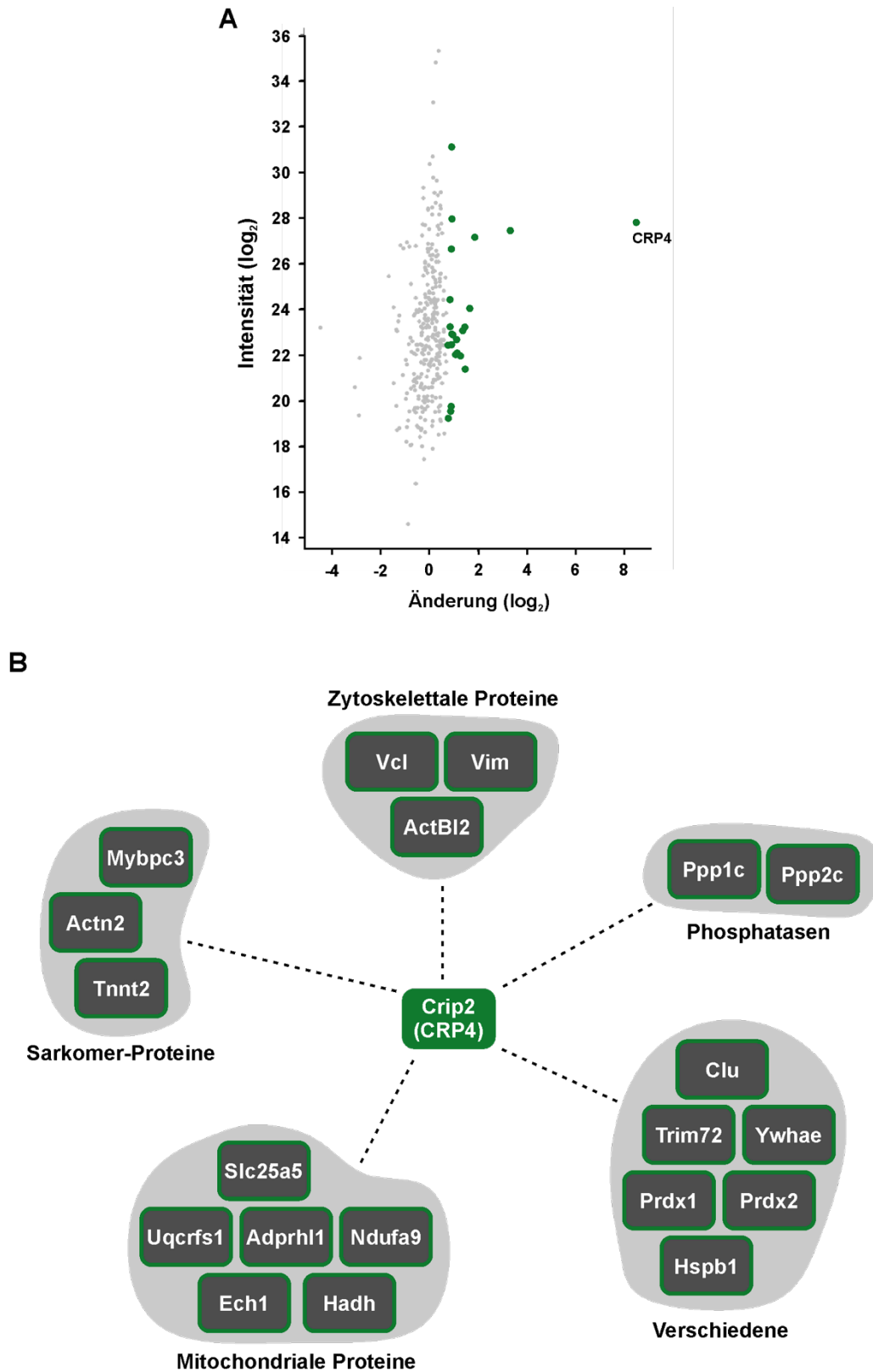


**Abb. 4.32: Massenspektrometrisch detektierte CRP4-Interaktoren unter Basalbedingungen.**

(A) Streudiagramm zur Darstellung der signifikant angereicherten Proteine nach Analyse der IP-Lysate aus jeweils  $n=6$  Herzen pro Genotyp mittels LC-MS/MS (grün). Graue Punkte repräsentieren die Gesamtheit aller detektierbaren Proteine im IP-Lysat, die nicht signifikant im CRP4-WT angereichert waren. CRP4 selbst, als sogenanntes „Köderprotein“, ist erwartungsgemäß das abundanteste Protein im IP-Lysat. (B) Einteilung der identifizierten CRP4-Interaktionspartner in verschiedene Gruppen gemäß ihrer Lokalisation bzw. Funktion. Im Schaubild sind die offiziellen internationalen Bezeichnungen der Proteine dargestellt. *Msn*: Moesin; *TnnI3*: Troponin I; *Myh7*: Myosin heavy chain 7; *Kbtbd5*: Kelch repeat and BTB domain containing protein 5, Sarcosynapsin; *Ndr2*: N-Myc downstream-regulated gene 2; *Sdhb*: Succinate dehydrogenase complex, subunit B; *Pcca*: Propionyl-Coenzyme A carboxylase alpha subunit; *Decr1*: 2,4-dienoyl CoA reductase 1; *Iqce*: IQ motif containing protein E; *A2m*: Alpha-2-macroglobulin; *Lpl*: Lipoprotein lipase; *Gyg1*: Glycogenin-1.

### 4.8.2 Analyse des CRP4-Interaktoms nach Angiotensin II-induzierter Herzhypertrophie

Bei der simultanen Untersuchung von IP-Lysaten aus Herzen Ang II-behandelter CRP4-WT/KO Geschwistertiere wurden folgende Interaktionsproteine identifiziert (s. Abb. 4.33).



**Abb. 4.33: CRP4-Interaktom nach 7-tägiger Ang II-Infusion.**

(A) Streudiagramm zur Darstellung der Interaktionspartner von CRP4 nach Infusion von Ang II in CRP4-WT (n=6) und CRP4-KO Mäusen (n=6). Die grün hervorgehobenen Proteine wurden mittels LC-MS/MS unter allen detektierbaren Proteinen der IP-Lysate (grau) als signifikant angereichert und somit als spezifische CRP4-Interaktionspartner ermittelt. CRP4 selbst, als sogenanntes „Köderprotein“, ist erwartungsgemäß das abundanteste Protein im IP-Lysat. (B) Lokalisations-, bzw. funktionsorientierte Anordnung der identifizierten CRP4-Interaktoren. Im Schaubild sind die offiziellen internationalen Bezeichnungen der Proteine dargestellt. *Mybpc3*: Myosin-binding protein C3; *Actn2*: Alpha-2-actinin; *Tnnt2*: Troponin T; *Vcl*: Vinculin; *Vim*: Vimentin; *Actl2*: Beta-actin-like protein 2; *Ppp1cb;ca;cc*: Protein phosphatase 1, catalytic subunits; *Ppp2cb;ca*: Protein phosphatase 2, catalytic subunits; *Clu*: Clusterin; *Trim72*: Tripartite motif-containing protein 72; *Ywhae*: 14-3-3-epsilon, Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon isoform; *Prdx1*: Peroxiredoxin 1; *Prdx2*: Peroxiredoxin 2; *Hspb1*: Heat-shock protein 27; *Slc25a5*: Solute carrier family 25 member A5, ADP/ATP Translocase 2; *Uqcrcs1*: Ubiquinol-cytochrome c reductase; *Adprh1*: ADP-ribosylhydrolase like 1; *Ndufa9*: NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 alpha subcomplex 9; *Ech1*: Enoyl coenzyme A hydratase 1; *Hadh*: Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase.

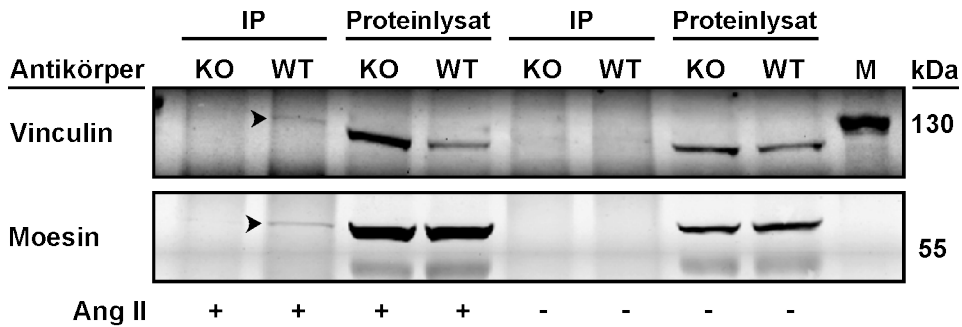
Zunächst fällt auf, dass sich die Zahl der Interaktionspartner von CRP4 in den CRP4-WT Herzlysaten nach Ang II-Infusion beinahe verdoppelt hat. Generell führt die Ang II-Stimulation zu einem völlig umgestalteten CRP4-Interaktom, denn keiner der basal identifizierten Interaktoren (s. Abb. 4.32) konnte auch in den hypertroph-umgestalteten Herzen nachgewiesen werden (s. Abb. 4.33). Übereinstimmend mit dem basalen Interaktom waren aber auch in Ang II-stimulierten Herzen viele Proteine des Sarkomers, des Zytoskeletts und der Mitochondrien als Bindungspartner detektierbar (s. Abb. 4.33 B). Darüber hinaus wurden Untereinheiten verschiedener Phosphatasen als Interaktoren identifiziert. Dies deutet wiederum auf eine erfolgte Phosphorylierung von CRP4 oder ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von CRP4 während des Ang II-induzierten Myokardwachstums hin (Eine Aufstellung aller Proteine im CRP4-WT/KO Immunpräzipitat nach Ang II-Infusion ist im Anhang dargestellt, s. Tab. 7.1).

**4.8.3 Bestätigung ausgewählter CRP4-Interaktoren mittels Immunoblot**

Um die massenspektrometrisch erhaltenen Interaktionsproteine zu bestätigen und die Interaktion durch eine alternative Methode darzustellen, wurden verschiedene CRP4-Bindungspartner zusätzlich mittels Western Blot untersucht. Hierbei wurden vor allem Proteine berücksichtigt, deren Mutationen (in Mensch und/oder Maus) zu hypertrophen oder dilatativen Kardiomyopathien führen (Knoll et al. 2011, Ho et al. 2015) und somit in dem hier untersuchten Zusammenhang am interessantesten erschienen. Bis auf den finalen Elutionsschritt (s. 3.7.3), in dem die präzipitierten Proteine in einem SDS-haltigen Probenpuffer denaturiert wurden, wurden die Immunpräzipitationen für die Immunoblots nach demselben Schema wie für die Massenspektrometrie hergestellt (die Effektivität beider Elutionsverfahren ist im Anhang dargestellt, s. Abb. 7.4).

Zunächst wurden mit Vinculin und Moesin zwei Proteine des Costamers untersucht (s. Abb. 4.34). An diesen zellulären Strukturen sind bereits eine Vielzahl weiterer LIM-Proteine lokalisiert worden (Li et al. 2012). Vinculin und Moesin als potentielle CRP4-Interaktoren sind wichtig für die exakte Organisation des Zytoskeletts und die Übersetzung von extrazellulären Signalen in das Zellinnere (Cutroneo et al. 2012, Jiang et al. 2014). Für Vinculin wurde die in

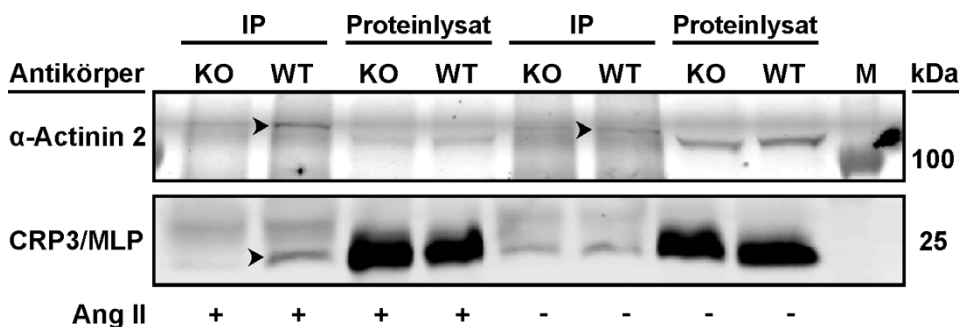
der LC-MS/MS-Analyse als hochsignifikant ermittelte Interaktion nach Ang II-Behandlung eindeutig bestätigt (s. Abb. 4.34). Spezifische Vinculin-Signale konnten nur in den IP-Lysaten von CRP4-WT Herzen nach Ang II-Infusion detektiert werden. Im Vergleich zu Vinculin war die Interaktion mit Moesin in der LC-MS/MS-Analyse zumindest unter Basalbedingungen deutlicher ausgefallen, im Immunoblot konnte allerdings nur die Bindung an CRP4 nach Stimulation mit Ang II nachgewiesen werden (s. Abb. 4.34).



**Abb. 4.34: Vinculin und Moesin sind zytoskelettale Interaktionspartner von CRP4.**

Repräsentative Western Blots der Co-IP von CRP4 mit Vinculin (Pfeilspitze oberer Blot) und Moesin (Pfeilspitze unterer Blot) zeigen eine deutliche Interaktion nach Stimulation mit Ang II spezifisch in IP-Lysaten von CRP4-WT Herzen.

$\alpha$ -Actinin 2 und CRP3/MLP sind wichtige Proteine der Z-Scheiben, die zu beiden Seiten das Sarkomer als kontraktile Einheit begrenzen (Luther 2009).  $\alpha$ -Actinin 2 ist hierbei ein zentrales Protein zur Verankerung weiterer Myofilamente (Sjoblom et al. 2008), unter anderem auch für CRP3/MLP, einem wichtiger Mechanosensor in Kardiomyozyten (s. 1.4.2). Eine Interaktion von CRP4 und  $\alpha$ -Actinin 2 konnte sowohl unter Basalbedingungen als auch nach Ang II-Infusion in den Immunpräzipitaten detektiert werden, wobei das Ausmaß der Interaktion unter stimulierten Bedingungen bedeutender zu sein scheint (s. Abb. 4.35).



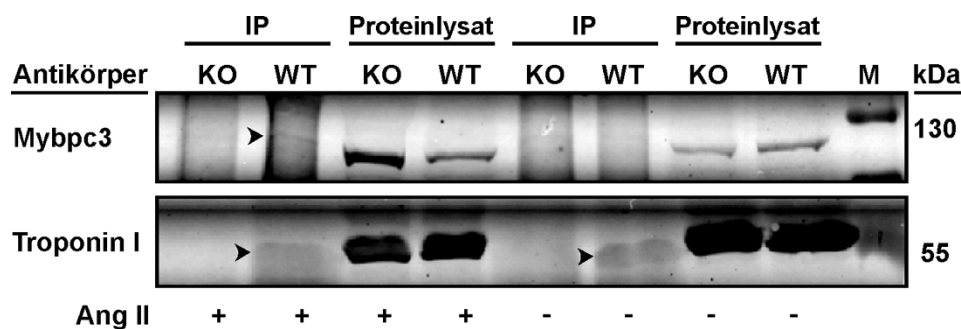
**Abb. 4.35: CRP4 bindet an die Z-Scheiben Proteine  $\alpha$ -Actinin 2 und CRP3/MLP.**

Repräsentative Immunoblots zeigen eine Interaktion von CRP4 mit  $\alpha$ -Actinin 2 unter Basalbedingungen, die nach Ang II-Infusion noch verstärkt ist (Pfeilspitzen oberer Blot). In CRP4-WT Herzlysaten lässt sich außerdem durch Ang II-Infusion die Bildung von Proteinkomplexen induzieren, die sowohl CRP4 als auch CRP3/MLP enthalten (Pfeilspitze unterer Blot).

Das CRP4-Schwesterprotein CRP3/MLP lag nach Ang II-Infusion in der LC-MS/MS Analyse angereichert vor, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (s. Anhang, Tab. 7.1). Dies könnte möglicherweise auf eine unspezifische Bindung von CRP3/MLP an die Agarosebeads zurückzuführen sein. In der Tat waren in allen Proben, insbesondere auch in CRP4-defizienten IP-Lysaten, unter Basalbedingungen schwache CRP3/MLP-Signale nachweisbar.

Darüber hinaus lässt sich feststellen, dass die Expression von CRP3/MLP in den Proteinlysaten generell sehr hoch ist (s. Abb. 4.35). Dennoch war eine verstärkte Anreicherung von CRP3/MLP in CRP4-WT IP-Lysaten nach Ang II-Stimulation detektierbar. Diese Befunde implizieren eine direkte Interaktion von CRP4 mit CRP3/MLP.

Mit dem Myosin-Bindeprotein C3 (Mybpc3) und Troponin I wurden mittels LC-MS/MS zwei CRP4-Interaktoren identifiziert, die direkt an der Herzmuskelkontraktion beteiligt sind. Mutationen in Mybpc3 und Troponin I sind ebenfalls sogenannte genetische *Hotspots* für die Entwicklung hereditärer Kardiomyopathien (Garcia-Castro et al. 2009). Für Mybpc3 war mittels LC-MS/MS insbesondere eine Anreicherung in CRP4-WT IP-Lysaten nach Ang II-Stimulation ermittelt worden. Obwohl die kardiale Mybpc3-Expression insgesamt gering ist, war es möglich, im Immunoblot diese spezifische Bindung zu bestätigen (s. Abb. 4.36). Troponin I interagiert mit CRP4 vor allem unter Basalbedingungen in gesunden CRP4-WT Herzen, während das Ausmaß der Interaktion in den IP-Lysaten von Ang II-behandelten Tieren geringer ausfiel. Auch diese Befunde stimmen mit den LC-MS/MS-Befunden überein und sind als weitere Bestätigung der Validität dieser Methode insgesamt zu verstehen.



**Abb. 4.36: Bestätigung der Interaktion von CRP4 mit Mybpc3 und Troponin I.**

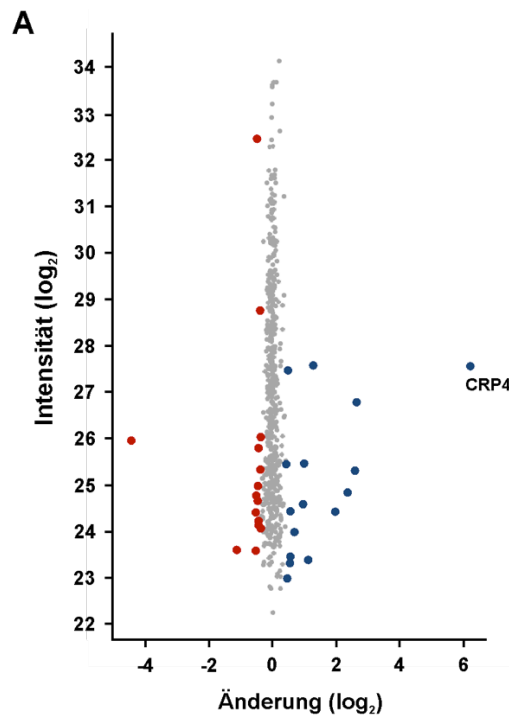
Repräsentative Western Blots nach CRP4-Immünpräzipitation zur Bestätigung der Interaktion von CRP4 mit dem Myosin-Bindeprotein C3 (Mybpc3) nach Ang II-Infusion (Pfeilspitze oberer Blot) und der Bindung von CRP4 an Troponin I primär unter Basalbedingungen (Pfeilspitzen unterer Blot).

## 4.9 Massenspektrometrische Analyse des CRP4-Proteoms

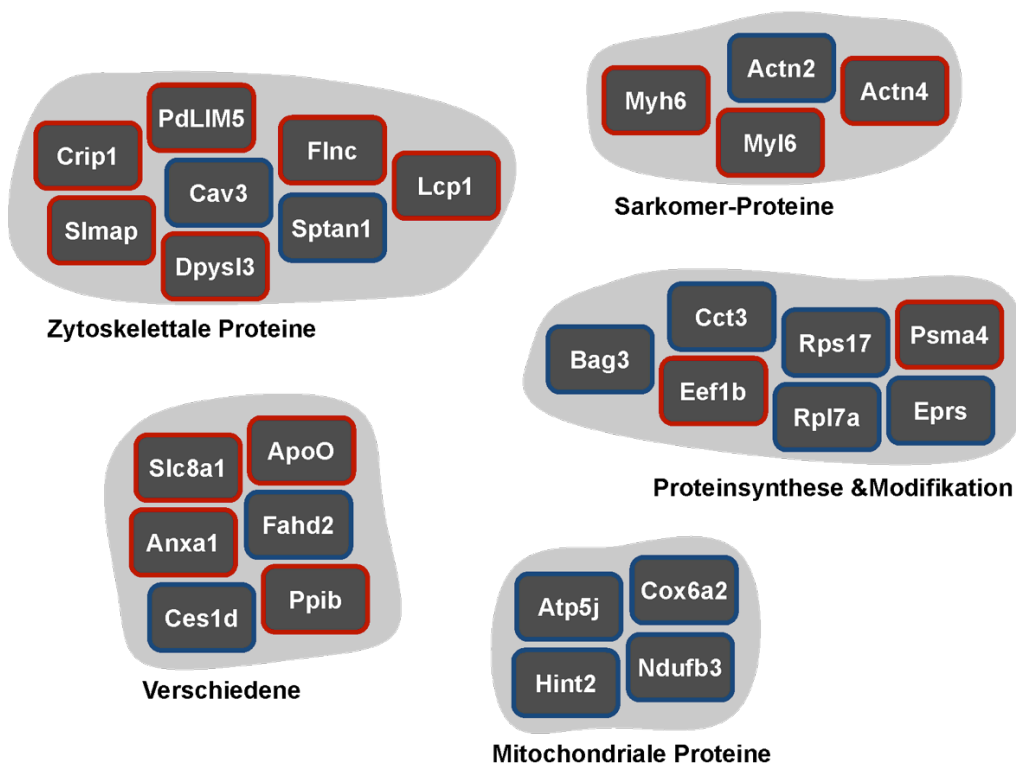
Analog der Experimente zur Identifikation von spezifischen CRP4-Interaktionspartnern (s. 4.8) wurde auch eine massenspektrometrisch basierte Proteom-Analyse der Gesamtherzen durchgeführt. Auf diese Weise soll untersucht werden, ob die Expression von kardialen Proteinen in Abhängigkeit von CRP4  $\pm$  Ang II reguliert wird. Aus Untersuchungen an Glattmuskelzellen ist bekannt, dass CRP4 mit Transkriptionsfaktoren interagiert und so die Expression von glattmuskelspezifischen Genen beeinflusst (Zhang et al. 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits CRP4-abhängige Änderungen im kardialen mRNA-Gehalt von BNP beobachtet (s. Abb. 4.26 D). Für diese vergleichende Proteomanalyse wurden jeweils 100  $\mu$ l des Gesamtherzlysats  $\pm$  Ang II beider Genotypen nicht der Co-IP (s. 4.8) zugeführt, sondern direkt für die proteomische Analyse verwendet. Hierfür wurden umgerechnet 2  $\mu$ g Protein pro Probe mittels LC-MS/MS analysiert. Auf diese Weise war es möglich, von demselben Tier Aussagen zu Interaktion (s. 4.8) und Expression (nachfolgend) zu erhalten.

### 4.9.1 Vergleichende Proteomanalyse von CRP4-WT und CRP4-KO Herzen

Zunächst wurde das CRP4-Proteom unter Basalbedingungen mittels LC-MS/MS analysiert. Innerhalb der Gesamtmenge aller detektierbaren Proteine (grau, s. Anhang, Tab. 7.2) stehen blau eingefärbte Punkte für Proteine, die nach der Quantifizierung signifikant in CRP4-WT Herzen angereichert waren. Im Streudiagramm rot markierte Proteine sind aufgrund der Ablation von CRP4, d.h. in CRP4-KO Herzen, signifikant hochreguliert (s. Abb. 4.37 A).



#### B



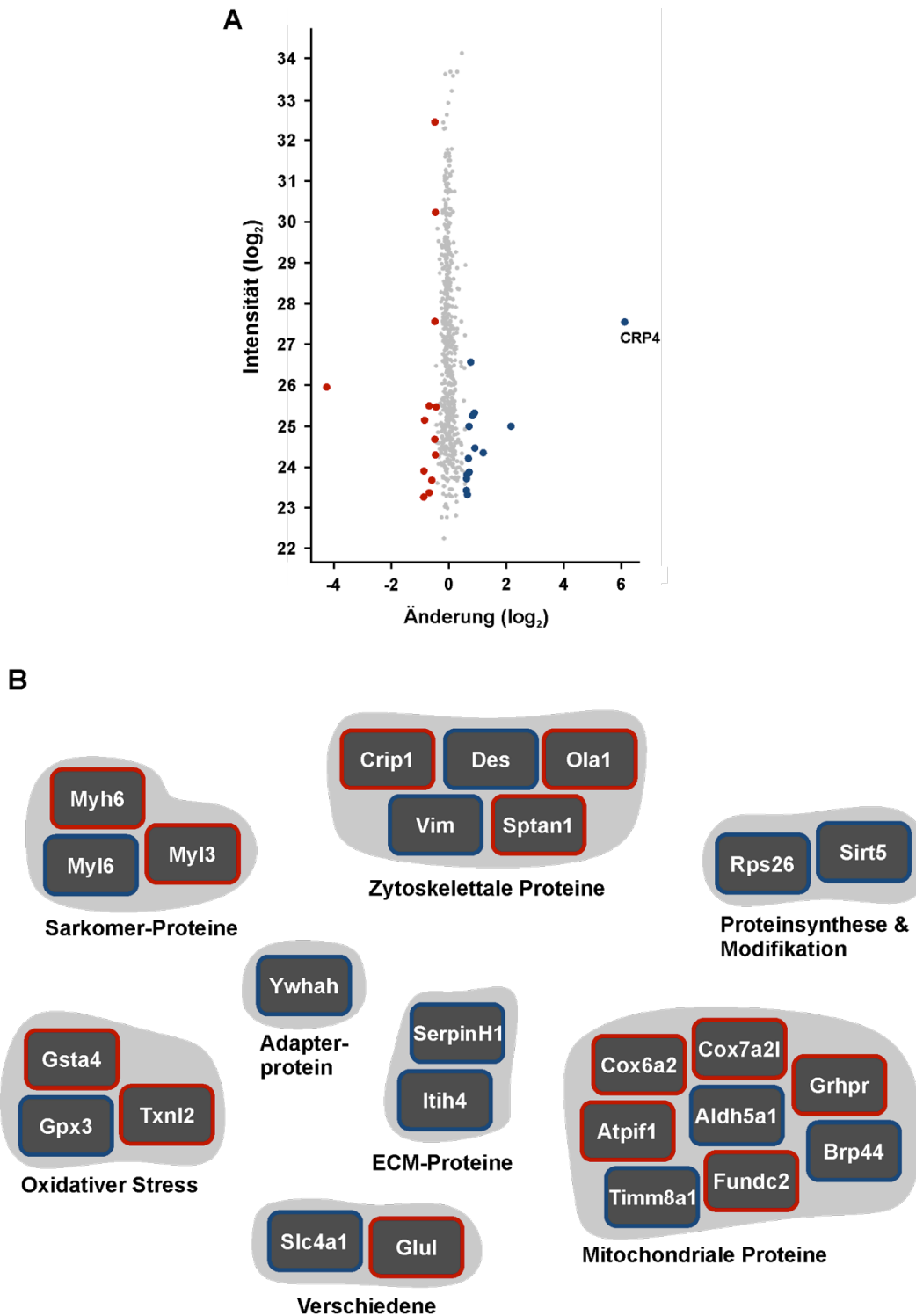


**Abb. 4.37: Vergleichende Proteomanalyse von unbehandelten CRP4-WT und CRP4-KO Herzen.**  
 (A) Streudiagramm massenspektrometrisch ermittelter Proteine aus dem Gesamtherzlysat von jeweils n=6 Tieren pro Genotyp. Graue Punkte stellen die Grundgesamtheit aller detektierbaren Proteine dar. Blau hervorgehoben sind die in CRP4-WT Herzen signifikant angereicherten Proteine. Die Expression der rot markierten Proteine war dagegen in CRP4-KO Herzen signifikant erhöht (B) Lokalisations- bzw. funktionsorientierte Gruppierung der CRP4-abhängig regulierten kardialen Proteine (Blauer Rahmen: Anreicherung in CRP4-WT Herzen; Roter Rahmen: Anreicherung in CRP4-KO Herzen). In der Darstellung wurden die offiziellen internationalen Bezeichnungen der Proteine verwendet. *Crip1*: Cysteine-rich intestinal protein 1; *PdLIM5*: PDZ and LIM domain protein 5; *Cav3*: Caveolin 3; *Finc*: Filamin C; *Smap*: Sarcolemmal associated protein; *Dpysl3*: Dihydropyrimidinase-like 3; *Sptan1*: Spectrin alpha, non-erythrocytic 1; *Lcp1*: Lymphocyte cytosolic protein 1; *Myh6*: Myosin heavy chain 6; *Actn2*: Alpha-2-actinin; *Actn4*: Alpha-4-actinin; *Myl6*: Myosin light chain 6; *Bag3*: BCL2-associated athanogene 3; *Cct3*: Chaperonin containing T-complex polypeptide 1, subunit 3; *Eef1b*: Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2; *Rps17*: Ribosomal protein S17; *Rpl7a*: Ribosomal protein L7A; *Psm4*: Proteasome subunit, alpha type, 4; *Eprs*: Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase; *Atp5j*: Mitochondrial ATP synthase, subunit F6; *Cox6a2*: Cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2; *Hint2*: Histidine triad nucleotide binding protein 2; *Ndufb3*: NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 beta subcomplex 3; *Slc8a1*: Sodium-calcium exchanger 1, NCX1; *ApoO*: Apolipoprotein O; *Anxa1*: Annexin A1; *Fahd2*: Fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A; *Ces1d*: Carboxylesterase 1D; *Ppib*: Peptidylprolyl isomerase B, Cyclophilin B.

Die Fokussierung der nicht regulierten (grau) Proteine im Streudiagramm (s. Abb. 4.37 A) impliziert eine gute Reproduzierbarkeit der insgesamt 6 unabhängig durchgeführten Versuche. Die Intensität ist ein Maß für die Anzahl der Peptide, die einem bestimmten Protein nach der LC-MS/MS-Analyse zugeordnet werden konnten. Je höher also die Signalintensität, desto abundanter ist dieses Protein im Herz exprimiert. Zu beachten ist, dass bei diesem Experiment keine Vorfraktionierung durchgeführt wurde. Mit diesen Voreinstellungen sind daher nur die insgesamt abundantesten kardialen Proteine detektierbar. CRP4 ist generell stark im Myokard exprimiert und war erwartungsgemäß auch nur in CRP4-WT Lysaten nachweisbar. Aus diesem Grund ist CRP4 nach der Quantifizierung gegenüber den CRP4-KO Lysaten im rechten Teil des Streudiagramms wiederzufinden, was gleichzeitig als interne Kontrolle und als Bestätigung der Validität der Methode anzusehen ist (s. Abb. 4.37 A). Im linken Teil des Streudiagramms ist dementsprechend ein Protein rot markiert, das massiv in Herzlysaten von CRP4-KO Mäusen angereichert war. Hierbei handelt es sich um ein Protein mit der genetischen Bezeichnung *Crip 1* (Cysteine-rich intestinal protein 1); dieses wird ausführlich in Kapitel 4.9.4 beschrieben. Nach Gruppierung der identifizierten Proteine gemäß ihrer Funktion und/oder Lokalisation im Kardiomyozyt (s. Abb. 4.37 B) konnten wiederum viele zytoskelettale Proteine und Bestandteile des Sarkomers als CRP4-abhängig reguliert ermittelt werden. So waren Isoformen der schweren (*Myh6*) und der leichten Myosinketten (*Myl6*) signifikant in CRP4-KO Herzen angereichert. Darüber hinaus war  $\alpha$ -Actinin 2, das zudem als CRP4-Interaktionspartner identifiziert wurde (s. Abb. 4.35), vermehrt in CRP4-WT Lysaten detektierbar. Eine Kompensation durch verstärkte  $\alpha$ -Actinin 4-Expression im CRP4-KO ist bei dieser nicht-muskulären Isoform zumindest in Myozyten ausgeschlossen. Mit Caveolin 3 (*Cav3*) war zudem ein Protein in CRP4-KO Lysaten reduziert, das mit der Entwicklung von Kardiomyopathien assoziiert ist (Hayashi et al. 2004). Mit Ausnahme der mitochondrialen Proteine zeigten die meisten regulierten Proteine eine verstärkte Anreicherung in CRP4-KO Herzen. Interessanterweise waren auch Proteine reguliert, die selbst in die Synthese (*Eprs*, *Rps17*), der Modifikation (*Cct3*) und Degradation (*Psm4*) anderer Proteine involviert sind.

### 4.9.2 CRP4-abhängige Proteinregulation bei Ang II-induzierter Hypertrophie

Die Identifikation der Interaktionsproteine (s. 4.8.1 und 4.8.2) offenbarte unterschiedliche Bindungspartner für CRP4 unter Basalbedingungen und nach Ang II-Dauerinfusion. Um auch Änderungen in der kardialen Proteinexpression aufgrund der neurohumoralen Stimulation zu identifizieren, wurden ebenfalls Lysate von CRP4-WT und CRP4-KO Herzen nach Ang II-Behandlung massenpektrometrisch analysiert (s. Abb. 4.38).



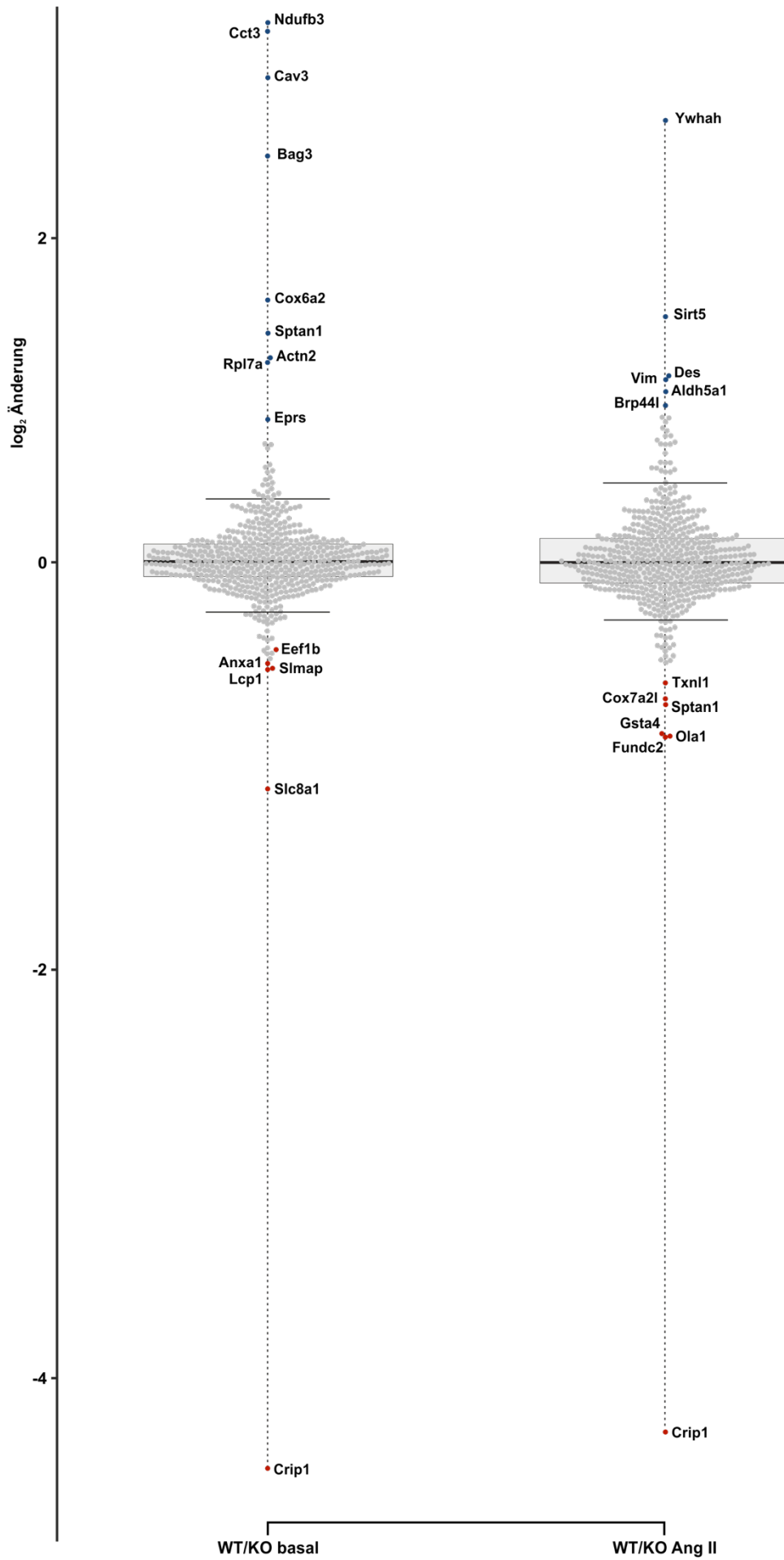
**Abb. 4.38: CRP4-abhängige Proteinexpression nach Ang II-Infusion.**

(A) Darstellung der massenspektrometrisch ermittelten Proteine aus Ang II-stimulierten Herzen von jeweils n=6 Tieren pro Genotyp. Im Streudiagramm sind die nicht differentiell regulierten Proteine (grau) sowie signifikant im CRP4-WT (blau) und CRP4-KO (rot) angereicherten Proteine abgebildet. (B) Lokalisations- bzw. funktionsorientierte Gruppierung aller CRP4-abhängig regulierter kardialer Proteine (Blauer Rahmen: Anreicherung in CRP4-WT Herzen; Roter Rahmen: Anreicherung in CRP4-KO Herzen). In der Abbildung wurden die offiziellen internationalen Bezeichnungen der Proteine verwendet. *Myh6*: Myosin heavy chain 6; *Myl6*: Myosin light chain 6; *Myl3*: Myosin light chain 3; *Crip1*: Cysteine-rich intestinal protein 1; *Des*: Desmin; *Ola1*: Olg-like ATPase 1; *Vim*: Vimentin; *Sptan1*: Spectrin alpha, non-erythrocytic; *Ywhah*: Brain protein 14-3-3-eta, Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide; *SerpinH1*: Serine (or cysteine) peptidase inhibitor clade H member 1, collagen-binding protein 2, Colligin 2; *Itih4*: Inter alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4, Plasma kallikrein-sensitive glycoprotein 120; *Rps26*: Ribosomal protein S26; *Sirt5*: Sirtuin 5; *Cox6a2*: Cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2; *Cox7a2l*: Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2-like; *Atpif1*: ATPase inhibitory factor 1; *Aldh5a1*: Aldehyde dehydrogenase family 5 member A1; *Grhpr*: Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase; *Timm8a1*: Translocase of inner mitochondrial membrane 8A1; *Fundc2*: FUN14 domain containing 2; *Brp44*: Brain protein 44; *Slc4a1*: Solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1; *Glul*: Glutamate-ammonia ligase, glutamine synthetase; *Gsta4*: Glutathione S-transferase, alpha 4; *Gpx3*: Glutathione peroxidase 3; *Txn1l*: Thioredoxin-like 1.

Tatsächlich waren nur Isoformen der leichten (*Myl6*) und der schweren Myosinketten (*Myh6*), sowie das Protein *Crip1* (s. 4.9.4) sowohl unter unstimulierten (s. 4.9.1) als auch unter hypertropher Ang II-Stimulation reguliert. Im Vergleich zu den Basalbedingungen (s. Abb. 4.37) waren deutliche Unterschiede in der genotyp-spezifischen Abundanz signifikant regulierter Proteine des Zytoskeletts erkennbar (s. Abb. 4.38). Mit Desmin (*Des*) und Vimentin (*Vim*) lagen hier zwei strukturgebende, zytoskelettale Proteine signifikant reduziert in CRP4-KO Herzen vor. Nur wenige Faktoren, die in die Prozessierung und Modifikation von Proteinen involviert sind (*Sirt5*, *Rps26*), waren unter den Ang II-stimulierten Bedingungen differenziert exprimiert. Im Gegensatz hierzu zeigte sich eine signifikante Anreicherung von Faktoren des Umbaus der Extrazellulärmatrix (*SerpinH1*, *Itih4*) im CRP4-WT Herzlysat. Ebenso lagen Proteine, die in den Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies involviert sind (*Gsta4*, *Gpx3*), reguliert vor. Wahrscheinlich als Adaptation an veränderte energetische Anforderungen bei hypertrophem Herzwachstum (Sebastiani et al. 2007, Rosca et al. 2013) waren mitochondriale Proteine, beispielsweise Untereinheiten der Cytochrom C-Oxidase der Atmungskette (*Cox6a2*, *Cox7a2l*), in beiden Genotypen vermehrt reguliert (s. Abb. 4.38 B). Sämtliche LC-MS/MS-detektierte Proteine sind im Anhang aufgeführt (s. Tab. 7.2).

**4.9.3 Boxplot-Analyse von CRP4-abhängig regulierten Proteinen**

Alle Proteine, die unter Basalbedingungen (s. 4.8.1) sowie nach Ang II-Dauerinfusion (s. 4.8.2) in CRP4-WT und CRP4-KO Herzen detektierbar waren, wurden im Anschluss einer Boxplot-Analyse zugeführt. Auf diese Weise lassen sich stark regulierte Proteine von der Gesamtmasse aller kardialen Proteine unterscheiden und darstellen, die CRP4-abhängig entsprechend abundanter in Herzlysaten von CRP4-WT bzw. CRP4-KO Herzen vorlagen und deren Expressionsänderung aufgrund einer bedeutenden Anreicherung wahrscheinlich eine biologische Relevanz haben könnte. Außerdem ist diese Darstellung (s. Abb. 4.39) geeignet, um die Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen unter basalen und Ang II-stimulierten Konditionen direkt zu vergleichen.



**Abb. 4.39: Boxplot-Analyse des CRP4-Proteoms  $\pm$  Ang II.**

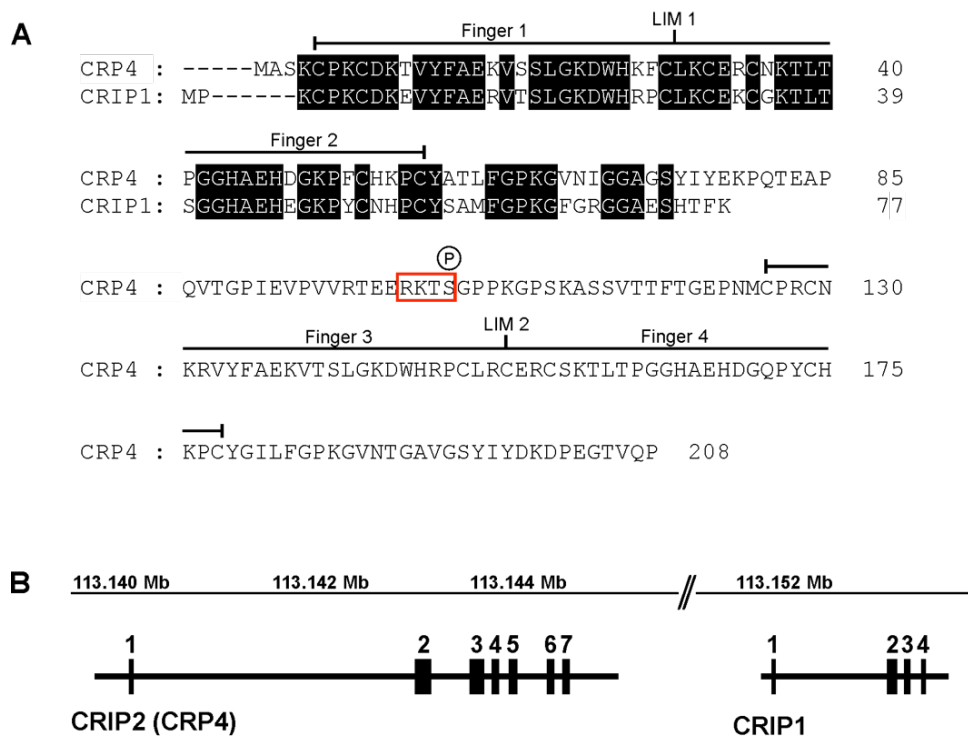
Die massenspektrometrisch untersuchten kardialen Proteine von CRP4-WT und CRP4-KO Herzen  $\pm$  Ang II wurden zusätzlich einer Boxplot-Analyse zugeführt. Diese logarithmische Auswertung vergleicht die Expressionsunterschiede zwischen CRP4-WT und CRP4-KO Lysaten und dient der Visualisierung jener Proteine, die aufgrund der CRP4-Deletion stark dysreguliert vorlagen (blau: signifikant angereichert im CRP4-WT, entsprechend reduziert in CRP4-KO Herzen, rot: Proteine, die verstärkt im CRP4-KO hochreguliert waren). Nähere Erläuterungen im Text. *Ndufb3*: NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 beta subcomplex 3; *Cct3*: Chaperonin containing T-complex polypeptide 1, subunit 3; *Cav3*: Caveolin 3; *Bag3*: BCL2-associated athanogene 3; *Cox6a2*: Cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2; *Sptan1*: Spectrin alpha, non-erythrocytic 1; *Actn2*: Alpha-2-actinin; *Rpl7a*: Ribosomal protein L7A; *Eprs*: Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase; *Slc8a1*: Sodium-calcium exchanger 1, NCX1; *Eef1b*: Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2; *Slmap*: Sarcolemmal associated protein; *Anxa1*: Annexin A1; *Lcp1*: Lymphocyte cytosolic protein; *Crip1*: Cysteine-rich intestinal protein 1; *Ywhah*: Brain protein 14-3-3-eta, Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide; *Sirt5*: Sirtuin 5; *Des*: Desmin; *Vim*: Vimentin; *Aldh5a1*: Aldehyde dehydrogenase family 5 member A1; *Brp44*: Brain protein 44; *Cox7a2l*: Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2-like; *Txn1l*: Thioredoxin-like 1; *Gsta4*: Glutathione S-transferase; *Ola1*: Olg-like ATPase 1; *Fundc2*: FUN14 domain containing. Die Box-Plot Analyse wurde freundlicherweise von Dr. Mohamed-ali Jarbou (Proteom-Forschungszentrum für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Tübingen) mit Hilfe der *BoxPlotR*-Software (Spitzer et al. 2014) erstellt.

Ein Großteil der detektierten Proteine, die nicht CRP4-abhängig reguliert vorlagen, reihen sich um den Median, dargestellt durch die schwarze Linie, welche die Box in oberes und unteres Quartil trennt. Proteine, die nicht mehr in den Quartilen liegen, aber noch innerhalb der *Whisker* (Begrenzungslinien außerhalb der Box, „Antennen“), repräsentieren Proteine, die sich stärker vom Median unterscheiden, in diesem Fall verstärkt im CRP4-WT (oben, positive Werte) bzw. im CRP4-KO Herz (unten, negative Werte) angereichert waren. Alle Proteine außerhalb dieser Antennen stellen in dieser Darstellung LC-MS/MS-identifizierte Proteine dar, die entweder verstärkt in CRP4-WT und dementsprechend massiv reduziert in CRP4-KO Herzen vorlagen (blau hervorgehoben) oder aufgrund der CRP4-Deletion noch abundanter in CRP4-KO Herzen exprimiert wurden. Diese sind im Diagramm rot unterlegt. Die Boxplot-Analyse dient primär der Orientierung und Abschätzung, welche Proteine aufgrund der CRP4-Ablation am stärksten reguliert vorzufinden sind und sich daher für weitere Untersuchungen empfehlen. Auch in dieser Darstellung war *Crip1* das abundanteste Protein in CRP4-KO Herzen und wurde deshalb im Folgenden weiter untersucht.

**4.9.4 Crip1 kompensiert den Verlust von CRP4**

In der vergleichenden Proteomanalyse wurde mit *Crip1* sowohl unter physiologischen Bedingungen (s. Abb. 4.37) als auch nach 7-tägiger Ang II-Dauerinfusion (s. Abb. 4.38) ein Protein identifiziert, das massiv in Herzlysaten von CRP4-KO Mäusen angereichert vorlag. Diese starke Hochregulation des *Crip1*-Proteins impliziert eine Kompensation des Funktionsverlustes von CRP4 möglicherweise über genetische Mechanismen. Interessanterweise kodieren die 445 exonischen *Crip1*-Basenpaare für ein ca. 8,5 kDa schweres Protein, dessen Aminosäuresequenz zu 67% mit CRP4 übereinstimmt. Damit erreicht *Crip1* nur ein Drittel des Molekulargewichts von CRP4 und besitzt demzufolge nur eine LIM-Domäne (s. Abb. 4.40 A). In den wenigen Veröffentlichungen zur Funktion von *Crip1* wird es gemäß seiner Erstbeschreibung im Gastrointestinaltrakt als *Cysteine-rich intestinal protein 1* bezeichnet (Birkenmeier and Gordon 1986). Interessanterweise befindet

sich der Genlocus von Crip1 in der Maus direkt in Nachbarschaft zu der Crip2/CRP4 codierenden Region auf Chromosom 12 (s. Abb. 4.40 B).

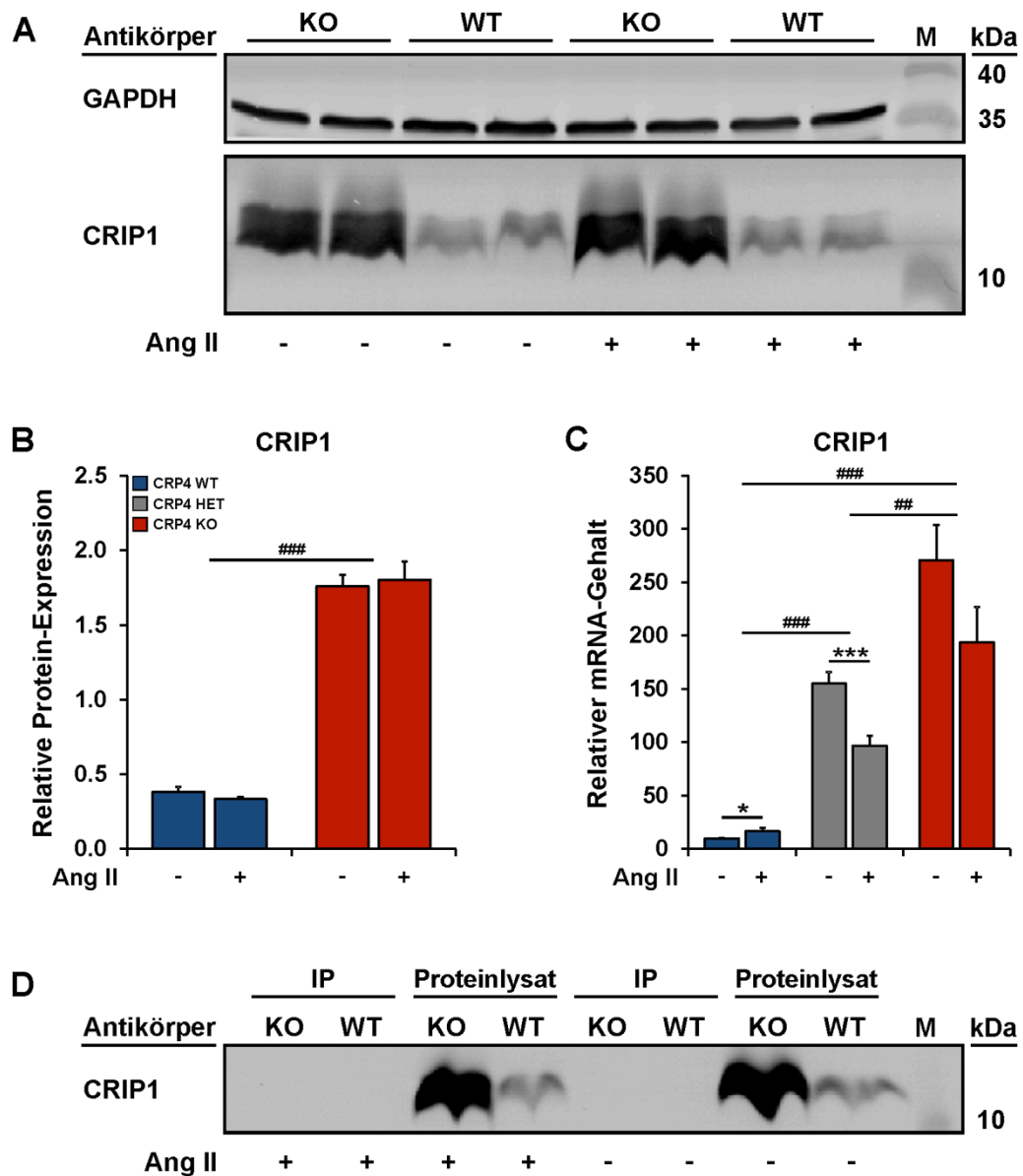


**Abb. 4.40: Sequenzanalyse und Lokalisation von Crip1 und Crip2/CRP4.**

(A) Ein Vergleich der Abfolge der Aminosäuren von Crip2/CRP4 und Crip1/*Cysteine-rich intestinal protein 1* ergibt eine Sequenzidentität von 67%. Die Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz von Crip2 und Crip1 sind schwarz unterlegt. Crip1 besteht aus insgesamt 77 Aminosäuren, die zwei Zinkfinger bzw. eine LIM-Domäne ausbilden. Crip1 besitzt somit auch nicht die RKTS-Sequenz als putative Phosphorylierungsstelle der cGKI. (A) Schematische Darstellung der Genloci von Crip2 und Crip1 und deren direkte Nachbarschaft auf Chromosom 12.

Obwohl es in der Literatur nur wenige Informationen zu Crip1 gibt, war erfreulicherweise ein kommerzieller Antikörper gegen Crip1 verfügbar. Expressionsanalysen mittels Western Blot (s. Abb. 4.41 A, B) bestätigen eine massive Überexpression von Crip1 in CRP4-defizienten Herzen (CRP4-WT  $0,382 \pm 0,036$ ; CRP4-KO  $1,761 \pm 0,075$ ). Die bereits mehr als vierfach erhöhten Proteinlevel waren durch die Ang II-Behandlung allerdings nicht weiter steigerbar (CRP4-WT  $0,334 \pm 0,013$ ; CRP4-KO  $1,804 \pm 0,121$ ). Quantitative Untersuchungen zur Crip1-mRNA konnten die Expressionsunterschiede bestätigen (s. Abb. 4.41 C). Geringe Mengen der auf HPRT normierten Crip1-mRNA wurden im CRP4-WT ( $9,698 \pm 0,689$ ) detektiert. In CRP4-HET Herzen ließ sich eine mehr als 15-fach höhere Crip1-Expression ( $155,013 \pm 10,895$ ) sowie ein deutlicher CRP4-Gendosiseffekt feststellen, denn in Herzlysaten von CRP4-KO Mäusen waren die Crip1 mRNA-Spiegel nochmals deutlich abundanter ( $270,836 \pm 32,700$ ). Die Applikation von Ang II bewirkte nur in CRP4-WT Herzen eine signifikante Expressionssteigerung ( $16,472 \pm 2,955$ ), wohingegen die Crip1 mRNA in CRP4-HET ( $96,715 \pm 9,176$ ) und CRP4-KO Herzen ( $193,883 \pm 33,231$ ) teilweise signifikant abnahm (s. Abb. 4.41 C). Da LIM-Domänen Protein-Protein-Interaktionen sowie die Bildung von Multimeren

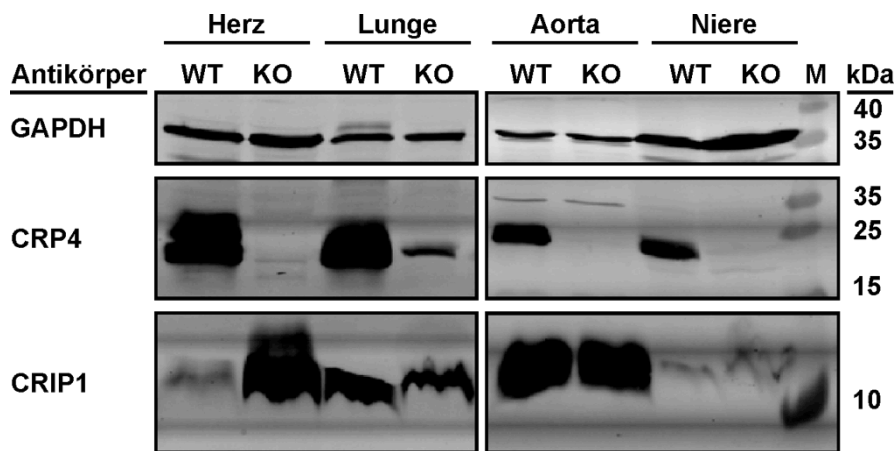
steuern, wurde auch eine direkte Interaktion von Crip1 mit CRP4 mittels Co-Immunpräzipitation untersucht (s. Abb. 4.41 D). Repräsentative Western Blots der Immunpräzipitate zeigen jedoch, dass Crip1 weder unter basalen noch unter Ang II-stimulierten Konditionen in dem durch CRP4-Immunpräzipitation angereicherten kardialen CRP4-Interaktom nachweisbar war.



**Abb. 4.41: Die Deletion von CRP4 führt zur kardialen Überexpression von Crip1.**

(A) Repräsentativer Western Blot zur Darstellung der Crip1-Überexpression in CRP4-defizienten Herzen  $\pm$  Ang II. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) bestätigt eine gleichmäßige Ladungsverteilung. (B) Statistische Quantifizierung der erhaltenen Proteinbanden von insgesamt n=9-12 Tieren pro Genotyp und Kondition von insgesamt 5 unabhängigen Einzelerperimenten. (C) Quantitative mRNA-Analyse der Crip1-Transkripte nach Normalisierung auf HPRT von n=9-12 Herzen von CRP4-WT, CRP4-HET und CRP4-KO Mäusen. Es zeigt sich erneut (vgl. Abb. 4.14 und Abb. 4.17) der CRP4-Genosiseffekt in den CRP4-HET Proben. Die mit Rauten markierten, in der Mitte der Säulen beginnenden Balken schließen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen und der entsprechenden Behandlung ein (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$ ). (D) Mittels Co-Immunpräzipitation konnte in Herzlysaten  $\pm$  Ang II keine Interaktion zwischen CRP4 und Crip1 beobachtet werden.

Aufgrund der starken Induktion von Crip1 auf Protein- und mRNA-Ebene in CRP4-KO Herzen und der Tatsache, dass Crip1 direkt nach Crip2/CRP4 auf Chromosom 12 lokalisiert ist, wurden die Protein-Expressionsanalysen auf weitere Organe ausgeweitet (s. Abb. 4.42). Tatsächlich konnten die massiv angereicherten kardialen Crip1-Proteinmengen in keinem anderen untersuchten Gewebe bestätigt werden. In der Lunge scheint die Crip1-Expression in CRP4-KO Lysaten sogar etwas geringer auszufallen. Des Weiteren wurden abundante Mengen von Crip1 in der Aorta ermittelt. Auch dieses Expressionsmuster war genotyp-unabhängig in CRP4-WT und CRP4-KO Gewebeproben zu beobachten (s. Abb. 4.42). Die massive Überexpression von Crip1 in CRP4-defizienten Herzen scheint somit auf den Herzmuskel begrenzt zu sein.



**Abb. 4.42: Gewebespezifische Analyse der Crip1-Expression.**

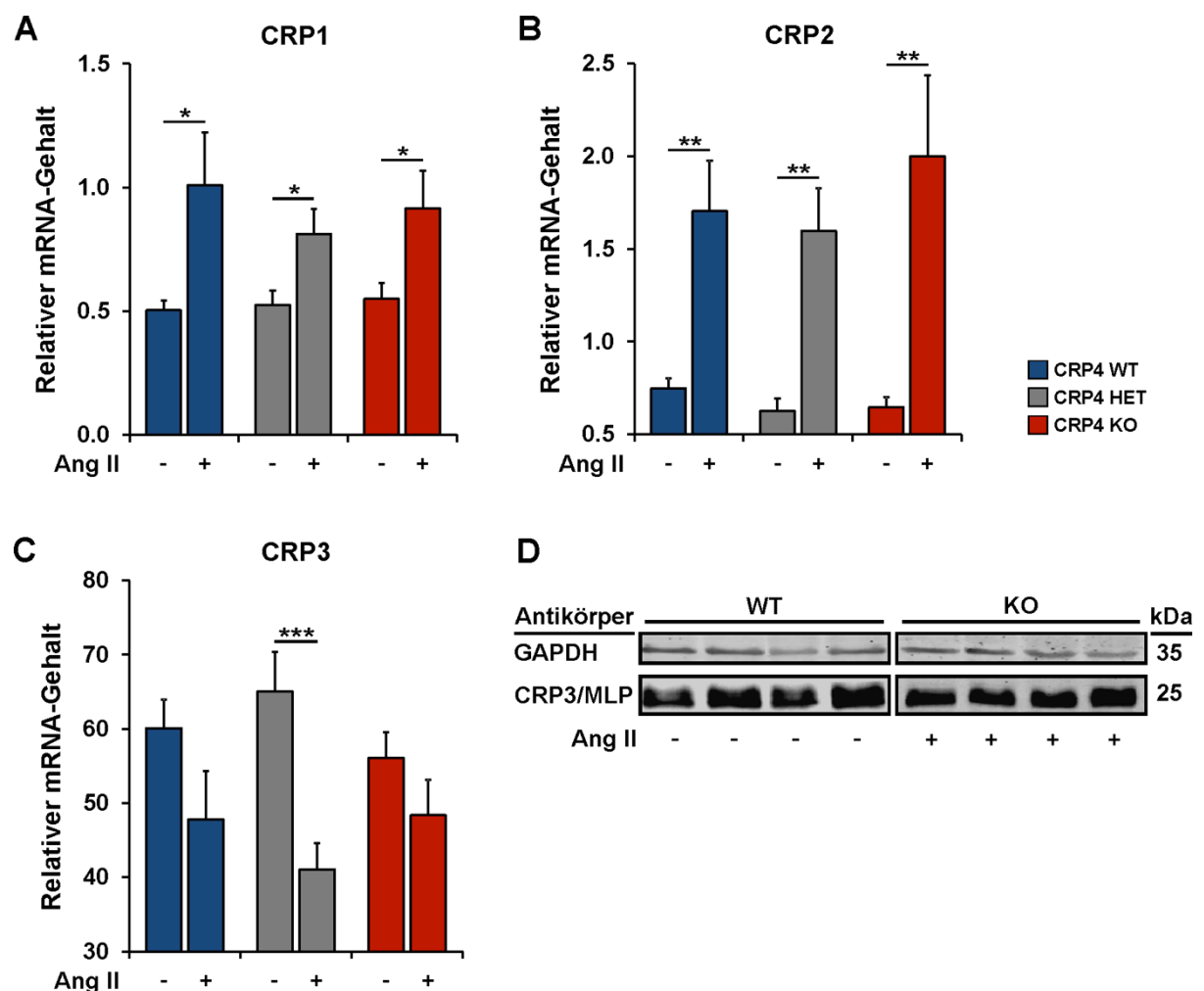
Ein repräsentativer Immunoblot zeigt die Crip1- und CRP4-Proteinexpression in Herz, Lunge, Aorta und Niere von CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen. Der Nachweis von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) bestätigt die gleichmäßige Proteinladungsverteilung. Die massive Überexpression von Crip1 war nur in CRP4-KO Herzlysaten, jedoch nicht in den anderen untersuchten Organen zu beobachten. Die CRP4-KO Proben waren erwartungsgemäß CRP4-negativ. Einzig für die Lungenlysate ergab die Detektion eine unspezifische Proteinbande mit einem vergleichbaren Molekulargewicht.

#### 4.9.5 Expressionsanalyse der homologen Proteine CRP1-CRP3 in CRP4-WT und CRP4-KO Herzlysaten

Die herzspezifische Überexpression von Crip1 (s. 4.9.4) sowie die hohe Sequenzhomologie von CRP4 und Crip1 deuten auf eine Kompensation der CRP4-Defizienz durch Crip1 hin. Es erscheint damit möglich, dass der kardiale Phänotyp der CRP4-KO Mäuse im Ang II-Infusionsmodell (s. 4.4.3 und 4.6) ohne diese Regulation sogar noch deutlicher ausfallen würde. Aufgrund dieser Befunde wurden die Expressionsuntersuchungen auf weitere Mitglieder (CRP1-3) der Cystein-reichen LIM-Proteinfamilie ausgeweitet (s. Abb. 4.43). Insbesondere für CRP3/MLP existieren bereits umfangreiche Daten zu dessen Bedeutung bei dilatativen und hypertrophen Herzerkrankungen (Arber et al. 1997, Knoll et al. 2002). Außerdem ist bekannt, dass CRP1 und CRP2 in einem experimentellen Restenose-Modell bei der Ausbildung einer Neointima füreinander kompensieren (Lilly et al. 2010).



Generell ließen sich im Myokard der CRP4-WT und CRP4-KO Tiere annähernd identische CRP1 und CRP2 mRNA-Expressionslevel feststellen (s. Abb. 4.43 A, B). Die geringe basale CRP1 und CRP2 Expression war durch die 7-tägige Ang II-Infusion signifikant, jedoch unabhängig vom CRP4-Genotyp steigerbar. Auch die Expressionsanalyse von CRP3/MLP ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten CRP4-WT und CRP4-KO Herzen (s. Abb. 4.43 C). Die Ang II-Stimulation führte in allen Genotypen zu einer Reduktion des CRP3/MLP mRNA-Gehalts, der sich jedoch nur innerhalb der Gruppe der CRP4-HET signifikant darstellte. Repräsentative CRP3/MLP Western Blots (s. Abb. 4.43 D) sowie die Proteomanalyse (s. Anhang, Tab. 7.2) bestätigten diese Untersuchungen zur CRP3/MLP mRNA-Quantifizierung.



**Abb. 4.43: CRP1-CRP3 kompensieren nicht für den Verlust von CRP4.**

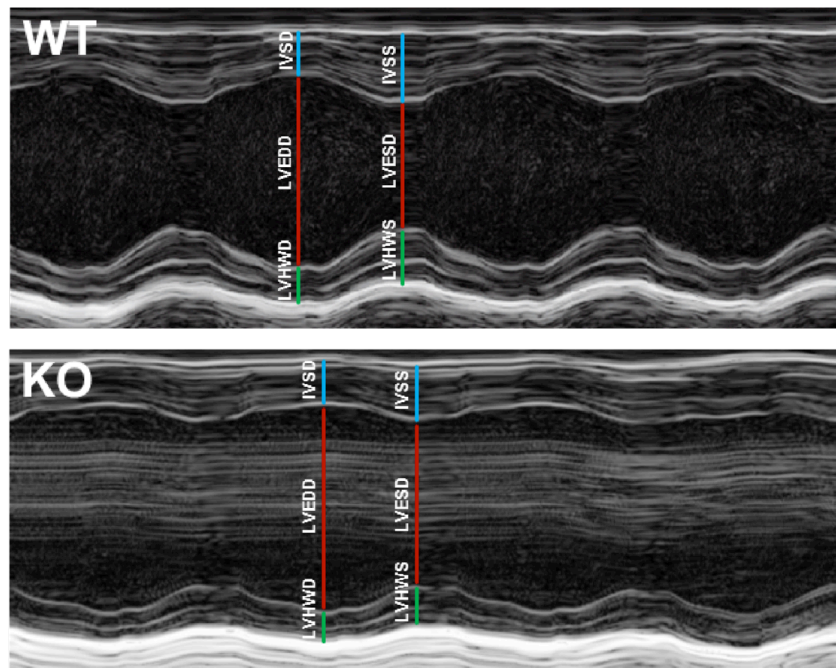
Quantitative mRNA-Analysen von (A) CRP1, (B) CRP2 und (C) CRP3/MLP in n=9-12 Herzen pro Genotyp  $\pm$  Ang II nach Normierung auf HPRT (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) zeigten keine Kompensation der CRP4-Ablation durch diese Mitglieder der Cystein-reichen LIM-Proteinfamilie. (D) Western Blot-Analyse von CRP3/MLP  $\pm$  Ang II in CRP4-WT und CRP4-KO Herzlysaten. Weitere Details im Text.

## 4.10 Echokardiographische Untersuchung der Herzfunktion

Die Echokardiographie ist eine wichtige nichtinvasive Methode in der kardialen Diagnostik. Mit Hilfe dieser ultraschall-basierten Untersuchung können Größenbestimmungen der Herzkammern und Vorhöfe sowie der Wanddicken vorgenommen werden. Zusätzlich ist es möglich, Funktionsparameter zu erfassen. Durch die Bestimmung der Kontraktilität und der Auswurfleistung lassen sich beispielsweise direkt Erkenntnisse zur Pumpfunktion des Herzens gewinnen. Die massenspektrometrische Analyse des CRP4-Interaktoms hat gezeigt, dass CRP4 mit Proteinen des kontraktilem Apparates, der Z-Scheibe und des Zytoskeletts interagiert (s. 4.8). Für eine Vielzahl dieser Proteine sind Fehlfunktionen, bzw. Mutationen beschrieben, die in unterschiedlichen Ausprägungen kardialer Myopathien münden (Seidman and Seidman 2011). Dementsprechend wurde mittels echokardiographischer Messungen ermittelt, ob das Fehlen von CRP4 die Herzfunktion beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden Messungen auf Basalniveau, nach akuter Stimulation mit dem nicht-selektiven  $\beta$ -Sympathomimetikum Isoprenalin (ISO) sowie in hypertrophen Herzen nach Ang II-Dauerinfusion bzw. in  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ /CRP4-doppeltransgenen Tieren (s. 3.1.2) durchgeführt. Unter volatiler Isofluran-Narkose wurden in drei verschiedenen Lagerungspositionen jeweils Längs- und Querachse vermessen (s. 3.3.5 für eine detaillierte Beschreibung der Datenakquise).

### 4.10.1 Herzfunktion von CRP4-WT und CRP4-KO Tieren

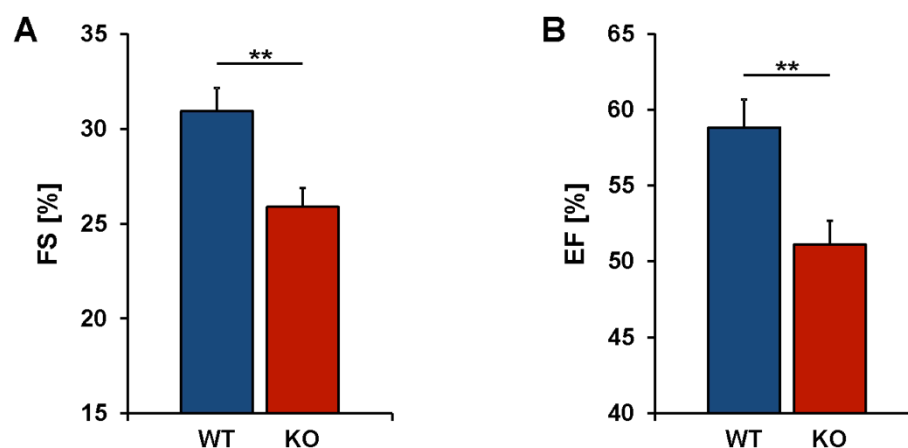
Echokardiographische Aufnahmen der Herzachsen im sogenannten M-Mode werden üblicherweise verwendet, um die Kammerdimensionen zu vermessen und die Herzfunktion zu evaluieren (s. 3.3.5). Abb. 4.44 zeigt repräsentative M-Mode Aufnahmen der Längsachse von CRP4-WT und CRP4-KO Herzen unter physiologischen Bedingungen. Zur besseren Darstellung der Wanddicken ist das Interventrikuläre Septum (IVS), das beide Herzkammern voneinander trennt, blau markiert, die linksventrikulären Hinterwände (LVHW) sind grün hervorgehoben. Dieses Farbschema gilt sowohl für die Systole als auch für die Diastole von CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen. Analog hierzu sind die endsystolischen (LVESD) und enddiastolischen Ventrikeldurchmesser (LVEDD) rot eingezeichnet. Bei identischer Pulsfrequenz (300 Schläge/min) fällt eine reduzierte systolische Verstärkung des IVS (blau) sowie der LVHW (grün) in den CRP4-KO Herzen auf (Abb. 4.44). In diesem Modus zeigte sich aufgrund der veränderten Wandamplituden auch ein vergrößerter endsystolischer Ventrikeldurchmesser (rot) für das CRP4-defiziente Myokard. Folglich fällt auch die Differenz zwischen den Kammerdimensionen in Systole und Diastole als Maß für die Kontraktion geringer aus. Bezüglich der Kammerdimensionen konnten keine signifikanten Unterschiede für die Werte des LVESD und LVEDD zwischen den untersuchten CRP4-WT und CRP4-KO Tieren ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Die endsystolischen (LVESD) und enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) der linken Ventrikel sind aber grundlegende Parameter für die Berechnung der Verkürzungsfraktion (%FS, *Fractional Shortening*) und der Auswurfraction (%EF, *Ejection Fraction*, s. Abb. 4.45 und Kapitel 3.3.5). Diese Größen stellen klinisch relevante Parameter zur Evaluierung der Herzfunktion dar.



**Abb. 4.44: M-Mode Aufnahmen linksventrikulärer Herzparameter unter Basalbedingungen.**

Repräsentative Ausschnitte von M-Mode Aufnahmen des linken Ventrikels in der Längsachse bei einem Puls von 300 Schlägen/min zeigen eine deutlich verminderte septale Kraftentwicklung in der Systole (IVSS) und einen vergrößerten ventrikulären systolischen Durchmesser (LVESD) im CRP4-KO Herz. Die Wandstärken der Hinterwände (LVHW) zeigen dieselbe Tendenz. (IVSD: Interventrikuläre Septumdicke in der Diastole; IVSS: Interventrikuläre Septumdicke in der Systole; LVESD: Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser; LVEDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVHWD: Linksventrikuläre Hinterwandstärke in der Diastole; LVHWS: Linksventrikuläre Hinterwandstärke in der Systole).

Zunächst wurden anhand der M-Mode Aufnahmen die Verkürzungsfraction (%FS) und die Auswurfraction (%EF) als wichtigste Determinanten der kardialen Pumpfunktion in unbehandelten, männlichen Tieren bestimmt (s. Abb. 4.45).

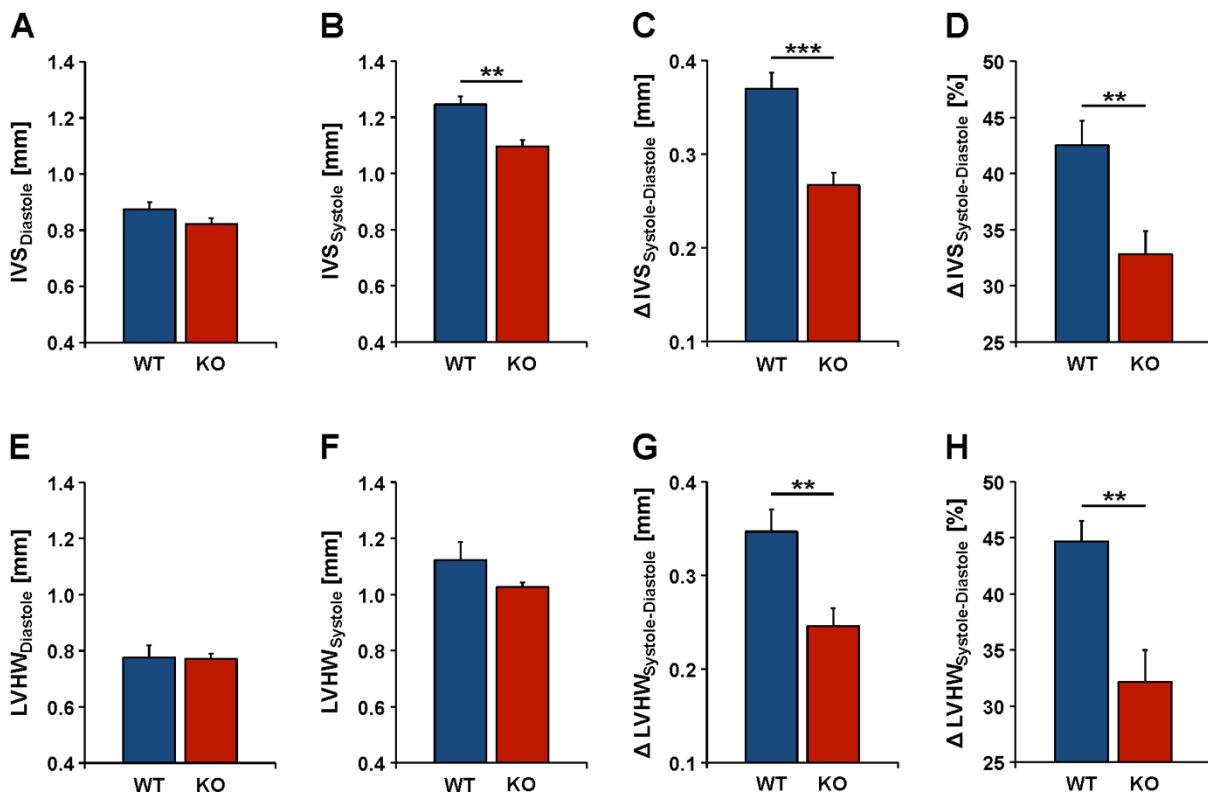


**Abb. 4.45: Eingeschränkte Herzfunktion in CRP4-defizienten Tieren.**

Verminderte (A) Verkürzungsfraction (%FS, *Fractional Shortening*) und (B) Auswurfraction (%EF, *Ejection Fraction*) in 10-15 Wochen alten männlichen CRP4-KO Tieren (n=12) im Vergleich zu CRP4-WT Tieren (n=7) unter physiologischen Bedingungen (\*\*p<0,01).

Bereits unter Basalbedingungen zeigten die CRP4-defizienten Tiere eine eingeschränkte Herzfunktion. Sowohl die Verkürzungsfraction (%FS  $25,89 \pm 0,98\%$ ) als auch die Auswurfraction (%EF  $51,11 \pm 1,55\%$ ) waren in den CRP4-KO Mäusen signifikant reduziert (s. Abb. 4.45). Die entsprechenden Werte für die CRP4-WT Wurfgeschwistertiere sind mit  $30,93 \pm 1,23\%$  (%FS), bzw.  $58,83 \pm 1,86\%$  (%EF) im Normbereich für den Sv129-Hintergrund der hier untersuchten Mauslinie einzuordnen.

Als wichtige Parameter der kardialen Geometrie wurden im Folgenden das interventrikuläre Septum (IVS), sowie die linksventrikuläre Hinterwand (LVHW) vermessen (s. Abb. 4.46). Für die Septumsdicke in der Diastole konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen (CRP4-WT  $0,875 \pm 0,024$  mm; CRP4-KO  $0,822 \pm 0,021$  mm) festgestellt werden (s. Abb. 4.46 A). Die genauere Betrachtung der systolischen Verdickung des Septum ergab dagegen signifikant geringere Werte für CRP4-defiziente Tiere (CRP4-KO  $1,097 \pm 0,023$  mm; CRP4-WT  $1,246 \pm 0,029$  mm, s. Abb. 4.46 B). Auch die Differenz zwischen maximaler Verdickung des IVS in der Systole und der maximalen Erschlaffung in der Diastole (s. Abb. 4.46 C) als weiterer Funktionsparameter der tatsächlichen Kraftentwicklung bestätigte die Störung der Pumpfunktion in den CRP4-KO Mäusen (CRP4-WT  $0,370 \pm 0,017$  mm; KO  $0,267 \pm 0,013$  mm). Prozentual betrachtet betrug die Verdickung des IVS in den CRP4-WT Herzen  $42,51 \pm 2,19\%$ , in CRP4-KO Herzen dagegen nur  $32,81 \pm 2,07\%$  (s. Abb. 4.46 D).



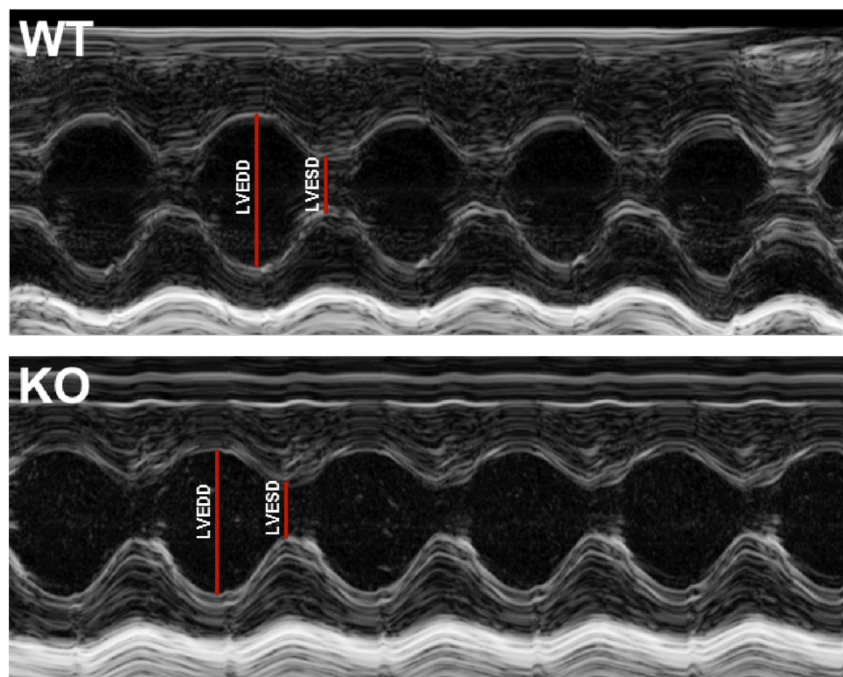
**Abb. 4.46: Verminderte systolische Kraftentwicklung in CRP4-KO Herzen.**

Dargestellt sind die Durchschnittswerte der echokardiographisch ermittelten diastolischen und systolischen (A, B) Septums- und (E, F) linksventrikulären Hinterwandsticken in n=7 CRP4-WT und n=12 CRP4-KO Tieren. Außerdem sind die absoluten (C, G) und prozentualen (D, H) Differenzen in den Wanddicken zwischen Systole und Diastole im interventrikulären Septum (IVS) und der linksventrikulären Hinterwand (LVHW) bei längsaxialer Vermessung gezeigt (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Diese Unterschiede zwischen den Genotypen waren vor allem für das interventrikuläre Septum sehr prominent. Die Vermessung der linken Hinterwände ergab wiederum keine Unterschiede für die Dimension der diastolischen Werte (s. Abb. 4.46 E). Die systolische Hinterwandsverdickung zeigte eine Tendenz zu größeren Werten in den CRP4-WT Herzen (s. Abb. 4.46 F), woraus sich die signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen für die diastolische und systolische Wertdifferenz ableiten lassen ( $\Delta$ LVHW: CRP4-WT  $0,347 \pm 0,024$ ; CRP4-KO  $0,246 \pm 0,019$ , s. Abb. 4.46 G;  $\Delta$ LVHW%: CRP4-WT  $44,69 \pm 1,82\%$ ; CRP4-KO  $32,18 \pm 2,81\%$ , s. Abb. 4.46 H).

#### 4.10.2 Beurteilung der Kontraktilität von CRP4-WT und CRP4-KO Herzen nach akuter Stimulation mit Isoprenalin

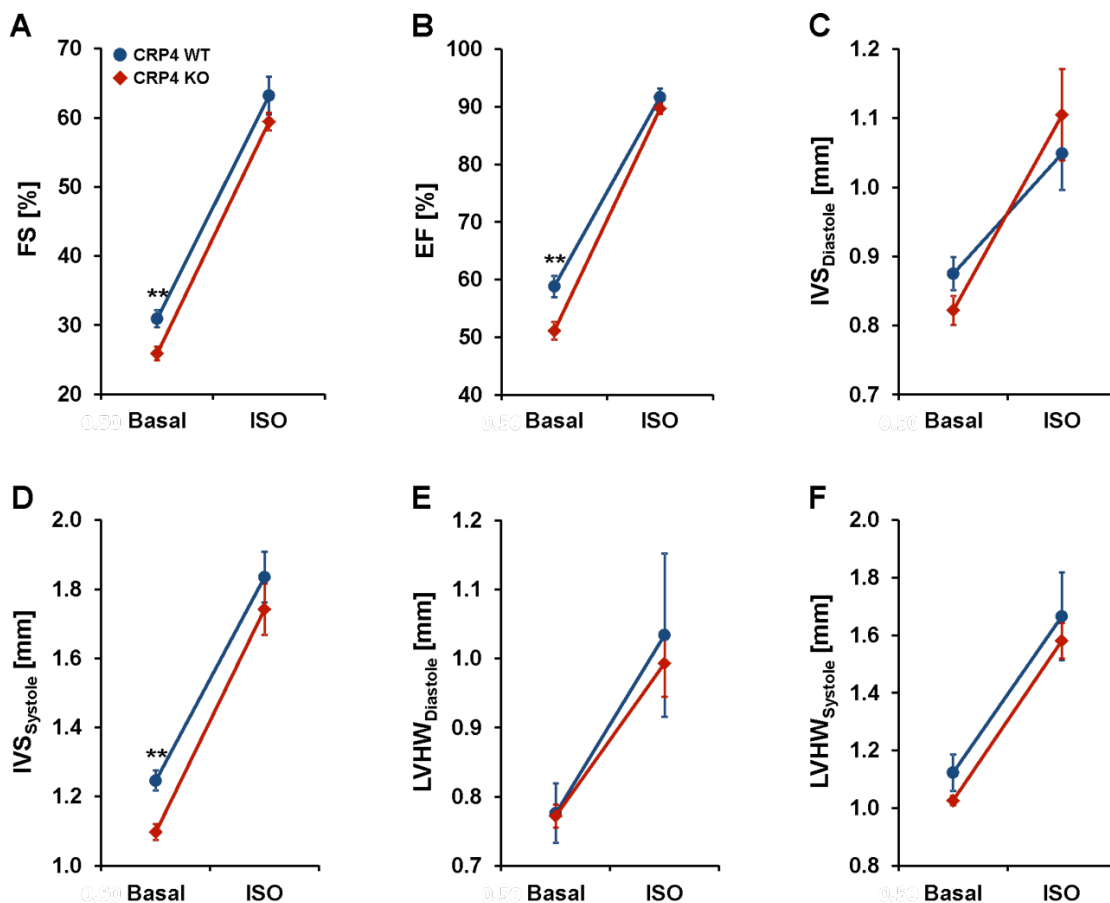
Die echokardiographisch erhobenen Resultate implizieren, dass die Deletion von CRP4 zu einer eingeschränkten Kontraktionsfähigkeit führt (s. 4.10.1). Die zunächst nur unter Basalbedingungen durchgeführten Untersuchungen wurden in einem Folgeexperiment unter Stimulationsbedingungen mit Isoprenalin (ISO) ausgeweitet. ISO ist ein Noradrenalin-Derivat und Agonist an kardialen  $\beta_1$ -Adrenozeptoren und wirkt am Herzen dadurch positiv inotrop und positiv chronotrop. Mit einer Latenzzeit von 2 Minuten nach Injektion des Sympathomimetikums (0,1 mg/kg) war erwartungsgemäß ein deutlicher Anstieg der Kontraktion und Herzfrequenz ersichtlich. Repräsentative M-Mode Aufnahmen von CRP4-WT und CRP4-KO Herzen mit identischer Frequenz zum Zeitpunkt der maximal erreichten Inotropie durch ISO sind in Abb. 4.47 dargestellt.



**Abb. 4.47: M-Mode Aufnahmen nach Injektion von Isoprenalin (0,1 mg/kg).**

Repräsentative linksventrikuläre M-Mode Aufnahmen der Längsachse von CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen zeigen im Herzfrequenzbereich von 450 Schlägen/min keine Unterschiede in der durch ISO stimulierten Kontraktilität (LVEDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVESD: Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser).

Die Anpassung der Kontraktilität sowie der Herzfrequenz an die ISO-Stimulationsbedingungen zeigte im CRP4-KO Myokard keine Auffälligkeiten und scheint damit im Gegensatz zur Regulation der entsprechenden Parameter unter Basalbedingungen (s. 4.10.1) von der CRP4-Ablation unbeeinflusst. Auch nach exakter Vermessung der systolischen und diastolischen Kammerdimensionen ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Kontraktionskraft zwischen den Genotypen nach der ISO-Injektion feststellen (s. Abb. 4.48). Die durch ISO stimulierte Verkürzungsfraction (%FS: CRP4-WT  $63,21 \pm 2,72\%$ ; CRP4-KO  $59,44 \pm 1,29\%$ , s. Abb. 4.48 A), sowie die Auswurfraction (%EF: CRP4-WT  $91,67 \pm 1,46\%$ ; CRP4-KO  $89,68 \pm 0,94\%$ , s. Abb. 4.48 B) erreichten nahezu identische Niveaus in den Genotypen. Auch für die akuten Änderungen in der Geometrie der Kammerwände konnten nach ISO-Injektion keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen CRP4-WT und CRP4-KO Herzen in der Systole ermittelt werden (IVS: CRP4-WT  $1,835 \pm 0,073$  mm; CRP4-KO  $1,742 \pm 0,075$  mm, s. Abb. 4.48 D; LVHW: WT  $1,666 \pm 0,152$  mm; KO  $1,581 \pm 0,061$  mm, s. Abb. 4.48 F). In den diastolischen Wanddicken waren ebenfalls keine genotyp-spezifischen Unterschiede nach ISO-Injektion erkennbar (s. Abb. 4.48 C, E).

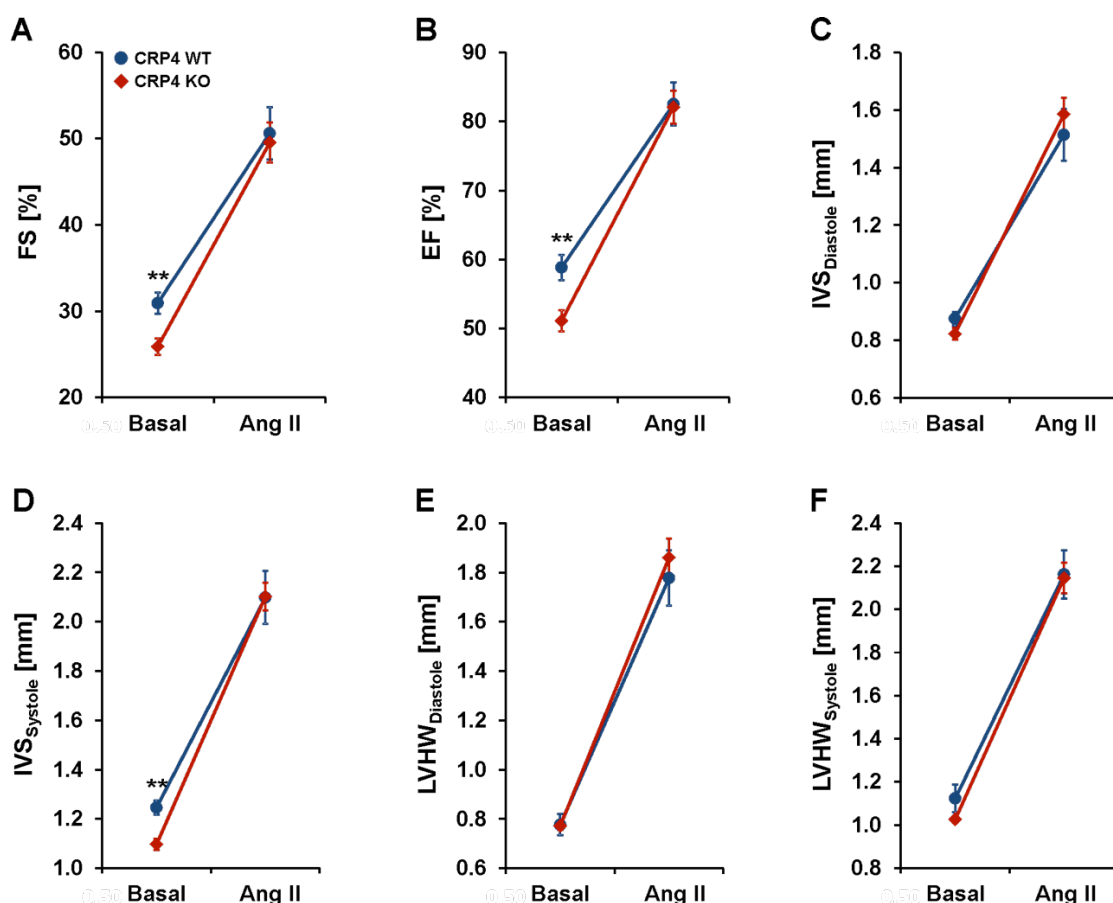


**Abb. 4.48: Akute Kontraktilitätssteigerung durch ISO in beiden Genotypen.**

Dargestellt sind die Mittelwerte vor und nach akuter Injektion von ISO von CRP4-WT (n=6) und CRP4-KO-Tieren (n=11). In beiden Genotypen ist eine starke Zunahme (A) der Kontraktilität (%FS) und (B) der Auswurfraction (%EF) erkennbar. Die signifikant unterschiedlichen Ausgangswerte entsprechen den Basalmessungen aus Abb. 4.45 und Abb. 4.46 (\*\*p<0,01). Die Bestimmung der Septumsdicke in (C) Diastole und (D) Systole, sowie die (E) diastolische und (F) systolische Hinterwanddicke ergaben nach ISO-Injektion keine Unterschiede (FS: *Fractional Shortening*; EF: *Ejection Fraction*; IVS: interventrikuläres Septum; LVHW: linksventrikuläre Hinterwand).

### 4.10.3 Bestimmung der Herzstruktur und Herzfunktion nach Ang II-Dauerinfusion

Die Deletion von CRP4 scheint demnach die akute Anpassung der Herzleistung auf einen sympathomimetischen Stimulus wie Isoprenalin nicht zu beeinträchtigen (s. Abb. 4.48). Auch für die Änderung der funktionalen Herzparameter zeigten sich nach Ang II-Infusion keine Unterschiede zwischen den Genotypen (s. Abb. 4.49). Generell war nach der 7-tägigen Ang II-Infusion ein deutlicher Anstieg der Verkürzungsfraction (%FS: CRP4-WT  $50,62 \pm 3,04\%$ ; CRP4-KO  $49,53 \pm 2,33\%$ , s. Abb. 4.49 A) und der Auswurffraction (%EF: CRP4-WT  $82,51 \pm 3,11\%$ ; CRP4-KO  $82,07 \pm 2,35\%$ , s. Abb. 4.49 B) in CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen erkennbar. Aufgrund der lang anhaltenden Druckbelastung durch das Neurohormon Ang II hätten reduzierte Werte für die Auswurf- und Verkürzungsfraction im Vergleich zu den Basalmessungen als erste Anzeichen einer Dekompensation gewertet werden können. Offensichtlich sind aber beide Genotypen unter diesen chronischen Belastungsbedingungen in der Lage, den Blutfluss und die Versorgung der Endorgane durch eine erhöhte Pumpfunktion zumindest kurzfristig aufrechtzuerhalten.

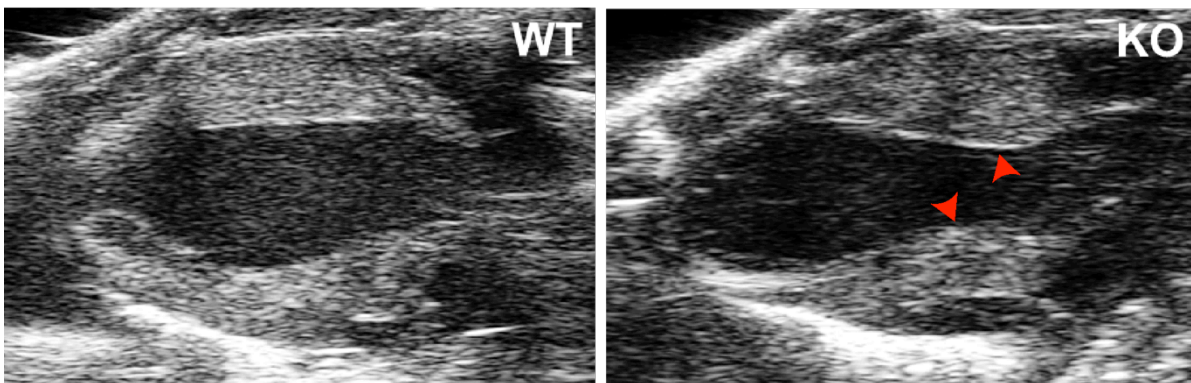


**Abb. 4.49: Echokardiographische Messungen nach 7-tägiger Ang II-Infusion.**

Dargestellt sind die Mittelwerte von CRP4-WT (n=8) und CRP4-KO Tieren (n=12) vor und nach 7-tägiger Infusion von Ang II. Die signifikant unterschiedlichen Ausgangswerte entsprechen den Basalmessungen aus Abb. 4.45 und Abb. 4.46 (\*\*p<0,01). In beiden Genotypen ist eine starke Zunahme (A) der Kontraktilität (%FS) und (B) der Auswurffraction (%EF) erkennbar. Die Bestimmung der Septumstärke in (C) Diastole und (D) Systole, sowie die (E) diastolische und (F) systolische Hinterwandstärke ergaben nach Ang II-Stimulaiton keine Unterschiede (FS: *Fractional Shortening*; EF: *Ejection Fraction*; IVS: interventrikuläres Septum; LVHW: linksventrikuläre Hinterwand).

Die Vermessung der Wandstrukturen der hypertrophen linken Ventrikel zeigten in der Diastole in CRP4-KO Herzen stärkere Verdickungen des interventrikulären Septums (CRP4-KO  $1,586 \pm 0,057$  mm; CRP4-WT  $1,514 \pm 0,090$  mm, s. Abb. 4.49 C) und der linken Hinterwand (CRP4-KO  $1,861 \pm 0,076$  mm; CRP4-WT  $1,778 \pm 0,113$  mm, s. Abb. 4.49 E) im Vergleich zum CRP4-WT Herz. Diese Tendenz erreichte allerdings keine statistische Signifikanz. Des Weiteren waren keine genotyp-spezifischen Unterschiede bezüglich der Entwicklung der Kontraktionskraft nach 7-tägiger neurohumoraler Stimulation zu beobachten. Die systolische Verdickung des Interventrikulären Septums (CRP4-WT  $2,098 \pm 0,107$  mm; CRP4-KO  $2,102 \pm 0,056$  mm, s. Abb. 4.49 D) und der linken Hinterwand (CRP4-WT  $2,162 \pm 0,111$  mm; CRP4-KO  $2,145 \pm 0,071$  mm, s. Abb. 4.49 F) ergaben annähernd dieselben Werte für CRP4-WT und CRP4-KO Herzen.

Interessanterweise wurden bei näherer Betrachtung der Ultraschallaufnahmen strukturelle Unterschiede zwischen den Herzen der Ang II-behandelten Tiere beider Genotypen deutlich (s. Abb. 4.50). Herzen von CRP4-WT Tieren zeigten ein gleichmäßiges, hypertrophes Wachstum des Septums und der Hinterwand. Die linksventrikulären Wandverdickungen in CRP4-KO Herzen waren dagegen asymmetrisch und präsentierten sich im Ultraschall als Kammerobstruktion und Muskelwulst im Bereich des Aortenbulbus (rote Pfeilspitzen). In der apikalen Region der CRP4-KO Herzen konnte dagegen kaum eine Zunahme der Wanddicke ermittelt werden, vielmehr waren die Ventrikelwände im Bereich des Apex dilatiert.



**Abb. 4.50: B-Mode Aufnahmen der Längsachse von Herzen Ang II-behandelter Tiere.**

Während Ang II zu einer gleichmäßigen hypertrophen Verdickung der Kammerwände in Herzen von CRP4-WT Tieren führte, zeigte sich in CRP4-defizienten Herzen ein ungleichmäßiges Wachstum des linken Ventrikels. Im Bereich der *Aorta ascendens* war eine deutliche Kammerobstruktion, sowie ein asymmetrischer Muskelwulst der Hinterwand und des Septums zu erkennen (rote Pfeilspitzen).

Nach Durchsicht aller B-Mode Aufnahmen der echokardiographisch untersuchten CRP4-WT und CRP4-KO Herzen war bei 66,6% aller CRP4-defizienten Tiere diese Obstruktion im Bereich des Aortenbulbus erkennbar. 75% der CRP4-KO Herzen zeigten zusätzlich eine apikale Dilatation. Im Gegensatz dazu war der obstruktive Phänotyp nur bei 12,5% der CRP4-WT Herzen erkennbar, weitere 37% zeigten dilatierete Kammerwände im Bereich des Apex (eine ausführliche Beschreibung dieses Sachverhalts findet sich im Anhang, s. Tab. 7.3). Die Auswertung der echokardiographischen Untersuchung basiert gewöhnlich auf der Vermessung der Ventrikelwände und der Kammerdimensionen in der Mitte des Herzens. Der



intensivierte Schallimpuls zur Generierung der M-Mode Aufnahmen wird während der Messung im Bereich des größten Ventrikeldurchmessers fixiert (s. 3.3.5). Aufgrund dieser Kriterien wurde das lokal begrenzte hypertroph-obstruktive *Remodeling* der CRP4-KO Herzen echokardiographisch möglicherweise nicht adäquat wiedergespiegelt.

Die echokardiographischen Messungen nach 7-tägiger Ang II-Stimulation verdeutlichten überdies, dass sich CRP4-WT und CRP4-KO Tiere zu diesem Zeitpunkt noch in einem kompensatorischen Stadium befanden, d.h. der durch kardiale *Remodeling*prozesse gezeichnete Herzmuskel war noch in der Lage, die Pumpfunktion ohne Anzeichen einer Dekompensation aufrecht zu erhalten (s. Abb. 4.49). Um die Rolle von CRP4 bei einer kontinuierlichen und intensivierten Ang II-Signaltransduktion über einen langen Zeitraum zu untersuchen, wurde die CRP4-Mauslinie in  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere eingekreuzt (s. 3.1.2). Von besonderem Interesse war der Beitrag von CRP4 in der Entwicklung des Myokardwachstums in diesem genetischen Hypertrophiemodell sowie Untersuchungen zur Herzfunktion dieser doppeltransgenen Tiere (s. 4.11).

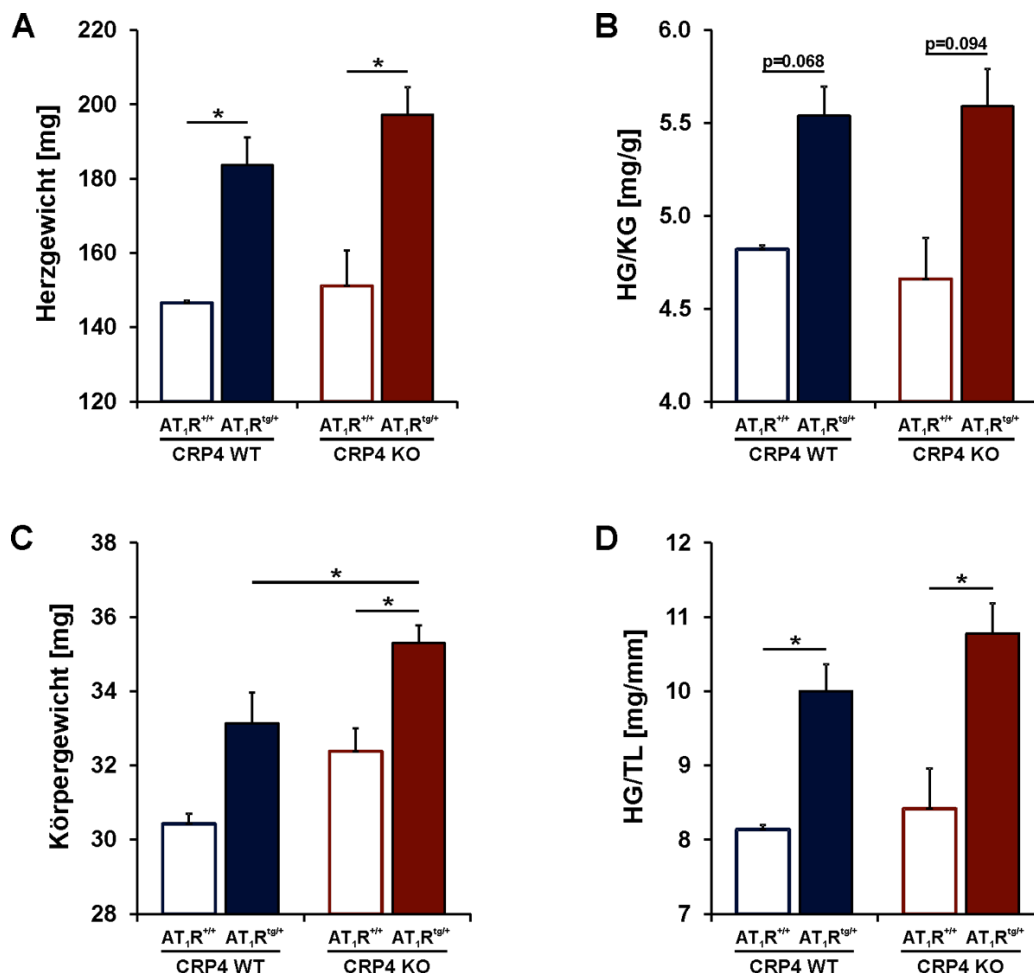
#### **4.11 Charakterisierung der $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -transgenen CRP4-WT und CRP4-KO Mauslinie**

Zunächst wurden Untersuchungen zur Entwicklung der Myokardhypertrophie in CRP4-WT und CRP4-KO Tieren mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression des  $\text{AT}_1\text{R}$  durchgeführt. Die Analyse der Doppelmutanten zeigte unabhängig vom CRP4-Expressionsstatus, dass das progressive Herzwachstum in diesen Tieren deutlich verzögert ist. Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich der heterogene genetische Hintergrund der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  bzw.  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Mäuse (75% Sv129, sowie 25% C57/Bl6). Die zu Beginn der Arbeit untersuchte  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mauslinie (s. Abb. 4.2) basiert auf einem reinen C57/Bl6-Hintergrund.  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäuse entwickeln schon im Alter von 120 Tagen eine starke Hypertrophie (Paradis et al. 2000), während die doppeltransgenen Tiere zu diesem Zeitpunkt keine Myokardhypertrophie oder sonstige strukturelle oder funktionelle Auffälligkeiten im Echokardiogramm zeigten (Daten nicht gezeigt). Die kardiale Hypertrophie in den Doppelmutanten manifestierte sich erst in einem Alter von durchschnittlich 400 Tagen. Aus diesem Grund wurden für repräsentative Herzhypertrophie-Versuche und die Untersuchung der Herzfunktion der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  bzw.  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Mäuse nur Tiere dieses Alters verwendet.

##### **4.11.1 Kardiale Hypertrophie in $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-doppeltransgenen}$ Tieren**

Die Herzgewichte der 400 Tage alten  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  bzw.  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Mäuse waren erwartungsgemäß signifikant erhöht gegenüber gleichaltrigen  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{+/+}/\text{CRP4-WT}$  bzw.  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{+/+}/\text{CRP4-KO}$  Kontrolltieren (s. Abb. 4.51 A). Außerdem lag das Gewicht der Herzen von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Tieren mit  $197,25 \pm 7,47$  mg leicht, aber nicht signifikant über dem der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  Herzen ( $183,69 \pm 7,39$

mg). Durch die Normierung der Herzgewichte auf die Körpergewichte (s. Abb. 4.51 B) nivellierte sich diese Tendenz ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT 5,54 ± 0,16 mg/g;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO 5,59 ± 0,20 mg/g), was insbesondere auf signifikante Körpergewichtsunterschiede zwischen 400 Tage alten  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT und  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO Tieren zurückzuführen war (s. Abb. 4.51 C). Aus diesem Grund wurde die Länge der Tibia als gewichtsunabhängiger Parameter zur Normierung des Herzgewichts verwendet (s. Abb. 4.51 D). Auch hier zeigte sich erwartungsgemäß ein signifikanter Anstieg des Verhältnisses des Herzgewichts zur Tibialänge (HG/TL) zwischen  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup> und  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup> Tieren unabhängig vom Vorhandensein von CRP4. Bei der Normierung auf die Tibialänge wurde für die Herzen von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO Tieren ein erhöhtes Hypertrophieausmaß (10,78 ± 0,41 mg/mm) im Vergleich zu  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT Wurfgeschwistertieren (10,00 ± 0,37 mg/mm) ermittelt. Im Gegensatz zum Ang II-Infusionsmodell (s. 4.4.3) stellten sich die Unterschiede hinsichtlich des Myokardwachstums zwischen CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen in dem genetischen Modell mit kardio-myozytenspezifischer Überexpression des AT<sub>1</sub>R nur als Tendenz dar (s. Abb. 4.51 D).

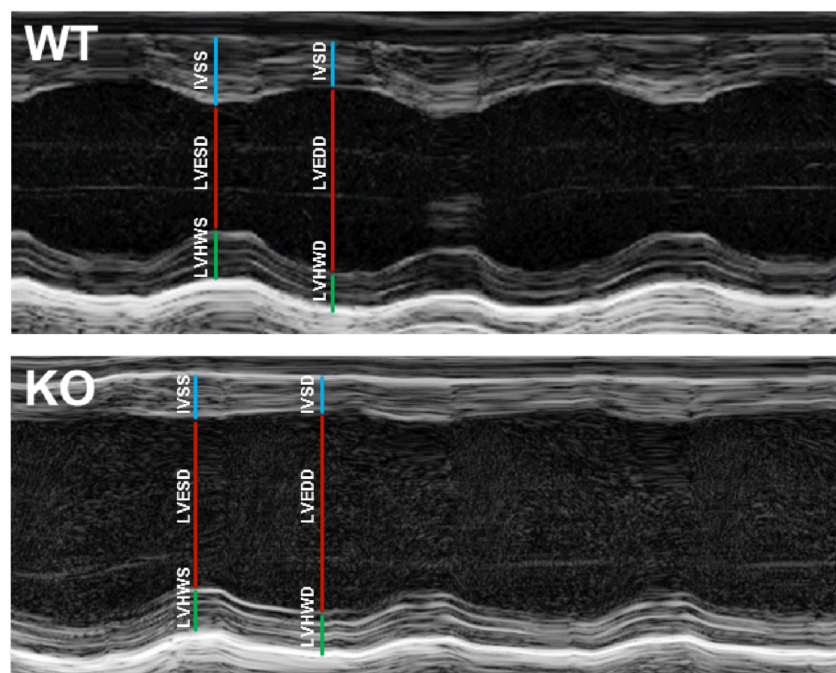


**Abb. 4.51: Hypertrophieausmaß in  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-doppeltransgenen Tieren.**

Dargestellt sind die Mittelwerte (A) der Herzgewichte, (B) des Verhältnisses des Herzgewichts (HG) zum Körpergewicht (KG), (C) des Körpergewichts sowie (D) des Verhältnisses des Herzgewichts (HG) zur Tibialänge (TL) von 400 Tage alten männlichen  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT (n=9) und  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO (n=19) Tieren. Alle Parameter des kardialen *Remodelings* wurden auch in gleichaltrigen  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup>/CRP4-WT (n=2) und  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup>/CRP4-KO (n=3) Wurfgeschwister-Kontrolltieren bestimmt (\*p<0,05). Nähere Erläuterungen im Text.

#### 4.11.2 Echokardiographische Untersuchung der $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$ und $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$ Tiere

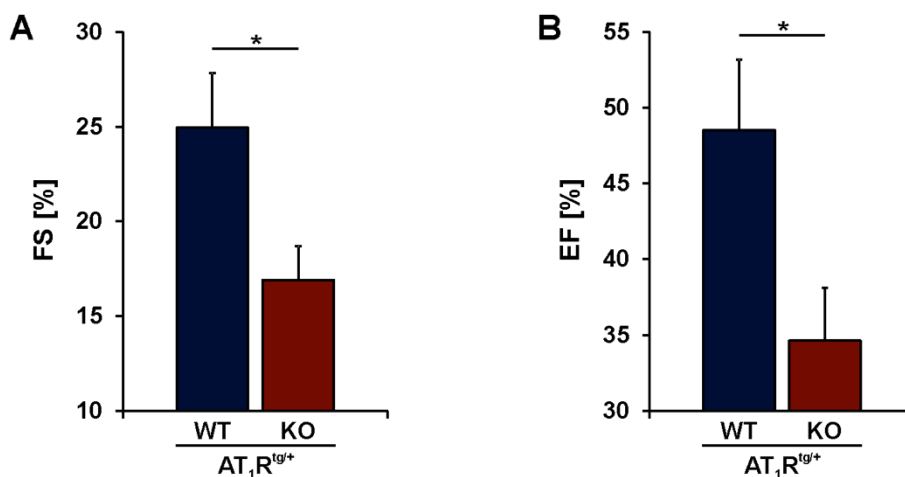
Die echokardiographischen Untersuchungen wurden ebenfalls an Herzen von 400 Tage alten  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  und  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Tieren durchgeführt. Die generell verschlechterte Herzfunktion von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren wurde bereits im Rahmen der Charakterisierung dieser Mauslinie beschrieben (s. 4.2.3). Da auch CRP4-KO Mäuse unter physiologischen Bedingungen, d.h. ohne intensivierete Ang II-Signaltransduktion bereits eine beeinträchtigte Herzfunktion offenbaren (s. 4.10.1), war in diesem Zusammenhang besonders interessant, ob sich das Fehlen von CRP4 in dem genetischen Modell mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression des  $\text{AT}_1\text{R}$  noch stärker auswirkt. Abb. 4.52 zeigt repräsentative M-Mode Aufnahme der Längsachse von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  und  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Tieren. Zur Hervorhebung der Wand- und Kammerdimensionen wurde das IVS blau, die LVHW grün und die Ventrikeldurchmesser rot dargestellt. Bei identischer Herzfrequenz von 300 Schlägen/min waren bei  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Tieren deutlich verminderte Kontraktionen zu erkennen. Zudem sind der vergrößerte Kammerdurchmesser und die ausgedünnten Ventrikelwände der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Herzen in der Diastole sowie in der Systole als Hinweise auf einen dilatativen Phänotyp zu werten (s. Abb. 4.52).



**Abb. 4.52: M-Mode Aufnahmen von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4}$ -doppelmutanten Herzen.**

Repräsentative Ausschnitte von M-Mode Aufnahmen des linken Ventrikels von 400 Tage alten  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  und  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Tieren bei einer Herzfrequenz von 300 Schlägen/min. Insbesondere  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Mäuse zeigen einen dilatativen Phänotyp, gekennzeichnet durch deutlich verringerte Wandstärken (blau, grün) und insgesamt vergrößerten Kammerdimensionen (rot) in Systole und Diastole (IVSD: Interventrikuläre Septumsdicke in der Diastole; IVSS: Interventrikuläre Septumsdicke in der Systole; LVESD: Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser; LVEDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVHWD: Linksventrikuläre Hinterwandsdicke in der Diastole; LVHWS: Linksventrikuläre Hinterwandsdicke in der Systole; WT:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$ ; KO:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$ ).

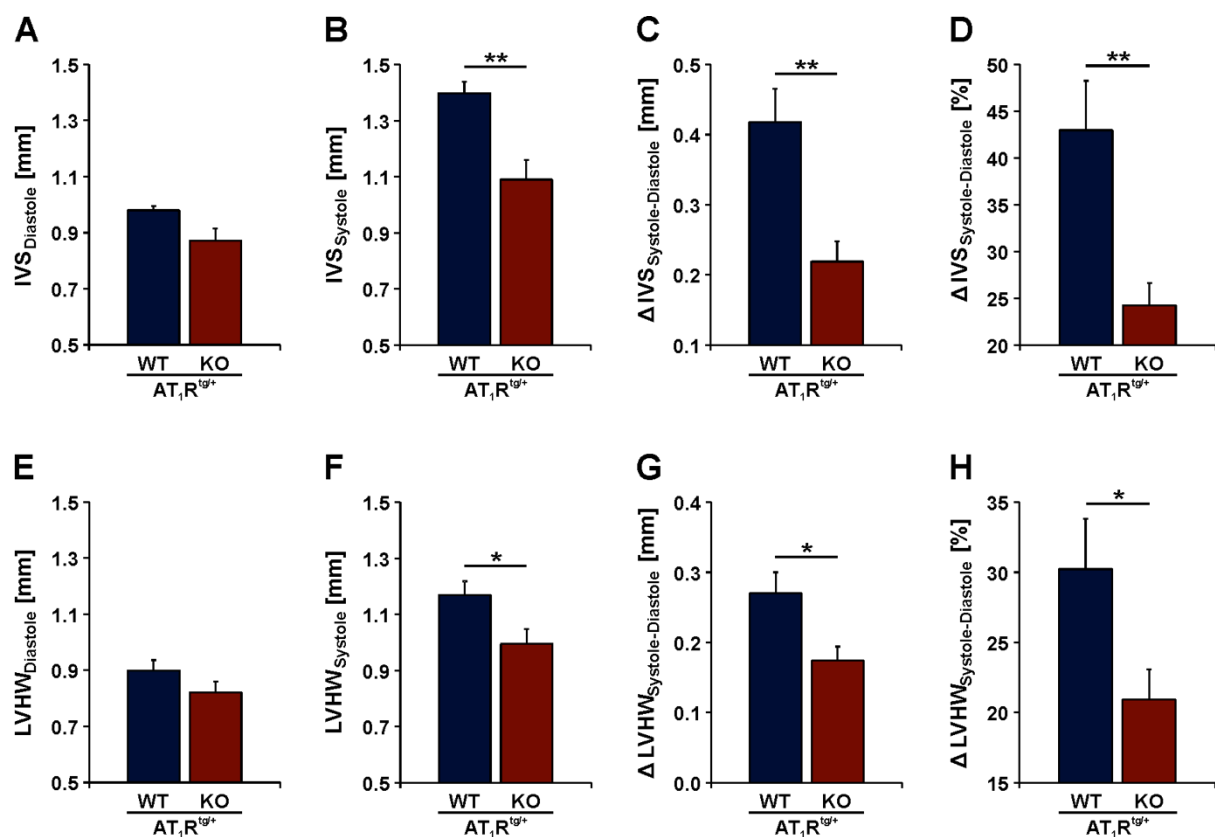
Die stark verminderte Kontraktionsfähigkeit der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Herzen kann nach Berechnung der Verkürzungsfraction und der Auswurfraction bestätigt werden (s. Abb. 4.53). Analog zu den echokardiographischen Befunden unter Basalbedingungen in der CRP4-Mauslinie (s. 4.10.1) waren ebenfalls signifikante Kontraktilitätsunterschiede zwischen  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  bzw.  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Mäusen erkennbar. Die Werte für die Verkürzungs- (%FS:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$   $24,94 \pm 2,89\%$ ;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$   $16,91 \pm 1,79\%$ , s. Abb. 4.53 A) und die Auswurfraction (%EF:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$   $48,51 \pm 4,68\%$ ;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$   $34,63 \pm 3,47\%$ , s. Abb. 4.53 B) divergierten nach Überexpression des  $\text{AT}_1\text{R}$  in Kardiomyozyten zahlenmäßig sogar noch weiter auseinander.



**Abb. 4.53: Eingeschränkte Kontraktilität in  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Herzen.** Echokardiographische Ermittlung der (A) Verkürzungsfraction (%FS, *Fractional Shortening*) und (B) Auswurfraction (%EF, *Ejection Fraction*) von 400 Tage alten männlichen  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  (n=7) und  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  (n=10) Tieren in der Längsachse zeigen eine signifikante Verschlechterung der Pumpfunktion für CRP4-defiziente Herzen (\*p<0,05).

Anhand der echokardiographischen Untersuchungen der CRP4-Mauslinie unter physiologischen Bedingungen (s. 4.10.1) konnte bereits beobachtet werden, dass CRP4-KO Tiere aufgrund der verringerten Verdickung ihrer Ventrikelwände nicht in der Lage waren, genügend Kontraktionskraft aufzubauen. Hierbei war vor allem das Septum betroffen (s. Abb. 4.46). Um die möglichen Ursachen für die reduzierte Kontraktilität der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Herzen zu bestimmen, wurden nachfolgend ebenfalls die systolischen und diastolischen Wandstärken des Septums und der linksventrikulären Hinterwand der Doppelmutanten vermessen (s. Abb. 4.54). Analog der Messungen unter Basalbedingungen (s. Abb. 4.46), ließen sich auch in dem genetischen Hypertrophiemodell anhand der diastolischen Wandstärken des Septums ( $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$   $0,980 \pm 0,014$  mm;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$   $0,871 \pm 0,043$  mm, s. Abb. 4.54 A) und der linken Hinterwand ( $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$   $0,899 \pm 0,037$  mm;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$   $0,821 \pm 0,038$  mm, s. Abb. 4.54 E) keine Unterschiede zwischen den Genotypen feststellen. Die Deletion von CRP4 führte zwar zu tendenziell niedrigeren diastolischen Wanddicken, jedoch ohne das statistische Signifikanzniveau zu erreichen. Deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten sich allerdings für die Wandstärken in der Systole (IVS:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$   $1,398 \pm 0,040$  mm;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$   $1,090 \pm 0,069$  mm, s. Abb. 4.54 C; LVHW:

$\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT  $1,169 \pm 0,049$  mm;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO  $0,995 \pm 0,053$  mm, s. Abb. 4.54 F). Dass auch in diesem Hypertrophiemodell die Unterschiede im IVS ausgeprägter sind, zeigt die Differenz zwischen maximaler Verdickung in der Systole und maximaler Erschlaffung in der Diastole ( $\Delta$ IVS:  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT  $0,418 \pm 0,047$  mm;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO  $0,219 \pm 0,029$  mm, s. Abb. 4.54 C;  $\Delta$ LVHW:  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT  $0,27 \pm 0,03$  mm;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO  $0,174 \pm 0,02$  mm, s. Abb. 4.54 G). Auch die prozentuale Darstellung der IVS- und LVHW-Verdickung bestätigt den Kontraktilitätsdefekt der CRP4-defizienten  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Herzen ( $\Delta$ IVS%:  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT  $42,98 \pm 5,27\%$ ;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO  $24,21 \pm 2,39\%$ , s. Abb. 4.54 D;  $\Delta$ LVHW%:  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT  $30,23 \pm 3,59\%$ ;  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO  $20,91 \pm 2,18\%$ , s. Abb. 4.54 H).



**Abb. 4.54: Verminderte systolische Wandstärken der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO Herzen.**

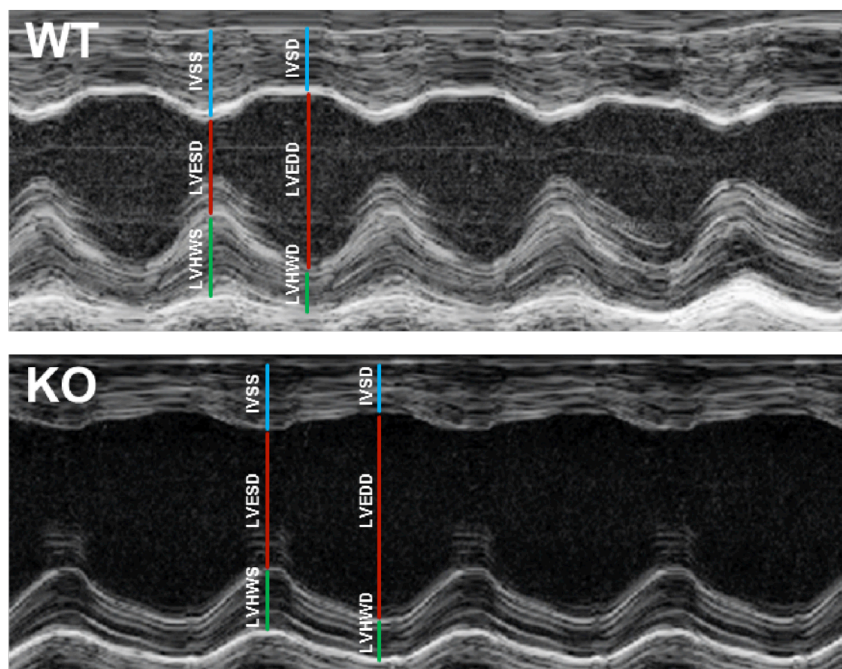
Dargestellt sind die Durchschnittswerte der echokardiographisch ermittelten linksventrikulären diastolischen und systolischen (A, B) Septums- und (E, F) Hinterwandstärken in Herzen von n=7  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT und n=10  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO Tieren, sowie die absoluten (C, G) und (D, H) prozentualen Differenzen in der Wandstärke zwischen Systole und Diastole im interventrikulären Septum (IVS) und der linken Hinterwand (LVHW) bei längsaxialer Vermessung (\*p<0,05; \*\*p<0,01). Weitere Erläuterungen im Text.

Die Wichtigkeit von CRP4 für die Pumpfunktion des Herzens wird somit auch mit diesem genetischen Modell veranschaulicht: die Kombination aus amplifizierter Ang II-Signaltransduktion und zusätzlicher CRP4-Deletion resultierte in einer drastisch reduzierten myokardialen Kontraktilität. Das Ausmaß der kardialen Hypertrophie in 400 Tage alten  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Doppelmutanten war generell nicht so stark ausgeprägt wie im Ang II-Infusionsmodell (s. Abb. 4.51). Die hier klar vergrößerten Kammerdimensionen werden dennoch als ein deutliches Anzeichen bereits dilatierter Herzmuskel gewertet und waren

insbesondere in  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Herzen sehr deutlich erkennbar (s. Abb. 4.52). Die verringerten Wandstärken der Ventrikel vor allem in der Systole bestätigen die Dilatation.

#### 4.11.3 Kontraktilitätsmessungen im $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-Modell}$ nach ISO

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass die CRP4-Ablation zu einem Defekt der basalen Pumpfunktion von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$  (s. Abb. 4.53) sowie nicht-transgenen CRP4-KO (s. Abb. 4.45) Herzen führt. Die durch ISO stimulierte Herzfunktion im CRP4-Mausmodell war dagegen von der CRP4-Defizienz nicht betroffen (s. Abb. 4.48). Nachfolgend sollte nun ermittelt werden, inwiefern die sympathomimetische Stimulation der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Herzen möglicherweise CRP4-abhängig ist. Abb. 4.55 zeigt repräsentative M-Mode Aufnahmen von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  und  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Herzen ca. 2 min nach Injektion von ISO (0,1 mg/kg) zum Zeitpunkt der höchsten Kontraktilität.

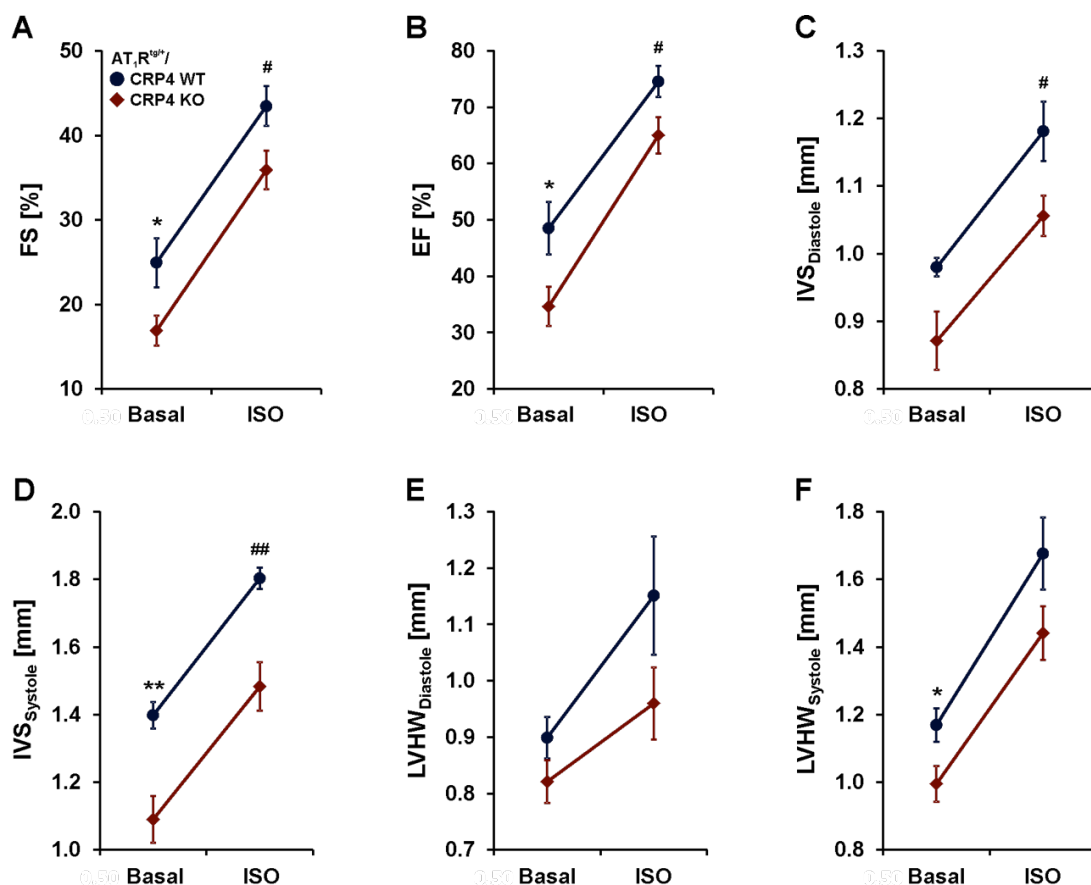


**Abb. 4.55: M-Mode Aufnahmen von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-}$ Herzen nach ISO-Injektion.**

Repräsentative linksventrikuläre M-Mode Aufnahmen der Längsachse von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  und  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Tieren nach ISO-Injektion bei einer Herzfrequenz von 450 Schlägen/min verdeutlichen die deutlich eingeschränkte Kontraktilität der doppeltransgenen CRP4-KO Herzen. (IVSD: Interventrikuläre Septumsdicke in der Diastole; IVSS: Interventrikuläre Septumsdicke in der Systole; LVEDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVEDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVHWD: Linksventrikuläre Hinterwandstärke in der Diastole; LVHWS: Linksventrikuläre Hinterwandstärke in der Systole; WT:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$ ; KO:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$ ).

Die Injektion von ISO führte erwartungsgemäß zu einer gesteigerten kardialen Kontraktilität (s. Abb. 4.55), erreichte aber nicht annähernd das Niveau der Tiere ohne  $\text{AT}_1\text{R}$ -Transgen (s. Abb. 4.47). Des Weiteren verdeutlichen die M-Mode Aufnahmen, dass die ISO-induzierte Kontraktilität in  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Herzen mit CRP4-Ablation stark verringert ist (s. Abb. 4.55). Die  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Tiere sind also nicht mehr in der Lage, ihre Kontraktionskraft

zu steigern, um das Niveau der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  Tiere zu erreichen. In vorgegangenen Versuchen mit CRP4-WT und CRP4-KO Tieren ohne  $\text{AT}_1\text{R}$ -Transgen nivellierten sich vormals signifikante Unterschiede unter physiologischen Bedingungen nach der ISO-Injektion (s. Abb. 4.48). Dass die Anpassung der Kontraktilität von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Herzen an das Niveau der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  Herzen durch die langanhaltende intensivierte Ang II/ $\text{AT}_1\text{R}$ -Signaltransduktion nicht mehr möglich ist, belegt eindeutig, dass sich die Deletion von CRP4 in diesem genetischen Langzeitmodell nachteilig auf die Kontraktionsfähigkeit und die Herzleistung auswirkt, bzw. der Verlust von CRP4 in Kombination mit der  $\text{AT}_1\text{R}$ -Überexpression die Herzfunktion so weit verschlechtert, dass  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Herzen kaum mehr in der Lage sind, auf den sympathomimetischen Stimulus zu reagieren. Die signifikant verschlechterte Kontraktilität der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$ -Herzen blieb somit auch nach der ISO-Injektion bestehen, wie an der Verkürzungsfraction (%FS:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$   $35,89 \pm 2,30\%$ ;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$   $43,46 \pm 2,36\%$ , s. Abb. 4.56 A) und der Auswurffraction (%EF:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$   $65,00 \pm 3,19\%$ ;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$   $74,54 \pm 2,74\%$ , s. Abb. 4.56 B) deutlich wurde.



**Abb. 4.56: Echokardiographie der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Doppelmutanten nach ISO-Injektion.**

Dargestellt sind die echokardiographisch erhaltenen Mittelwerte vor und nach akuter Injektion von ISO von männlichen  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$  ( $n=7$ ) und  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Tieren ( $n=9$ ). ISO führte in beiden Genotypen nur zu einem moderaten Anstieg (A) der Kontraktilität (%FS) und (B) der Auswurffraction (%EF). Diese Parameter waren in  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Herzen signifikant verschlechtert. Die Bestimmung der Septumstärke (IVS) in (C) Diastole und (D) Systole, sowie die (E) diastolische und (F) systolische Hinterwandstärke (LVHW) nach ISO ergaben teilweise signifikant reduzierte Wandstärken der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$ -Herzen ( $\#p < 0,05$ ;  $\#\#p < 0,01$ ). Die signifikant unterschiedlichen Ausgangswerte entsprechen den Basalmessungen der Doppelmutanten aus Abb. 4.53 und Abb. 4.54 ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ; FS: Fractional Shortening; EF: Ejection Fraction).

Durch die Darstellung der Kammerwanddimensionen wird der dilatative Phänotyp der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$  Herzen ersichtlich. Die diastolischen Wandstärken zeigten sich bei CRP4-Defizienz nach der ISO-Applikation deutlich vermindert (IVS:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$   $1,056 \pm 0,03$  mm;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$   $1,181 \pm 0,044$  mm, s. Abb. 4.56 C; LVHW:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$   $0,960 \pm 0,064$  mm;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$   $1,151 \pm 0,105$  mm, s. Abb. 4.56 E). Ebenso blieben die bereits basal vorhandenen Unterschiede (s. Abb. 4.46) in der systolischen Septumsdicke sowie der linksventrikulären Hinterwandsverdickung nach ISO zwischen den Genotypen bestehen (IVS:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$   $1,483 \pm 0,072$  mm;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$   $1,803 \pm 0,031$  mm, s. Abb. 4.56 D; LVHW:  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-KO}$   $1,441 \pm 0,079$  mm;  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}/\text{CRP4-WT}$   $1,676 \pm 0,107$  mm, s. Abb. 4.56 F).

Mit Hilfe der echokardiographischen Messungen konnte in zwei unterschiedlichen Hypertrophiemodellen die Wichtigkeit von kardialen CRP4 dargelegt werden. Im genetischen Hypertrophiemodell mit der myozytenspezifischen Überexpression des  $\text{AT}_1\text{R}$  führte die zusätzliche Deletion von CRP4 zu einer weiteren Verschlechterung der Herzfunktion (s. 4.11.3). Im Ang II-Infusionsmodell wurde deutlich, dass der Verlust von CRP4 in einem asymmetrischen, obstruktiven Wachstum der Ventrikelwände resultiert (s. 4.10.3). Die Wichtigkeit von CRP4 als gegenregulatorischer Faktor bei Ang II-induzierter kardialer Hypertrophie wurde bereits zu Beginn der Arbeit gezeigt, denn CRP4-defiziente Tiere (CRP4-KO und CRP4-HET) entwickelten unter Ang II-Dauerinfusion eine massive kardiale Hypertrophie, die gekennzeichnet war durch vergrößerte Myozyten und einer starken Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen (s. 4.4.3 und 4.6). Dieses Myokardwachstum wurde nicht vom Verlust von CRP4 im Gefäßsystem beeinflusst (s. 4.5). Des Weiteren waren CRP4-KO Tiere in der Lage, ein physiologisches Ausdauertraining zu absolvieren (s. 4.4.2). Dennoch zeigten CRP4-defiziente Tiere bereits unter physiologischen Bedingungen Anzeichen einer verschlechterten Herzfunktion (s. 4.10.1). Dieser Befund ist vermutlich auf spezifische Interaktionspartner von CRP4 im Kardiomyozyt zurückzuführen. CRP4 bindet an eine Vielzahl zytoskelettaler und kontraktile Proteine, der Verlust von CRP4 führt demnach zu Störungen im Ablauf der Herzkontraktion (s. 4.8). Darüber hinaus ist CRP4 auch im Herz ein Substrat der cGKI (s. 4.7.5) und vermittelt möglicherweise protektive cGKI-Effekte bei Ang II-induzierten kardialen Umbauprozessen. Der Verlust von CRP4 führte zu Veränderungen der cGKI-Aktivität sowie zu Verschiebungen im Expressionsmuster von Komponenten des cGMP/cGKI-Signalwegs (s. 4.7). Eine Analyse des CRP4-Proteoms  $\pm$  Ang II hat darüber hinaus ergeben, dass eine Vielzahl weiterer Proteine CRP4-abhängig reguliert sind (s. 4.9.1 und 4.9.2). Mit Crip 1 wurde durch die vergleichende Proteomanalyse ein weiteres LIM-Protein identifiziert, das den Verlust von CRP4 kompensiert und die CRP4-defizienten Tiere möglicherweise vor einer weiteren Verschlechterung des kardialen Phänotyps bewahrt (s. 4.9.4).



## 5 Diskussion

Kardiale Hypertrophie entsteht durch eine Überbelastung des Arbeitsmyokards durch Bluthochdruck, neurohumorale Stimulation oder Mutationen, die zu Fehlbildungen sarkomerischer Proteine führen (Frey et al. 2004). Kurzfristig ist die Herzmuskelhypertrophie als Anpassungsmechanismus an die veränderten hämodynamischen Verhältnisse zu verstehen. Persistierende pathologische Stimuli (s.o.) fördern die strukturellen Veränderungen und damit den Übergang der Herzhypertrophie zur Herzinsuffizienz (Lorell and Carabello 2000). Damit ist die Herzmuskelhypertrophie eine wichtige Determinante der kardialen Morbidität und Mortalität. Therapieoptionen, die mit unterschiedlichen Modulatoren der Signaltransduktion bei kardialer Hypertrophie interferieren und damit die Entstehung oder Progredienz dieses Krankheitsbildes beeinflussen, sind noch unzureichend charakterisiert. Insbesondere fehlen Ansätze, die auf die Stimulation gegenregulatorischer, d.h. protektiver Systeme abzielen (Lip 2001). In diesem Kontext ist eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems als eine entscheidende Größe des pathologischen kardialen *Remodelings* zu verstehen (Booz and Baker 1996), während der cGMP/cGKI-Signalweg eine wichtige gegenregulatorische Determinante der myokardialen Umbauprozesse darstellt (Hammond and Balligand 2012, Patrucco et al. 2014). Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde die Relevanz des cGMP/cGKI-Signalwegs und des kardialen cGKI-Effektorproteins CRP4 für die Entwicklung und Progression einer hypertrophen Herzerkrankung unter systemischer, bzw. kardiomyozytenspezifischer Stimulation des Ang II/AT<sub>1</sub>R-Signalwegs untersucht.

### 5.1 Untersuchungen an Mäusen mit myozytenspezifischer Überexpression des AT<sub>1</sub>R

#### 5.1.1 Kardialer Phänotyp der $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse

Angiotensin II ist eine wichtige Determinante des Gefäßwiderstands und der Blutdruckregulation. Neben der direkten vasokonstriktorischen Wirkung auf sämtliche Gefäße induziert Ang II über renale Effekte zudem eine Erhöhung des Blutvolumens (Fyhrquist et al. 1995). Im Zusammenspiel mit Aldosteron, das wiederum durch erhöhte Ang II-Spiegel aus der Nebennierenrinde freigesetzt wird, forciert Ang II die Na<sup>+</sup>-Rückresorption und somit auch die Wasserretention (Williams and Williams 2003). Ebenso exprimieren zahlreiche Zelltypen des Herzens, insbesondere Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten Ang II-Rezeptoren, über die bei erhöhter RAAS-Aktivität Hypertrophie und Fibrosierung direkt induziert werden (Crawford et al. 1994, Guo et al. 2001). Sowohl eine Erhöhung der Nachlast durch Ang II über renovaskuläre Effekte, als auch die direkte Beeinflussung verschiedener kardialer Zelltypen führen zu einer krankhaften Herzmuskelhypertrophie (Kim and Iwao 2000). Diese pleiotropen Wirkungen erschweren in einem präklinischen

Hypertrophiemodell nach Dauerinfusion des Neurohormons Ang II eine exakte Zuordnung der pro-hypertrophen und pro-fibrotischen Effekte von Ang II zu einem definierten kardialen Zelltyp. Aktuelle Befunde deuten darauf hin, dass dem cGMP/cGKI-Signalweg eine protektive Funktion vor allem bei Ang II-induziertem kardialem *Remodeling* zukommt: Die Analyse genetisch veränderter Mäuse mit spezifischer Ablation der cGKI in Kardiomyozyten (Frantz et al. 2013), bzw. in sämtlichen nicht-glattmuskulären Zellen (Patrucco et al. 2014) impliziert, dass dem cGMP/cGKI-Signalweg insbesondere eine große Bedeutung bei der Gegenregulation pro-fibrotischer Effekte von Ang II in Herzmuskelzellen zuteil wird. Da auch die cGKI in zahlreichen Herzzelltypen exprimiert wird, eine Kommunikation dieser Zellen bei der hypertrophen Umgestaltung des Myokards wahrscheinlich ist, und zudem cGMP/cGKI in vaskulären Muskelzellen und der Niere mit dem AngII/AT<sub>1</sub>R-Signalweg interagieren könnte, wurden diese Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst auf ein Mausmodell mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression des humanen AT<sub>1</sub>R erweitert (Paradis et al. 2000). In diesem genetischen Herzhypertrophiemodell sind die Wachstumseffekte primär auf die direkte Aktivierung des Ang II/AT<sub>1</sub>R-Signalwegs in Kardiomyozyten zurückzuführen. Pleiotrope Effekte durch exogen zugeführtes Ang II auf andere Herzzelltypen sind ebenso ausgeschlossen wie der Einfluss des Blutdrucks, denn  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse sind normoton und präsentieren sich erwartungsgemäß mit einer normalen Herzfrequenz (Paradis et al. 2000). In dem hier verwendeten  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Herzhypertrophiemodell führt die Rezeptorüberexpression in den transgenen Mäusen wie erwünscht zu einer Hypertrophie, verbunden mit einer Kammerdilatation und massiver Akkumulation von fibrotischen Einlagerungen (s. 4.1.1). Dennoch erreichen die  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere das Erwachsenenalter (das durchschnittliche Überleben beträgt 140 Tage) und stehen somit auch für funktionelle Experimente zur Verfügung. Die zusätzliche Zufuhr von exogenem Ang II toleriert diese Mauslinie jedoch nicht (Paradis et al. 2000). Bereits bei der Erstbeschreibung durch Paradis et al. zeigten sich die kardialen Umbauprozesse (in Gegenwart von endogenem Ang II) sensitiv gegenüber dem spezifischen AT<sub>1</sub>R-Antagonisten Losartan (Paradis et al. 2000). Interessanterweise führt die Überexpression des humanen AT<sub>1</sub>R-Subtyps in diesem Hypertrophiemodell damit zu einem vergleichsweise robusten Phänotyp, der sich auch in dem längeren Überleben der Tiere zeigt. In einer alternativen Mauslinie mit kardiomyozytärer Überexpression des murinen AT<sub>1</sub>R starben die transgenen Nachkommen dagegen schon wenige Tage nach ihrer Geburt (Hein et al. 1997). Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mauslinie besitzen aufgrund ihres genetischen Hintergrunds nur ein Renin-Gen, wodurch die gesamte RAAS-Aktivität etwas niedriger zu sein scheint als bei Tieren mit zwei Renin-Genen, die einen leicht erhöhten Blutdruck und folglich auch größere Nebeneffekte, und eine insgesamt höhere Mortalität aufweisen (Mazzolai et al. 1998). Die Protease Renin markiert den Beginn der Kaskade zur Synthese von Ang II (s. 1.1.5). Endogen erhöhte Renin und folglich Ang II-Spiegel könnten vor allem über renovaskuläre Effekte somit auch im  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Modell zu einer Verschlechterung des kardialen Phänotyps beitragen. Interessanterweise beobachteten Yasuda et al. in früheren Experimenten mit der auch in dieser Arbeit verwendeten  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mauslinie bereits eine spontane, konstitutive Rezeptoraktivität. Durch eine zusätzliche genetische Manipulation der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere in Form von Deletion der Ang

II-Vorstufe Angiotensinogen bilden diese Tiere kein endogenes Ang II, entwickeln aber dennoch dieselbe kardiale Symptomatik (Ventrikeldilatation, Fibrosierung) wie  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse, die durch die Gabe von Candesartan, einem inversen Agonist am AT<sub>1</sub>R gemildert werden konnte (Yasuda et al. 2012). Dass also allein die konstitutive Aktivität des AT<sub>1</sub>R ausreicht, pathophysiologisches Herzmuskelwachstum zu induzieren, ermöglicht eine neue Therapieoption bei hypertrophen Herzerkrankungen mit inversen Agonisten, welche an spontan aktive Rezeptoren binden und deren Aktivität herabsetzen (de Ligt et al. 2000). Tatsächlich konnte der kardiale Phänotyp in diesen Angiotensinogen-KO/ $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren nicht gemildert werden, wenn Candesartan chemisch verändert vorlag und seine invers-agonistische Wirkung verloren hatte (Yasuda et al. 2012). Die progressiv verlaufende Herzmuskelhypertrophie der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere könnte auch auf einer zusätzlichen autokrinen Aktivierung des RAAS beruhen. Je stärker das Herz an Größe zunimmt, desto größer wird der mechanische Scherstress, welcher wiederum die Freisetzung von Angiotensin II aus dem Kardiomyozyten induziert, was in einem in sich verstärkenden Mechanismus zu einer weiteren Stimulation der überexprimierten AT<sub>1</sub>R führen könnte (Sadoshima et al. 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zunächst bereits beschriebene und auch offensichtliche phänotypische Ausprägungen der pathologischen kardialen Umbauprozesse bestätigt werden (s. Abb. 4.2). Die bereits in der Literatur dokumentierte progressive Hypertrophie des Myokards (Paradis et al. 2000) war nach 120 Tagen sichtbar. Ursächlich hierfür waren stark vergrößerte Myozyten und eine massive Einlagerung von Extrazellulärmatrix im Interstitium (s. Abb. 4.4). Auch die ca. 350-fache AT<sub>1</sub>R-Überexpression konnte mittels qRT-PCR eindeutig den Kardiomyozyten zugeordnet werden (s. Abb. 4.1). Durch Vermessen der Kardiomyozytenquerschnittsfläche in Gewebefeinschnitten, sowie durch Bestimmung der Zellgröße isolierter Kardiomyozyten ließ sich das Ausmaß der Zellhypertrophie der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere im Vergleich zu deren WT-Wurfgeschwistertieren als signifikant bestätigen (s. Abb. 4.4 B, C). Letztlich ergaben sich keine laborspezifischen Abweichungen für die publizierte  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mauslinie; das Modell schien damit für weitere Hypertrophie-Untersuchungen gut geeignet. Auch auf molekularer Ebene konnte die progressiv verlaufende Hypertrophie anhand des verringerten mRNA-Gehalts der SERCA2 bestätigt werden (s. Abb. 4.8 E). Häufig ist die Herzhypertrophie durch Veränderungen im Verhältnis der adulten und fetalen  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Isoform der schweren Myosinkette gekennzeichnet (Krenz and Robbins 2004). Die eigenen Ergebnisse zeigen einen leichten Rückgang der  $\alpha$ -Isoform im  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Modell und kaum Änderungen für die MHC  $\beta$ -Isoform (s. Abb. 4.8 C, D). Dies ist möglicherweise über die Eigenheiten des hier untersuchten genetischen Hypertrophie-modells erklärbar. Die kardiomyozytenspezifische Überexpression des AT<sub>1</sub>R besteht seit dem Embryonalstadium, da der  $\alpha$ MHC-Promotor, der die Überexpression des humanen AT<sub>1</sub>R kontrolliert, an Tag 7,5-8 des Embryonalstadiums aktiviert wird (Lyons et al. 1990). Auf diese Weise ist es vermutlich zu einer Adaptation bei der Zusammensetzung der kontraktilen Elemente im  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mausmodell gekommen.

Da krankhaft vergrößerte Kardiomyozyten die optimale Kontraktionsfähigkeit sowie die elektromechanische Kopplung der Zellen untereinander beeinflussen und die Integrität des

Herzmuskels generell durch die massive Fibrosierung (s. Abb. 4.4 D) behindert sein könnte, wurden echokardiographische Untersuchungen zur Bestimmung der Herzfunktion von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren durchgeführt. Eine Repolarisationsstörung der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Herzen verbunden mit Arrhythmien war bereits bekannt (Rivard et al. 2008). Die Ultraschallmessungen bestätigten auch die stark eingeschränkte Herzfunktion der 120 Tage alten  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere (s. Abb. 4.11). Zu diesem Zeitpunkt präsentierten sich die  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäuse mit dünnen Ventrikelwänden und einem großen Kammervolumen als Kennzeichen einer deutlichen Myokarddilatation (s. Abb. 4.3). Diese typischen Änderungen in der Herzgeometrie entwickeln sich normalerweise aufgrund einer chronischen Volumenbelastung des Herzens und markieren den Übergang zum letztlichen Herzversagen (Katz et al. 2013). Im Vergleich dazu ließen sich in 60 Tage alten  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäuse eher verdickte Kammerwände beobachten (Daten nicht gezeigt).

Obwohl der verstärkte Ang II/AT<sub>1</sub>R-Signalweg in den transgenen Mäusen prinzipiell auf Kardiomyozyten beschränkt ist, bezeugen auch die Sirius-Rot Färbungen an Feinschnitten des Herzens die massive Fibrosierung (s. Abb. 4.4 D). Da die Myozyten unter dieser dauerhaften hypertrophen Stimulation nicht zur Regeneration fähig sind, könnten hier apoptotische oder nekrotisch beschädigte Muskelzellen durch Fibroblasten bzw. Extrazellulärmatrix ersetzt worden sein. Wahrscheinlich ist aber auch ein intensiver *Crosstalk* zwischen Kardiomyozyten und Fibroblasten (Kakkar and Lee 2010): Es ist bekannt, dass kardiomyozytäre Zytokine Fibroblasten aktivieren können (Takeda and Manabe 2011). Tatsächlich könnten erhöhte Mengen von CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) mRNA in den Herzlysaten der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere ein direkter Hinweis für die Kommunikation von Kardiomyozyten mit Fibroblasten sein (Abb. 4.4 F). CTGF ist bei kardialer Hypertrophie hochreguliert, was u.a. über Ang II und eine nachgeschaltete Aktivierung der Proteinkinase C vermittelt wird. Im Zusammenspiel mit TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) kann CTGF über längere Zeiträume fibrotische Umgestaltungen des Myokards induzieren (Mori et al. 1999, Perbal 2004, Brigstock 2010). Diese beinhalten beispielsweise die Transformation von Fibroblasten in Myofibroblasten, welche einen intermediären Zelltyp zwischen Fibroblast und glatter Muskelzelle darstellen und große Mengen an Extrazellulärmatrix produzieren (Hinz et al. 2001). Identifizieren lassen sich Myofibroblasten u.a. über die Expression glattmuskelspezifischer Aktinstrukturen wie  $\alpha$ -SMA (Santiago et al. 2010). Die  $\alpha$ -SMA-Expression war ebenfalls in den transgenen Tieren signifikant erhöht, was eine Akkumulation von Myofibroblasten im Myokard des  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Hypertrophie-modells bestätigt (s. Abb. 4.4 E). mRNA-Transkripte kardialer Kollagen-Typen wurden in Herzen transgener Tiere tendenziell vermehrt detektiert (s. Abb. 4.9 C, D). In diesem genetischen Hypertrophie-modell entsteht die Fibrosierung des Herzmuskels wahrscheinlich durch eine kontinuierliche Kollagensynthese über einen langen Zeitraum. Demnach war ein massiver Anstieg der Kollagen-Transkripte wie sie bei Infusionsmodellen beobachtet werden (Westermann et al. 2012), in denen Fibroblasten/Myofibroblasten durch die exogene Zufuhr von pro-fibrotischen Stimuli direkt betroffen sind, nicht zu erwarten.

Interessanterweise wurden in den  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Herzen auch Veränderungen im Expressionsstatus von Faktoren des *Turnovers* der Extrazellulärmatrix detektiert (s. Abb.

4.10). Die kardiale ECM kann als ein komplexes Netzwerk betrachtet werden, das in gesunden Herzen funktionsunterstützend ist und einem ständigen, kontrollierten Auf- und Abbau unterliegt. Dieser wird vorrangig von Matrixmetalloproteasen (MMPs) und deren gewebespezifischer Inhibitoren, den TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) reguliert (Miner and Miller 2006). Hypertrophe Umbauprozesse verändern auch Expression und Aktivität dieser Enzyme (Ahmed et al. 2006), was wiederum zu einem großen Teil durch Myofibroblasten reguliert wird (Berk et al. 2007). Bei Expressionsuntersuchungen von Faktoren des ECM-Umbaus wurden in Herzlysaten von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäusen signifikant verringerte mRNA-Mengen für MMP9 detektiert (s. Abb. 4.10 A). Im Zusammenspiel mit weiteren kardialen MMPs ist MMP9 insbesondere für die finale Degradation von Kollagenfragmenten zuständig, die bereits von anderen MMPs zu kleineren Bruchstücken abgebaut wurden (Nagase et al. 2006). Möglicherweise trägt die verringerte MMP9-Expression und die daraus reduzierte Degradation dieser kleinen Kollagenfragmente zur Akkumulation der Extrazellulärmatrix in  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren bei. In Herzen von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren wurden darüber hinaus signifikant erhöhte mRNA-Mengen von TIMP1, einem Inhibitor diverser MMPs, der auch mit MMP9 komplexieren kann (Visse and Nagase 2003), detektiert (s. Abb. 4.10 B). Dieser Befund stimmt mit der Literatur überein: Erhöhte TIMP1-Spiegel wurden bereits bei linksventrikulärer Hypertrophie und Herzinsuffizienz beschrieben (Laviades et al. 1998). Einhergehend mit verringerten MMP9-Spiegeln könnte eine TIMP1-induzierte Hemmung diverser MMPs im  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mausmodell zur beobachteten Myokardfibrosierung (s. Abb. 4.4) beitragen. Um dieser Vermutung nachzugehen, sollten künftige Untersuchungen der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere die Bestimmung der Proteinmengen von Faktoren des ECM-Umbaus, sowie die Messung der Aktivität unterschiedlicher MMPs und TIMPs beinhalten. Eine pharmakologische Modulation der Aktivität von MMPs bzw. TIMPs bei kardialer Fibrosierung wäre ein interessanter Therapieansatz, jedoch muss das komplexe Zusammenwirken, mögliche Kompensationsmechanismen und die Balance zwischen MMPs und TIMPs insbesondere bei hypertrophen Herzerkrankungen zum besseren Verständnis insgesamt weiter erforscht werden (Spinale et al. 2000, Pauschinger et al. 2002, Chiao et al. 2012).

### 5.1.2 Hochregulation des cGMP/cGKI-Signalwegs in $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren

Ein intaktes und funktionsfähiges cGMP/cGKI-Signalsystem wird in sämtlichen Organen des Körpers für eine einwandfreie Zellfunktion benötigt (Pfeifer et al. 1998, Hofmann and Wegener 2013). Speziell im Myokard ist die cGKI unter physiologischen Bedingungen an der exakten Abstimmung der Herzmuskelkontraktion beteiligt (Wegener et al. 2002) und kann darüber hinaus in hypertrophen Herzen Ang II-induzierten Gewebeumbauprozessen entgegenwirken (Frantz et al. 2013). Die natriuretischen Peptide ANP und BNP sind wichtige Komponenten des fetalen Genprogramms, die im Zuge des hypertrophen Herzwachstums - u.a. nach Ang II-Stimulation - im Sinne eines Adaptationsmechanismus verstärkt gebildet werden (Volpe et al. 2014). So war auch in den Herzen der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere eine starke Hochregulation von ANP und BNP erkennbar (s. Abb. 4.8 A, B). Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass sowohl die Konzentration an kardialem cGMP als auch

die cGKI-Proteinmenge sowie die cGKI-mRNA Spiegel in  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Herzen signifikant erhöht waren (Abb. 4.5 A-D). Diese Befunde implizieren eine kompensatorische Hochregulation dieses Signalwegs in Herzmuskelzellen und verdeutlichen erneut die Wichtigkeit des cGMP/cGKI-Systems bei einer intensivierten kardiomyozytären Ang II-Signaltransduktion. Eine Vielzahl von Studien zeigten bereits die enge Verknüpfung des protektiven cGKI- und des Hypertrophie-promovierenden Angiotensin II-Signalwegs (Li et al. 2002, Booz 2005, Kilic et al. 2007, Tokudome et al. 2008, Klaiber et al. 2010). So führte die kardiomyozytenspezifische Ablation der cGKI bei hypertropher Ang II-Stimulation zu einem den  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Herzen analogen Phänotyp mit dilatierten, funktionseingeschränkten Herzen und massiver Myokardfibrosierung (Frantz et al. 2013). Gegenregulatorische Mechanismen, die durch eine erhöhte cGKI-Expression im Kardiomyozyten (wie z.B. in  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Herzen) möglicherweise verstärkt ablaufen, greifen beispielsweise modulierend in den myozytären Ca<sup>2+</sup>-Haushalt ein. Ca<sup>2+</sup> ist ein wichtiges Signalmolekül, das über Aktivierung der CaMKII und CnA zu einer Induktion des fetalen Genprogrammes führt (s. Abb. 1.3, Hammond and Balligand 2012). Insbesondere bei neurohumoraler Stimulation hemmt die cGKI den Ang II-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Extrazellulärraum durch TRPC6 und TRPC3-Kanäle, was wiederum indirekt die Aktivität von CnA reduziert (Koitabashi et al. 2010, Domes et al. 2014). Darüber hinaus forciert die cGKI über eine Aktivitätssteigerung von RGS2 und RGS4 und die dadurch beschleunigte Hydrolyse von GTP zu GDP eine Abschaltung der G<sub>αq</sub>-abhängigen hypertrophen Ang II-Stimulation (Tokudome et al. 2008, Klaiber et al. 2010). Die cGKI-abhängige Phosphorylierung der RGS-Proteine führt in diesem Zusammenhang zu einer Translokation dieser Proteine an die Myozytenmembran (Takimoto et al. 2009). Für RGS2 wurde zudem kürzlich in Zellkultursystemen gezeigt, dass dessen Phosphorylierung durch die cGKI nach Stimulation mit ANP noch verstärkt werden konnte (Klaiber et al. 2010). Da die GC-A, der Rezeptor für ANP und BNP in hypertrophen Herzen meist desensibilisiert vorliegt (Flora and Potter 2010), müsste die Relevanz dieses Effekts *in vivo* verifiziert werden, und möglicherweise auf alternative cGMP-erhöhende Substanzen zurückgegriffen werden. So stellen z.B. Antikörper, die phosphoryliertes RGS2 detektieren eine Möglichkeit dar, die Aktivität der cGKI bei verstärkter Ang II-Signaltransduktion zu evaluieren. Im Rahmen der Versuche an  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren wurde zur Bestimmung der Kinase-Aktivität zunächst die cGKI-abhängige Serin-239 Phosphorylierung des ubiquitären cGKI-Substrats VASP untersucht (Smolenski et al. 1998). Tatsächlich konnte eine verstärkte VASP-Phosphorylierung in  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Herzen gemessen werden, diese erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (s. Abb. 4.5 E, F). Möglicherweise ist eine Interaktion der cGKI mit VASP in hypertroph-umgestalteten Herzen vernachlässigbar. Phosphospezifische Antikörper gegen weitere cGKI-Substrate wie Phospholamban, Troponin I oder RGS-Proteine stellen Alternativen zur Messung der tatsächlichen Kinaseaktivität in  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Herzen dar. Eine weitere Möglichkeit sind direkte cGKI-Aktivitätsmessungen mit kommerziell erhältlichen Kit-Systemen.

Das Ausmaß bzw. inwieweit die Hochregulation eines funktionsfähigen cGMP/cGKI-Systems die  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere vor einer noch schwerwiegenderen kardialen Symptomatik schützt, könnte anhand doppeltransgener  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/cGKI-KO Mäusen abgeschätzt werden.

Diese würden idealerweise durch Verpaarung der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere mit kardiomyozytenspezifischen cGKI-KO Tieren generiert werden. Auf diese Weise ließe sich ein Phänotyp analysieren, der sich ausnahmslos auf den Kardiomyozyt beschränkt, eventuelle parakrine Effekte durch Fibroblasten/Myofibroblasten wie sie in Infusionsmodellen zu erwarten sind, wären somit ausgeschlossen. Prinzipiell ist durch die zusätzliche Deletion der cGKI mit einer Verschlimmerung der kardialen Symptomatik der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere und einer verkürzten Lebenserwartung zu rechnen. Ferner könnte untersucht werden, wie sich die Hypertrophie auf Zellebene in diesen Doppelmutanten verhält, denn bisher standen meist antifibrotische Wirkungen der cGKI im Vordergrund (Patrucco et al. 2014). Durch den Verlust der cGKI wären außerdem erhöhte myozytäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ /cGKI-KO Mäusen zu erwarten. Durch eine vergleichende Genexpressionsanalyse könnte darüber hinaus die Rolle der cGKI an der Induktion bzw. Regulation des fetalen Genprogramms ermittelt werden.

### 5.1.3 PDEs regulieren die myozytären cGMP-Spiegel in $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäusen

Die Bestimmung der kardialen cGMP-Spiegel von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäusen und deren WT-Wurfgeschwistertiere ergab signifikant höhere cGMP-Konzentrationen in Gesamtherzlysaten von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tieren (s. Abb. 4.5 D). Eine kompensatorisch gesteigerte kardiomyozytäre cGMP-Generierung aufgrund der amplifizierten Ang II-Signaltransduktion wird in diesem Zusammenhang als wahrscheinlich angesehen. Um die erhöhten cGMP-Spiegel explizit auf den Kardiomyozyten eingrenzen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels FRET-Messungen (Förster-Resonanzenergietransfer) der cGMP-Gehalt in isolierten, lebenden Kardiomyozyten der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mauslinie bestimmt. Hierfür wurden  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$  transgenen Tiere mit Reportermausen verpaart, die den zytosolischen red cGES-DE5-Biosensor tragen (Gotz et al. 2014). Die FRET-Signale bestätigten die erhöhten cGMP-Spiegel im Gesamtherzlysate der transgenen Tieren nun spezifisch im Kardiomyozyt (s. Abb. 4.12 A). Darüber hinaus implizierten die FRET-Messungen eine Beteiligung von PDEs, die den Abbau von cGMP katalysieren (s. Abb. 4.12 B): Durch Zugabe des unspezifischen PDE-Hemmstoffes IBMX konnten die cGMP-Spiegel vor allem in WT-Kardiomyozyten weiter erhöht werden und erreichten annähernd das Niveau der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Myozyten. Ein zusätzlicher IBMX-induzierter Anstieg der cGMP-Spiegel in Kardiomyozyten aus  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Herzen war dagegen nur schwach ausgeprägt (s. Abb. 4.12 B). Ein weiterer Versuchsansatz beinhaltete die Stimulation der Kardiomyozyten mit IBMX ohne CNP-Prästimulation, was einen steilen Anstieg der cGMP-Konzentration in Kardiomyozyten aus WT-Tieren zur Folge hatte, während für die cGMP-Spiegel von  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Myozyten nur ein moderater Anstieg zu verzeichnen war (Abb. 4.12 C, D). Diese Befunde deuteten darauf hin, dass verschiedene PDEs in hypertrophen Herzen der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere bereits unter Basalbedingungen annähernd maximal gehemmt sind bzw. deren Expressionsmuster verändert war. Tatsächlich ergaben Expressions-untersuchungen von cGMP-hydrolysierenden PDEs in Gesamtherzlysaten signifikant verringerte PDE1C-mRNA Mengen (s. Abb. 4.13 D). Diese duale,  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM regulierte PDE hydrolysiert cGMP und cAMP mit annähernd derselben Aktivität (Vandeput et al. 2007). Kürzlich durchgeführte

Aktivitätsmessungen ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der PDE1C-Hydrolyseaktivität für cGMP in Gesamtherzlysaten von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren und deren WT-Wurfgeschwister (Straubinger et al. 2015). Diese Messungen bestätigten aber, dass cGMP-hydrolysierende Esterasen der PDE1-Familie einen großen Anteil zur gesamten kardialen cGMP-Hydrolyseaktivität beitragen (Lukowski et al. 2010). Da die PDE1C aufgrund ihrer dualen Aktivität als wichtiges Bindeglied zwischen cGMP und cAMP-abhängigen Signalwegen angesehen wird, stellt die Hemmung der PDE1C eine künftige therapeutische Option zur Behandlung hypertropher Herzerkrankungen dar (Miller et al. 2009). Hohe Mengen PDE1C-mRNA konnten darüber hinaus in Herzmuskelzellen (nicht aber in Fibroblasten, s. Anhang, Abb. 7.3 C) detektiert werden. Die funktionale Untersuchung der myozytären PDE1C lässt sich künftig anhand einer kürzlich generierten PDE1C-KO Mauslinie evaluieren (Cygnar and Zhao 2009). Die Analyse der mRNA-Transkriptmengen der ebenfalls dualen Esterasen PDE2A (durch cGMP-stimuliert, cAMP-selektiv) und PDE3A (durch cGMP-gehemmt, cAMP-selektiv) ergab ebenfalls verringerte Expressionslevel dieser PDEs in  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Myozyten, diese erreichten aber nicht das Signifikanzniveau (s. Abb. 4.13 A, B).

Zusammengefasst bestätigen die ELISA- (s. Abb. 4.5 D) und die FRET-Messungen (s. Abb. 4.12) sowie die Untersuchungen zur Expression und Aktivität der PDEs damit eine Anpassung des cGMP-Signalwegs an die chronische AT<sub>1</sub>R-Überexpression. Die Befunde zu den dualen PDEs im  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Modell (s. o.) deuten darauf hin, dass eine chronische Ang II/AT<sub>1</sub>R-Aktivität in Herzmuskelzellen das dynamische Gleichgewicht zwischen den intrazellulären Botenstoffen cGMP und cAMP verschiebt. Der *Crosstalk* von cGMP und cAMP in Herzmuskelzellen ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Mongillo et al. 2006, Gotz et al. 2014) und wird primär über die cGMP-/cAMP-regulierten PDEs realisiert (Fischmeister et al. 2006, Conti et al. 2014). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Änderungen des kardialen cGMPs könnten letztlich auch auf eine Modulation von cAMP/PKA-abhängigen Prozessen zurückzuführen sein (Zaccolo and Movsesian 2007). Es muss zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben, inwieweit der cAMP/PKA-Signalweg an der Ausprägung des progressiven Krankheitsbildes der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere beteiligt ist. Die Aktivität und Lokalisation der cGMP-/cAMP-regulierten PDEs bestimmt darüber hinaus die intrazelluläre Kompartimentierung von cAMP-/cGMP-Signalen in Herzmuskelzellen (Castro et al. 2006, Stangherlin et al. 2011). Bei hypertrophen Herzerkrankungen werden pathophysiologisch relevante Veränderungen der so entstehenden cGMP- bzw. cAMP-Pools intensiv diskutiert (Nikolaev et al. 2010, Perera et al. 2015). Es ist aktuell aber unklar, inwiefern die Überexpression des AT<sub>1</sub>R Einfluss auf die Kompartimentierung von cGMP (oder cAMP) hat. Kürzlich generierte FRET-Sensoren, die an bestimmten Zellkompartimenten der Herzmuskelzellen verankert sind, könnten hier Aufschluss bringen. Signale von Sensoren an Caveolin-reichen Domänen der Zellmembran (Wachten et al. 2010) würden auf NO-induziertes cGMP deuten, welches zum sogenannten „globalen cGMP“ beiträgt (Mineo and Shaul 2012). FRET-Sensoren, die an Phospholamban gekoppelt sind, könnten zur Visualisierung von endogenem cGMP in der Umgebung des Sarkoplasmatischen Retikulums dienen, welches primär durch membranständige



Guanylatzyklen generiert wurde (Castro et al. 2006, Piggott et al. 2006). Diese Sensoren wurden bisher zur Messung von cAMP-Signalen realisiert (Sprenger et al. 2015). Letztlich sind die erhöhten cGMP-Spiegel im  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Modell wahrscheinlich als Resultat eines komplexen und dynamischen Zusammenwirkens von Rezeptoren, Generatoren und PDEs anzusehen.

#### **5.1.4 Die hypertrophen Umbauprozesse im $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mausmodell sind Sildenafil-insensitiv**

Die Hochregulation des gewöhnlich protektiven cGMP/cGKI-Systems impliziert einen positiven Einfluss des Signalwegs auf den schweren und progressiven Herzphänotyp im  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiermodell. In diesem Zusammenhang zeigte auch eine Hemmung der cGMP-abbauenden PDE5 durch SIL in unterschiedlichen Herzhypertrophie-Modellen einen positiven Einfluss auf das kardiale *Remodeling* (Takimoto et al. 2005, Nishida et al. 2010, Westermann et al. 2012). Diese Effekte, insbesondere die an den SIL-Wirkungen tatsächlich beteiligten Zelltypen, werden jedoch sehr kontrovers diskutiert (Lukowski et al. 2010). Nach Aortenkonstriktion und damit verbundener Nachlastserhöhung sowie nach chronischer Infusion von Ang II wurden beispielsweise positive Effekte von SIL bezüglich einer Milderung der Hypertrophie und Fibrose ermittelt (Takimoto et al. 2005, Westermann et al. 2012). Andere Gruppen postulierten dagegen vor allem antifibrotische Eigenschaften von SIL im Ang II-Dauerinfusionsmodell (Patrucco et al. 2014) und bei experimentell induzierter Rechtsherzinsuffizienz (Borgdorff et al. 2014). Obwohl bis dato die Expression der PDE5 in Kardiomyozyten noch nicht endgültig geklärt ist, wurden die cGMP-abhängigen Effekte nach PDE5-Hemmung mittels SIL primär als Effekte von cGMP und cGKI in Kardiomyozyten selbst verstanden (Kass 2012, Takimoto 2012). Für das krankhafte Herzmuskelwachstum nach chronischer Stimulation der kardialen  $\beta_1$ -Adrenozeptoren konnte eine Beteiligung der kardiomyozytären cGKI jedoch generell ausgeschlossen werden (Lukowski et al. 2010). Dies lässt sich durch die grundsätzlich unterschiedlichen Signaltransduktionswege im Kardiomyozyt erklären (s. Abb. 1.3): Agonisten an  $G_{\text{os}}$ -gekoppelten  $\beta_1$ -Adrenozeptoren wie Isoprenalin induzieren ihre pro-hypertrophe Wirkung primär über cAMP/PKA-abhängige Signalwege, die über die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration weitere Mechanismen, z.B. die Transkription fetaler Gene, induzieren (Chowdhury et al. 2013). Die hypertrophe Stimulation durch das Neurohormon Ang II wird über  $G_{\text{aq}}$ -gekoppelte  $\text{AT}_1\text{R}$  vermittelt und beinhaltet neben der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speicherformen vor allem die Aktivierung einer Vielzahl intrazellulärer Proteinkinasen (PKC, MAPK, AKT/PKB, JAK) und der „kleinen“ G-Proteine (s. Abb. 1.3, Heineke and Molkentin 2006). Des Weiteren werden im Ang II-Infusionsmodell oder nach transversaler Aortenkonstriktion eine Vielzahl kardialer Zellen beeinflusst, insbesondere ist die Anzahl an Myofibroblasten in hypertrophen Herzen stark erhöht (Lukowski et al. 2014). Diese exprimieren sämtliche Bestandteile des cGMP/cGKI-Signalwegs und darüber hinaus (im Gegensatz zum Kardiomyozyt) hohe Mengen an PDE5 und könnten auf diese Weise die ausgeprägten antifibrotischen SIL-Effekte vermitteln (Patrucco et al. 2014). Die  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mäuse mit der spezifischen myozytären Überexpression des  $\text{AT}_1\text{R}$  bieten daher die einzigartige

Möglichkeit, die Wirkung von SIL auf den nur im Kardiomyozyten amplifizierten Signalweg und damit unabhängig von pleiotropen Effekten des Neurohormons Ang II zu studieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein etabliertes Protokoll zur Verabreichung von SIL über das Trinkwasser adaptiert (Adamo et al. 2010). Die Plasmaspiegel von SIL betragen durch diese Behandlung 70 nM und liegen damit deutlich oberhalb der  $IC_{50}$  (10 nM) von SIL für die Hemmung der PDE5 (Adamo et al. 2010). Wie in Abb. 4.6 gezeigt, führte diese Behandlung zu einem Anstieg der cGMP-Spiegel in Gesamtherzlysaten und Aorten, was vermuten lässt, dass der cGMP/cGKI-Signalweg in den Herzen der  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Mäuse per se noch nicht maximal aktiviert war. Dennoch zeigte SIL keinerlei positiven Effekte auf das normierte oder absolute Herzgewicht (s. Abb. 4.7 A, B), die myozytäre Hypertrophie (s. Abb. 4.7 C, D) oder das Ausmaß der kardialen Fibrosierung (s. Abb. 4.9 A, B). Ebenso wenig wurden auf molekularer Ebene Änderungen in der Expression von Hypertrophie- (ANP, BNP,  $\alpha$ MHC,  $\beta$ MHC, SERCA2) oder Fibrosemarker (Col1A1, Col1A2) durch SIL induziert (s. Abb. 4.8 A-E und Abb. 4.9 C, D). Dies steht im Widerspruch mit einigen Studien, die in hypertrophumgestalteten Herzen eine SIL-abhängige Genregulation beobachteten (Zhang et al. 2008, Koitabashi et al. 2010, Zhang et al. 2010). Eine Ausnahme waren die unter SIL-Therapie reduzierten mRNA-Spiegel für Calcineurin (CnA; Abb. 4.8 F). Über eine verminderte Expression der Phosphatase CnA unter SIL wurde bereits berichtet (Nagayama et al. 2009). CnA ist ein pro-hypertropher Faktor, der über NFAT-Transkriptionsfaktoren  $Ca^{2+}$ -abhängig die Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene induziert (Molkentin et al. 1998). Da jedoch keine SIL-bedingte Verbesserung des Phänotyps der  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Mäuse ermittelt werden konnte (s. o.) wurde diese verringerte Expression unter SIL-Therapie als vernachlässigbar betrachtet und auf CnA-Aktivitätsmessungen verzichtet.

Interessanterweise führte die SIL-Behandlung bereits nach 7 Tagen zu einem Anstieg des kardiovaskulären cGMPs (s. Abb. 4.6), wohingegen ein über 60 Tage fortgesetztes SIL-Therapieregime keinen erkennbaren Einfluss auf die molekularen und histologischen Parameter des *Remodelings* ausübte (s. 4.2.1 und 4.2.2). Einige Arbeitsgruppen postulierten für die primäre Zielstruktur PDE5 eine immunhistologisch starke Anreicherung an den Z-Scheiben muriner Kardiomyozyten (Nagayama et al. 2008, Zhang et al. 2008, Pokreisz et al. 2009). Lukowski et al. konnten diese Befunde mittels Immunoblot und Aktivitätsmessungen der PDEs (in Gegenwart und Abwesenheit von SIL) jedoch nicht bestätigen (Lukowski et al. 2010). Diese diskrepanten Ergebnisse lassen sich letztlich nur durch Untersuchungen an PDE5-KO Mäusen aufklären, sobald diese verfügbar sind. Die unter basalen Bedingungen im adulten Herzmuskel detektierbare PDE5-Menge ist wahrscheinlich eher gering, eine verstärkte Expression bei hypertrophem Wachstum, nach Myokardinfarkt oder in insuffizienten Herzen erscheint dagegen vorstellbar (Cremers et al. 2003, Das et al. 2005, Takimoto et al. 2005, Lin et al. 2006). Auch speziesbedingte Unterschiede im kardialen PDE5-Expressionsmuster sind bei der Interpretation der Effekte von SIL zu berücksichtigen (Degen et al. 2015). Zumindest in dem hier untersuchten  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Hypertrophiemodell zeigte sich das progressive Herzmuskelwachstum SIL-insensitiv. Dementsprechend waren die PDE5-mRNA Mengen in den Kardiomyozyten der  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Mäuse - im Vergleich zur cGKI-Expression - gering bzw. kaum oberhalb der Nachweisgrenze für die quantitative

RT-PCR-Methode (s. Anhang, Abb. 7.3 A, B). Diese kaum zu quantifizierende PDE5-mRNA Expression stellt möglicherweise auch präparationsbedingte Verunreinigungen durch Fibroblasten und Thrombozyten dar. Tatsächlich war die Expression der PDE5 in isolierten Fibroblasten entsprechend hoch, was wiederum mit früheren Studien zur PDE5-Proteinexpression in Myofibroblasten übereinstimmt (Lukowski et al. 2010). Zusammengefasst determinieren diese Befunde eher kardiale (Myo-) Fibroblasten als Hauptort des SIL-induzierten cGMP-Anstiegs. Da die PDE5 als primäre Zielstruktur von SIL in den Kardiomyozyten der  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Tiere eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint, überrascht es nicht, dass das 60-tägige SIL-Therapieregime keine günstigen Effekte bezüglich des kardialen *Remodelings* zeigte. Auch der antifibrotische Effekt einer PDE5-Hemmung (Patrucco et al. 2014) ließ sich in dem  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Modell nicht beobachten. Bei der Interpretation dieses Befundes ist zu berücksichtigen, dass die Fibrose in den transgenen AT<sub>1</sub>R-überexprimierenden Herzen als ein sekundärer Effekt zu verstehen ist, der aufgrund des Defektes in Kardiomyozyten entsteht. Offensichtlich bedürfen die antifibrotischen Effekte von SIL und PDE5 einer direkten Stimulation der (Myo-) Fibroblasten durch Ang II (Westermann et al. 2012, Patrucco et al. 2014). Die antifibrotische Wirkung von SIL wird mit den an  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Mäusen erhobenen Ergebnissen keinesfalls in Frage gestellt, sondern bestätigt vielmehr frühere Vermutungen, dass nicht Kardiomyozyten, sondern (Myo-) Fibroblasten den primären Wirkort des PDE5-Hemmstoffes SIL darstellen. Echokardiographische Messungen der Herzfunktion zeigten für  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Tiere im Vergleich zu WT-Wurfgeschwistern bereits im Alter von 120 Tagen eine massiv verschlechterte Pumpfunktion sowie Anzeichen einer Dekompensation (s. Abb. 4.7). Die chronische SIL-Gabe hatte dabei keinen Einfluss auf wichtige Funktionsparameter wie die Verkürzungs- und Auswurfraction (s. Abb. 4.7 B, C). Der 60. Lebensstag der Mäuse wurde als Zeitpunkt für den Behandlungsbeginn bestimmt, da die Gabe von Losartan in diesem Alter bekanntermaßen die *Remodeling*prozesse im  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Mausmodell positiv beeinflusst (Paradis et al. 2000). Um zu prüfen, ob frühzeitige Defekte der chronischen AT<sub>1</sub>R-Überexpression SIL-sensitiv sind, wurde eine kleine Kohorte (n=8  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Mäuse) bereits kurz nach dem Absetzen, d.h. im Alter von 40 Tagen, der SIL-Behandlung zugeführt. Auch dieses frühzeitig beginnende und 80 Tage andauernde Behandlungsregime hatte keinen positiven Effekt auf das Hypertrophieausmaß (Daten nicht gezeigt). Letztlich belegen diese Befunde, dass eine im Kardiomyozyt durch Ang II/AT<sub>1</sub>R ausgelöste Herzhypertrophie nicht auf eine PDE5-Hemmung durch SIL anspricht.

In diesem Zusammenhang enttäuschten aktuell auch zwei Phase III-Studien (RELAX und SIDAMI), in denen die Wirkung von SIL zur Therapie der Herzinsuffizienz untersucht wurde (Andersen et al. 2013, Redfield et al. 2013). In diese Studien waren unterschiedliche Schweregrade und Ausprägungen der Herzinsuffizienz eingeschlossen, z.B. auch Patienten nach Myokardinfarkt oder mit angeborenen Herzfehlern. Es ist davon auszugehen, dass die eingeschränkte Herzfunktion der Betroffenen im Wesentlichen durch die Myozytenfunktion bestimmt wurde. Von dem Hintergrund der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten in dem  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Mausmodell (s. 4.2) scheint daher eine Stratifizierung zukünftiger klinischer Studien mit SIL sinnvoll. Insbesondere sollte die interstitielle Myokardfibrosierung

als wichtiges Einschlusskriterium für das Patientenkollektiv gewählt werden, da bei kritischer Betrachtung der Literatur SIL auch in Tiermodellen eher antifibrotische als antihypertrophe Effekte zeigte (Westermann et al. 2012, Patrucco et al. 2014). Eine beachtliche Zahl präklinischer Studien hatte das Vorhandensein der PDE5 in Kardiomyozyten bereits zuvor in Frage gestellt (Wallis et al. 1999, Corbin et al. 2003, Lukowski et al. 2010, Patrucco et al. 2014). Autoren der RELAX-Studie berichteten kürzlich selbst, dass gesunde Herzen der Spezies Mensch, Kaninchen und Maus PDE5-negativ sind (Degen et al. 2015). Insgesamt verdeutlichen die missglückten SIL-Studien, dass zunächst übereinstimmende Resultate in Zellsystemen und Tiermodellen vorliegen und begründete Zweifel an neuen Therapieoptionen ausgeräumt werden sollten, bevor breit angelegte multizentrische Studien mit einer Vielzahl schwerkranker Patienten forciert werden, denn den Patienten wird so eine möglicherweise wirksamere Therapie vorenthalten.

### **5.1.5 Alternative Ansätze zur cGMP-basierten Verbesserung der progressiven Remodelingprozesse im $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Mausmodell**

Interessanterweise betrachtet dieselbe Arbeitsgruppe, die vor rund zehn Jahren mit ihrer Arbeit bezüglich der Reversibilität kardialer Hypertrophie durch SIL (Takimoto et al. 2005) die Grundlage für die RELAX und SIDAMI-Studien geschaffen hatte, nun die PDE9 als hauptverantwortliche PDE für den myozytären cGMP-Anstieg in hypertrophen Herzen. Die in der Vergangenheit erhobenen Ergebnisse von Takimoto et al. wurden in dieser Arbeit sogar teilweise widerlegt (Lee et al. 2015). Im Vergleich mit anderen cGMP-hydrolysierenden PDEs besitzt die PDE9 die höchste Affinität für cGMP (Fisher et al. 1998), ist aber interessanterweise insensitiv gegenüber IBMX (Keravis and Lugnier 2012). Die Stimulation von Kardiomyozyten aus  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>- und WT-Kontrolltieren mit IBMX ergab einen starken cGMP-Anstieg nur in WT-Myozyten (s. Abb. 4.12 C, D), was ein generell verändertes PDE Expressions- und Aktivitätsmuster in transgenen Herzen implizierte (s. 5.1.3). Lee et al. detektierten erhöhte PDE9-Mengen in hypertrophen Herzen (Lee et al. 2015). Ob eine veränderte Expression und Aktivität der PDE9 auch in  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Herzen zu den erhöhten cGMP-Spiegeln beiträgt, und eine Hemmung der PDE9 (Hutson et al. 2011) zu einer Verbesserung der kardialen Symptomatik führen kann, sollte im Anschluss an diese Arbeit untersucht werden. Um zu evaluieren, welche PDE(s) ursächlich für die erhöhten cGMP-Spiegel in hypertrophen  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Herzen sind, könnten FRET-Messungen mit isoform-spezifischen PDE-Hemmstoffen durchgeführt werden. Durch Messungen der cGMP-Hydrolyseaktivität in Gesamtherzlysaten von  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>- und WT-Tieren konnte kürzlich noch einmal bestätigt werden, dass die PDE5 nur wenig zur Generierung von kardialem cGMP beiträgt. Eine nennenswerte Hemmung der PDEs ergaben sich erst bei SIL-Konzentrationen von 1000 nM (Straubinger et al. 2015), die in *in vivo*-Versuchen aber nicht realisierbar sind. In diesem Konzentrationsbereich ist darüber hinaus eine Hemmung der PDE1C durch SIL wahrscheinlich (Vandeput et al. 2009).

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zur kompensatorischen Hochregulation des cGMP/cGKI-Signalwegs (s. 4.1.2) aufgrund der amplifizierten Ang II-Signaltransduktion

bestätigten nochmal die Wichtigkeit dieses gegenregulatorischen Systems bei hypertrophen Herzerkrankungen. Aus diesem Grund erscheint ein therapeutischer Ansatz einer zusätzlichen Erhöhung der cGMP-Spiegel sinnvoll, der jedoch mit SIL nicht realisierbar ist (s. 5.1.4). Aufgrund des intensiven *Crosstalks*, der komplexen Distribution und Aktivität kardialer PDEs, insbesondere bei hypertrophen Herzerkrankungen, wäre anstelle der Hemmung des cGMP-Abbaus vielmehr die Stimulation der cGMP-Generierung eine Alternative. Mit Cinaciguat könnte beispielsweise eine Stimulation der löslichen Guanylatzyklase in  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Herzen erfolgen (Tamargo et al. 2010). Nach erfolgreichen tierexperimentellen Studien befindet sich dieser Aktivator der sGC bereits in klinischer Prüfung zur Therapie der akuten, dekompensierten Herzinsuffizienz (Hingorany and Frishman 2011). In Zellsystems zeigte Cinaciguat darüber hinaus einen antihypertrophen Effekt (Irvine et al. 2012). Da Cinaciguat unabhängig von NO und dem Oxidationsstatus der sGC (s. 1.2.6) eine cGMP-Erhöhung induziert, könnte dieser Wirkstoff auch angewendet werden, um Symptome einer Dekompensation der  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Tiere durch die zusätzliche cGMP-Erhöhung zu mildern. Im Gegensatz zur PDE5 wird die sGC in Kardiomyozyten exprimiert (Fraccarollo et al. 2014), wobei eine Überprüfung dieser Befunde im  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Mausmodell noch aussteht. Seit kurzem steht außerdem ein Mausmodell mit gefloxtem sGC-Gen zur Verfügung (Groneberg et al. 2010). In diesem Zusammenhang wäre der resultierende kardiale Phänotyp aus  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Tieren mit zusätzlicher kardiomyozytenspezifischer sGC-Ablation interessant. Man könnte auf diese Weise ermitteln, inwieweit die sGC an den kompensatorisch erhöhten cGMP-Spiegeln bei intensivierter Ang II-Signaltransduktion beteiligt ist. Die partikuläre GC-A, der Rezeptor für ANP und BNP, liegt in hypertrophen Zuständen oft desensibilisiert vor (Klaiber et al. 2011). Inwieweit die GC-A noch zur cGMP-Generierung in den hypertrophen  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Herzen in der Lage ist, könnte ebenfalls durch Doppelmutanten ( $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Tiere mit myozytenspezifischer GC-A-Deletion, Kuhn 2003) erörtert werden, insbesondere unter dem Gesichtspunkt, dass auch in  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Herzen die mRNA-Mengen von ANP und BNP kompensatorisch erhöht waren und so zur Rezeptordesensibilisierung beitragen können (s. Abb. 4.8 A, B). Dass eine pharmakologische Modulation des RAAS und der Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide einen sinnvollen therapeutischen Ansatz darstellt, zeigt eine aktuelle Studie zur Blockade des RAAS in Kombination mit einer Nephilysin-Inhibition. Nephilysin bzw. neutrale Endopeptidase (NEP) ist eine membranständige, zinkabhängige Metalloprotease, die unter anderem auch für den Abbau der natriuretischen Peptide verantwortlich ist (Potter 2011). Zur Reduktion von Hypertrophie und Fibrose sowohl im Tiermodell nach Myokardinfarkt als auch in klinischen Zulassungsstudien zur Behandlung der Herzinsuffizienz war die Kombinationstherapie der jeweiligen Monotherapie überlegen (McMurray et al. 2014, von Lueder et al. 2015). Die Effizienz dieser Therapie bei intensivierter Ang II-Signaltransduktion im Kardiomyozyt könnte ebenfalls anhand des  $\alpha$ MHC-AT1R<sup>tg/+</sup>-Hypertrophie-modells evaluiert werden. Da BNP nur in geringerem Ausmaß durch Nephilysin abgebaut wird, resultiert eine NEP-Hemmung insbesondere in einem Anstieg von ANP und CNP (Potter 2011). Im Gegensatz zu GC-A wurde für GC-B noch keine Desensibilisierung beschrieben (Rosenkranz et al. 2003). Eine Stimulation dieses Rezeptorsubtyps mit CNP stoppte im Mausmodell kardiale Umbauprozesse sowohl nach

Ang II-Infusion als auch nach experimentell induziertem Myokardinfarkt (Hobbs et al. 2004, Izumiya et al. 2012). Möglicherweise profitiert die duale RAAS- und Neprilysin-Inhibition überwiegend von erhöhten CNP-Spiegeln.

## **5.2 Kardialer Phänotyp CRP4-defizienter Mäuse**

### **5.2.1 Expression und mögliche Funktionen von kardialem CRP4**

Die Untersuchung zur Relevanz des kardialen Cystein-reichen LIM-Proteins 4 für die Entwicklung und Progression von hypertrophen Herzerkrankungen war aus mindestens zwei Gründen von großem Interesse und daher Gegenstand dieser Arbeit. (1) CRP4 wurde im enterischen Nervensystem (Huber et al. 2000), in vaskulären Glattmuskelzellen (Zhang et al. 2007) sowie in Spinalganglien des Rückenmarks (Schmidtko et al. 2008) als neues cGKI-Substrat identifiziert. cGMP und cGKI gelten als wichtige Komponenten endogener Schutzmechanismen bei kardialen Umbauprozessen, jedoch sind die molekularen Mechanismen und Interaktionspartner bisher kaum bekannt (Hofmann and Wegener 2013). (2) CRP4 besitzt eine hohe Homologie zu seinem Schwesterprotein CRP3/MLP. Mutationen im CRP3/MLP-Gen sind für die Entwicklung von familiären Kardiomyopathien ausschlaggebend (Geier et al. 2003).

Bislang verfügbare Studien zu kardialem CRP4 konzentrierten sich vor allem auf mRNA- und Protein-Expressionsuntersuchungen während der Embryonalentwicklung mit konstant hohen Mengen in den Herzanlagen (Yu et al. 2002, Wei et al. 2011). Dies ist insofern nicht verwunderlich, da viele LIM-Proteine essentiell für die Embryogenese sind (Bach 2000, Cai et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Western Blot und immunhistochemischen Färbungen die Expression von CRP4 in Gesamtherzlysaten bzw. Gewebefeinschnitten von adulten Mäusen bestätigt (s. Abb. 4.14 A, B). Diese Detektionsmethoden schließen auch andere Zelltypen wie kardiale Fibroblasten, Endothelzellen und Glattmuskelzellen mit ein. Durch Isolation und Separation der Kardiomyozyten und nachfolgende Immunfluoreszenzfärbungen konnte die exakte Lokalisation von CRP4 an den Z-Scheiben und der Kardiomyozytenmembran gezeigt werden (s. Abb. 4.14 C). Interessanterweise lässt sich auch CRP3/MLP im gesunden Myokard vermehrt an Z-Scheiben detektieren (Knoll et al. 2002). Es wird vermutet, dass CRP3/MLP an diesen Zellstrukturen als Mechanosensor fungiert und nach hypertrophen Stimuli in den Zellkern transloziert, um transkriptionelle Vorgänge zu modulieren (Boateng et al. 2009, Gunkel et al. 2009). Da CRP4 ebenfalls ein nukleäres Translokationssignal (NLS) besitzt (Huber et al. 2000), ist eine Translokation von CRP4 in den Zellkern unter ähnlichen Bedingungen zumindest vorstellbar. Um diese Vermutung zu untersuchen, müssten primäre Kardiomyozyten mit unterschiedlichen Hypertrophie-induzierenden Faktoren wie beispielsweise Ang II, ET I, Phenylephrin und/oder Isoprenalin inkubiert werden. Diese Versuche sollten auch Aufschluss über die möglicherweise von CRP4 modulierten Rezeptorsignalwege liefern. In diesem Zusammenhang wäre auch die Durchführung

sogenannter *Stretch-Assays* interessant (Calaghan and White 1999): Hierbei werden üblicherweise neonatale Kardiomyozyten für wenige Tage auf einer Silikon-Membran kultiviert und biaxialer Dehnung bei unterschiedlichen Frequenzen ausgesetzt. Bei diesem etablierten System zur experimentellen Simulation einer mechanischen Belastung des Herzens, die sich typischerweise bei Hochdruck-Patienten im Laufe der Zeit entwickelt, kommt auch dem Ang II-Signalweg eine große Bedeutung zu (Frank et al. 2008). Diese wären geeignet, um die Funktion von CRP4 bei erhöhter biomechanischer Belastung zu überprüfen.

CRP3/MLP liegt nur im Zellkern als Monomer vor. Im Zytoplasma, bzw. an den Z-Scheiben bildet CRP3/MLP über den C-Terminus zum Großteil Dimere oder Multimere, die nach hypertrophen Stimuli im Kern akkumulieren. Auch bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz wurden diese Beobachtungen bereits gemacht (Boateng et al. 2007). Zusammenhänge zwischen CRP4 und Herzerkrankungen beim Menschen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Bislang gibt es auch keine Daten zur Multimerenbildung von CRP4 im gesunden oder hypertroph veränderten Myokard. Auch diese Untersuchungen müssen Gegenstand künftiger Experimente sein.

### 5.2.2 Rolle von CRP4 in unterschiedlichen Hypertrophie-Modellen

Auch wenn die Sequenzidentität und Lokalisation für CRP4 und CRP3/MLP vergleichbare Funktionen vermuten lassen, gibt es bedeutsame Unterschiede zwischen diesen Vertretern der LIM-Proteinfamilie. Beispielsweise entwickeln CRP4-defiziente Tiere keinen offensichtlichen Herzphänotyp, während CRP3/MLP-KO Mäuse schon 3-4 Tage postnatal Anzeichen einer Ventrikeldilatation, verbunden mit massiv gestörter Zytoarchitektur sowie einem Integritätsverlust des gesamten Gewebeverbundes zeigen (Arber et al. 1997). Auch bei genauer Betrachtung ausgewachsener CRP4-KO Mäuse wurde deutlich, dass die CRP4-Deletion keinen Einfluss auf die Körpergröße und das Körpergewicht ausübt.

Zunächst sollte eine mögliche Rolle von CRP4 bei der Entwicklung einer physiologischen Myokardhypertrophie untersucht werden. Ein körperliches Training, bestehend aus Schwimmeinheiten von 5-90 min über einen Zeitraum von 4 Wochen, führte in CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen wie erwartet zu einem physiologischen Herzwachstum (s. Abb. 4.15 A), wobei das Ausmaß der Adaptation in CRP4-defizienten Tieren weniger stark ausgeprägt war (s. Abb. 4.15 A). Eine Normierung der Herzgewichte auf das Körpergewicht (s. Abb. 4.15 B) und die prozentuale Darstellung (s. Abb. 4.15 C) der relativen Zunahme des physiologischen Herzwachstums im Bezug zum Körpergewicht verglichen mit nicht-schwimmenden Tieren ergab eine Nivellierung der Gewichtszunahmen der Herzen zwischen den Genotypen; die prozentualen Werte (s. Abb. 4.15 C) entsprachen den Literaturangaben für dieses Protokoll (Kaplan et al. 1994). Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass CRP4 für die Entstehung einer physiologischen Herzhypertrophie als Anpassung an die erhöhten Anforderungen im Schwimmtraining eine eher untergeordnete Rolle spielt.

Die Induktion des pathophysiologischen Herzwachstums erfolgte zunächst durch eine 7-tägige Infusion von Ang II. Ein protektiver Einfluss der cGKI auf die kardialen Umbauprozesse wurde bereits in einem identischen Ang II-Infusionsmodell beschrieben (Patrucco et al. 2014). Auch in dieser Arbeit konnte ein deutlicher Anstieg der Herzmasse in allen untersuchten Genotypen beobachtet werden (s. Abb. 4.16 A). Bei genauerer Betrachtung fiel auf, dass sowohl die absoluten als auch die auf das Körpergewicht normierten Herzgewichte (s. Abb. 4.16 A, B) in CRP4-KO und CRP4-HET Tieren signifikant erhöht waren. Da simultan durchgeführte telemetrische Blutdruckmessungen keine Unterschiede im Ang II-induzierten Anstieg der systolischen und diastolischen Drücke zwischen CRP4-WT und CRP4-KO Tieren aufzeigten (s. Abb. 4.21), konnten hämodynamisch-bedingte Unterschiede als Ursache für das verstärkte Herzwachstum durch die globale Deletion von CRP4 ausgeschlossen werden. Auch in der prozentualen Darstellung der auf das Körpergewicht normierten Herzmassen zeigte sich die massive kardiale Hypertrophie der CRP4-defizienten Tiere (s. Abb. 4.16 C). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bereits die Ausschaltung von einem CRP4-Allel zu einem deutlichen Herzhypertrophiephänotyp führte (s. Abb. 4.16 A-C). Obwohl in CRP4-HET Herzen anhand reduzierter Protein- und mRNA-Mengen ein Gendosiseffekt zu beobachten war (s. Abb. 4.14 A), zeigen diese Experimente, dass neben dem Fehlen bereits unzureichende CRP4-Spiegel im pathophysiologischen Kontext einer Ang II-Dauerinfusion unzureichend sind. Um dem massiven hypertrophen Wachstum entgegenzuwirken, sind offensichtlich ausreichend hohe Konzentrationen an endogenem CRP4 notwendig. Auch in den hypertrophen Herzen der CRP4-WT Tiere wurde eine geringe, aber signifikante Abnahme des CRP4-Proteingehalts beobachtet (s. Abb. 4.17 A, B). Diese moderat erniedrigten Expressionsspiegel implizieren, dass eine chronische Aktivierung pro-hypertropher Signalkaskaden Einfluss auf protektive Faktoren wie CRP4 hat, und möglicherweise die Überwindung basal hoher CRP4-Konzentrationen ein Kennzeichen des Ang II-Hypertrophie-modells ist. Für das CRP4-Schwesterprotein CRP3/MLP wurden sowohl Expressionssteigerungen (Grzeskowiak et al. 2003, Kostek et al. 2007) als auch verminderte Proteinspiegel in hypertrophen und insuffizienten Herzen beschrieben (Ecarnot-Laubriet et al. 2000, Zolk et al. 2000).

In früheren Untersuchungen zur Expression von kardialem CRP4 nach experimentell induzierter Herzmuskelhypertrophie durch TAC oder Isoprenalin wurden bislang keine Veränderungen bezüglich der CRP4-Expression aufgezeigt (Yu et al. 2002, Wei et al. 2011). Die Aussagekraft dieser Studien ist jedoch limitiert, da keine validen Aussagen zum tatsächlichen Ausmaß der Herzhypertrophie bekannt sind und diese Experimente generell nicht durch Analyse der CRP4-KO Mauslinie kontrolliert wurden. Eigene präliminäre Befunde zeigten bereits, dass CRP4-KO Tiere im Isoprenalin-Infusionsmodell keine gesteigerte Myokardhypertrophie im Vergleich zu CRP4-WT Tieren entwickelten (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zum Ang II-Infusionsmodell (s. Abb. 4.16), bei dem die kardiale Hypertrophie durch  $G_{\alpha_q}$ -gekoppelte Rezeptoren (Balakumar and Jagadeesh 2014) induziert wird, scheint die Rolle von CRP4 bei  $G_{\alpha_s}$ -gekoppelter,  $\beta_1$ -Adrenozeptor-induzierter Myokardhypertrophie (Morisco et al. 2001) vernachlässigbar. Dieser Befund ist ähnlich der kürzlich erhobenen Befunde für die Rolle der cGKI bei kardialer Hypertrophie, denn auch die Kinase vermittelt



ihre protektiven Effekte vor allem in Ang II-bedingten kardialen *Remodeling*prozessen (Lukowski et al. 2010, Frantz et al. 2013).

Aktuell ist nicht klar, inwiefern die hier erhobenen Befunde auch auf den Menschen übertragbar sind. Um diesbezüglich Klarheit zu schaffen, könnte man sich humaner Biobanken bedienen, die Proben von Patienten enthalten, die z.B. an Kardiomyopathien und/oder Herzinsuffizienz erkrankt waren. Mutationen oder Deletionen im CRP4-Genlocus müssten dann mit den hinterlegten Patientendaten verglichen werden. Da CRP4 bis dato, zumindest als genetischer Faktor bei hypertrophen Herzerkrankungen völlig unbekannt ist, wäre es sinnvoll, CRP4 in die Genotypisierung von Kardiomyopathie-Patienten einzuschließen. Unter Umständen führt CRP4 auch erst im Zusammenspiel mit weiteren Mutationen zu einer Verschlimmerung des Krankheitsbildes. Auch eine retrospektive Untersuchung der Biobank-Daten von älteren Patienten wäre denkbar: Möglicherweise bringen fortschreitender Bluthochdruck, und dadurch erhöhter biomechanischer Stress und/oder altersbedingte Funktionseinschränkungen des Herzens primär vorhandene CRP4-Defekte erst verzögert zu Tage. Die Tatsache, dass bereits CRP4-HET Mäuse nach neurohumoraler Stimulation ein massives Myokardwachstum aufwiesen, macht die Untersuchung humaner Proben noch lohnenswerter, denn möglicherweise sind auch im Menschen bereits Mutationen/Polymorphismen in einem CRP4-Allel kausal, d.h. krankheitsverursachend bzw. krankheitsassoziiert.

### **5.2.3 Molekulare Effekte von CRP4 bei kardialer Hypertrophie und Fibrosierung**

Das pathophysiologische Wachstum des Herzmuskels beruht auf einer Vielzahl komplexer Signalkaskaden, die engmaschig miteinander verstrickt sind und häufig ineinander greifen (s. Abb. 1.3). Diese werden zunächst kompensatorisch induziert, um pathophysiologischen Stimuli, beispielsweise erhöhtem Gefäßwiderstand, verstärkter Sympathikusaktivität oder anderen neurohumoralen Belastungen, entgegenzuwirken (Heineke and Molkentin 2006). Die komplizierte Verschaltung der Signalkaskaden im Kontext der kardialen Hypertrophie erschwert die exakte Zuordnung eines Hypertrophie-assoziierten Proteins zu einem definierten Signalweg. Weitaus wahrscheinlicher ist, dass viele Proteine Bestandteil unterschiedlicher, Wachstums-promovierender Signaltransduktionswege sind. In diesem Zusammenhang trägt auch die Kommunikation zwischen Kardiomyozyten und Fibroblasten zu der hypertrophen Umgestaltung des Myokards bei (Kakkar and Lee 2010).

Durch Vermessen der Kardiomyozytenquerschnittsflächen in den Gewebeschnitten hypertropher Herzen war es möglich, das signifikant verstärkte Herzmuskelwachstum (s. Abb. 4.16) auf zellulärer Ebene als Folge der CRP4-Ablation zu bestätigen (s. Abb. 4.24 A, B). Begleitende mRNA-Untersuchungen belegten die Induktion des fetalen Genprogramms in den Kardiomyozyten, beispielsweise anhand der signifikanten Abnahme der mRNA-Transkripte für die SERCA2 in allen Genotypen (s. Abb. 4.24 C). CRP4-abhängige Änderungen der erwartungsgemäß verringerten Expression der adulten  $\alpha$ -Isoform der

schweren Myosinkette ( $\alpha$ -MHC) im Rahmen der Ang II-induzierten Herzhypertrophie waren nicht erkennbar (s. Abb. 4.24 D). Die Infusion von Ang II hatte generell keinen Einfluss auf die Expression der fetalen  $\beta$ -Isoform der schweren Myosinkette ( $\beta$ -MHC), einem weiteren Marker der Herzhypertrophie (Daten nicht gezeigt). Da Ang II über  $AT_1$ -Rezeptoren pleiotrope Effekte auf das kardiale *Remodeling* ausübt (Booz and Baker 1996), wurden auch Untersuchungen zum Ausmaß der Fibrosierung in CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen durchgeführt. Es ist bekannt, dass Kardiomyozyten und Fibroblasten in hypertrophen Herzen mit Hilfe unterschiedlicher Signalmoleküle (CTGF, TGF- $\beta$ , FGF etc., s. Abb. 1.2) zu einer intensiven Kommunikation befähigt sind (Fredj et al. 2005). Dies hat wechselseitige Einflüsse auf das Ausmaß der Myozytenhypertrophie und Fibrose (Takeda and Manabe 2011). Tatsächlich war im Vergleich zu Herzmuskelzellen aber nur eine geringe CRP4-mRNA Expression auch in kardialen Fibroblasten nachweisbar (s. Anhang, Abb. 7.5 B). Zur Detektion und Quantifizierung der unter Ang II-Dauerinfusion akkumulierten Interzellulärschicht wurden Sirius-rot gefärbte Gewebefehnschnitte untersucht. Herzen von Ang II-infundierten CRP4-KO Tieren zeigten im Vergleich zu CRP4-WT Wurfgeschwistertieren eine signifikant gesteigerte Myokardfibrosierung (s. Abb. 4.25). Im Gegensatz zum Hypertrophieausmaß (s. Abb. 4.16) ergab die Quantifizierung der fibrotischen Areale erneut ein Gendosiseffekt für CRP4-HET Tiere (s. Abb. 4.25). Scheinbar reicht ein CRP4-Allel aus, um die CRP4-HET Tiere vor einer noch stärkeren Fibrosierung zu schützen. Die Befunde zur kardialen Fibrosierung in CRP4-KO Herzen bestätigen die signifikant höheren Herzgewichte (s. Abb. 4.16) und implizieren neben den kardiomyozytären Effekten eine mögliche Funktion von CRP4 in kardialen Fibroblasten. Inwiefern die Deletion von CRP4 in dem hier untersuchten globalen CRP4-KO Mausmodell direkt an der myokardialen Fibrosierung beteiligt ist, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. In präliminären Experimenten wurde bereits das Proliferationsverhalten frisch isolierter Fibroblasten verfolgt (s. Anhang, Abb. 7.5 C). Hierbei konnten keine Wachstumsunterschiede zwischen CRP4-WT und CRP4-KO Zellen detektiert werden, wodurch sich ein Einfluss von CRP4 auf die Produktion bzw. Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen nicht ausschließen lässt. Ergänzend zu den histologischen Versuchen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch mRNA-Analysen typischer Fibrosemarker angefertigt. Nach neurohumoraler Ang II-Stimulation konnten erhöhte Mengen mRNA-Transkripte für die Kollagen-Isoformen Col1A1, und Col3A1 sowie für Fibronectin in CRP4-KO Herzen ermittelt werden (s. Abb. 4.26 A-C). Aufgrund der interindividuellen Schwankungen innerhalb der Genotypen erreichten diese Unterschiede jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau.

Natriuretische Peptide sind weitere typische Markerproteine der fetalen Reprogrammierung und bei kardialer Hypertrophie massiv hochreguliert (Calvieri et al. 2012). In allen Genotypen ließ sich eine Induktion von ANP und CNP bestätigen (s. Abb. 4.27 A, B). Interessanterweise scheint CNP nur nach einem akuten hypertrophen Stimulus, wie es im Infusionsmodell der Fall ist, hochreguliert zu sein. Die chronische Aktivierung der Ang II-Signalkaskade der  $\alpha$ MHC- $AT_1R^{tg/+}$ -Tiere verursachte keine Expressionsänderungen (Daten nicht gezeigt). Möglich wäre hier eine vermehrte endotheliale Sekretion aufgrund von akut verstärktem Scherstress (Stingo et al. 1992). CNP ist im Gegensatz zu ANP und BNP generell sehr

schwach exprimiert und mittels qRT-PCR nur an der untersten Detektionsgrenze nachweisbar (s. Abb. 4.27 B). Interessanterweise fiel die BNP-Expression nach 7-tägiger Ang II-Infusion in CRP4-HET und CRP4-KO Tieren deutlich geringer aus (s. Abb. 4.26 D). BNP wird wie ANP im Vorhof und von hypertrophen Herzmuskelzellen der Ventrikel freigesetzt (London 2006). Im Gegensatz zu ANP, das eine starke natriuretische und vasodilatatorische Wirkkomponente besitzt, agiert BNP primär als antifibrotischer Faktor (Nishikimi et al. 2006). Mäuse mit einer globalen Deletion von BNP entwickeln weder Bluthochdruck noch Anzeichen einer kardialen Hypertrophie, zeigen jedoch fibrosierte Ventrikelareale in Verbindung mit einer Hochregulation der mRNA verschiedener Fibrosemarker, des ACE (*Angiotensin-converting enzyme*) sowie Unregelmäßigkeiten in sarkomerischen Strukturen (Ogawa et al. 2001). Eine Erhöhung der Nachlast mittels TAC verschlimmerte die Myokardfibrosierung der BNP-defizienten Tiere nochmal deutlich, während sich das Ausmaß der hypertrophen Wachstumsprozesse unabhängig von der BNP-Expression darstellte (Tamura et al. 2000). Es erscheint also plausibel, dass die interstitielle Fibrosierung im CRP4-negativen Herzmuskel eine Folge der insuffizienten BNP-Mengen nach Ang II-Dauerinfusion darstellt.

Im Kardiomyozyt wird die Synthese von BNP transkriptionell u.a. von GATA4 Proteinen kontrolliert (Hautala et al. 2002). GATA4 ist insbesondere an der BNP-Induktion bei hämodynamischem Stress und Ang II-stimulierter Signaltransduktion beteiligt (Marttila et al. 2001, Majalahti et al. 2007). In vaskulären Glattmuskelzellen wurde bereits eine Interaktion von CRP4 mit Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie gezeigt. Hier reguliert CRP4 die Expression glattmuskelspezifischer Gene nach Bindung von GATA6 (Zhang et al. 2007). In neonatalen Kardiomyozytenkulturen ließ sich interessanterweise eine Kolo-kalisation und ein funktionelles Zusammenspiel von GATA4 und GATA6 bei der Aktivierung des BNP-Promotors ermitteln (Charron et al. 1999). Eine direkte Interaktion von kardialem CRP4 mit GATA-Proteinen bei der Regulation der BNP-mRNA Synthese erscheint also möglich. Ob GATA-Transkriptionsfaktoren tatsächlich mit CRP4 interagieren, müssen zukünftige Chromatin-Immünpräzipitationsexperimente (ChIP)  $\pm$  Ang II zeigen.

#### **5.2.4 Kardiales CRP4 ist ein pathophysiologisch relevanter Effektor des cGMP/cGKI-Signalwegs**

Die reduzierten BNP-Spiegel in hypertrophen Herzen von CRP4-HET und CRP4-KO Tieren (s. Abb. 4.26 D) deuten auf eine CRP4-abhängige Regulation des antifibrotischen Faktors BNP hin. Dies war der erste Hinweis, dass eine mögliche funktionale Verbindung von CRP4 und dem cGMP/cGKI-Signalweg auch im Herzmuskel bestehen könnte. Eine Konsequenz der reduzierten BNP-Spiegel wäre somit eine verminderte Hemmung kardialer (Myo-) Fibroblasten CRP4-defizienter Tiere. Auf Myozytenebene war zunächst eine reduzierte Aktivierung der GC-A und somit der cGMP-Generierung während neurohumoraler Stimulation denkbar. Die Bestimmung der kardialen cGMP-Konzentration nach 7-tägiger Ang II-Infusion ergab tatsächlich erniedrigte cGMP-Spiegel in CRP4-KO Herzen, die aber aufgrund von Schwankungen innerhalb des Genotyps keine statistische Signifikanz

erreichten (s. Abb. 4.28). Generell führte die Ang II-Dauerinfusion zu einem Anstieg der cGMP-Spiegel. Dieser Befund ist analog zu den erhobenen Daten für die  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere, auch die myozytenspezifische Amplifizierung des Ang II/ $\text{AT}_1\text{R}$ -Signalweges resultierte in erhöhten cGMP-Konzentrationen in hypertrophen Herzen (s. Abb. 4.5 D). Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit durch zwei unterschiedliche Ang II-Hypertrophie Modelle eine Erhöhung kardialer cGMP-Spiegel ermittelt, was wiederum die Wichtigkeit eines aktivierten cGMP/cGKI-Signalwegs als gegenregulatorisches System bei Ang II-induzierter Herzhypertrophie belegt. Interessanterweise wurden in CRP4-KO Herzen bereits unter physiologischen Bedingungen erniedrigte cGMP-Konzentrationen gemessen (s. Abb. 4.28). Da sich unter unstimulierten Bedingungen jedoch keine Abweichungen bezüglich der BNP-mRNA zwischen den Genotypen feststellen ließen (s. Abb. 4.26 D), sind andere Ursachen für die reduzierten cGMP-Spiegel in CRP4-KO Herzen anzunehmen. Auf transkriptioneller Ebene wurde eine reduzierte mRNA-Expression von GC-A, dem Rezeptor für BNP, ausschließlich in unbehandelten CRP4-KO Herzen ermittelt. Möglicherweise ist eine verringerte GC-A abhängige Generierung des zyklischen Nukleotids ursächlich für die reduzierten cGMP-Konzentrationen in unstimulierten CRP4-KO Herzen. Die reduzierte GC-A Expression sollte deshalb mittels Western Blot-Untersuchungen verifiziert werden. In der vergleichenden CRP4-Proteomanalyse (s. 4.9) konnten die partikulären Guanylatzyklen aufgrund ihrer insgesamt geringen kardialen Expressionslevel nicht nachgewiesen werden. Jedoch wurde für das Membranprotein Caveolin 3 (Cav3) eine massive Anreicherung in CRP4-WT Herzen detektiert, was wiederum eine stark erniedrigte Expression im CRP4-KO impliziert (s. Abb. 4.32). Mutationen in Caveolin 3 oder dessen Verlust sind mit einer Vielzahl von Erbkrankheiten assoziiert, unter anderem auch mit hypertrophen Kardiomyopathien (Hayashi et al. 2004). Neben klassischen Aufgaben wie der Organisation des Zytoskeletts, Regulation des Ionenaustauschs sowie metabolischen und kontraktile Funktionen (Gazzerro et al. 2010) ist Caveolin 3 auch durch Kollokalisierung mit der eNOS und  $\beta_3$ -Adrenozeptoren für die Modulation der NO-Synthese in den Caveolae zuständig (Michel et al. 1997, Williams and Lisanti 2004). Somit sind genotyp-bedingte Unterschiede in der generierten NO-Menge nicht ausgeschlossen. Eine dadurch verminderte Aktivierung der sGC könnte ebenso zu den erniedrigten Basalkonzentrationen von cGMP beitragen.

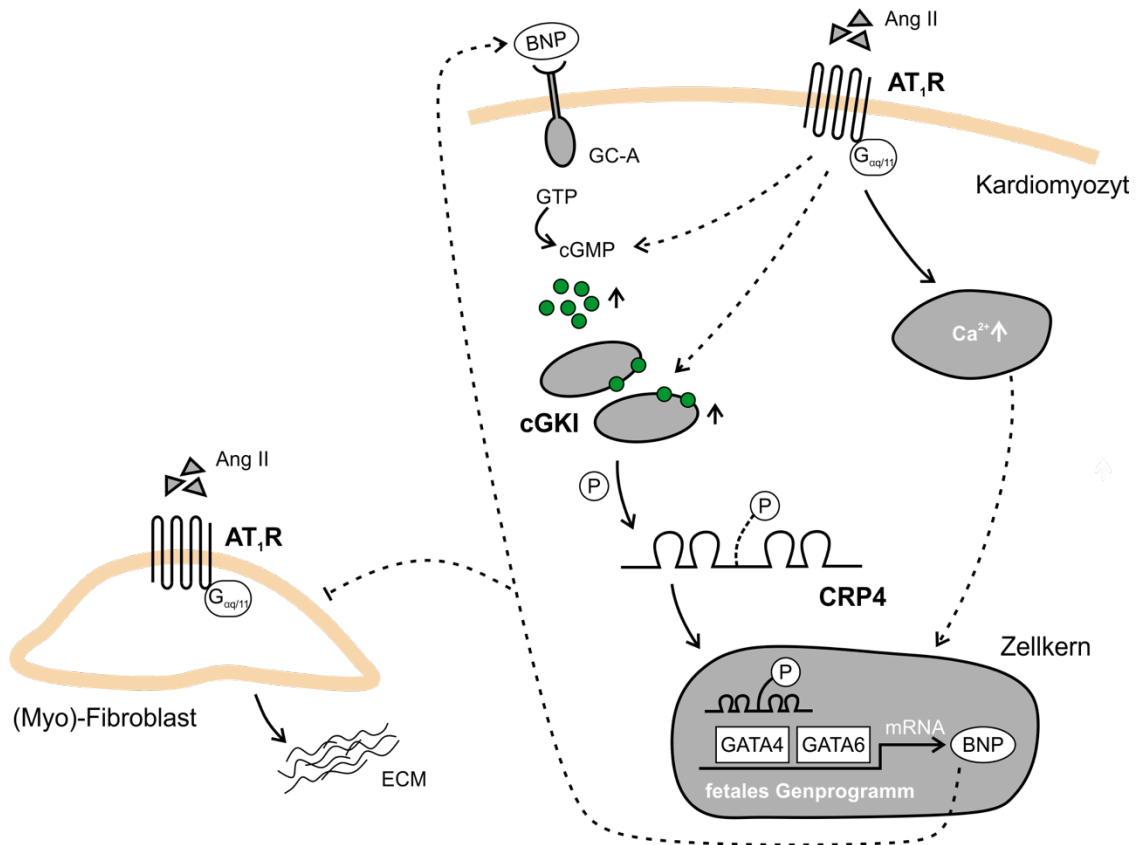
Erhöhte intrazelluläre cGMP-Spiegel können mit einer verstärkten Expression der cGKI verbunden sein (Xu et al. 2013). Eine gesteigerte cGKI-Proteinmenge war auch bereits in den hypertrophen Herzen der  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Tiere zu beobachten (s. Abb. 4.5 A, B). Übereinstimmend mit diesen Befunden führte die amplifizierte Ang II-Signaltransduktion auch nach 7-tägiger Dauerinfusion in CRP4-WT Herzen zu einer gesteigerten Expression der cGKI auf Proteinebene (s. Abb. 4.29 A, B). Interessanterweise traf dies nicht für CRP4-KO Herzen zu. Hier war eine gegenläufige Tendenz zu sehen: Die neurohumorale Stimulation führte zu einem Rückgang der cGKI-Proteinexpression noch unterhalb des Basalniveaus der unstimulierten CRP4-KO Herzen. Im Gegensatz zur chronischen  $\text{AT}_1\text{R}$ -Überstimulation im  $\alpha\text{MHC-AT}_1\text{R}^{\text{tg}/+}$ -Mausmodell waren bezüglich der mRNA-Spiegel keine genotyp- oder behandlungsbedingten Unterschiede zu erkennen (s. Abb. 4.29 C). Dies deutet darauf hin, dass die cGKI unter Ang II-Dauerinfusion auf Proteinebene möglicherweise stabilisiert wird,

was u. a. auch auf eine reduzierte proteasomale Degradation zurückzuführen sein könnte. Da dieser Effekt nur in CRP4-WT Herzen zu beobachten war, impliziert dies eine weitere funktionale Verbindung zwischen der Kinase und CRP4. Möglicherweise sind die protektiven Effekte der cGKI bei Ang II-induzierter kardialer Hypertrophie CRP4-abhängig. Um die Aktivität der Kinase in gesunden und Ang II-stimulierten Herzen zu überprüfen, wurde erneut die cGKI-abhängige Phosphorylierung des Serin-239 von VASP (Smolenski et al. 1998) ermittelt. Auch hierbei waren unter unstimulierten Bedingungen keine Unterschiede in der VASP-Phosphorylierung zwischen den Genotypen zu beobachten (Abb. 4.30 A, B). Eine Steigerung der cGKI-Aktivität nach 7-tägiger Ang II-Dauerinfusion konnte in CRP4-WT Herzen ermittelt werden, wohingegen in CRP4-KO Herzen kein Anstieg der cGKI-Aktivität zu verzeichnen war. Dieser Befund lässt vermuten, dass die Kinase für eine effiziente Phosphorylierung ihrer kardialen Substrate bei intensivierter Ang II-Stimulation auf CRP4 angewiesen ist. Möglicherweise fungiert CRP4 auch hier als Adapterprotein zur exakten sterischen Ausrichtung der Kinase zu seinen Zielproteinen. Diese Vermutung setzt eine direkte Interaktion der cGKI und CRP4 voraus, was auch mittels Co-Immünpräzipitation bestätigt werden konnte. Diese Interaktion konnte mittels der IP nur unter Ang II-stimulierten Bedingungen detektiert werden (s. Abb. 4.31).

Zhang et al. zeigten anhand von Interaktionsstudien in Glattmuskelzellen, dass CRP4 bei der Bindung der cGKI über seine Zinkfingerstrukturen gleichzeitig von der Kinase phosphoryliert wird, was eine Voraussetzung für die Anlagerung weiterer Interaktionsproteine war (Zhang et al. 2007). Mit Hilfe von Antikörpern, die u. a. phosphorylierte Serin-Reste detektieren, konnte ausschließlich in Lysaten Ang II-behandelter CRP4-WT Tiere Signale auf einer Höhe von 23 kDa detektiert werden, was dem erwarteten Molekulargewicht von CRP4 entspricht (s. Abb. 4.30 D). Übereinstimmend hierzu erbrachte eine akute Stimulation von Herzgewebe mit dem membrangängigen cGMP-Analogen 8Br-cGMP ebenso nur Signale in CRP4-WT Herzen. Schwächere Banden waren darüber hinaus auch in unstimulierten CRP-WT Lysaten zu detektieren. Dies deutet auf eine mögliche basale Phosphorylierung von CRP4 durch die cGKI hin (s. Abb. 4.30 C), auch wenn die Darstellung einer Präzipitation von CRP4 und cGKI unter physiologischen Bedingungen mittels Co-IP nicht möglich war (s. Abb. 4.31). Um diese Signale eindeutig CRP4 zuzuordnen sind weitere Versuche nötig, beispielsweise mit phosphospezifischen CRP4-Antikörpern. Insgesamt deuten die Phosphorylierungsversuche darauf hin, dass für eine effiziente cGKI-abhängige Phosphorylierung kardialer Zielproteine eine Interaktion der Kinase mit CRP4 bzw. die Phosphorylierung von CRP4 selbst nötig ist.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Befunde bestätigen erneut die Bedeutsamkeit des cGMP/cGKI-Signalwegs als endogenes, gegenregulatorisches System bei neurohumoral-induzierter Myokardhypertrophie. Zusätzlich ist mit CRP4 ein wichtiger Vermittler dieser protektiven Effekte identifiziert worden. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse bezüglich der Verbindung von cGKI und CRP4 im Kardiomyozyt sind nachfolgend in einem Hypothesenschaubild zusammengefasst (s. Abb. 5.1). Wahrscheinlich ist hierbei, dass CRP4 unter Ang II-stimulierten Bedingungen aufgrund der erhöhten cGKI-Aktivität verstärkt phosphoryliert wird. Phosphoryliertes CRP4 vermittelt einerseits die Bindung weiterer cGKI-Substrate und trägt zur Stabilisierung der Kinase bei. Darüber hinaus ist CRP4 in

phosphoryliertem Zustand in der Lage, in den Zellkern zu translozieren und durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie unter anderem die Transkription von BNP zu induzieren. BNP als zentraler antifibrotischer Faktor wirkt hemmend auf die Proliferation und Aktivität kardialer (Myo-) Fibroblasten. Gleichzeitig werden in CRP4-WT Herzen durch die BNP-abhängige Stimulation der GC-A die beschriebenen Mechanismen im Sinne einer positiven Signalverstärkung aufrechterhalten. CRP4 besitzt hierbei eine zentrale, modulierende Funktion (s. Abb. 5.1).



**Abb. 5.1: Interaktion von CRP4 und cGMP/cGKI in hypertrophen Herzmuskelzellen.**

Unter chronischer Ang II-Stimulation wird der cGMP/cGKI-Signalweg kompensatorisch hochreguliert. Eine Aktivierung der cGKI führt zur Phosphorylierung von kardialen Zielproteinen u.a. von CRP4. Phosphoryliertes CRP4 transloziert möglicherweise in den Nukleus und induziert über Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie die Synthese von BNP. BNP reguliert die Aktivität des cGMP/cGKI-Signalwegs in Kardiomyozyten über GC-A und wirkt antifibrotisch, sowie antiproliferativ auf (Myo-) Fibroblasten. AT<sub>1</sub>R: Angiotensin II Rezeptor Subtyp1; Ang II: Angiotensin II; BNP: *Brain natriuretic peptid*; GTP: Guanosin-5'-triphosphat; cGMP: zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat; CRP4: Cystein-reiches Protein 4; GC-A: partikuläre Guanylatzyklase Typ A; cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I; Ca<sup>2+</sup>: Calcium; ECM: Extrazellulärmatrix. Weitere Erläuterungen im Text.

### 5.2.5 Identifizierung von neuen CRP4-Interaktionspartnern im gesunden und hypertrophen Herzen

Um weitere kardiale Bindungspartner von CRP4 zu identifizieren, wurden Co-Immünpräzipitationen angefertigt und die Interaktoren massenspektrometrisch analysiert. Ziel war es, über die ermittelten Partnerproteine Aufschluss über die molekulare Bedeutung von CRP4 im gesunden und hypertrophen Myokard zu erhalten. Auch diese Experimente wurden mit Herzproben von CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen durchgeführt. Dieser Ansatz erlaubt die Generierung hinreichend verlässlicher Daten, da limitierende Faktoren der Co-IP Technik, insbesondere die häufig unspezifisch präzipitierten Proteine, auf diese Weise leicht erkennbar waren.

Die massenspektrometrische Analyse der Co-IP Lysate demonstriert die große Dynamik des CRP4-Interaktoms (s. Abb. 4.32 und Abb. 4.33). Kein CRP4-Interaktionsprotein war sowohl unter basalen als auch unter Ang II-stimulierten Bedingungen identifizierbar. Primär wurden kardiomyozytäre Proteine des Zytoskeletts und Bestandteile des Sarkomers als CRP4-Interaktoren in den Präzipitaten identifiziert (s. Abb. 4.32). Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen zur (sub-) zellulären Lokalisation von CRP4 (s. Abb. 4.14 C) und zu kardialen LIM-Proteinen generell (Knoll et al. 2002, Li et al. 2012). Des Weiteren wurden durch die Co-IPs auch andere Adapterproteine sowie einige mitochondriale Proteine als mögliche CRP4-Interaktoren identifiziert (s. Abb. 4.32). CRP4 selbst ist in kardialen Mitochondrien jedoch nicht nachweisbar (s. Anhang, Abb. 7.6). Es scheint daher möglich, dass die Interaktion von CRP4 mit mitochondrialen Proteinen erst im aufgeschlossenen Herzlysat stattfindet. Nach vollständigem Aufschluss der Zellen und Organellen können auch Proteine aus unterschiedlichen Kompartimenten interagieren. Diese Interaktionen sind biologisch wahrscheinlich irrelevant und nach kompletter Zellyse häufig zu beobachten (persönliche Kommunikation mit Dr. Karsten Boldt, Proteom-Forschungszentrum für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Tübingen). Insgesamt erwies sich die Kombination von Co-IP und LC-MS/MS als sehr valide Methode, denn alle putativen Bindungspartner, die zusätzlich einer Western Blot Analyse zugeführt wurden, konnten verifiziert werden (s. Abb. 4.34 bis Abb. 4.36).

Mit *Vinculin* (*Vcl*) und *Moesin* (*Msn*, s. Abb. 4.34) wurden zunächst zwei Proteine untersucht, die sich in ihrer subzellulären Lokalisation sehr ähnlich sind. Beide sind als Strukturproteine anzusehen, die Querverbindungen der Myozytenmembran mit dem Zytoskelett ermöglichen und der Zellkommunikation dienen (Louvét-Vallee 2000). Moesin bildet mit seinen Homologen Ezrin und Radixin eine Proteinfamilie, der aufgrund der Vermittlung von Migrationsvorgängen eine Rolle in der Tumorgenese zuteil wird (Clucas and Valderrama 2014). In einer Vielzahl anderer Zellen wurden eine Funktion bei der Aktivierung von Integrinen sowie Interaktionen mit der Rho-Kinase ermittelt (Tang et al. 2007, Janostiak et al. 2014). Falls Moesin in Kardiomyozyten ähnliche Aufgaben erfüllt, könnte CRP4 durch eine direkte Interaktion mit Moesin an der Zellkommunikation durch Integrinkomplexe beteiligt sein und deren Phosphorylierungsaktionen in fokalen Adhäsionskomplexen eventuell durch Bindung der Rho-Kinase forcieren. Vinculin ist ebenso in fokalen Adhäsionen an deren

Stabilisierung und an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt. Die Verbindungen Vinculins reichen außerdem bis zur Z-Scheibe und zum kontraktilem Apparat, sodass Vinculin als ein essentieller Vermittler der Kontraktion über Costamer-Strukturen bis zur Zellmembran betrachtet wird (Janostiak et al. 2014). CRP4 geht unter Ang II-stimulierten Konditionen eine starke Verbindung mit Vinculin ein, die vermutlich nötig ist, um die Integrität der Zelle und ihre Funktion aufrecht zu erhalten. Dies wird umso deutlicher, da Mäuse mit einer kardiomyozytenspezifischen Ablation von Vinculin im Alter von ungefähr drei Monaten an plötzlichem Herztod versterben, eine globale Deletion von Vinculin führt sogar zum Tod im Embryonalstadium (Zemljic-Harpf et al. 2007). Des Weiteren wurde über Mutationen berichtet, die über erniedrigte Vinculin-Proteinspiegel zur Ausprägung von hypertrophen Kardiomyopathien beitragen (Vasile et al. 2006).

Mit dem *Myosin-Bindeprotein C3 (Mybpc3)* konnte in hypertrophen Herzen ein CRP4-Interaktionspartner ermittelt werden, der ein zentrales Bindeglied in der gesamten Herzarbeit darstellt. Mybpc3 bindet an Titin sowie an dicke und dünne Filamente und reguliert sowohl Geschwindigkeit als auch die Kontraktionskraft (Mamidi et al. 2014). Bisher sind über 200 Mutationen in diesem Schlüsselprotein beschrieben, die in unterschiedlichen Formen und Ausprägungen von Kardiomyopathien münden (Harris et al. 2011). Mybpc3 wird von vielen Kinasen in verschiedenen Proteinregionen phosphoryliert und ist u.a. ein Substrat der PKA, der PKC und der CaMKII. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Modifikation durch CRP4 vermittelt wird. Eine Mybpc3-Hypophosphorylierung führt generell zu dessen Degradation und wird mit einem Fortschreiten der Kardiomyopathie-Symptomatik in Verbindung gebracht (Barefield and Sadayappan 2010). Der trimere Troponin-Komplex, bestehend aus Troponin I, T, und C ist ein ebenso wichtiger Bestandteil des kontraktilem Apparates. Mutationen in allen drei Troponin-Untereinheiten sind mit hypertropher oder dilatativer Kardiomyopathie assoziiert (Willott et al. 2010). CRP4 interagiert unter Basalbedingungen mit *Troponin I (Tnni3)*, s. Abb. 4.36). Troponin I blockiert in der Relaxationsphase zusammen mit Tropomyosin die Bindestelle des Myosinköpfchens und unterbindet auf diese Weise eine Kontraktion. Erst nach Bindung von  $Ca^{2+}$  an Troponin C gibt Troponin I die Bindestelle frei, Troponin T forciert dann die exakte Ausrichtung von Tropomyosin an Aktin und moduliert die Kontraktion (Katrukha 2013). Interessanterweise stimuliert die Ang II-Behandlung einen Austausch der Troponin-Isoformen im CRP4-Interaktom, CRP4 bindet unter hypertrophen Bedingungen an Troponin T (s. Abb. 4.33). Troponin I ist der einzige unter Basalbedingungen mittels LC-MS/MS-identifizierte CRP4-Interaktionspartner, der gleichzeitig auch ein beschriebenes Substrat der cGKI ist. Die cGKI phosphoryliert TnI an derselben Stelle wie die PKA, jedoch mit einer um den Faktor 100 reduzierten Geschwindigkeit. Diese Phosphorylierung reduziert letztlich die Sensitivität der Myofilamente gegenüber  $Ca^{2+}$ , was vor allem in der Relaxationsphase wichtig ist (Layland et al. 2005). Troponin T dient hierbei möglicherweise der Verankerung der cGKI und unterstützt die TnI-Phosphorylierung ohne selber phosphoryliert zu werden (Yuasa et al. 1999). Sollte CRP4 die cGKI-abhängige Phosphorylierung von Troponin I modulieren, wäre eine verkürzte diastolische Relaxationsphase der CRP4-defizienten Herzen vorstellbar. Ob ein ternärer



Interaktionskomplex aus CRP4, cGKI und Tnl existiert, müsste in CRP4 Co-IPs mittels phosphospezifischer Antikörper gegen Serin-23/24 von Troponin I untersucht werden.

Interaktionen mit  $\alpha$ -Actinin 2 (*Actn2*), das sowohl in Fokaladhäsionen, als auch in Z-Scheiben-Strukturen ein wichtiges Ankerprotein darstellt, wurden bereits für viele Vertreter der LIM-Proteine beschrieben (Weiskirchen and Gunther 2003). Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse des CRP4-Interaktoms bestätigte die direkte Interaktion von CRP4 mit  $\alpha$ -Actinin 2 in gesunden und hypertrophen Herzen (s. Abb. 4.35). Diese Verbindung impliziert, dass CRP4 ebenfalls eine Strukturkomponente der Z-Scheibe, dem zentralen Verankerungsort der kontraktilen Proteine, ist. Dabei fungiert CRP4 möglicherweise als sogenannter *Stretch*-Sensor, der die Umwandlung mechanischer in biochemische Signale vermittelt. Da  $\alpha$ -Actinin 2 als wichtigstes Element der Z-Scheibe angesehen wird, ist es nicht verwunderlich, dass Mutationen im humanen  $\alpha$ -Actinin 2-Gen in Kardiomyopathien resultieren (Chiu et al. 2010). Da  $\alpha$ -Actinin 2 auch die Aktivität spannungsabhängiger L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (LTTC), vor allem  $\text{Ca}_v1.2$  und  $\text{Ca}_v1.3$ , moduliert, könnten  $\alpha$ -Actinin 2-Funktionsdefizite auch zu einem schädlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -*Overload* führen, der die hypertrophen Umbauprozesse und die Kontraktilität negativ beeinflusst (Lu et al. 2007). *CRP3/MLP* (*Csrp3*) stellt ebenso ein wichtiges Protein der Z-Scheibe dar (Knoll et al. 2002). Obwohl *CRP3/MLP* in der massenspektrometrischen Untersuchung nicht signifikant angereichert vorlag, konnte das CRP4-Schwesterprotein im Western Blot als Interaktor nach Ang II-Stimulation ermittelt werden (s. Abb. 4.35). Weitere gemeinsame Interaktoren von *CRP3/MLP* und CRP4 waren mit dem hier verfolgten IP-Ansatz jedoch nicht zu ermitteln. Proteinkinase C und Calcineurin A sowie weitere bekannte Effektoren dieser Signalwege wie Cypher, Calsarcin, PICOT und CapZ (Knoll et al. 2002) sind *CRP3/MLP*-Partnerproteine an der Z-Scheibe, aber keine Bestandteile des CRP4-Interaktoms ( $\pm$  Ang II). Dass abgesehen von  $\alpha$ -Actinin 2 keine gemeinsamen Bindungspartner für *CRP3/MLP* bzw. CRP4 ermittelt wurden, deutet darauf hin, dass diese beiden LIM-Proteine unabhängige Hypertrophie-Signalwege modulieren. Dies lässt eine gegenseitige Kompensation dieser LIM-Proteine nach Funktionsverlust unwahrscheinlich erscheinen, zumal in CRP4-defizienten Herzen weder auf mRNA- noch auf Proteinebene eine Hochregulation von *CRP3/MLP* zu beobachten war (s. Abb. 4.43 C, D).

Die Interaktion von CRP4 mit Proteinen, deren Fehlfunktionen zu hypertrophen oder dilatativen Kardiomyopathien führen, verdeutlicht die Wichtigkeit dieses LIM-Proteins als Struktur- und Adapterprotein im Kardiomyozyt. Über seine Zinkfingerdomänen ist CRP4 zu Protein-Protein-Interaktionen befähigt und kann so beispielsweise die optimale sterische Ausrichtung und Funktion der Partnerproteine beeinflussen. Gleichzeitige Defekte in CRP4 und den hier identifizierten Interaktionsproteinen könnten das Krankheitsbild verstärken. So wurde auch über dilatative Kardiomyopathien berichtet, die sich auf Mutationen im Vinculin sowie *Mybpc3*-Gen zurückführen ließen (Wells et al. 2011). Ein ähnliches Krankheitsbild wurde für gemeinsam auftretende *CRP3/MLP*- und  $\alpha$ -Actinin 2-Mutationen beschrieben (Mohapatra et al. 2003). Mit der  $\beta$ -Isoform der schweren Myosinkette,  $\beta$ -MHC (*Myh7*) wurde unter Basalbedingungen ein CRP4-Interaktionsprotein identifiziert (s. Abb. 4.33), auf dessen Fehlfunktion 40% aller hereditären Kardiomyopathien zurückzuführen sind (Seidman and

Seidman 2011). Interessanterweise konnte kürzlich mit Hilfe von *Knock-In* Mausmodellen für eine häufige Mutation von  $\beta$ -MHC gezeigt werden, dass diese erst einen dekompensierten Kardiomyopathie-Phänotyp zum Vorschein brachte, wenn zusätzliche Mutationen in demselben Gen vorlagen. Daraus lässt sich schließen, dass eine Vielzahl von Kardiomyopathien möglicherweise auf einer Häufung mehrerer Mutationen beruht, eine exakte Genotypisierung von HCM/DCM-Patienten ist deshalb unerlässlich (Blankenburg et al. 2014). Ob bisher noch nicht entdeckte Mutationen im CRP4-Gen bei Kardiomyopathie-Patienten bereits bei Diagnose vorlagen und in Verbindung mit bereits bekannten Hypertrophie-assoziierten Mutationen eventuell zu einer Progression der Erkrankung beigetragen haben, ist unklar.

Für annähernd alle mittels LC-MS/MS identifizierten Interaktoren war bislang kein Zusammenhang mit dem cGMP/cGKI-Signalweg erkennbar. Wahrscheinlich handelt es sich bei den CRP4-Bindungspartnern nicht um direkte Substrate der cGKI. Eventuell agiert CRP4 unter physiologischen sowie pathophysiologischen Bedingungen auch unabhängig von cGMP/cGKI. Generell waren Kinasen (z.B. PKA, PKC, FAK) inklusive der cGKI nicht Bestandteil des CRP4-Interaktoms (s. Abb. 4.32 und Abb. 4.33). Dieser Befund bestätigt die häufig nur transiente Interaktion von Kinasen mit ihren Zielproteinen und damit auch die Tatsache, dass Kinasen nach Co-IP von ihren eigentlichen Bindungspartnern nur selten erfasst werden (persönliche Kommunikation mit Dr. Karsten Boldt, Proteom-Forschungszentrum für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Tübingen). Dass Phosphorylierungsreaktionen im Kontext der CRP4-Interaktomanalyse nach hypertropher Stimulation wichtig sind, zeigt der Nachweis der katalytischen Untereinheiten der *Proteinphosphatasen 1 und 2* (*Ppp1;Ppp2*) in den Co-IP Komplexen (s. Abb. 4.33). Eventuell wird über die PP1 (und PP2) auch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung an Serin-104 von CRP4 erreicht. Interessanterweise reguliert die cGKI über die Hemmung der PP1 in hypertrophen Herzen indirekt die Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers (NHE), wodurch über dessen Zusammenspiel mit dem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) letztlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Myozyten herabgesetzt wird (Balligand and Hammond 2013). Dementsprechend resultiert die Überexpression der PP1 in einer progressiv verlaufenden Dilatation des linken Ventrikels (Carr et al. 2002). Möglicherweise optimiert CRP4 in diesem Zusammenhang die Interaktion von PP1 und cGKI. Die kardiale PP1 ist darüber hinaus an zahlreichen Dephosphorylierungsreaktionen beteiligt, die bereits gut beschriebenen PP1-Substrate Troponin I und Mybpc3 wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls als CRP4-Interaktionsproteine identifiziert (s. Abb. 4.32 und Abb. 4.33). Die funktionale Bedeutung dieser Interaktion bleibt rein spekulativ, jedoch impliziert die Komplexbildung eine regulatorische Funktion von CRP4 (und evtl. cGKI) für die Dephosphorylierungsreaktion der kontraktilen Adapterproteine.

*Beta-actin-like protein 2* (*ActB12*) und das Strukturprotein *Vimentin* (*Vim*), eine intergrale Komponente des Zytoskeletts (Eriksson et al. 2009), wurden unter Ang II-stimulierten Konditionen in CRP4-WT Co-IPs identifiziert (s. Abb. 4.33). ActB12 ist eine neu entdeckte Aktin-Isoform (Chang et al. 2006), über die bisher nur sehr wenig bekannt ist. Es gibt

Berichte darüber, dass ActB12 eine gängige Verunreinigung massenspektrometrischer Proteinanalysen sein könnte (Mellacheruvu et al. 2013). Da im Rahmen dieser Arbeit eine massive Anreicherung von ActB12 nur nach Ang II-Infusionsbedingungen in CRP4-WT Proben beobachtet wurde, könnte die Interaktion von CRP4 mit ActB12 spezifisch und somit biologisch relevant sein. Die Bindung von CRP4 an *Clusterin* (*Clu*; s. Abb. 4.33) könnte mit einer spezifischen Regulation von apoptotischen Vorgängen im Zellkern und einer Entsorgung von zellulären Abbauprodukten verbunden sein. Generell ist die Funktion des Chaperons Clusterin im Herzen recht unbekannt, es könnte in Zuständen von erhöhtem oxidativem Stress (z.B. durch Ang II-Dauerinfusion) das Überleben der Zelle positiv beeinflussen (Park et al. 2014). Eine ähnliche Verbindung lässt sich aus der Interaktion von CRP4 mit dem Zinkfinger-Protein *TRIM72* (*Tripartite motive 72*) ablesen, das an Reparaturvorgängen im Zellinneren beteiligt ist (Cai et al. 2009). *Glycogenin* (*Gyg*) und *Lipoproteinlipase* (*Lpl*), die selektiv in unstimulierten CRP4-WT Proben angereichert waren, implizieren eine mögliche Regulation von metabolischen Vorgängen über CRP4 (Sugden et al. 1993, Depre et al. 1999). Kaum in der Literatur beschrieben sind die ebenfalls als Adapterproteine fungierenden *Ndr2* (*N-Myc downstream-regulated gene*) und *Kbtbd5* (*Kelch repeat and BTB domain containing protein 5*), die ebenfalls unter physiologischen Bedingungen an CRP4 binden (s. Abb. 4.32). Letzteres ist auch unter dem Namen *Sarcosynapsin* bekannt und gehört zu den Kelch-Proteinen, die mit propellerartigen Strukturen Verbindungen mit anderen Proteinen eingehen können (Adams et al. 2000). Lokalisiert ist *Kbtbd5* an den A-Band Abschnitten der Sarkomere. Der *Knockdown* von *Kbtbd5* in Zebrafischen verursachte Defekte in der myozytären Feinstruktur. *Kbtbd5*-Mutationen werden auch beim Menschen mit der seltenen Nemalin-Myopathie in Verbindung gebracht (Ravenscroft et al. 2013). Es bleibt zu überprüfen, inwiefern die Interaktion von CRP4 die Position oder Funktion von *Kbtbd5* bei der Stabilisierung der Aktinfilamente des Sarkomers beeinflusst. Das Adapterprotein *Ywhae* (*14-3-3-epsilon*) erkennt und bindet hochselektiv Phosphoserin-Motive, reguliert die Aktivität seiner Bindungspartner und ist darüber hinaus in eine Vielzahl intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse involviert (Vincenz and Dixit 1996, Craparo et al. 1997). Daher könnte der *Ywhae*-Nachweis in den CRP4-WT Co-IPs auf eine direkte Phosphorylierung von CRP4 unter hypertropher Ang II-Stimulation hinweisen. Die stärkste Anreicherung in CRP4-WT Proben wurde unter Basalbedingungen für das Protein *Iqce* (*IQ motif containing protein E*) ermittelt (s. Abb. 4.32). IQ-Domänen, stellen bestimmte Aminosäuresequenzen zur Bindung von Calmodulin dar und sind oft in Myosinketten, Proteinen der Ras-Familie, spannungsabhängigen Ionenkanälen oder Phosphatasen vorzufinden (Rhoads and Friedberg 1997). *Iqce* ist ein Bestandteil des *Hedgehog*-Signalweges in Zilien (Pusapati et al. 2014), und könnte in anderen Organen daher eine Rolle in der transkriptionellen Steuerung der Embryonalentwicklung inne haben. Eine Funktionsbeschreibung von *Iqce* im Herzen ist bisher in der Literatur jedoch nicht zu finden.

Insgesamt bestätigt die Interaktomstudie, dass CRP4 über (direkte oder indirekte) Protein-Protein-Interaktionen vielfältige und bisher unbekannt Funktionen bei der Regulation von Adapter- (*Kbtbd5*, *Ndr2*) bzw. Strukturproteinen des Sarkomers (z. B. Troponin I, Troponin

T,  $\alpha$ -Actinin 2,  $\beta$ -MHC, Mybpc3) und des Zytoskeletts (z.B. Moesin und Vinculin), zellulären Reparaturvorgänge (Clusterin, TRIM72), oder metabolischen Prozessen (z.B. Lipoproteinlipase, Glycogenin) im Herzen haben könnte. Offensichtlich besteht noch weiterer Forschungsbedarf, um die Mechanismen, die diesen Interaktionen zugrunde liegen und damit letztlich auch die Rolle von CRP4 im Kardiomyozyt für hypertrophe Herzerkrankungen aufzuklären. Der Nachweis von Interaktionspartnern in CRP4 Co-IP Komplexen mit bislang unbekannter Funktion im gesunden und/oder hypertrophen Myokard (z. B. Iqce, ActB12, Ywhae) birgt darüber hinaus eine große Chance für die zukünftige Identifikation neuer Signalwege bei erhöhter (physiologischer oder pathologischer) Belastung. Aktuell ist noch unklar, ob und inwiefern das CRP4-Interaktom generell geeignet ist, um auch die Bedeutung der cGMP/cGKI-gesteuerten Prozesse bei kardialen Wachstumsprozessen besser zu verstehen. Die Anreicherung von Troponin I unter physiologischen Bedingungen und der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase 1 unter Ang II-Stimulation in Präzipitaten von CRP4-WT Tieren ist neben der direkten Interaktion von cGKI und CRP4 (s. Abb. 4.31) ein weiterer sehr guter Hinweis auf eine biologisch relevante Überschneidung der cGMP/cGKI- sowie CRP4-abhängigen Effekte im murinen Herz.

### **5.2.6 Kardiale CRP4-Proteomanalyse unter patho-/physiologischen Bedingungen**

Um zu ermitteln, ob sich die Ablation von CRP4 unter biologischen oder pathologischen Bedingungen auf die Expression und damit die Zusammensetzung des kardialen Proteoms auswirkt, wurde das Gesamtherzlysat der Versuchstiere (CRP4-WT bzw. CRP4-KO  $\pm$  Ang II) im Massenspektrometer aufgetrennt und quantifiziert. Unabhängig von der Ang II-Behandlung wurde *Crip1* (*Cysteine-rich intestinal protein 1*) als sehr stark reguliertes Protein detektiert (s. Abb. 4.37, Abb. 4.38 und Abb. 4.41). In CRP4-KO Proben war generell eine massive *Crip1*-Anreicherung zu beobachten, die auf eine kompensatorische Regulation im Sinne des CRP4-Funktionsverlusts hindeutet (weitere Details hierzu s. 5.2.7). Generell zeigen die präliminären Untersuchungen zum CRP4-Proteom eine Vielzahl differentiell exprimierter Proteine in den untersuchten Genotypen. Von insgesamt 568 massenspektrometrisch detektierten kardialen Proteinen waren 29 Proteine unter Basalbedingungen und 26 Proteine unter Ang II-Stimulation signifikant CRP4-abhängig reguliert (s. Anhang, Tab. 7.2). Die Mehrzahl der regulierten Proteine konnte sarkomerischen und zytoskelettalen Zellstrukturen im Kardiomyozyt zugeordnet werden (s. Abb. 4.37 und Abb. 4.38). Insgesamt ergab ein Vergleich der Proteine unter basalen und hypertrophen Versuchsbedingungen nur wenige Überschneidungen (s. Abb. 4.37 und Abb. 4.38). Nach Ang II-Stimulation waren vor allem in CRP4-KO Lysaten viele mitochondriale Bestandteile und Proteine zur Prozessierung von oxidativem Stress angereichert. Möglicherweise ergibt sich aus den verstärkten *Remodeling*prozessen nach CRP4-Deletion (s. Abb. 4.24 und Abb. 4.25) ein erhöhter Energiebedarf für die Aufrechterhaltung bzw. Anpassung der Zellfunktion (s. Abb. 4.38). Erfahrungsgemäß sollten Proteine, die in der Massenspektrometrie als reguliert identifiziert wurden, mindestens zweifach angereichert sein und sich mittels alternativer Methoden, beispielsweise im Western Blot, reproduzieren lassen (persönliche

Kommunikation mit Dr. Karsten Boldt, Proteom-Forschungszentrum für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Tübingen). Die Detailanalyse der biologischen Bedeutung dieser Regulationen wird in jedem Fall Gegenstand weiterer Forschungsprojekte am hiesigen Lehrstuhl (AG JProf. Dr. Robert Lukowski) sein.

Die Proteomdaten implizieren, dass auch kardiales CRP4 in Translations- bzw. Proteinmodifikationsvorgänge involviert sein könnte (s. Abb. 4.37 und Abb. 4.38). Bereits unter basalen Bedingungen war mit *Eprs* (*Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase*) eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase selektiv im CRP4-WT Herzlysat angereichert. Eprs-Proteine katalysieren die Beladung der t-RNAs mit ihren jeweiligen Aminosäuren und sind damit für die Initiation der Proteintranslation am Ribosom essentiell (Woese et al. 2000). Mit *Rps17* (*Ribosomal protein S17*) und *Rpl7a* (*Ribosomal protein L7A*) waren auch Proteinuntereinheiten der 40S-Untereinheit bzw. 60S-Untereinheit der Ribosomen selektiv abundanter in CRP4-WT Herzlysaten nachweisbar. Dies lässt auf eine dynamische Veränderung der Translation in CRP4-WT Herzen schließen. Diese Befunde werden gestützt durch die selektive Hochregulation von *Psm4* (*Proteasome subunit, alpha type*), einer Untereinheit des Proteasoms, in CRP4-KO Lysaten (s. Abb. 4.37). Möglicherweise spielt CRP4 somit bereits unter Basalbedingungen eine Rolle für den *Turnover* kardialer Proteine. Mitochondriale Proteine waren unter Basalbedingungen nur im CRP4-WT Herz signifikant angereichert (s. Abb. 4.37), was wiederum für eine Dysregulation metabolischer und oxidativer Prozesse im CRP4-KO Herz spricht. Das Protein mit der Bezeichnung *Ndufb3* (*NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 beta subcomplex 3*) kodiert für eine essentielle Untereinheit von Komplex I der Elektronentransportkette im Mitochondrium und repräsentiert das abundanteste Protein in CRP4-WT Herzen unter Basalbedingungen überhaupt (s. Abb. 4.37 und Abb. 4.39). Um die aus der CRP4-Ablation resultierenden biochemischen Defekte der Atmungskette zu untersuchen, müsste der Sauerstoff-Verbrauch (als Indikator der ATP-Produktion) von Herzmuskelfasern, Kardiomyozyten oder isolierter Mitochondrien z. B. nach dem Clark-Prinzip bestimmt werden (Clark et al. 1953, Frezza et al. 2007). Unter Ang II-stimulierten Bedingungen war mit *Sirtuin 5* (*Sirt5*) ein weiteres, an posttranslationalen Proteinmodifikationen beteiligtes Enzym signifikant in CRP4-WT Herzlysaten angereichert (s. Abb. 4.38). Durch Deacetylierung sowie ADP-Ribosylierung regulieren Sirtuine Transkription, Apoptose und Alterungsvorgänge. Aus diesem Grund werden Sirtuin-Proteinen generell positive Wirkungen bezüglich des Überlebens von Zellen in Stresssituationen zugeschrieben, weshalb sie auch oft als sogenannte *Anti-Aging*-Enzyme bezeichnet werden (Hayflick 2007; Michan & Sinclair 2007). Sirtuin 7 fördert beispielsweise das Überleben von Kardiomyozyten in einem Modell der inflammatorischen Kardiomyopathie (Vakhrusheva et al. 2008). Möglicherweise steuert CRP4 (direkt oder indirekt) die Transkription von *Sirt5* oder stabilisiert *Sirt5*-abhängige Proteinmodifikationen. Eine starke Anreicherung in CRP4-WT Lysaten ergab sich auch für *Cct3* (*Chaperonin containing T-complex polypeptide 1, subunit 3*, s. Abb. 4.37). *Cct3* ist eine Untereinheit des 900 kDa großen TCP-1 (*chaperonin containing TCP-1*) Ringkomplexes. Die sogenannten TRiC-Proteine unterstützen die Faltung von translatierten Proteinen im Zytosol. Unter anderem werden in diesen Ringkomplexen auch Aktin-Isoformen und Tubuline modifiziert (Dunn et al. 2001). Kürzlich wurde auch eine

Verbindung zwischen der Cct-Proteinfamilie und dem cGMP/cGKI-Signalweg gefunden: Patienten mit einer Mutation in der Cct5-Untereinheit tragen zusätzlich eine Variante der löslichen Guanylatzyklase, die zu einer verminderten Expression und damit verbunden zu reduzierten cGMP-Spiegeln führte, was sich in einem erhöhten Myokardinfarktsrisiko äußerte (Erdmann et al. 2013, Lukowski et al. 2014). Ob TRiC-Proteine generell für die translationale Modifikation von Guanylatzyklasen verantwortlich sind und verringerte Proteinmengen dieses Chaperonins in CRP4-KO Herzen möglicherweise ursächlich für geringere cGMP-Spiegel unter physiologischen Bedingungen sind (s. Abb. 4.28), müsste in weiteren Studien ermittelt werden.

Die Deletion von CRP4 führt auch zu einer Dysregulation von sarkomerischen und zytoskelettalen Proteinen. Die Expressionslevel der leichten Myosinketten (*Myl6: Myosin light chain 6; Myl3: Myosin light chain 3*) zeigten sich sehr variabel zwischen den Genotypen ± Ang II, wohingegen die schwere Kette der  $\beta$ -Myosin-Isoform (*Myh6: Myosin heavy chain 6*) im CRP4-KO Myokard konstant hochreguliert war (s. Abb. 4.37 und Abb. 4.38). Möglicherweise indizieren die Veränderungen auf Ebene der Myosin-Isoformen im CRP4-KO Herz kompensatorische Vorgänge, um den Funktionsverlust von CRP4 bei der exakten Koordination der Kontraktion auszugleichen. Unter basalen Bedingungen (s. Abb. 4.37) waren im CRP4-WT nur *Spectrin (Sptan1)* und  *$\alpha$ -Actinin 2 (Actn2)* angereichert, alle weitere zytoskelettalen und sarkomerischen Proteine (z.B. *PdLIM5: PDZ and LIM domain protein 5* und *Finc: Filamin C* sowie *Slmap: Sarcolemmal associated protein*) konnten vor allem in CRP4-KO Herzen vermehrt detektiert werden. Die Ang II-Dauerstimulation führte zu einer Anreicherung der Intermediärfilamente *Desmin (Des)* und *Vimentin (Vim)* in CRP4-WT Herzen, möglicherweise um in hypertrophen Zuständen die Struktur und Integrität der Zelle zu erhalten. Desmin ist für seine strukturgebende Funktion hinreichend bekannt, es umspannt kontraktile Elemente und verbindet diese mit dem Zytoskelett und der Z-Scheibe (Heling et al. 2000). Da sowohl Desmin als auch Vimentin mit Kardiomyopathien assoziiert sind, können erniedrigte Proteinlevel zu der Ausprägung des kardialen CRP4-KO Phänotyps beitragen. CRP4-KO Herzen zeigen überdies einen Mangel an *Bag3 (BCL2-associated Athanogene 3)*. Verkürzte Bag3-Proteine, SNPs oder weitere Mutationen in diesem antiapoptotisch wirkenden Protein führen zu unterschiedlichen Kardiomyopathie-Formen (Villard et al. 2011, Citro et al. 2013). Mindestens zwei heterozygote Bag3-Mutationen sind bereits beschrieben. Diese verursachen beispielsweise die myofibrilläre Myopathie Typ 6, eine schwere Myopathieform, die bereits im Kindesalter auftritt und sich von den Gliedmaßen über die Atemmuskulatur bis zum Herzen ausbreitet. Mutationen des in Z-Scheiben angereicherten Proteins führen außerdem zur Akkumulation unnützer Proteine, zu einem Integritätsverlust der Z-Scheiben und damit zur Versteifung der Muskulatur (Jaffer et al. 2012). Die Deletion dieses Proteins war darüber hinaus im murinen Organismus mit einer rasch einsetzenden Myopathie sowie einem verfrühten Ableben verbunden (Selcen et al. 2009). Erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel sind im Allgemeinen nachteilig bei Myopathien und ursächlich für die Krankheitsprogression. In Gesamtherzlysaten von CRP4-defizienten Herzen war eine starke Anreicherung des *NCX-Austauschers (Slc8a1)* zu ermitteln (s. Abb. 4.39). Dieser Antiporter transportiert  $\text{Na}^+$  im Austausch mit  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle (Yeves et al.

2010), somit sind erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in CRP4-KO Herzen wahrscheinlich. Der NCX-Austauscher ist umso aktiver, je mehr  $\text{Na}^+$  über benachbarte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher (NHE) in die Zelle gelangt. Auch NHE-Austauscher sind in Zuständen kardialer Hypertrophie oft hochreguliert (Kilic et al. 2005). Da eine direkte pharmakologische Hemmung des NCX-Austauschers unkalkulierbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel zur Folge haben kann (Hasenfuss and Schillinger 2004), scheint die Inhibierung des vorgeschalteten NHE-Transporters ein möglicher Therapieansatz zu sein. Kürzlich erhielt der NHE-Inhibitor Rimeporide unter dem Status eines *Orphan Drugs* die Zulassung zur Therapie der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (www.esperare.org). Interessanterweise steht die Transkription des NCX-Austauschers unter Kontrolle von GATA4 (Akazawa and Komuro 2003), das gemeinsam mit CRP4 möglicherweise die Genexpression steuert (s. Abb. 5.1). Aus diesem Grund muss bei der Interpretation der Proteomdaten neben einer Stabilisierung und posttranslationaler Modifikation auch stets die mögliche Modulation transkriptioneller Vorgänge durch CRP4 beachtet werden. Interessante Kandidaten für weitere Analysen sollten daher zusätzlich quantitativen mRNA-Analysen unterzogen werden. Durch die 7-tägige Ang II Dauerinfusion zeigte sich in CRP4-WT Herzen auch eine Anreicherung von *Ywhah* (*Brain protein 14-3-3-eta*), einem Protein der 14-3-3 Familie (s. Abb. 4.38). Möglicherweise übt auch dieses Adapterfunktionen aus, über seine Rolle im Herzen ist jedoch nichts bekannt. Mit Hilfe der Proteomanalyse wurden eine Vielzahl höchst interessanter Kandidatenproteine identifiziert, deren Expression oder Stabilität CRP4-abhängig reguliert wird. Weitere Untersuchung zur funktionalen Bedeutung dieser differentiellen Expression (unter Basalbedingungen bzw. nach Ang II-Infusion) scheinen sehr vielversprechend und sind derzeit Gegenstand der Arbeiten am hiesigen Lehrstuhl (AG JProf. Dr. Robert Lukowski).

### 5.2.7 Die Ablation von CRP4 resultiert in einer selektiven Hochregulation von *Crip1* im Myokard

Die vergleichende Proteomanalyse ergab in CRP4-defizienten Herzen eine deutliche Hochregulation des Proteins *Crip1* (*Cysteine-rich intestinal protein 1*; s. Abb. 4.37 und Abb. 4.38). Diese massive Anreicherung konnte mittels Western Blot und mRNA-Expressionsanalysen bestätigt werden (s. Abb. 4.41 A-C). Bisherige Publikationen zu *Crip1* beschränken sich gemäß der Nomenklatur auf die Untersuchung zur Funktion von *Crip1* im Gastrointestinaltrakt. Außerdem gibt es Befunde, die auf eine mögliche Rolle von *Crip1* bei der Tumorgenese und der Immunantwort hindeuten (Birkenmeier and Gordon 1986, Cousins and Lanningham-Foster 2000, Baumhoer et al. 2011, Ludyga et al. 2013). Da der *Crip1*-Genlocus und das CRP4 codierende *Crip2*-Gen in direkter Nachbarschaft auf demselben Chromosom lokalisiert sind (s. Abb. 4.40 B), musste zunächst geprüft werden inwiefern die Knockout-Strategie durch Ausschalten von Exon 2-7 des CRP4-Gens regulatorische *Crip1* DNA-Sequenzen beeinflusst und somit ursächlich für die Überexpression von *Crip1* ist. Die *Crip1*-Expressionslevel zeigten sich jedoch nur im CRP4-defizienten Myokard verändert, in allen weiteren untersuchten CRP4-KO Organen (z.B. Lunge, Niere und Aorta; s. Abb. 4.42) war keine *Crip1*-Regulation erkennbar. Diese Befunde deuten auf einen spezifischen

kardialen Kompensationsmechanismus aufgrund der CRP4-Ablation hin. Interessanterweise stimmen die Aminosäuresequenzen von Crip1 und CRP4 zu 67 % überein, das Crip1-Protein erreicht aber nur ein Drittel des Molekulargewichts von CRP4 und besteht dementsprechend nur aus einer LIM-Domäne mit zwei Zinkfingern (s. Abb. 4.40 B). Da Crip1 keine RKT-S-Konsensussequenz besitzt, ist zumindest die Interaktion von Crip1 mit dem cGMP/cGKI-Signalweg unwahrscheinlich. Eine direkte Interaktion von CRP4 und Crip1 war außerdem in den Co-IPs nicht nachweisbar (s. Abb. 4.41 D). Zudem müssen künftige Crip1 Interaktomuntersuchungen zeigen, inwiefern Crip1 und CRP4 mit denselben Partnerproteinen interagieren können. Aufgrund des deutlichen Herzphänotyps der CRP4-KO Mäuse (s. 4.4.3 und 4.6) wird sehr deutlich, dass Crip1 nicht alle essentiellen Funktionen von CRP4 unter pathophysiologischen Bedingungen kompensieren kann. Es bleibt leider ungeklärt wie sich CRP4-defiziente Mäuse präsentieren würden, wenn Crip1 nicht hochreguliert wäre. In diesem Zusammenhang wären Untersuchungen an CRP4/Crip1-doppelmutanten Mäusen sicherlich lohnenswert, jedoch wurde bis dato keine Crip1-KO Maus generiert. Der Zebrafisch stellt generell ein geeignetes Modell dar, um Muskeldefekte zu studieren, die sich meist gut auf andere Organismen übertragen lassen. Hierbei kann mit sogenannten Morpholinos, analog zu siRNA, ein Gen-*Knockdown* induziert werden. Der entscheidende Vorteil besteht darin, dass Morpholinos nicht durch RNasen abgebaut werden und somit eine längere Halbwertszeit aufweisen (Summerton & Weller 1997). In präliminären Untersuchungen in einem Kooperationsprojekt mit JProf Dr. Steffen Just (AG Molekulargenetik, Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Ulm) wurde bereits ein deutlicher Herzphänotyp von Crip1-morpholinobehandelten (und auch CRP4-morpholinobehandelten) Zebrafischlarven beobachtet (Daten nicht gezeigt). Crip1 scheint in diesem Zusammenhang neben CRP4 ein weiteres, kaum beschriebenes LIM-Protein zu sein, dessen Verlust/Fehlfunktion möglicherweise zu Kardiomyopathien führt. Untersuchungen hierzu sowie die generelle Funktion von Crip1 im Herz-Kreislaufsystem sollten im Anschluss an diese Arbeit unbedingt fortgeführt werden.

Die Expressionsanalyse wurde auch auf die gängigen Mitglieder der CRP-Familie, CRP1-3, erweitert. Die niedrigen kardialen Expressionslevel von CRP1 und CRP2 zeigten keine genotyp-abhängigen Unterschiede und Expressionssteigerungen nach Ang II-Behandlung stellten sich in CRP4-WT und CRP-KO Herzen identisch dar (Abb. 4.43 A, B). Übereinstimmend mit der Proteomanalyse waren ebenfalls keine genotyp- oder behandlungsspezifischen Unterschiede zur CRP3/MLP-Expression zu beobachten (Abb. 4.43 C, D). Dass die CRP3/MLP-Spiegel unverändert waren, schließt eine Übernahme von CRP4-Funktionen per se nicht aus, denn die Gesamtmenge an CRP3/MLP im Myokard ist extrem hoch. Jedoch konnten keine Übereinstimmungen der Interaktionsproteine von CRP3/MLP und CRP4 ermittelt werden (s. 5.2.5). Somit erscheint eine Kompensation des CRP4-Verlusts durch Crip1 zum heutigen Zeitpunkt wahrscheinlicher.



### 5.2.8 Verschlechterte Herzfunktion in CRP4-defizienten Tieren

Aufgrund der zellulären Lokalisation und Interaktion von CRP4 mit zahlreichen strukturellen sowie funktionalen Elementen des kontraktiven Apparates waren die echokardiographischen Herzfunktionsmessungen unter basalen Bedingungen und nach Ang II-Dauerinfusion von großem Interesse. Erstaunlicherweise zeigten CRP4-defiziente Tiere bereits unter physiologischen Bedingungen eine verschlechterte Herzfunktion, die sich durch signifikant verringerte Verkürzungs- und Auswurffractionen manifestierte (s. Abb. 4.44 und Abb. 4.45). Dies war der einzige Befund bei der Untersuchung des kardialen CRP4s, der für CRP4-defiziente Tiere unter physiologischen Bedingungen einen offensichtlichen Nachteil erbrachte. Diesem stand die Tatsache gegenüber, dass CRP4-defiziente Tiere unerwarteterweise hypoton sind (s. Abb. 4.19) und sich der eigentliche Kraftaufwand des Herzens in der Systole somit geringer darstellen sollte. Mögliche Adaptationsmechanismen des Herzens an den erniedrigten Blutdruck oder umgekehrt sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht auszuschließen. Dass die verschlechterte Herzfunktion auf eine reduzierte Kontraktionskraft der CRP4-defizienten Herzen zurückzuführen ist, wird bei genauerer Betrachtung der Kammerwände deutlich. Hier fällt vor allem die Hypokinesie des CRP4-KO Septums in der Systole auf, d.h., eine adäquate Kontraktionsamplitude bleibt aus, was letztlich auf eine verminderte Muskelkraft schließen lässt (Abb. 4.46). Eine reduzierte systolische Septumdicke deutet prinzipiell auf eine Kardiomyopathie hin, jedoch zeigten sich unter physiologischen Bedingungen keinerlei Anzeichen einer Ventrikeldilatation. Möglicherweise befanden sich die Tiere, die im Alter von 10-15 Wochen diesen Untersuchungen zugeführt wurden, noch in einem weitestgehend asymptomatischen und damit kompensierten Zustand. Unter diesen Bedingungen könnten eine Vielzahl von Mechanismen zur Kompensation des CRP4-Funktionsverlusts beitragen, beispielsweise die mögliche Kompensation durch Crip1 (s. Abb. 4.41) oder die Expression bzw. Funktion weiterer Proteine, die aufgrund der CRP4-Deletion in CRP4-KO Herzen angereichert waren (s. Abb. 4.37). Generell scheint in diesem Zusammenhang auch die Untersuchung älterer Tiere sinnvoll. Weitere Funktionseinschränkungen des Herzmuskels würden auf eine progressive Dekompensation aufgrund der CRP4-Ablation hindeuten. Insbesondere zeigen verschiedene Formen von Muskeldystrophien in späteren Stadien auch einen kardialen Phänotyp (Cox and Kunkel 1997). Anhand der LC-MS/MS-Analyse ist nicht ausgeschlossen, dass der Verlust von CRP4 möglicherweise indirekt zu Symptomen führt, die einer Muskeldystrophie sehr ähnlich sind. So ergab die Proteomanalyse extrem erniedrigte Proteinlevel für Bag3 und Caveolin 3 unter Basalbedingungen (s. Abb. 4.37). Beide sind mit Muskeldystrophien assoziiert, für Bag3 sind überdies schwere Verlaufsformen bezüglich des Herzmuskels beschrieben (Konersman et al. 2015). Das Kelch-Protein Kbtbd5 bzw. Sarcosynapsin ist sogar ein direkter Interaktionspartner von CRP4 (s. Abb. 4.32) und auch Mutationen in diesem Gen führen zu einer Myopathie (Ravenscroft et al. 2013). In diesem Zusammenhang wäre darüber hinaus interessant, ob sich CRP4-bedingte Defekte ebenfalls in der Skelettmuskulatur darstellen lassen, z.B. durch einen herabgesetzten Muskeltonus von CRP4-KO Mäusen. Möglicherweise sind multiple Faktoren am kardialen CRP4-Phänotyp beteiligt. Durch den Verlust von CRP4 fehlt darüber hinaus auch ein Bindungspartner von Troponin I,  $\alpha$ -Actinin 2

und der  $\beta$ -Isoform der schweren Myosinkette (s. 5.2.5) bei der Regulation der Herzmuskelkontraktion.

Durch die Injektion des Sympathomimetikums Isoprenalin (s. Abb. 4.47 und Abb. 4.48) sollte die Adaptation der Herzfunktion auf einen akuten Stimulus hin untersucht werden. In beiden Genotypen war eine starke Zunahme der Kontraktilität und der Herzfrequenz zu beobachten. Die basalen Unterschiede zwischen den CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen in der globalen Herzfunktion (Verkürzungs- und Auswurffraktion, Wandstärken etc.) wurden durch die Isoprenalin-Injektion egalisiert. CRP4 scheint somit für die Adaptation an diesen akuten Stimulus nicht essentiell zu sein. Ebenso waren keine genotyp-bedingten Unterschiede der funktionalen Herzparameter nach 7-tägiger Ang II-Dauerinfusion erkennbar (s. Abb. 4.49). Im Gegensatz zu  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren, die eine massive Beeinträchtigung der Pumpfunktion mit einer Dilatation des Ventrikels zeigten (s. Abb. 4.11), befanden sich CRP4-WT und CRP4-KO Tiere nach der neurohumoralen Stimulation noch in der hypertrophen Kompensationsphase, was sich an massiv verstärkten Wanddicken ermitteln ließ (s. Abb. 4.50). Offensichtlich ist die Adaptation der CRP4-KO Herzen an die erhöhte Nachlast jedoch von ungünstigen histologischen und molekularen Parametern begleitet, denn Herzmasse (s. Abb. 4.16), Myozytengrößen (s. Abb. 4.24 A, B) sowie das Ausmaß der fibrotischen Einlagerungen (s. Abb. 4.25) waren nach 7-tägiger Ang II-Infusion signifikant erhöht. Eine rapide Progression des Krankheitsbildes erscheint somit wahrscheinlich und sollte im Anschluss an diese Arbeit beispielsweise mit einer 14-tägigen Ang II-Stimulation und anschließender echokardiographischer Untersuchung evaluiert werden. Dies scheint generell ein angemessener Zeitraum für die Induktion einer Dekompensation zu sein, denn auch Herzen mit einer kardiomyozytenspezifischer Deletion der cGKI zeigen erst nach 14 Tagen Ang II-Infusion einen dilatierten Phänotyp mit signifikant reduzierter Pumpfunktion (Frantz et al. 2013). Interessanterweise waren bereits nach 7-tägiger Ang II-Stimulation ungleich verdickte Wandstrukturen in CRP4-KO Herzen zu beobachten (s. Abb. 4.50 und Anhang, Tab. 7.3). Die ungleichmäßige Verdickung präsentierte sich vor allem als Muskelwulst mit massiver Verstärkung des Septums und der linken Hinterwand am Aortenbulbus. Diese asymmetrische Verdickung der basisnahen Ventrikelwände führt sehr wahrscheinlich zu einer starken Behinderung des Blutflusses und ist typisch für das Krankheitsbild einer hypertroph-obstruktiven Kardiomyopathie (HOCM). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass verringerte Proteinmengen von Vinculin an Z-Scheiben mit diesem Krankheitsbild assoziiert werden können (Vasile et al. 2006). Die starke Bindung von Vinculin an CRP4 unter Ang II-Stimulation (s. Abb. 4.34) impliziert ein Zusammenspiel dieser Proteine, um diesem hypertrophen Stimulus entgegen zu treten. Wie bereits ausgeführt (s. 5.2.5) ist CRP4 möglicherweise an der Verankerung von Vinculin an Z-Scheiben Strukturen beteiligt. Demnach könnte man in CRP4-defizienten Herzen eine geringere Vinculin-Akkumulation an den *Stretch*-Sensoren postulieren, was mit verstärkten HOCM-Symptomen einhergehen würde.

### 5.2.9 Funktionale Untersuchungen der $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-doppelmutanten Mauslinie

Um die Herzfunktion und das Ausmaß der kardialen Hypertrophie bei einer kontinuierlich-intensivierten Ang II-Signaltransduktion über einen langen Zeitraum spezifisch im Kardiomyozyt zu untersuchen, wurden Tiere der CRP4-Mauslinie mit  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren verpaart (s. 3.1.2). Der durch diese Verpaarung resultierende Phänotyp der  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT und  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO Tiere basiert somit auf einem *Mixed*-Hintergrund (75% Sv129 und 25% C57/Bl6), was ein verzögertes Einstellen der kardialen Symptomatik zur Folge hatte. Die doppeltransgenen Tiere wurden im Alter von 400 Tagen für echokardiographische Untersuchungen herangezogen, erst dann manifestierte sich die Myokardhypertrophie der doppeltransgenen Tiere gegenüber gleichaltrigen Mäusen ohne AT<sub>1</sub>R-Überexpression. Das Ausmaß der tatsächlichen Überexpression bzw. ob der Rezeptor aus unbekanntem bzw. unwahrscheinlichen Gründen in den Doppelmutanten vermindert exprimiert wird, wurde bislang nicht ermittelt. Ein verzögertes Einstellen der Symptomatik aufgrund des genetischen Hintergrundes wurde jedoch auch schon für andere Krankheitsmodelle beschrieben (Dixon and Dixon 2004, Puccini et al. 2013, Heiman-Patterson et al. 2015). Ungeachtet hiervon waren die Herzgewichte von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO Tieren durch die zusätzliche Deletion von CRP4 erhöht (s. Abb. 4.51). Das hierbei keine Signifikanz erreicht wurde, liegt vermutlich daran, dass die genetische Veränderung schon in der Keimbahn vorhanden ist und sich völlig andere Kompensationsmechanismen einstellen können als nach einer akuten Infusion von Ang II. Die signifikant erhöhten Körpergewichte der transgenen  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO Tiere weisen darüber hinaus auf eine systemische Belastung aufgrund der kardialen Erkrankung hin (s. Abb. 4.51 C). Tatsächlich wurden bei der Organpräparation der doppeltransgenen Tiere auch zumeist ödematöse Einlagerungen bei  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO Tieren beobachtet. Dieser Befund erforderte eine zusätzliche Normierung des Herzgewichts auf die Tibialänge. Die Darstellung der HG/TL-Verhältnisse bestätigte wiederum die Tendenz der gesteigerten kardialen Hypertrophie in  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO Tieren (s. Abb. 4.51 D).

Die echokardiographische Untersuchung demonstrierte wiederum die generell beeinträchtigte Pumpfunktion CRP4-defizienter Herzen. Des Weiteren wurde anhand der doppelmutanten Tiere deutlich, dass die CRP4-Deletion unter gleichzeitig intensivierter Ang II-Signaltransduktion in einer drastisch reduzierten myokardialen Kontraktilität resultierte (s. Abb. 4.52). So waren die tatsächlichen prozentualen Werte bezüglich Verkürzungs- und Auswurffraktion durch das eingebrachte AT<sub>1</sub>R-Transgen in  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO Herzen nochmals massiv verschlechtert bzw. die Differenz von  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO zu  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-WT war vergrößert, verglichen mit Basalmessungen an CRP4-WT und CRP4-KO Tieren ohne amplifizierte Ang II-Signaltransduktion (s. Abb. 4.53). Dieselbe Beobachtung konnte für die Verdickung der Ventrikelwände in der Systole gemacht werden (s. Abb. 4.54). Interessanterweise waren  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>/CRP4-KO Tiere in diesem genetischen Hypertrophiemodell nach sympathomimetischer Stimulation durch Isoprenalin kaum mehr in der Lage, ihre Kontraktilität zu steigern (s. Abb. 4.55 und Abb. 4.56). Dieser Befund kann

eindeutig der über 400 Tage erfolgten, kontinuierlichen  $AT_1R$ -Stimulation in Herzmuskelzellen und den daraus resultierenden maladaptiven Veränderungen in der Myozytenfunktion bzw. der Kontraktionsfähigkeit zugeschrieben werden, denn CRP4-KO Tiere ohne zusätzlichen Ang II-Stimulus waren in der Lage, nach Isoprenalin-Injektion ihre Herzfunktion den CRP4-WT Tieren anzupassen (s. Abb. 4.47). Insgesamt belegen die erhobenen Befunde mit doppeltransgenen  $\alpha MHC$ - $AT_1R^{tg/+}$ /CRP4-WT und  $\alpha MHC$ - $AT_1R^{tg/+}$ /CRP4-KO Mäusen eindeutig, dass eine CRP4-Ablation unter langfristiger kardiomyozytärer Ang II-Stimulation die Herzfunktion weiter negativ beeinflusst und bestätigen wiederum die Wichtigkeit von CRP4 in Kardiomyozyten.

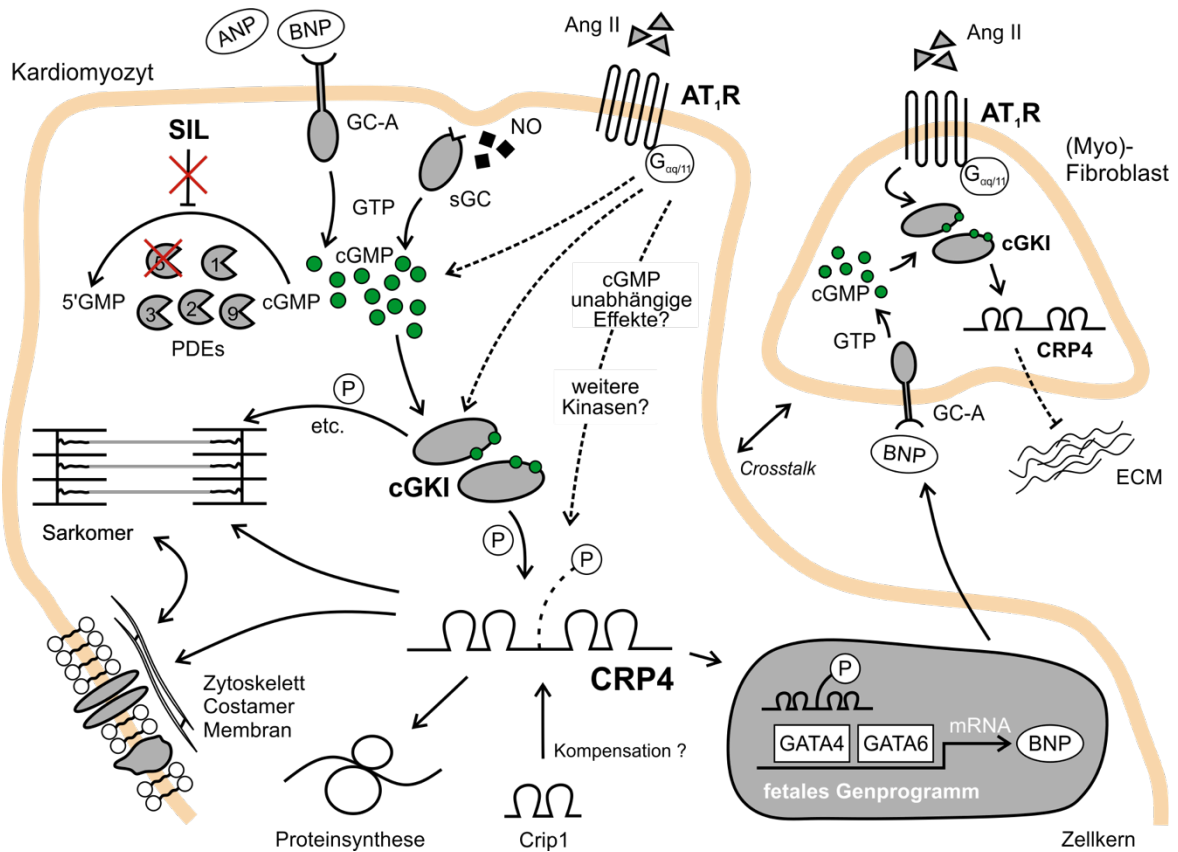
## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Kardiale Hypertrophie ist zumeist eine Folgeerkrankung aufgrund einer Überbelastung des Arbeitsmyokards durch Bluthochdruck, neurohumorale Stimulation sowie Aortenklappendefekten. In diesem Kontext ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron System ein entscheidender Faktor der pro-hypertrophen und pro-fibrotischen myokardialen Gewebeumbauprozesse. Ein wichtiges endogenes System zur Gegenregulation und Funktionserhaltung ist der cGMP/cGKI-Signalweg. Dessen Aktivierung, z.B. über eine cGMP-Erhöhung durch eine Hemmung der PDE5 mit SIL, zeigte in früheren Studien vor allem antifibrotische Effekte (Westermann et al. 2012, Patrucco et al. 2014). Jedoch herrscht über die exakten kardialen Zelltypen, in denen SIL/PDE5/cGMP/cGKI diese Effekte vermittelt, bis dato Unklarheit (Lukowski et al. 2014). Um eine mögliche Protektion des cGMP/cGKI-Systems bei intensivierter Ang II-Stimulation spezifisch in Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurden Tiere mit einer myozytären Überexpression des AT<sub>1</sub>R untersucht. Eine Behandlung dieser Tiere mit dem PDE5-Hemmstoff SIL konnte weder das Ausmaß der kardialen Hypertrophie, die Myokardfibrosierung noch die Herzfunktion entscheidend verbessern. Dennoch waren Komponenten des cGMP/cGKI-Signalwegs aufgrund der amplifizierten Ang II-Signaltransduktion in Herzmuskelzellen hochreguliert, was grundsätzlich für die protektive Bedeutung von cGMP/cGKI unter diesen Bedingungen spricht. Dieses Ergebnis sollte auch richtungsweisend für weitere Studien sein. Konkret scheint eine Stimulation des cGMP/cGKI-Signalwegs in Kardiomyozyten, beispielsweise durch Aktivierung der cGMP-generierenden löslichen oder partikulären Guanylatzyklen, zumindest im Kontext amplifizierter Ang II/AT<sub>1</sub>R-Signaltransduktion weiterhin vielversprechend. Generell bestätigen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde die erst kürzlich veröffentlichten Studienergebnisse zur Therapie der diastolischen Herzinsuffizienz: Auch hier erbrachte eine SIL-Therapie keinerlei Vorteile gegenüber einer Placebo-Gabe (Andersen et al. 2013, Redfield et al. 2013). Insgesamt deuten diese Befunde darauf hin, dass SIL kein geeigneter Wirkstoff zur Therapie von hypertrophen Herzerkrankungen darstellt, deren Ursache primär im Kardiomyozyt begründet ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde CRP4 als neues cGKI-Substrat im Herzmuskel identifiziert. CRP4 gehört zur Klasse der LIM-Proteine, die meist als Adapterproteine fungieren und für die Integrität und Stabilität einer Zelle unbedingt benötigt werden (Kadmas and Beckerle 2004). Mutationen/Fehlfunktionen kardialer LIM-Proteine, z.B. des CRP4-Geschwisterproteins CRP3/MLP, stehen im Zusammenhang mit erblichen Formen hypertropher und dilatativer Kardiomyopathien (Arber et al. 1997, Li et al. 2012). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Herzhypertrophieversuche beschreiben erstmalig die Rolle von CRP4 als Teil eines wesentlichen endogenen Schutzmechanismus bei neurohumoral bzw. Ang II-induzierter Myokardhypertrophie. Kardiales CRP4 wirkt hierbei als antihypertropher sowie antifibrotischer Faktor. Auf die physiologische Umgestaltung des Herzwesens an höhere Leistungsanforderungen übt CRP4 dagegen keinen Einfluss auf. Die Deletion von CRP4 resultierte darüber hinaus in einer Vielzahl von Veränderungen in der

Expression und der Funktion zentraler Komponenten des cGMP/cGKI-Signalwegs. Der Nachweis von cGKI/CRP4-Proteinkomplexen im hypertrophen Myokard bestätigt letztlich, dass CRP4 auch an den protektiven Wirkungen des cGMP/cGKI-Signalwegs beteiligt ist. Darüber hinaus implizieren Untersuchungen zum kardialen Interaktom und Proteom (Kooperation mit Dr. Karsten Boldt, Proteom-Forschungszentrum für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Tübingen) aber auch cGMP/cGKI-unabhängige Funktionen für kardiales CRP4. In den umfassenden Interaktions- und Expressionsstudien zeigte sich eine direkte Verbindung von CRP4 mit einer Vielzahl von strukturellen sowie funktionellen Proteinen des Sarkomers, des Zytoskeletts und der Z-Scheiben. Dies lässt eine essentielle Rolle für CRP4 in der Erhaltung der Zellintegrität und der Mechanotransduktion vermuten. Die verschlechterte Pumpfunktion CRP4-defizienter Tiere impliziert eine modulierende Funktion des LIM-Proteins bei kontraktile Vorgängen des Myokards.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Proteomanalysen verdeutlichen darüber hinaus eine Dysregulation zahlreicher zytoskeltaler, sarkomerischer und mitochondrialer Proteine nach CRP4-Deletion. Offensichtlich ist für CRP4 auch eine modulierende Funktion bei der Expression myozytärer Gene und der Translation bzw. Modifikation kardialer Proteine anzunehmen. Insbesondere Crip1, ein CRP4-homologes LIM-Protein mit hoher Sequenzidentität, war im CRP4-Mausmodell massiv, annähernd 5-fach überexprimiert. Eine Kompensation mancher Defekte von CRP4-defizienten Herzen durch die Crip1-Überexpression erscheint daher plausibel. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, inwiefern die Crip1-Regulation die CRP4-KO Mäuse tatsächlich vor einer noch schwerwiegenderen kardialen Symptomatik unter Stressbedingungen schützt. Analog zu CRP4 stellt möglicherweise auch Crip1 einen neu entdeckten genetischen *Hot Spot* für die Entwicklung einer Kardiomyopathie dar. In diesem Zusammenhang waren Untersuchungen an einem alternativen Tiermodell bereits sehr vielversprechend. Zebrafischlarven zeigten nach *Knockdown* von Crip1 (und CRP4) einen deutlichen Herzphänotyp (Kooperation mit JProf Dr. Steffen Just, AG Molekulargenetik, Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Ulm). Zumeist sind multiple genetische Faktoren für die klinische Ausprägung einer Kardiomyopathie verantwortlich (Seidman and Seidman 2011). Deshalb sollte bei der künftigen Diagnostizierung und Charakterisierung dieses heterogenen Krankheitsbildes auch untersucht werden, inwiefern Mutationen in den im Rahmen dieser Arbeit neu beschriebenen kardialen LIM-Proteinen CRP4 und Crip1 prädisponierend oder krankheitsverursachend wirken. Das nachfolgende Schema fasst die wichtigsten Ergebnisse der Dissertationsarbeit graphisch zusammen (s. Abb. 6.1)



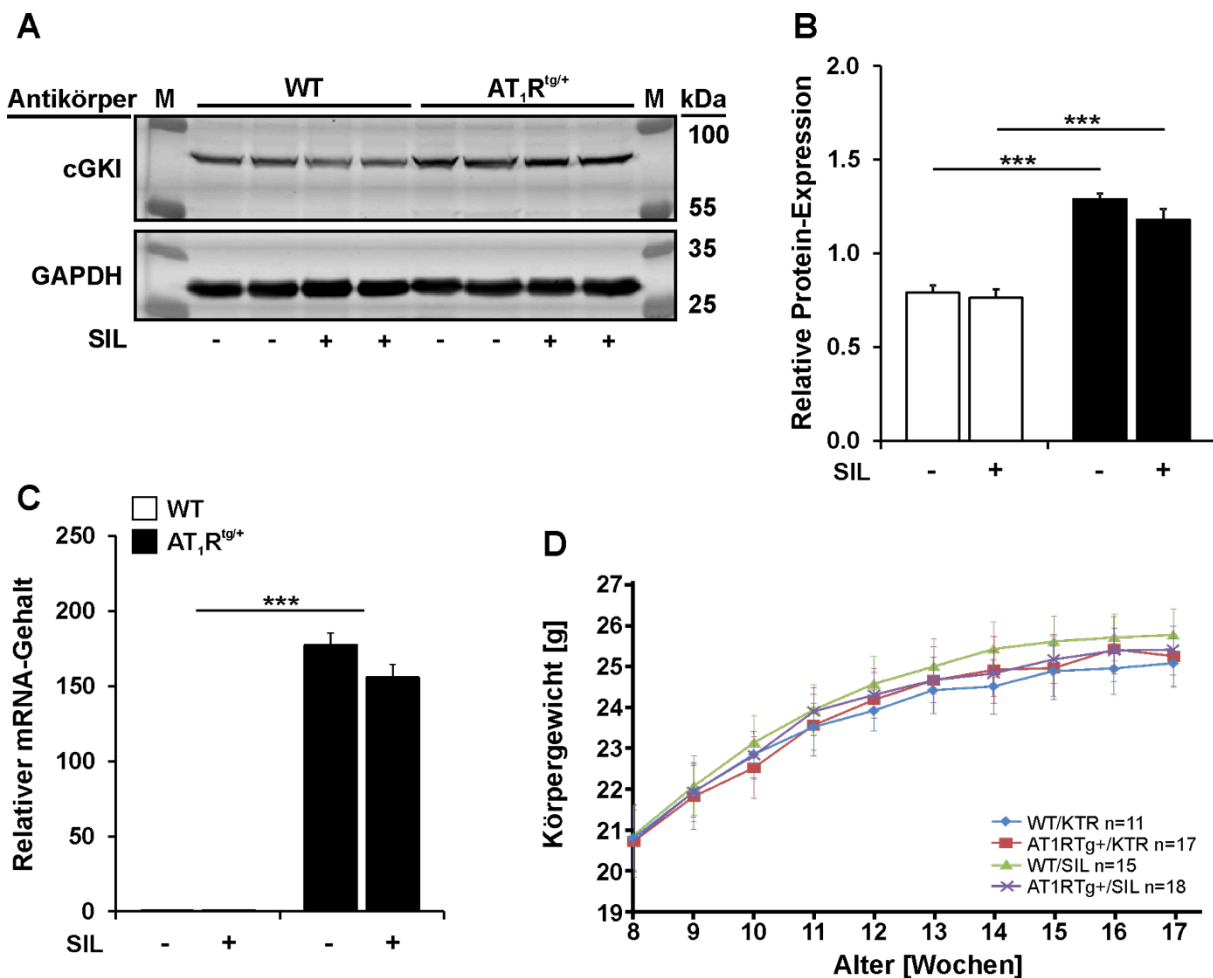
**Abb. 6.1: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Dissertationsarbeit.**

Das cGKP/cGKI-System stellt ein endogenes gegenregulatorisches System bei Ang II-induzierter kardialer Hypertrophie dar. Ein Therapieansatz mit dem PDE5-Hemmstoff SIL zur Erhöhung kardialer cGMP-Spiegel zur Verbesserung der Symptomatik hypertropher Herzerkrankungen zeigt jedoch keinen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf, wenn der initiale Hypertrophiestimulus in einer amplifizierten Ang II-Signaltransduktion im Kardiomyozyt begründet ist. Künftige Studien mit SIL sollten auf dessen antifibrotische Effekte über cGMP/cGKI/PDE5 in kardialen (Myo-) Fibroblasten abzielen. Mit CRP4 wurde ein neues cGKI-Substrat im Herzmuskel identifiziert, das insbesondere unter Ang II-stimulierten Bedingungen von der cGKI phosphoryliert wird. CRP4 interagiert aber auch mit einer Vielzahl weiterer kardialer Proteine des Sarkomers, des Costamers und der Z-Scheiben und greift unter anderem modulierend in die Gentranskription, Proteinsynthese und die Kontraktion des Herzens ein. Mit Crip1 wurde ein weiteres LIM-Protein beschrieben, das möglicherweise den Verlust von kardialem CRP4 kompensiert. AT<sub>1</sub>R: Angiotensin II Rezeptor Subtyp1; Ang II: Angiotensin II; BNP: *Brain natriuretic peptid*; ANP: Atriales natriuretisches Peptid; GTP: Guanosin-5'-triphosphat; cGMP: zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat; PDE: Phosphodiesterase; 5'GMP: Guanosin-5'-monophosphat; NO: Stickstoffmonoxid; CRP4: Cystein-reiches Protein 4; Crip1: *Cysteine-rich intestinal protein 1*; GC-A: partikuläre Guanylatzyklase Typ A; sGC: lösliche Guanylatzyklase; cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I; Ca<sup>2+</sup>: Calcium; ECM: Extrazellulärmatrix. Weitere Erläuterungen im Text.

## 7 Anhang

### 7.1 Kardialer Phänotyp der $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Mäuse

#### 7.1.1 Sildenafil-Behandlung von $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tieren

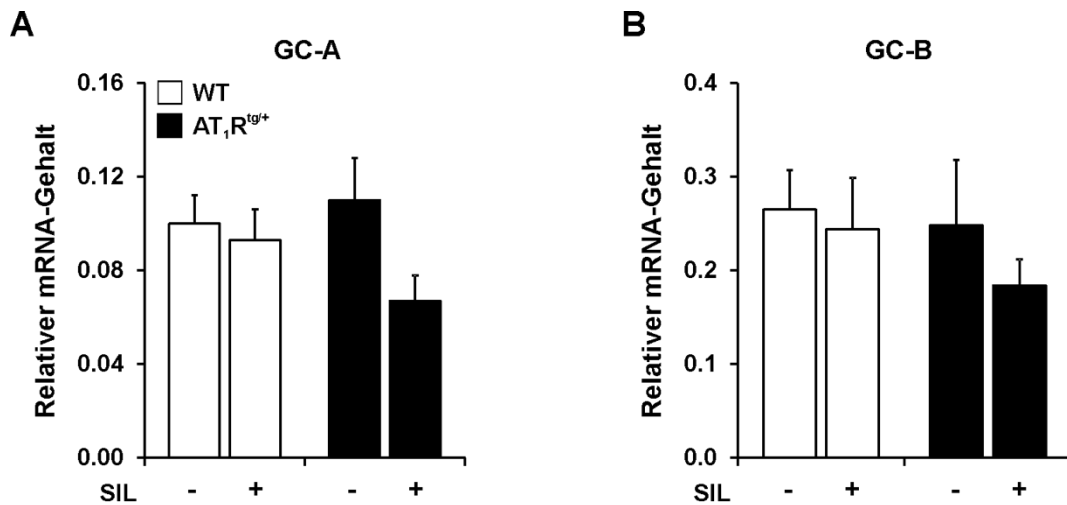


**Abb. 7.1: Expressionsanalysen nach Sildenafil.**

(A) Western Blot-Analyse von Herzlysaten 120 Tage alter  $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>-Tiere und deren WT-Wurfgeschwister  $\pm$  SIL. Die 60-tägige SIL-Behandlung hatte keine Auswirkung auf das Expressionsniveau der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGKI). GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) diente als Ladungskontrolle; Zur Detektion der Kinase wurde der cGKI $_{\alpha/\beta}$ -Antikörper verwendet (Lukowski et al. 2010). (B) Quantifizierung der erhaltenen Proteinbanden aus jeweils n=8 Tieren pro Genotyp und Kondition. (C) qRT-PCR Analysen ergaben keine SIL-spezifischen Änderungen im Expressionslevel des überexprimierten humanen AT<sub>1</sub>R. Verwendete Tierzahlen: Placebo-behandelt: n=5 (WT), n=9 ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>), SIL-behandelt: n=8 (WT), n=11 ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>). HPRT diente als Referenzgen (\*\*\*)p<0,001). (D) Durch wöchentliche Dokumentation des Herzgewichts während der 60-tägigen Behandlung konnte ein Einfluss von SIL auf das Körpergewicht ausgeschlossen werden. Die Western Blot-Analyse und die Aufzeichnung der Körpergewichte wurden in Zusammenarbeit mit Verena Schöttle im Rahmen eines Diplomarbeitprojekts durchgeführt.



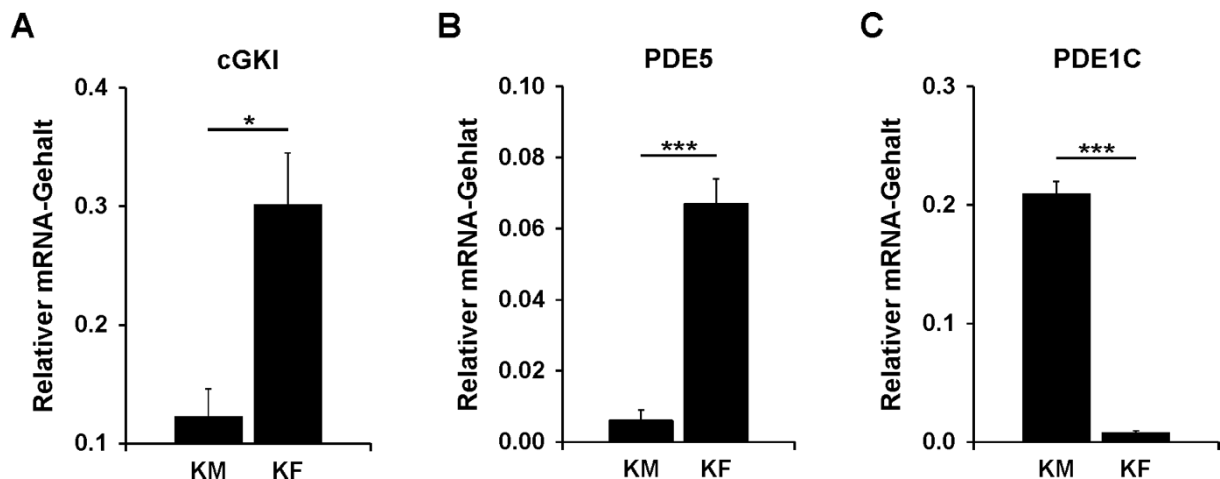
### 7.1.2 Expressionanalyse partikulärer Guanylatzyklen



**Abb. 7.2: Expressionsstatus der partikulären Guanylatzyklen.**

Es konnten weder genotyp-spezifische noch SIL-induzierte Änderungen im Expressionsstatus der partikulären (A) Guanylatzyklase A (GC-A) und (B) der Guanylatzyklase B (GC-B) ermittelt werden. Verwendete Tierzahlen: Placebo-behandelt: n=5 (WT), n=9 ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>), SIL-behandelt: n=8 (WT), n=11 ( $\alpha$ MHC-AT<sub>1</sub>R<sup>tg/+</sup>). HPRT diente als Referenzgen.

### 7.1.3 Zellspezifische Analyse der cGKI, PDE5 und PDE1C

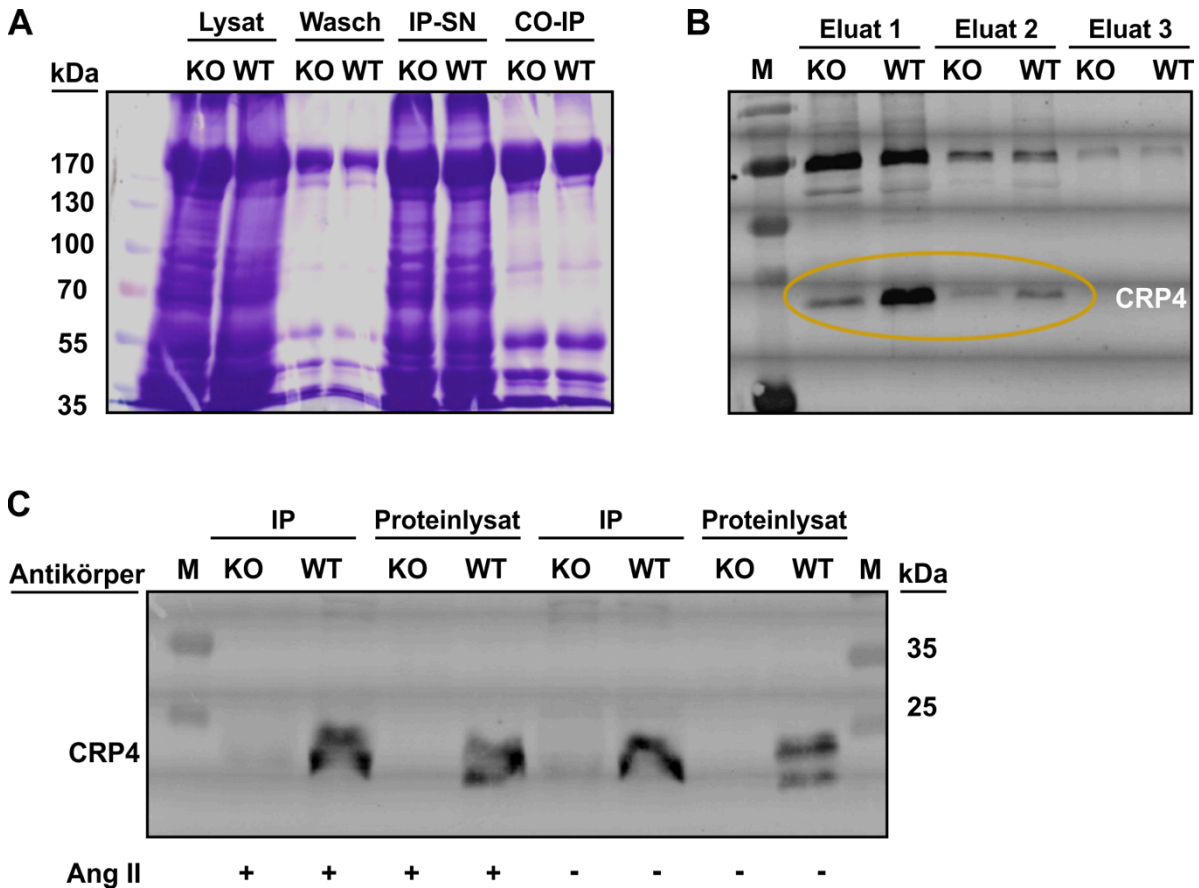


**Abb. 7.3: Expression von cGKI, PDE5 und PDE1C in kardialen Myozyten und Fibroblasten.**

Nach Separieren der Kardialmyozyten (KM) und kardialen Fibroblasten (KF) wurden hohe Mengen an (A) cGKI und (B) PDE5 vor allem in kardialen Fibroblasten detektiert. Während cGKI ebenso im Kardialmyozyt exprimiert wird, war PDE5 kaum in Herzmuskelzellen detektierbar. (C) PDE1C wird abundant in Myozyten, dafür nur in geringem Ausmaß in kardialen Fibroblasten exprimiert. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 7.2 Untersuchungen zu kardialem CRP4

### 7.2.1 Validierung der Co-Immünpräzipitation



**Abb. 7.4: Bestätigung der Funktionalität der Co-IP.**

(A) Coomassie-gefärbtes Acrylamid-Gel zur Bestätigung der Effektivität der Immunpräzipitation. Im Lysat sowie im Überstand (IP-SN) ist die Gesamtmenge kardialer Proteine zu erkennen. Im IP-Lysat (Co-IP) entsprechen alle Banden, die in den Waschbeads (Wasch) nicht zu sehen sind, spezifisch gebundenen Interaktionspartnern von CRP4. Die Waschbeads indizieren unspezifische Bindungen diverser Proteine an die Agarosebeads, sowie die schweren Ketten der IgG-CRP4-Antikörper, welche an die Agarosebeads gekoppelt waren. (B) Schema der Glycin-Elution für die massenspektrometrische Analyse. Sogar nach dem zweiten Elutionsschritt konnten weiterhin CRP4-Protein und mögliche Interaktionspartner eluiert werden. Die Banden bei 55 kDa repräsentieren die schweren Ketten der IgG-Antikörper auf den Agarosebeads. (C) Repräsentativer Western Blot zur Detektion des präzipitierten CRP4s aus Lysaten von NaCl- und Ang II-stimulierten Herzen. Für beide Konditionen ( $\pm$  Ang II) wurde dieselbe Menge CRP4 aus den Proben präzipitiert. Somit konnten behandlungsspezifische Unterschiede in der präzipitierten CRP4-Menge und somit eine Verfälschung im Ausmaß der Anreicherung der spezifischen Interaktoren in den LC-MS/MS-Versuchen ausgeschlossen werden. Erwartungsgemäß wurde in CRP4-defizienten Herzen kein CRP4-Protein nachgewiesen.

## 7.2.2 Analyse des CRP4-Interaktoms

Protein	Proteinbezeichnung	Gen	WT-KO Basal	WT-KO Basal p-wert	WT-KO Basal Signifikant	WT-KO Ang II	WT-KO Ang II p-Wert	WT-KO Ang II Signifikant	Intensität
Q9DCT8	Cysteine-rich protein 2	Crip2	419,6013	4,39E-62	+	354,7046	6,96E-89	+	232070000
Q6PCQ0	IQ domain-containing protein E	lqce	43,26183	1,01E-25	+	0,6846216	0,912416928		111640000
P26041	Moesin	Msn	2,915606	0,00097112	+	0,744566	0,857604474		1090700
Q9D783	Kelch repeat and BTB domain-containing protein 5	Kbtbd5	2,874174	0,001106392	+	1,366741	0,158362514		890920
P11152	Lipoprotein lipase	Lpl	2,45735	0,004209099	+	1,345258	0,171769904		3148800
Q9QYG0	Protein NDRG2	Ndrgr2	2,072659	0,014900242	+	1,089845	0,409303875		480090
Q91ZA3	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	Pcca	2,040586	0,016569142	+	1,061237	0,44486514		3605200
Q61838	Alpha-2-macroglobulin	A2m	2,037072	0,016763048	+	1,14934	0,340699213		21420000
P48787	Troponin I, cardiac muscle	Tnni3	2,00354	0,018731761	+	1,288635	0,211687288		525890000
Q91Z83	Myosin-7	Myh7	1,94153	0,023002624	+	0,8129401	0,779373768		154920000
P01867	Ig gamma-2B chain C region	Igh-3	1,891081	0,027184332	+	0,5936546	0,96725269		1489800
Q9CQ62	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	Decr1	1,818536	0,034553635	+	0,7759531	0,823514243		5668900
Q9CQA3	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Sdhb	1,808347	0,035735827	+	1,366256	0,158655254		6325500
Q9R062	Glycogenin-1	Gyg1	1,756279	0,042428753	+	1,186475	0,301890394		9327600
P58771	Tropomyosin alpha-1 chain	Tpm1	1,693654	0,052121405		1,437033	0,120558939		165140000
A2AQP0	Myosin-7B	Myh7b	1,686386	0,053377598		0,5718436	0,975551526		109940000
P07724	Serum albumin	Alb	1,66323	0,05759241		1,00275	0,52178439		5231600
P19123	Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles	Tnni1	1,647003	0,060713129		0,8428205	0,741187593		656730000
O08528	Hexokinase-2	Hik2	1,643045	0,061502349		1,204429	0,284278705		1126200
Q3TZ89	Protein transport protein Sec31B	Sec31b	1,637861	0,062550992		0,8332305	0,753652138		9213300
Q9EQP2	EH domain-containing protein 4	Ehd4	1,615847	0,067199435		1,629187	0,054790094		14528000
O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	1,602087	0,070272021		0,6105113	0,959629781		270700
Q62425	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	Ndufa4	1,601453	0,070416819		1,355163	0,165474385		33237000
Q8K0E8	Fibrinogen beta chain;Fibrinopeptide B;Fibrinogen beta chain	Fgb	1,558092	0,081027742		0,4028727	0,99922091		8475600
P42932	T-complex protein 1 subunit theta	Cct8	1,552142	0,08259796		0,7096336	0,891296169		481510
Q9CRB9	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial	Chchd3	1,502275	0,096941806		0,7167817	0,884790319		4828000
P01592	Immunoglobulin J chain	Igj	1,49376	0,099615339		0,9748788	0,559908666		6444700
P17665	Cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial	Cox7c	1,481359	0,103632785		0,6503441	0,937104648		4330800
Q9EQK5	Major vault protein	Mvp	1,462844	0,109914381		0,6822175	0,091430999		716160
P61164	Alpha-actinin	Actr1a	1,460331	0,110794018		0,7668601	0,833734947		2086500
Q9ESN9	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 3	Mapk8ip3	1,454453	0,112876831		0,3976481	0,99933199		424770
P38647	Stress-70 protein, mitochondrial	Hspa9	1,443565	0,116831587		1,229474	0,260973825		97398000
Q02788	Collagen alpha-2(VI) chain	Col6a2	1,432316	0,121052167		0,8020309	0,792790652		850040
Q9Z1E4	Glycogen [starch] synthase, muscle	Gys1	1,430751	0,12165065		0,8686231	0,7068476		16772000
P58252	Elongation factor 2	Eef2	1,419854	0,125892499		0,590091	0,968726251		267920
P04247	Myoglobin	Mb	1,408554	0,130435046		1,494017	0,09598338		13872000
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	Actbl2	1,40719	0,130993572		9,963644	3,80E-15	+	180260000
Q5SYD0	Unconventional myosin-Id	Myo1d	1,400165	0,133904031		1,2333	0,257542799		11449000
P56393	Cytochrome c oxidase subunit 7B, mitochondrial	Cox7b	1,391751	0,137468386		0,9490386	0,595736813		858760
Q76M23	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	Ppp2r1a	1,386379	0,140968738		1,314391	0,192682986		836510
P35700	Peroxiredoxin-1	Ppx1	1,382385	0,141537656		1,677035	0,044681028	+	5606200
P01942	Hemoglobin subunit alpha	Hba	1,379642	0,142749865		1,84203	0,021758276	+	5742900
P01029	Complement C4-B;Complement C4 beta chain	C4b	1,378509	0,143253352		0,8823568	0,688185818		3547700
Q61425	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	Hadh	1,378319	0,143337734		1,805026	0,025616121	+	755170
P50752	Troponin T, cardiac muscle	Tnni2	1,371645	0,14633835		1,869515	0,019263052	+	230190000
P50136	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial	Bckdha	1,36409	0,149803196		1,038674	0,473937197		3241900
P02088	Hemoglobin subunit beta-1	Hbb-b1	1,359203	0,152084083		1,307998	0,197265502		70142000
Q99246	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1D	Cacna1d	1,352106	0,155451997		0,6807105	0,915484287		1847400
P02089	Hemoglobin subunit beta-2	Hbb-b2	1,347941	0,157459715		1,575164	0,06875721		4156300
P97807	Fumarate hydratase, mitochondrial	Fh	1,345483	0,158655254		0,7943869	0,802001699		3301700
P48193	Protein 4.1;Band 4.1-like protein 2	Epb41;Epb412	1,333417	0,164643761		1,11034	0,38481519		1774600
P80318	T-complex protein 1 subunit gamma	Cct3	1,332557	0,16507819		0,4273016	0,998476285		13515000
Q02105	Complement C1q subcomponent subunit C	C1qc	1,328055	0,167369197		1,119613	0,374024744		44235000
Q9Z0X1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	Aifm1	1,314163	0,174617927		0,8619466	0,715832709		3136300
Q3V3A1	Cyclin-dependent kinase 15	Cdk15	1,28845	0,188769387		1,513383	0,08871761		6505100
Q6P3A8	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	Bckdhb	1,279573	0,193882458		1,051166	0,457736822		3393000
Q8BFR5	Elongation factor Tu, mitochondrial	Tufm	1,27611	0,195910057		1,228958	0,261439006		17525000
Q9R0Y5	Adenylate kinase isoenzyme 1	Ak1	1,275802	0,196091064		1,271891	0,22482781		2194400
P01872	Ig mu chain C region secreted form;Ig mu chain C region membrane-bound form	Igh-6	1,272234	0,198201049		1,002322	0,522363157		186650000
Q6URW6	Myosin-14	Myh14	1,270766	0,199074486		1,384617	0,147892576		347580000
P82347	Delta-sarcoglycan	Sgcd	1,262323	0,204164568		0,9691594	0,567809096		1027700
Q8K2B3	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Sdha	1,251452	0,210882648		1,35055	0,168381586		38171000
P06151	L-lactate dehydrogenase A chain	Ldha	1,242633	0,216470835		1,259114	0,235280621		2738600
Q99MN9	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Pccb	1,238807	0,218933961		1,617855	0,057479958		2362900
Q9WTI7	Unconventional myosin-1c	Myo1c	1,230765	0,224188932		1,203392	0,285275255		418990000
Q9D6J5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial	Ndufb8	1,229057	0,225318841		0,6440006	0,941130259		771230

# Anhang

P62141	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta/alpha/gammacatalytic subunit	Ppp1cb;ca:cc	1,228668	0,225576405	2,725246	0,000398034	+	9801300
P62631	Elongation factor 1-alpha 2	Eef1a2	1,228009	0,226014613	1,198466	0,290044013		32497000
Q9CYH6	Ribosome biogenesis regulatory protein homolog	Rrs1	1,217294	0,23322998	0,7932968	0,803301922		423940
P62259	14-3-3 protein epsilon	Ywhae	1,215447	0,234493075	2,363964	0,002057087	+	4050900
P01869	Ig gamma-1 chain C region, membrane-bound form;Ig gamma-1 chain C region secreted form	Ighg1	1,213722	0,235677691	0,9663291	0,571726038		12442000
P97447	Four and a half LIM domains protein 1	Fhl1	1,210951	0,237591231	0,94234	0,605064244		2120700
P42125	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	Eci1	1,207236	0,24017772	1,271454	0,225179297		5427100
Q9DB20	ATP synthase subunit O, mitochondrial	Atp5o	1,204434	0,242143538	0,5349301	0,985989722		1282800
Q99MR8	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	Mccc1	1,204162	0,242334678	1,531086	0,082516086		381370
Q8BG95	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	Ppp1r12b	1,200491	0,244932327	0,8369154	0,748884242		730450
Q02013	Aquaporin-1	Aqp1	1,199708	0,245488655	1,494121	0,095943037		21868000
Q6PHZ2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta	Camk2d	1,188144	0,253836147	1,089078	0,410236128		3580500
P05202	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	Got2	1,1848	0,2562929	0,7980087	0,797657548		9719100
Q63918	Serum deprivation-response protein	Sdpr	1,181513	0,258726625	0,8554258	0,724544925		1157700
P70404	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma 1, mitochondrial	Idh3g	1,179409	0,260294814	1,503729	0,092274879		8961100
Q8QZT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	Acat1	1,177138	0,261995447	1,083909	0,416554451		1533000
P20029	78 kDa glucose-regulated protein	Hspa5	1,161966	0,273588109	1,15553	0,334009269		12495000
P21956	Lactadherin	Mlge8	1,160204	0,274960785	1,398056	0,140417629		546900
P99027	60S acidic ribosomal protein P2	Rplp2	1,159218	0,275730951	0,4722021	0,995632476		2237000
Q02566	Myosin-6	Myh6	1,155448	0,278692757	1,208572	0,280322074		2932700000
Q70468	Myosin-binding protein C, cardiac-type	Mybpc3	1,143386	0,288338535	1,775939	0,02910324	+	22397000
Q99K10	Aconitate hydratase, mitochondrial	Aco2	1,142202	0,289298562	1,06168	0,444302979		74322000
Q9DBR7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	Ppp1r12a	1,138793	0,292079177	1,10462	0,39156288		239670
Q62188	Dihydropyrimidinase-related protein 3	Dpysl3	1,138646	0,292199511	1,094906	0,403177072		10832000
Q91VR2	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Atp5c1	1,133718	0,296255791	0,9996336	0,526010184		2738000
Q99JY0	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial;3-ketoacyl-CoA thiolase	Hadhb	1,128327	0,300744031	0,890507	0,677014549		69055000
Q8BWF0	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	Aldh5a1	1,121503	0,306499481	0,1369565	1		660690
P62204	Calmodulin;Calmodulin-like protein 3	Calm1;Calm3	1,111095	0,31543943	0,8390237	0,74614409		216970000
O35682	Myeloid-associated differentiation marker	Myadm	1,092174	0,332190263	1,267817	0,228120607		7918500
Q9J28	Protein flightless-1 homolog	Flii	1,089962	0,33419093	0,6395305	0,94386595		1883900
O08638	Myosin-11	Myh11	1,089406	0,334695341	1,021837	0,496148385		1329900000
P16125	L-lactate dehydrogenase B chain	Ldhd	1,088734	0,335304699	0,9128557	0,646116816		9552600
P09542	Myosin light chain 3	Myli3	1,083604	0,339989744	1,092657	0,405893193		359940000
Q9DCW4	Electron transfer flavoprotein subunit beta	Etfb	1,083128	0,340426693	0,8810083	0,690027781		12473000
O35459	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Ech1	1,077622	0,34551123	1,843488	0,021618431	+	875470
Q9CQ07	ATP synthase subunit b, mitochondrial	Atp5f1	1,06983	0,352800492	1,350494	0,168417617		6092300
P14869	60S acidic ribosomal protein P0	Rplp0	1,068521	0,354036013	0,646888	0,939318809		2298300
P62702	40S ribosomal protein S4, X isoform	Rps4x	1,068261	0,354281137	1,176557	0,31194251		735440
P50462	Cysteine and glycine-rich protein 3	Csrp3	1,062872	0,359400937	1,282449	0,216469297		15687000
Q9CPU4	Microsomal glutathione S-transferase 3	Mgst3	1,062464	0,359790465	1,569773	0,07031854		2339700
Q61554	Fibrillin-1	Fbn1	1,062051	0,360185193	1,276372	0,221249206		5390500
B1AVZ0	Uracil phosphoribosyltransferase homolog	Uprt	1,059011	0,363101284	0,6816319	0,914767414		82994
Q8BWT1	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	Acaa2	1,058952	0,363157345	0,9470221	0,598543634		49470000
Q99KD5	Prunc unc-45 homolog A	Unc45a	1,053797	0,368138421	1,182291	0,306102316		19177000
P54071	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	Idh2	1,050507	0,37134238	1,022977	0,49463093		22566000
Q9WUB3	Glycogen phosphorylase, muscle form	Pygm	1,045633	0,376123325	1,260755	0,233917264		14569000
Q8CAQ8	Mitochondrial inner membrane protein	Immt	1,045128	0,376621402	1,052548	0,455960679		105410000
P08249	Malate dehydrogenase, mitochondrial	Mdh2	1,042628	0,379092022	0,8456386	0,737491217		45199000
P0CG50	Polyubiquitin-C;Ubiquitin	Ubc;Ubb	1,042248	0,379468796	0,9782845	0,555214765		23379000
P50544	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acadvl	1,040738	0,380967629	1,087643	0,411984841		58278000
P51174	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acadl	1,039786	0,38191352	0,9527833	0,590527012		18637000
Q9CQC7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	Ndufb4	1,039174	0,382523764	0,8169903	0,774315862		5515300
P20152	Vimentin	Vim	1,033414	0,388292099	1,843287	0,021637662	+	104200000
P17751	Triosephosphate isomerase	Tpi1	1,031199	0,390525358	1,383617	0,148462601		6441700
P68372	Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-4A chain	Tubb4b;Tubb4a	1,027014	0,394768216	1,397466	0,140738631		48855000
Q3UHZ5	Leiomodin-2	Lmod2	1,019233	0,402736024	1,176755	0,311739222		40028000
Q8BH95	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	Echs1	1,014495	0,407638117	0,8850885	0,684448662		13821000
O09161	Calsequestrin-2	Casq2	1,013001	0,409191561	0,9985952	0,527420541		27397000
Q7TPW1	Nexilin	Nexn	1,012924	0,409272236	0,6933975	0,905301139		16060000
P31428	Dipeptidase 1	Dpep1	1,01091	0,411372036	1,116443	0,3776922		26799000
Q9DOK2	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	Oxct1	1,007702	0,414731951	0,8166167	0,774784093		258870
P53395	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex	Dbt	1,007298	0,415156112	0,6870522	0,910478333		23109000
Q9CR68	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial;Cytochrome b-c1 complex subunit 11	Uqcrls1	1,005512	0,417034755	1,890175	0,017572443	+	7848400
P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Mdh1	1,00394	0,418693254	0,5599891	0,979370149		5763700
Q9QXX4	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	Slc25a13	1,002251	0,420478731	0,9228765	0,632180726		1085700
Q9Z2Z6	Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein	Slc25a20	1,001496	0,421279444	0,6683257	0,924772342		826770
P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Atp5b	0,9968098	0,426264441	0,9619911	0,577738057		349840000
Q9WVC3	Caveolin-2	Cav2	0,9965459	0,426546282	0,5314296	0,986769634		30959000

Q9JMH9	Unconventional myosin-XVIIIa	Myo18a	0,9880098	0,435721743		1,274049	0,223099245		201950000
O55143	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	Atp2a2	0,9877844	0,43596562		1,08761	0,412024841		118080000
Q9WUM5	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	Suclg1	0,9850673	0,438911382		1,297451	0,205019023		8003000
P23927	Alpha-crystallin B chain	Cryab	0,981936	0,442320568		1,101273	0,395542373		50921000
P07310	Creatine kinase M-type	Ckm	0,9785222	0,446054583		0,8429881	0,740968238		4917500
P56392	Cytochrome c oxidase subunit 7A1, mitochondrial	Cox7a1	0,9733565	0,451738734		0,3632723	0,999781272		17478000
Q99LC3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Ndufa10	0,9717646	0,453498504		1,007983	0,514712055		9483500
P99029	Peroxisredoxin-5, mitochondrial	Prdx5	0,971217	0,454104731		1,1352	0,356306197		3017100
Q9Z219	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	Sucla2	0,9664456	0,459406001		1,114382	0,380089155		7658900
P21550	Beta-enolase	Eno3	0,9656252	0,460320962		0,5141569	0,990150652		1077200
Q9J191	Alpha-actinin-2	Actn2	0,9649678	0,46105471		3,580469	9,15E-06	+	149870000
Q64331	Unconventional myosin-VI	Myo6	0,9599816	0,466641175		0,4167663	0,998848256		113840000
P11499	Heat shock protein HSP 90-beta	Hsp90ab1	0,9576628	0,469251389		1,081817	0,419126399		11968000
Q9QYB5	Gamma-adducin	Add3	0,9571582	0,469820352		0,8731125	0,700772223		967030
P49813	Tropomodulin-1	Tmod1	0,9570336	0,469960883		1,375702	0,153037948		384240000
P23242	Gap junction alpha-1 protein	Gja1	0,9551734	0,47206201		1,049408	0,460001208		20270000
P31001	Desmin	Des	0,9545758	0,472738106		0,8969671	0,668118032		66617000
O08709	Peroxisredoxin-6	Prdx6	0,9533011	0,474181788		0,9130314	0,64587275		9410300
P47753	F-actin-capping protein subunit alpha-1	Capza1	0,9527837	0,47476839		0,671481	0,922467473		14254000
P63038	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspd1	0,9514579	0,476273355		1,21644	0,27291822		3526300
P14106	Complement C1q subcomponent subunit B	C1qb	0,9483833	0,479772614		0,9513024	0,592586831		10186000
Q01853	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Vcp	0,9453993	0,483181253		0,8944024	0,671654043		1530300
Q80XN0	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	Bdh1	0,942781	0,48618202		1,253853	0,239693195		2332600
Q7TPR4	Alpha-actinin-1	Actn1	0,9384955	0,491113164		0,978178	0,555361443		4309800
Q8K4G5	Actin-binding LIM protein 1	Ablim1	0,9348689	0,495304759		1,119854	0,373746843		13181000
P46735	Unconventional myosin-Ib	Myo1b	0,9338387	0,496498638		1,14185	0,34890932		53639000
P98086	Complement C1q subcomponent subunit A	C1qa	0,9316225	0,499071301		1,222401	0,267406541		7651200
Q9JKS4	LIM domain-binding protein 3	Ldb3	0,9308238	0,5		1,164577	0,324389528		14327000
P13020	Gelsolin	Gsn	0,9286076	0,502581105		0,7761126	0,823332589		19614000
O70325	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	Gpx4	0,927153	0,504278479		1,273596	0,223461103		7354200
Q8R404	Protein QIL1	Qil1	0,9212466	0,511197055		1,070906	0,432674859		1546400
P14094	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	Atp1b1	0,9143887	0,519281674		0,8759553	0,696912059		793250
P97434	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	Mrip	0,9134384	0,52040609		0,3617512	0,999792766		1736800
P49817	Caveolin-1	Cav1	0,9127449	0,521227429		0,8892801	0,678700124		58152000
Q02357	Ankyrin-1	Ank1	0,9095521	0,52501528		0,5296775	0,987147569		460910
A2AMM0	Muscle-related coiled-coil protein	Murc	0,9054238	0,529929407		1,134418	0,357181468		1925300
P14602	Heat shock protein beta-1	Hspb1	0,90295	0,532882568		1,941829	0,013952975	+	7721700
Q3U0S6	Ras-interacting protein 1	Rasip1	0,9024585	0,533470084		0,9165739	0,640949787		5380700
Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Vdac2	0,8971721	0,539804637		0,948496	0,596491978		34924000
P41216	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	Acs1	0,8969463	0,540075809		1,252246	0,241053792		4266700
O09111	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial	Ndufb11	0,8900124	0,54842698		1,618142	0,057410471		3351600
Q60597	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	Ogdh	0,8888178	0,54987033		1,395087	0,142040502		570560000
Q9DC69	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	Ndufa9	0,8874992	0,551464866		1,785461	0,027914243	+	9883700
P70248	Unconventional myosin-Ii	Myo1i	0,8860861	0,553175447		1,088753	0,410631477		7242100
P68134	Actin, alpha skeletal muscle	Acta1	0,8852459	0,554193389		1,305329	0,19920452		41361000000
Q3UH68	LIM and calponin homology domains-containing protein 1	Limch1	0,8813516	0,55891904		1,281909	0,216890405		207100000
Q6P8J7	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Ckmt2	0,8803437	0,560144287		1,018947	0,05		27334000
O54724	Polymerase I and transcript release factor	Ptf	0,8801297	0,560404489		0,912442	0,646691309		23549000
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	0,8797401	0,560878335		1,219587	0,269998406		69140000
Q9D8B4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11	Ndufa11	0,878538	0,562341215		0,8149567	0,776860448		4412000
Q03265	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Atp5a1	0,8766015	0,564700285		0,9736848	0,561556219		335040000
Q8BMS1	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	Hadha	0,8765883	0,564716266		0,9612166	0,578812418		94754000
P67778	Prohibitin	Phb	0,8738037	0,568113528		0,9742812	0,560733142		2587400
Q91YT0	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	Ndufv1	0,8723981	0,569830589		1,168464	0,320314264		22646000
P16546	Spectrin alpha chain, brain	Sptan1	0,8673315	0,576031715		1,326801	0,184035705		292410000
P19783	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	Cox4i1	0,8666434	0,576875306		1,220692	0,268978366		81810000
P21981	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	Tgm2	0,8659346	0,577744502		1,510547	0,089749443		28719000
P46412	Glutathione peroxidase 3	Gpx3	0,8651294	0,578732462		0,5454806	0,983431044		24596
Q9CPQ1	Cytochrome c oxidase subunit 6C	Cox6c	0,8642368	0,579827965		0,6916285	0,906761362		1780700
Q8VDD5	Myosin-9	Myh9	0,8631465	0,58116692		1,125859	0,366860362		880660000
Q8K370	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10	Acad10	0,857838	0,587696609		1,337702	0,176706749		2083200
P47754	F-actin-capping protein subunit alpha-2	Capza2	0,8507702	0,596415007		0,9709991	0,565265587		120920000
Q04857	Collagen alpha-1(VI) chain	Col6a1	0,8480995	0,599716096		1,365842	0,158905202		1137100
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	0,8450176	0,603529429		1,079474	0,422015981		289890000
Q9WUM4	Coronin-1C	Coro1c	0,8397362	0,610073236		0,9246332	0,629734799		11600000
Q61879	Myosin-10	Myh10	0,8378704	0,612387592		1,250245	0,242755436		819700000
P20108	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	Prdx3	0,8378038	0,6124702		0,6680536	0,924969084		1416900
Q9WTR5	Cadherin-13	Cdh13	0,8366006	0,613963248		1,100607	0,396337488		7085800
Q60931	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	Vdac3	0,8363273	0,614302501		1,151604	0,338241752		21265000

# Anhang

Q8BGH2	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	Samm50	0,8357694	0,614994933		0,9259858	0,627851141		20255000
Q5EBG6	Heat shock protein beta-6	Hspb6	0,8347495	0,616261155		1,055355	0,452361752		4915400
Q62261	Spectrin beta chain, brain 1	Sptbn1	0,8317631	0,619970567		1,417203	0,130332263		221200000
P62880	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	Gnb2	0,8297485	0,622474153		1,220212	0,269420702		20762000
P51881	ADP/ATP translocase 2	Slc25a5	0,8294781	0,622810216		2,114367	0,006408148	+	42093000
Q3ULD5	Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Mccc2	0,825689	0,627521828		1,113081	0,381606955		547780
P47738	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	Aldh2	0,8227916	0,631126267		1,326736	0,184080194		748750
P47857	6-phosphofructokinase, muscle type	Pfkfb	0,8223345	0,63169497		1,298489	0,204245107		367080
Q9WTX5	S-phase kinase-associated protein 1	Skp1	0,8213547	0,632914259		0,715816	0,885681282		21006000
Q9D023	Brain protein 44	Brp44	0,8164993	0,638957641		0,7188073	0,88290956		825360
Q91VD9	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	Ndufs1	0,81198	0,644583837		1,153594	0,336092006		52218000
P47757	F-actin-capping protein subunit beta	Capzb	0,8111392	0,64563057		1,108277	0,387240951		86472000
Q8VDN2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Atp1a1	0,8063716	0,651565523		1,221641	0,268104325		6350000
P07758	Alpha-1-antitrypsin 1-1; 1-3; 1-2; 1-5	Serpina1a;1c;1b;1e	0,8059052	0,652145982		0,7969271	0,79895875		1624100
Q91WD5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	Ndufs2	0,8036001	0,655014689		1,125975	0,36672786		12390000
P11404	Fatty acid-binding protein, heart	Fabp3	0,7971735	0,663008603		0,7366732	0,865626546		453080
P08752	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	Gnai2	0,7963061	0,664086941		1,105754	0,390219738		31250000
Q9CR62	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	Slc25a11	0,7944287	0,666420196		0,7507408	0,851168983		16402000
Q8CC88	Uncharacterized protein KIAA0564 homolog	Kiaa0564	0,7936116	0,667435476		0,1200406		1	15431000
Q8R123	FAD synthase;Molybdenum cofactor biosynthesis protein-like region;FAD synthase region	Flad1	0,7901311	0,671757796		0,5955505	0,966449414		35458000
Q9CZ13	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Uqcrc1	0,7883736	0,673938861		1,031476	0,483382308		84813000
Q9QXS1	Plectin	Plec	0,7883204	0,674004893		0,8680632	0,707603496		4868000
Q3UTJ2	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2	Sorbs2	0,7865536	0,676196526		0,9009196	0,662659272		54329000
Q9D2G2	Dihydropyridylsine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	Dlst	0,7796762	0,684715163		1,331397	0,180915541		187170000
Q5SUA5	Unconventional myosin-Ig	Myo1g	0,7774817	0,68742884		1,185744	0,302623316		1891500
Q8BTM8	Filamin-A	Flna	0,7772161	0,687757025		0,6985977	0,900933552		5587900
Q9D6J6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	Ndufv2	0,7770609	0,687948834		0,9749877	0,559758368		7111700
P62932	F-box only protein 40	Fbxo40	0,7767872	0,688287132		0,8887304	0,679454977		570080
P29788	Vitronectin	Vtn	0,7758884	0,689397413		1,387452	0,146287688		5516100
P48962	ADP/ATP translocase 1	Slc25a4	0,7758257	0,689474934		0,892534	0,674226698		213850000
Q3THE2	Myosin regulatory light chain 12B	Myl12b	0,7752767	0,69015296		0,8508965	0,730556596		483080000
P25911	Tyrosine-protein kinase Lyn	Lyn	0,7738358	0,691931628		0,6513639	0,936441679		1593000
Q7TMF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	Ndufa12	0,7714593	0,694862515		1,38403	0,148226738		5815300
Q9DB77	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Uqcrc2	0,7697499	0,696968611		0,984234	0,547035852		62780000
P19536	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	Cox5b	0,7654681	0,702235736		1,164064	0,324930175		15288000
Q61171	Peroxioredoxin-2	Prdx2	0,7605863	0,708225094		2,764368	0,000333552	+	2697600
P00405	Cytochrome c oxidase subunit 2	Mtco2	0,7549946	0,715062095		1,287145	0,212830961		86044000
Q924X2	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform	Cpt1b	0,7545439	0,715612065		1,146111	0,34422272		20293000
Q9EQ20	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	Aldh6a1	0,7523905	0,718237051		0,5495102	0,982368029		562750
P00158	Cytochrome b	Mt-Cyb	0,7517411	0,719027886		1,355005	0,165573245		4429400
P12787	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	Cox5a	0,7491385	0,722193127		0,6470727	0,939201728		13604000
Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain	Fgg	0,7483001	0,723210224		2,576375	0,000781749	+	8713000
P63260	Actin, cytoplasmic 2;Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed	Actg1	0,7435462	0,728971667		1,102664	0,393886096		1677400000
Q9D6R2	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	Idh3a	0,7430159	0,72961286		1,281589	0,217140139		2022100
Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1	0,7346201	0,73972119		1,016449	0,50333845		103470000
A2ASS6	Titin	Ttn	0,734463	0,739909488		0,8101835	0,782792912		1722800
P62715	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform; alpha isoform	Ppp2cb;Ppp2ca	0,7343768	0,740012812		1,697271	0,040958696	+	615820
P56135	ATP synthase subunit f, mitochondrial	Atp5f2	0,7286668	0,746813682		0,915253	0,642785912		6606700
Q60994	Adiponectin	Adipoq	0,7279608	0,747678395		0,7802699	0,81856933		610900
Q61387	Cytochrome c oxidase subunit 7A-related protein, mitochondrial	Cox7a2l	0,7266563	0,749230438		0,8522909	0,728709417		1467500
Q9CQH3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial	Ndufb5	0,7265259	0,749385476		0,8844824	0,685278507		391690
Q9CQ54	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	Ndufc2	0,7251042	0,751074137		1,375941	0,1528981		581670
Q8BGK2	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase-like protein 1	Adprh1	0,7214155	0,755442166		2,158101	0,005254201	+	6670700
P51667	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	Myl2	0,7201975	0,75688027		1,116495	0,37763175		888050000
Q88342	WD repeat-containing protein 1	Wdr1	0,7187817	0,758549159		0,8102202	0,782747491		7434900
Q9CZU6	Citrate synthase, mitochondrial	Cs	0,717769	0,759741069		0,8936565	0,672681439		5028600
Q920M5	Coronin-6	Coro6	0,7146895	0,763356087		1,587386	0,065335204		43354000
Q8BH59	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	Slc25a12	0,7046756	0,775007033		1,489989	0,097560324		5510500
Q8CI51	PDZ and LIM domain protein 5	Pdlim5	0,7038659	0,775941753		1,077804	0,424083441		1183100
Q9DCT2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	Ndufs3	0,7001623	0,780202649		1,266793	0,22895366		14344000
Q08857	Platelet glycoprotein 4	Cd36	0,6992432	0,781256274		1,287377	0,212652919		21817000

Q99LC5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	EtfA	0.6916347	0.789918269	0.8459957	0.737021879	10618000
Q9CQ19	Myosin regulatory light polypeptide 9	MyI9	0.6913217	0.790272244	1.206644	0.282157959	36550000
Q9D0M3	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	Cyc1	0.6882331	0.793754904	0.8936524	0.672687096	25978000
Q60605	Myosin light polypeptide 6	MyI6	0.6859385	0.796330033	1.154607	0.33500077	567680000
Q71LX4	Talin-2	Tln2	0.6838491	0.798665426	0.6091132	0.96030382	4523700
Q88441	Metaxin-2	Mtx2	0.6828345	0.799796248	0.9783441	0.555132689	1526800
Q9D3D9	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	Atp5d	0.6810857	0.801740293	0.6833534	0.913418554	4185200
Q8K3J1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	Ndufs8	0.671428	0.812357099	0.5266751	0.987776249	296610
P45591	Cofilin-2	Cfl2	0.6706862	0.813163867	0.8007497	0.794345664	7954000
P15508	Spectrin beta chain, erythrocyte	Sptb	0.6696966	0.814238322	1.154553	0.335059248	17019000
Q80X19	Collagen alpha-1(XIV) chain	Col14a1	0.6689657	0.815030458	1.185187	0.303182308	8727600
O70433	Four and a half LIM domains protein 2	Fhl2	0.6671903	0.816949325	1.182269	0.306125	6532600
Q61941	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	Nnt	0.6627539	0.82171174	0.8050584	0.789098364	15776000
P10126	Elongation factor 1-alpha 1	Eef1a1	0.6436716	0.841635454	0.9208199	0.635043441	11629000
Q64727	Vinculin	Vcl	0.6425437	0.84278322	3.132192	6.44E-05	17135000
Q9ESD7	Dysferlin/Myoferlin	Dysf:Myof	0.6364709	0.848902205	0.7620967	0.838979969	339000
Q9JM76	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	Arpc3	0.6319862	0.853354328	0.568352	0.976724938	741230
P45952	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acadm	0.6319628	0.853377427	0.9536299	0.589349936	6618200
Q8VEM8	Phosphate carrier protein, mitochondrial	Slc25a3	0.6294478	0.855822203	0.9483659	0.596673085	18847000
Q1XH17	Tripartite motif-containing protein 72	Trim72	0.6253359	0.859848871	1.891431	0.017474505	263650000
Q9WUZ7	SH3 domain-binding glutamic acid-rich protein	Sh3bgr	0.6248676	0.86030133	0.9174899	0.639676074	3525300
Q38HM4	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM63	Trim63	0.6216809	0.863362408	1.094671	0.403460226	1014200
P35486	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	Pdha1	0.6132467	0.871314185	0.4827114	0.994570516	104650000
Q68FD5	Clastrin heavy chain 1	Cltc	0.6110429	0.87335543	0.9441432	0.602552518	103400000
Q8BMF4	Dihydrolypoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	Dlat	0.6103697	0.873975942	0.445073	0.997628468	115050000
Q61234	Alpha-1-syntrophin	Snta1	0.6011574	0.88232024	0.3964217	0.999356044	880950
P52623	Uridine-cytidine kinase 1	Uck1	0.6003817	0.883010231	0.4265795	0.998504589	444670
P11276	Fibronectin;Anastellin	Fn1	0.6002598	0.883118462	0.7685966	0.831803961	19886000
P05125	Natriuretic peptides A;Atrial natriuretic factor;Auricularin-B;Auricularin-A;Atriopeptin-1;Atriopeptin-2	Nppa	0.5828303	0.898081948	0.6224213	0.953573291	6250000
P52480	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	Pkm2	0.5748184	0.904608618	1.440138	0.119088224	6453600
Q9D051	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	Pdhb	0.571812	0.906999116	0.5281965	0.987460642	124210000
O08749	Dihydrolypoyl dehydrogenase, mitochondrial	Did	0.570816	0.907783937	0.9208695	0.634974426	54679000
P62874	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	Gnb1	0.5596586	0.916331121	0.7422985	0.85993276	1187100
Q5FW52	Muscular LMNA-interacting protein	Mlip	0.5502347	0.923195767	0.5122738	0.990474918	3523100
Q7TQ48	Sarcalumenin	Srl	0.5485716	0.924373089	1.230809	0.259772638	3833600
Q62417	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1	Sorbs1	0.5390807	0.930894459	0.8150339	0.776763959	8193000
Q8CI94	Glycogen phosphorylase, brain form	Pygb	0.5288974	0.937515563	0.8843282	0.685489485	784440
O35904	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	Pik3cd	0.5244708	0.940271736	0.8580949	0.72098674	174150
P08032	Spectrin alpha chain, erythrocyte	Spta1	0.5119729	0.947653883	1.367241	0.158061203	48082000
Q9ERS2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	Ndufa13	0.4862125	0.961019422	0.8495982	0.73227337	4155600
Q8VHX6	Filamin-C	Finc	0.4823882	0.9627941	1.10141	0.395379474	14118000
Q8CI43	Myosin light chain 6B	MyI6b	0.4649681	0.970210792	0.7477337	0.854320245	11457000
Q922B1	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase MACROD1	MacroD1	0.4593498	0.972374432	1.0302	0.485064819	21864000
Q8CGY6	Protein unc-45 homolog B	Unc45b	0.4526445	0.974814937	0.9493548	0.595296756	1171900
Q06890	Clusterin;Clusterin beta chain;Clusterin alpha chain	Clu	0.4487425	0.97616544	2.140444	0.005692967	4369700
P61161	Actin-related protein 2	Acr2	0.4356721	0.980326289	0.7746813	0.82495986	1549000
P01027	Complement C3	C3	0.4006311	0.98893456	1.451303	0.113930371	1734800
Q61147	Ceruloplasmin	Cp	0.3969504	0.989643209	1.325471	0.18494646	3926800
Q91YL3	Uridine-cytidine kinase-like 1	Uckl1	0.3852936	0.991668545	0.1379676	1	3727700
Q99P72	Reticulon-4	Rtn4	0.3781299	0.992757414	0.5875041	0.969766606	6943200
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	Aldoa	0.3667984	0.994257426	0.8680716	0.707592145	4760700
Q8BKZ9	Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial	Pdhx	0.3650647	0.994464341	0.391201	0.999450469	8881300
Q9DCX2	ATP synthase subunit d, mitochondrial	Atp5h	0.3533087	0.995721708	0.7196548	0.882117879	5649800
P11531	Dystrophin	Dmd	0.3516844	0.99587651	1.006786	0.516327149	22525000
Q9EP89	Serine beta-lactamase-like protein LACTB, mitochondrial	Lactb	0.3084527	0.998640285	0.9857041	0.545019303	3059700
P68368	Tubulin alpha-4A chain	Tuba4a	0.307691	0.99866992	0.3163695	0.999966644	44424000
P03921	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	Mtnd5	0.3047664	0.998778948	1.034225	0.479765427	2924400
P04919	Band 3 anion transport protein	Slc4a1	0.2904127	0.999214834	0.9636474	0.575441483	11560000
Q791V5	Mitochondrial carrier homolog 2	Mtch2	0.2879884	0.999274011	0.6740536	0.920557079	1980700
Q9DC70	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	Ndufs7	0.2313006	0.99992129	0.8019236	0.792920964	2308200
Q9JJZ2	Tubulin alpha-8 chain	Tuba8	0.06007956	1	0.04530992	1	9369000
P63254	Cysteine-rich protein 1	Crip1	0.05184136	1	1.519701	0.086457257	8277900

**Tab. 7.1: CRP4-Interaktom unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen.**

Auflistung der Mittelwerte aller mittels LC-MS/MS detektierten Proteine in Co-IP-Lysaten von CRP4-WT und CRP4-KO Herzen und der Signifikanzniveaus (\* $p < 0,05$ ) der im CRP4-WT Lysat angereicherten Proteine unter basalen ( $n=6$  pro Genotyp) und Ang II-stimulierten ( $n=6$  pro Genotyp) Bedingungen. Signifikant angereicherte Proteinen stellen demnach spezifische Interaktionspartner von CRP4 dar und sind gekennzeichnet (+).

## 7.2.3 Vergleichende Proteomanalyse ± Ang II

Protein	Proteinbezeichnung	Gen	Median Basal WT-KO	Basal WT-KO p-Wert	Basal WT-KO Signifikant	Median Ang II WT-KO	Ang II WT-KO p-Wert	Ang II WT-KO Signifikant	Intensität
Q99P72	Reticulon-4	Rtn4	1,197139	0,08068382		0,874876	0,18968594		115580000
P97447	Four and a half LIM domains protein 1	Fhl1	0,9804016	0,80268825		1,051213	0,69490755		199830000
Q02566	Myosin-6	Myh6	0,7201009	9,34E-05	+	0,7145188	0,00074531	+	591170000
P56135	ATP synthase subunit f, mitochondrial	Atp5f2	1,258218	0,02552987		1,290479	0,06276651		345790000
P80318	T-complex protein 1 subunit gamma	Cct3	6,057245	2,49E-69	+	0,8284773	0,06201973		41581000
Q9CQZ6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3	Ndubf3	6,249204	1,09E-71	+	1,000416	0,97008872		116200000
P43023	Cytochrome c oxidase subunit 6A2, mitochondrial	Cox6a2	2,434088	3,78E-18	+	0,7146354	0,00074982	+	200570000
P05125	Natriuretic peptides A	Nppa	0,9566602	0,5889101		1,144319	0,3173206		44473000
P10605	Cathepsin B;Cathepsin B light chain;Cathepsin B heavy chain	Ctsb	0,8367389	0,0333487		0,8841223	0,22839547		32331000
P99024	Tubulin beta-5 chain	Tubb5	1,357869	0,00289618		0,7769889	0,01176118		48597000
P51667	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	Myl2	0,9225511	0,33168905		0,7718349	0,00968237		966740000
P40124	Adenylyl cyclase-associated protein 1	Cap1	0,9854211	0,8498241		1,101235	0,46837057		17264000
P09542	Myosin light chain 3	Myl3	0,8365512	0,03312872		0,7245703	0,00123722	+	1277400000
Q06890	Clusterin;Clusterin beta chain;Clusterin alpha chain	Clu	1,202618	0,0732322		0,8462427	0,09890151		17628000
P10126	Elongation factor 1-alpha 1	Eef1a1	1,080315	0,45763687		1,159788	0,27301587		124350000
P63254	Cysteine-rich protein 1	Crip1	0,0460427	1,16E-291	+	0,0519103	1,57E-198	+	65657000
P10107	Annexin A1	Anxa1	0,7086478	4,18E-05	+	0,9624349	0,73336226		28883000
P57780	Alpha-actinin-4	Actn4	0,7728825	0,00214955	+	1,077286	0,57026139		42688000
Q9WVA4	Transgelin-2	Tagln2	0,9647292	0,65930965		0,9119494	0,37395769		32098000
P51637	Caveolin-3	Cav3	5,17642	4,64E-58	+	0,9284999	0,480176		30080000
P09103	Protein disulfide-isomerase	P4hb	1,009107	0,93938567		0,9587353	0,70405135		130470000
Q9EQK5	Major vault protein	Mvp	1,206384	0,0684621		0,9071939	0,34603919		8625000
Q8BTM8	Filamin-A	Flna	0,9761102	0,762757		0,8308878	0,06627149		50024000
P15105	Glutamine synthetase	Glul	1,207075	0,06761645		0,7094913	0,00057272	+	27302000
Q8VHX6	Filamin-C	Finc	0,7654402	0,0014554	+	0,8131257	0,03973179		452140000
Q8CGC7	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	Eprs	1,622868	2,34E-06	+	1,132471	0,35473609		16777000
Q61233	Plastin-2	Lcp1	0,6933814	1,33E-05	+	1,49003	0,00384552		12774000
P49817	Caveolin-1	Cav1	1,039664	0,71307721		0,8607	0,13946551		69364000
P31001	Desmin	Des	0,9832435	0,82932831		1,877169	5,50E-06	+	23348000
Q9WUA3	6-phosphofructokinase type C	Pfkip	1,147888	0,18155981		0,967447	0,77350952		18763000
A2ASS6	Titin	Ttn	0,8201472	0,01801839		0,8667947	0,15973483		25397000
Q8VDD5	Myosin-9	Myh9	0,9085029	0,24908007		1,154459	0,28770778		68518000
P20152	Vimentin	Vim	0,9978472	0,9674388		1,852211	8,63E-06	+	42670000
Q922R8	Protein disulfide-isomerase A6	Pdia6	1,047944	0,65611272		1,07992	0,5584412		20663000
Q9Z1Q5	Chloride intracellular channel protein 1	Clcc1	1,068145	0,52740492		0,875522	0,19223468		14515000
P63276	40S ribosomal protein S17	Rps17	1,492855	9,41E-05	+	1,083664	0,54189809		11592000
P12970	60S ribosomal protein L7a	Rpl7a	1,96875	3,82E-11	+	0,7956182	0,0227223		25333000
P62918	60S ribosomal protein L8	Rpl8	1,010862	0,92588075		1,018134	0,87033798		34301000
Q62188	Dihydropyrimidinase-related protein 3	Dpysl3	0,7430027	0,00040615	+	0,9445328	0,59488857		59145000
P14602	Heat shock protein beta-1	Hspb1	0,9919815	0,91185586		0,8745922	0,18857327		488910000
Q62446	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	Fkbp3	0,9352483	0,41868425		0,8289318	0,06280466		35160000
P16546	Spectrin alpha chain, brain	Sptan1	2,17638	3,17E-14	+	0,614149	8,97E-07	+	10989000
Q9EQP2	EH domain-containing protein 4	Ehd4	0,9901067	0,89409893		0,9493675	0,63137073		287720000
P26039	Talin-1	Tln1	0,9278769	0,36679584		0,7776606	0,01205825		30438000
Q9JLV1	BAG family molecular chaperone regulator 3	Bag3	3,970325	2,37E-41	+	1,033328	0,78768773		22735000
Q9CZX8	40S ribosomal protein S19	Rps19	0,8595451	0,07042941		0,9756047	0,83966514		34749000
Q35887	Calumenin	Calu	0,9029412	0,22043718		0,9857994	0,92311253		27800000
P24369	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	Ppib	0,7477242	0,00053822	+	1,372249	0,02140086		18429000
P40142	Transketolase	Tkt	0,8606425	0,07281046		1,186692	0,2075327		14212000
Q9DCD0	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Pgd	1,128623	0,24181068		0,9336078	0,51557655		22689000
Q9Z2U0	Proteasome subunit alpha type-7	Psm7	1,206078	0,06883921		0,8938977	0,27457737		25752000
P25444	40S ribosomal protein S2	Rps2	1,142785	0,19621664		0,8395886	0,0835317		35765000
Q8BG05	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Hnrnpa3	1,01851	0,86758637		1,230321	0,12877378		13532000
P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein	Ahsg	0,994043	0,93139266		1,077131	0,57095863		177300000
P62960	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Ybx1	0,9969485	0,95892681		0,9740991	0,82739654		23675000
Q70468	Myosin-binding protein C, cardiac-type	Mybpc3	1,299997	0,01068976		0,8163115	0,04372403		574100000
Q9WTR5	Cadherin-13	Cdh13	1,023566	0,82965697		1,025067	0,83224008		17808000
Q07076	Annexin A7	Anxa7	0,8277144	0,02404655		0,9209465	0,43001881		16692000
P97429	Annexin A4	Anxa4	1,187712	0,09503075		1,224618	0,13736399		94057000
Q9J191	Alpha-actinin-2	Actn2	1,999585	1,35E-11	+	1,158908	0,27540154		46852000
Q9CZM2	60S ribosomal protein L15	Rpl15	1,23326	0,04161058		0,7991905	0,0255837		20019000
P59999	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	Arpc4	1,03356	0,75644665		0,9064401	0,34172616		12249000
P35980	60S ribosomal protein L18	Rpl18	0,8996834	0,20472387		1,03125	0,79880346		43332000
P26041	Moesin	Msn	0,9945037	0,93575969		1,196084	0,18789272		124520000
P14211	Calreticulin	Calr	1,023945	0,82683714		1,023699	0,83970876		141930000



A6X935		Itih4	0,9882464	0,87649836		1,57223	0,00105611	+	10689000
Q91VI7	Ribonuclease inhibitor	Rnh1	0,9460069	0,50085709		0,9927692	0,98021128		34087000
P35385	Heat shock protein beta-7	Hspb7	1,118489	0,27912575		0,8578728	0,13071922		27885000
P19324	Serpin H1	Serpinh1	0,934793	0,4153718		1,53108	0,00203419	+	11370000
P14148	60S ribosomal protein L7	Rpl7	1,143625	0,19374337		0,8456715	0,09750417		31231000
Q60605	Myosin light polypeptide 6	Myl6	0,7390796	0,00031969	+	1,605917	0,00061037	+	19622000
P27773	Protein disulfide-isomerase A3	Pdia3	1,028859	0,79056546		1,152858	0,29223753		141590000
P21981	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	Tgm2	1,219125	0,05426963		1,191506	0,19726904		213520000
P70414	Sodium/calcium exchanger 1	Slc8a1	0,4623441	5,26E-20	+	0,770757	0,00928993		12924000
P67984	60S ribosomal protein L22	Rpl22	1,037827	0,72601332		0,8862827	0,23813508		34495000
O88569	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Hnrnpa2b1	1,07538	0,48518834		0,8996261	0,30415543		55193000
Q8CIB5	Fermitin family homolog 2	Fermt2	1,124768	0,25552917		0,9605098	0,71807255		8671800
Q00623	Apolipoprotein A-I;Truncated apolipoprotein A-I	Apoa1	1,0304	0,77931784		0,9428277	0,58221266		570710000
P19123	Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles	Tnnc1	0,8549889	0,06118846		0,9451698	0,59965085		183310000
O35639	Annexin A3	Anxa3	0,843476	0,04207141		1,225075	0,13665858		25539000
P47911	60S ribosomal protein L6	Rpl6	0,9905547	0,89834056		0,9489713	0,62835207		43898000
P51410	60S ribosomal protein L9	Rpl9	0,9523547	0,55259374		1,2746	0,07636588		14172000
Q9DCN2	NADH-cytochrome b5 reductase 3	Cyb5r3	0,9753467	0,75569642		0,9951915	1		37930000
Q8CI51	PDZ and LIM domain protein 5	Pdlm5	0,7317337	0,00020145	+	0,8650224	0,15363862		33270000
P01027	Complement C3	C3	0,9582136	0,60223708		1,210747	0,16028951		253650000
P14131	40S ribosomal protein S16	Rps16	1,003468	0,98305133		0,9785156	0,86343866		28975000
Q9CY58	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	Serbp1	0,9809659	0,8079668		0,8531464	0,11699698		7213900
P16045	Galectin-1	Lgals1	1,012937	0,90996843		0,9761323	0,84396938		88447000
Q3THE2	Myosin regulatory light chain 12B	Myl12b;Myl9	0,8763523	0,1141934		1,217494	0,14876897		29523000
Q64727	Vinculin	Vcl	1,000861	0,99594824		1,047363	0,71441972		143310000
P35979	60S ribosomal protein L12	Rpl12	0,8358314	0,03229645		1,156784	0,28122489		43649000
P62242	40S ribosomal protein S8	Rps8	0,9876048	0,87043432		1,097915	0,48173641		52637000
P18760	Cofilin-1	Cfl1	0,9300256	0,38153207		1,133725	0,35062832		160660000
P62855	40S ribosomal protein S26	Rps26	0,9428775	0,47620864		1,628382	0,00042117	+	15603000
Q99JY9	Actin-related protein 3	Actr3	1,03838	0,72211184		1,073731	0,5864451		24725000
P47963	60S ribosomal protein L13	Rpl13	1,106587	0,32823189		1,046359	0,7195471		31195000
Q9R0P5	Destrin	Dstn	1,065271	0,54476217		1,071754	0,59555984		60496000
P62264	40S ribosomal protein S14	Rps14	0,9523067	0,55219487		0,7451052	0,00322215		34582000
P12382	6-phosphofructokinase, liver type	Pfkl	0,9414892	0,46546427		1,115563	0,41351951		19992000
P62754	40S ribosomal protein S6	Rps6	1,007802	0,94945835		1,172327	0,24073402		36188000
P08113	Endoplasmic	Hsp90b1	0,9229391	0,33417727		1,019628	0,86208034		170680000
P23927	Alpha-crystallin B chain	Cryab	1,160284	0,14958775		0,8562191	0,12579108		701160000
P07356	Annexin A2	Anxa2	0,982172	0,81926812		1,029078	0,81048751		259260000
O70400	PDZ and LIM domain protein 1	Pdlm1	1,18933	0,09242439		1,397897	0,0149555		16030000
Q9D8E6	60S ribosomal protein L4	Rpl4	0,9957284	0,94736626		0,9163562	0,4008982		18508000
Q6P3A8	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	Bckdhb	1,059341	0,58159847		0,9912124	0,9674726		35387000
Q9R0P3	S-formylglutathione hydrolase	Esd	0,8921115	0,17119343		1,039149	0,75691105		40236000
Q9D8N0	Elongation factor 1-gamma	Eef1g	0,9057066	0,23439126		0,9220585	0,43723123		6074000
P62270	40S ribosomal protein S18	Rps18	1,035961	0,73925757		0,9800816	0,87625182		40109000
P61979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Hnrnpk	1,02779	0,79840366		0,9112836	0,36997616		45701000
P14206	40S ribosomal protein SA	Rpsa	1,051577	0,63185115		0,9864073	0,92809673		54923000
P68254	14-3-3 protein theta	Ywhaq	0,8087994	0,01139401		1,183537	0,21448951		25780000
Q68FD5	Clastrin heavy chain 1	Cltc	0,904989	0,23071574		1,114235	0,41840856		143260000
Q9QU10	Transforming protein RhoA;Rho-related GTP-binding protein RhoC	Rhoa;Rhoc	0,8727238	0,10335599		1,011018	0,91003664		48709000
Q4KML4	Costars family protein ABRACL	Abracl	0,9598289	0,61621447		1,488741	0,00392205		15471000
Q9D1A2	Cytosolic non-specific dipeptidase	Cndp2	0,9566199	0,58856595		1,203945	0,17264551		10531000
P29391	Ferritin light chain 1;Ferritin light chain 2	Ftl1;Ftl2	1,021843	0,842517		1,09044	0,51273604		84833000
A2AUC9		Kbtbd10	1,056224	0,60150818		1,103433	0,45965501		27394000
Q6ZWN5	40S ribosomal protein S9	Rps9	0,9882786	0,87680323		1,256893	0,09452775		29908000
P68040	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	Gnb2l1	0,8880172	0,154765		1,077073	0,57122311		91976000
P63325	40S ribosomal protein S10	Rps10	0,8475752	0,0482283		1,001155	0,96587143		13693000
Q9WV35	Probable C->U-editing enzyme APOBEC-2	Apobec2	1,331532	0,00531925		0,8400031	0,0844323		18152000
P37804	Transgelin	Tagln	0,9933005	0,92435529		0,9418998	0,57535803		22013000
Q9R1P0	Proteasome subunit alpha type-4	Psma4	0,7757167	0,0024833	+	1,124982	0,3799828		17709000
P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90aa1	1,070783	0,51176668		1,075761	0,57717036		84123000
O70251	Elongation factor 1-beta	Eef1b	0,7338278	0,00023021	+	1,047062	0,71595455		26647000
P61358	60S ribosomal protein L27	Rpl27	0,9573212	0,59456705		0,9903598	0,9604914		40589000
P60335	Poly(rC)-binding protein 1	Pcbp1	1,075365	0,48527308		0,9130013	0,38029612		34624000
P02089	Hemoglobin subunit beta-2	Hbb-b2	1,307716	0,00903921		0,9564149	0,68582967		250980000
Q3UTJ2	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2	Sorbs2	0,8459063	0,04563942		0,9157463	0,39710964		31691000
Q61147	Ceruloplasmin	Cp	1,006997	0,9556852		1,157784	0,27847072		48871000
P27546	Microtubule-associated protein 4	Map4	0,9452865	0,49513103		0,9855611	0,92115851		79291000
Q9CWJ9	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	Atic	1,264152	0,02264952		1,049132	0,70542087		10399000
Q92111	Serotransferrin	Tf	1,034902	0,74681779		1,162004	0,26708		180960000
P62141	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta/gamma catalytic subunit	Ppp1cb;Ppp1c	1,191267	0,08938363		1,010605	0,91235722		38840000
Q9JJZ2	Tubulin alpha-8 chain	Tuba8	1,029372	0,78681753		1,07231	0,59298493		27819000

# Anhang

Q8CDN6	Thioredoxin-like protein 1	Txn1	1,18824	0,09417425	0,6610351	3,12E-05	+	13651500
P14869	60S acidic ribosomal protein P0	Rplp0	0,9423506	0,47211649	1,044972	0,72666908		33415000
Q05816	Fatty acid-binding protein, epidermal	Fabp5	0,9019501	0,21557405	1,046099	0,72088072		27208000
P62908	40S ribosomal protein S3	Rps3	0,9173227	0,29923327	1,089399	0,5171488		101830000
Q9CQV8	14-3-3 protein beta/alpha;14-3-3 protein beta/alpha, N-terminally processed	Ywhab	1,082825	0,44401235	0,950131	0,63720062		42917000
P14115	60S ribosomal protein L27a	Rpl27a	1,099915	0,3583294	1,263109	0,08776375		26252000
P57776	Elongation factor 1-delta	Eef1d	0,9366704	0,42912092	1,105408	0,45191827		80951000
P97351	40S ribosomal protein S3a	Rps3a	0,8857493	0,14616585	0,9709951	0,80217992		26835000
Q9R062	Glycogenin-1	Gyg1	1,053468	0,61940531	0,910149	0,36324549		49157000
P70168	Importin subunit beta-1	Kpnb1	1,029803	0,78366771	0,8939858	0,27501849		50763000
P48036	Annexin A5	Anxa5	1,033343	0,75801234	1,08018	0,55728479		185900000
Q1XH17	Tripartite motif-containing protein 72	Trim72	1,251473	0,02920297	0,8681653	0,16456462		53286000
P17182	Alpha-enolase	Eno1	0,9414114	0,46486632	0,9569771	0,69023236		340290000
Q99PT1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Arhgdia	0,966181	0,67226382	0,9188693	0,41670963		140390000
P68510	14-3-3 protein eta	Ywhah	0,8891428	0,1591645	4,468379	5,57E-27	+	33953000
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	1,007491	0,9518654	0,8954955	0,2826413		145700000
P58252	Elongation factor 2	Eef2	1,0101777	0,9311486	0,9332629	0,51315069		369590000
O88342	WD repeat-containing protein 1	Wdr1	1,012727	0,91157894	1,159367	0,27415532		176310000
P61205	ADP-ribosylation factor 3;ADP-ribosylation factor 1;ADP-ribosylation factor 2	Arf3;Arf1;Arf2	1,069221	0,5209907	1,000949	0,96704691		51513000
P99027	60S acidic ribosomal protein P2	Rplp2	0,9863415	0,85850492	1,028868	0,81161917		93945000
P21614	Vitamin D-binding protein	Gc	0,8489263	0,0504094	0,8896483	0,25383569		10754000
P46412	Glutathione peroxidase 3	Gpx3	1,133855	0,2241008	1,556563	0,00135808	+	14975000
Q9D819	Inorganic pyrophosphatase	Ppa1	1,063202	0,55745992	1,019137	0,86479236		45213000
Q8K0E8	Fibrinogen beta chain;Fibrinopeptide B;Fibrinogen beta chain	Fgb	1,028087	0,79622399	1,086326	0,53032326		116790000
P63323	40S ribosomal protein S12	Rps12	0,8815199	0,1310592	1,217498	0,14876169		16564000
P10630	Eukaryotic initiation factor 4A-II	Eif4a2	1,040056	0,71033568	1,062235	0,64056695		49127000
Q60864	Stress-induced-phosphoprotein 1	Stip1	0,8918771	0,17022076	1,008437	0,92456413		29029000
P63028	Translationally-controlled tumor protein	Ttp1	1,108755	0,31884963	0,9972604	0,98813372		79777000
P68372	Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-4A chain	Tubb4b;Tubb4	1,051991	0,6291142	0,9333762	0,51394674		723120000
Q61838	Alpha-2-macroglobulin	A2m	1,268696	0,02064693	1,241225	0,11361598		493710000
Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1	Pgam1	0,9888413	0,88212425	1,034607	0,78087937		117410000
P62082	40S ribosomal protein S7	Rps7	0,9902897	0,89583191	1,180128	0,22221711		22045000
Q99L47	Hsc70-interacting protein	Stt13	1,070801	0,51165743	1,229147	0,13050465		15499000
P17710	Hexokinase-1	Hk1	0,8881825	0,15540576	0,913785	0,38505613		200670000
O88492	Perilipin-4	Plin4	0,9349027	0,41616852	0,7543228	0,0047939		34390000
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	0,93121	0,3897932	1,259492	0,0916464		347800000
P11499	Heat shock protein HSP 90-beta	Hsp90ab1	0,9815758	0,81367941	0,9441314	0,59189532		100520000
P20029	78 kDa glucose-regulated protein	Hspa5	0,9933887	0,92519137	0,9890155	0,94947786		625230000
P62827	GTP-binding nuclear protein Ran	Ran;Rasl2-9	0,9908464	0,901103	1,003839	0,95059398		81722000
P97825	Hematological and neurological expressed 1 protein	Hn1	0,9423326	0,471977	1,13131	0,35856732		19306000
P14824	Annexin A6	Anxa6	1,001103	0,99823671	1,062653	0,63855081		386030000
P62281	40S ribosomal protein S11	Rps11	1,081366	0,45189886	1,281282	0,07035482		16816000
P70349	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	Hint1	0,9675084	0,68417623	1,185958	0,20913583		63252000
Q5EBG6	Heat shock protein beta-6	Hspb6	1,187028	0,09615227	1,010183	0,91472576		256480000
P62702	40S ribosomal protein S4, X isoform	Rps4x	1,030626	0,77767226	1,090183	0,51382234		33697000
P51885	Lumican	Lum	1,197062	0,08079303	1,186219	0,20856381		15611000
Q9JHU4	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Dync1h1	0,9355853	0,4211452	1,042922	0,73724713		46165000
Q60854	Serpin B6	Serpinb6	1,027242	0,80243267	1,059697	0,65287352		81654000
P22599	Alpha-1-antitrypsin 1-2	Serpina1b	1,088137	0,41605405	1,498206	0,00339234		158010000
Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain	Fgg	0,9956862	0,94696691	1,186753	0,20740068		102760000
Q8VDM4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	Psm2	0,9529116	0,55723766	1,200299	0,17958659		74186000
P58771	Tropomyosin alpha-1 chain	Tpm1	0,9197381	0,31397687	1,021563	0,85142035		186100000
Q9QYB1	Chloride intracellular channel protein 4	Clc4	1,245554	0,03281157	0,9015399	0,31444757		60921000
Q91X72	Hemopexin	Hpx	1,214609	0,05897327	1,360882	0,02500915		200340000
Q04447	Creatine kinase B-type	Ckb	0,8243179	0,02115985	1,125137	0,37944846		37164000
P62821	Ras-related protein Rab-1A	Rab1A	1,094087	0,38615607	0,9076427	0,34862208		54345000
P42932	T-complex protein 1 subunit theta	Cct8	1,055566	0,60575318	1,486192	0,00407765		32216000
P07724	Serum albumin	Alb	1,038332	0,72244648	1,053374	0,68407248		1380800000
Q99J39	Malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial	Mlycd	1,218625	0,0547741	1,022717	0,84508832		20676000
P01942	Hemoglobin subunit alpha	Hba	1,102881	0,34471696	1,239654	0,11570091		1381300000
P63158	High mobility group protein B1	Hmgb1	0,9708366	0,71431322	0,9495593	0,63283321		105660000
P46638	Ras-related protein Rab-11B;Ras-related protein Rab-11A	Rab11b;Rab1	0,9861029	0,85625427	1,010628	0,91222591		39714000
Q91VT4	Carbonyl reductase family member 4	Cbr4	0,9862269	0,85742338	0,745911	0,00333862		20424000
Q9R1P4	Proteasome subunit alpha type-1	Psma1	0,983186	0,8287884	0,9880593	0,94164138		16331000
Q9WUZ7	SH3 domain-binding glutamic acid-rich protein	Sh3bgr	0,8423585	0,04050842	0,7926154	0,02052774		17835000
P63242	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1/5A2	Eif5a;Eif5a2	0,9081261	0,24706697	1,223315	0,13939296		40256000
P68368	Tubulin alpha-4A chain	Tuba4a	0,9097142	0,25562437	0,9482875	0,62315514		394090000
Q3URD3	Sarcolemmal membrane-associated protein	Slmap	0,6964167	1,68E-05	+	1,130084	0,36264745	22595000
P62204	Calmodulin;Calmodulin-like protein 3	Calm1;Calm3	1,038467	0,72149651	0,8809093	0,21439965		102040000
Q91ZJ5	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Ugp2	1,096902	0,37253877	0,9694625	0,7897733		86612000
P35564	Calnexin	Canx	1,033816	0,75461067	0,9342886	0,52038013		93322000
Q9CZ30	Obg-like ATPase 1	Ola1	0,8332759	0,02947944	0,5525935	2,12E-09	+	10320000

P56399	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	Usp5	1,064625	0,548705	1,078554	0,56455023	23318000	
Q61316	Heat shock 70 kDa protein 4	Hspa4	0,9401736	0,45539476	1,040357	0,75059126	88444000	
Q01853	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Vcp	0,9531502	0,55923282	1,116242	0,41103679	289760000	
Q9EQH3	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	Vps35	0,9490986	0,52577412	1,002542	0,95796817	27830000	
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	0,9471873	0,51030556	0,9518933	0,65072486	820240000	
P61982	14-3-3 protein gamma;14-3-3 protein gamma, N-terminally processed	Ywhag	1,027283	0,80213699	0,9881218	0,94215343	174910000	
O08677	Kininogen-1;Kininogen-1 heavy chain;Bradykinin;Kininogen-1 light chain	Kng1	1,11711	0,2845181	1,444379	0,00763689	52115000	
P50247	Adenosylhomocysteinase	Ahcy	1,112859	0,30162901	0,9675866	0,77463393	23102000	
P06151	L-lactate dehydrogenase A chain	Ldha	0,9245446	0,34459034	1,001101	0,96617734	777270000	
P50752	Troponin T, cardiac muscle	Tnnt2	0,9896225	0,88951543	1,133982	0,34979264	759090000	
P62259	14-3-3 protein epsilon	Ywhae	1,084163	0,43685488	1,0094	0,91913435	348680000	
P52480	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	Pkm2	1,063805	0,55373915	0,9031456	0,32324012	1573500000	
P50462	Cysteine and glycine-rich protein 3	Csrp3	1,036222	0,73739764	0,9906012	0,96246837	1584600000	
Q76MZ3	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	Ppp2r1a	0,9907458	0,90015072	1,022863	0,84428798	45542000	
P13634	Carbonic anhydrase 1	Ca1	1,19894	0,07816434	1,200812	0,17859697	32268000	
P34884	Macrophage migration inhibitory factor	Mif	1,254262	0,02762974	0,9075953	0,34834853	70314000	
P24270	Catalase	Cat	1,064842	0,54738062	1,120374	0,39613999	42823000	
P48787	Troponin I, cardiac muscle	Tnni3	0,9698383	0,7052343	1,090344	0,51314203	541160000	
Q8JZQ2	AFG3-like protein 2	Afg3l2	1,270408	0,01993541	1,372856	0,02122266	24640000	
O70325	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	Gpx4	1,061979	0,56504066	0,9784849	0,86318764	36185000	
Q9DBP5	UMP-CMP kinase	Cmpk1	1,071593	0,5070191	0,9427634	0,581737	13811000	
P32020	Non-specific lipid-transfer protein	Scp2	1,208173	0,06629204	0,8654339	0,15503898	47813000	
Q02053	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	Uba1	0,9800155	0,79907972	1,090431	0,51277132	80950000	
Q61598	Rab GDP dissociation inhibitor beta	Gdi2	1,001048	0,99771645	1,181278	0,21958478	116270000	
O88685	26S protease regulatory subunit 6A	Psmc3	0,8726591	0,10316996	1,0908	0,51121373	14229000	
O35143	ATPase inhibitor, mitochondrial	Atpif1	1,13298	0,22699052	0,7377043	0,00230897	+	47345000
Q9D0S9	Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial	Hint2	1,363082	0,00256123	+	0,9217492	0,43521945	46088000
Q9DBC7	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	Prkar1a	0,9984063	0,97273217	1,282645	0,0691817	27028000	
Q9D6U8	Protein FAM162A	Fam162a	1,08625	0,42584669	0,9630223	0,73804292	58663000	
Q9QUR6	Prolyl endopeptidase	Prep	0,9202746	0,31731051	1,061457	0,64432625	18049000	
P70670	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	Naca	0,9182804	0,30502776	0,8859622	0,23667377	191390000	
Q6ZWW3	60S ribosomal protein L10;60S ribosomal protein L10-like	Rpl10;Rpl10l	0,9563704	0,58643661	1,092081	0,5058237	10287000	
Q8R127	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	Scppdh	1,283675	0,01513455	0,7523435	0,00440906	25604000	
Q99LX0	Protein DJ-1	Park7	1,067529	0,53109338	0,9606866	0,71947331	197400000	
P62631	Elongation factor 1-alpha 2	Eef1a2	1,041016	0,70362915	1,044552	0,72882855	1052600000	
Q9Z2W0	Aspartyl aminopeptidase	Dnpep	1,019294	0,86167163	0,9157035	0,39684449	21236000	
Q9Z1E4	Glycogen [starch] synthase, muscle	Gys1	1,096216	0,37582508	1,062614	0,36874028	38580000	
P09411	Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	1,062389	0,562491	1,05566	0,67270189	1242900000	
P00920	Carbonic anhydrase 2	Ca2	1,299902	0,01071156	1,365439	0,02350025	92804000	
Q9D1X0	Nucleolar protein 3	No13	1,489297	0,00010365	+	0,8168055	0,044371	22869000
P49813	Tropomodulin-1	Tmod1	1,132614	0,22820768	0,936786	0,53816586	8977800	
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	Aldoa	0,9800171	0,79909476	1,043735	0,73304203	2424500000	
P07758	Alpha-1-antitrypsin 1-1;Alpha-1-antitrypsin 1-3;Alpha-1-antitrypsin 1-5	Serpina1a;1c;	1,05891	0,58432786	1,198404	0,18328366	648420000	
P61089	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	Ube2n	1,080887	0,45450767	1,092078	0,50583519	54398000	
P04919	Band 3 anion transport protein	Slc4a1	1,151565	0,17155064	1,626422	0,0004351	+	33824000
Q60994	Adiponectin	Adipoq	1,157777	0,15565364	0,9977562	0,98529365	45184000	
P18242	Cathepsin D	Ctsd	0,9095547	0,25475607	0,9086547	0,35448573	122970000	
O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	0,9757668	0,75957932	0,9858413	0,92345564	56989000	
P55264	Adenosine kinase	Adk	0,8957129	0,18662508	1,0277	0,81793798	70498000	
P61971	Nuclear transport factor 2	Nutf2	0,9418486	0,46823471	1,022296	0,84739356	29760000	
P10639	Thioredoxin	Txn	1,067446	0,53159186	0,9854445	0,92020203	106590000	
Q01768	Nucleoside diphosphate kinase B	Nme2	1,042906	0,69050728	0,9192518	0,41914448	812700000	
P02088	Hemoglobin subunit beta-1	Hbb-b1	1,176561	0,11474951	1,385289	0,01785701	18778000000	
Q99LY9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	Ndufs5	1,032788	0,76201107	0,9100044	0,36239229	149400000	
O35381	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	Anp32a	0,9822099	0,81962428	1,184127	0,21317447	20957000	
Q9R0Q7	Prostaglandin E synthase 3	Ptges3	0,9732741	0,73660739	0,9858963	0,92390675	41508000	
P06745	Glucose-6-phosphate isomerase	Gpi	0,9898958	0,89210264	0,9604845	0,71787235	547370000	
Q9CPY7	Cytosolic aminopeptidase	Lap3	0,9138355	0,27871042	0,9824591	0,8957267	19537000	
P45591	Cofilin-2	Cif2	0,9753778	0,75598384	1,166984	0,25410131	51523000	
Q99LP6	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	Grpel1	1,1058	0,33168476	1,010659	0,91204838	36917000	
O08528	Hexokinase-2	Hk2	0,9971422	0,96076182	1,058679	0,65784504	200780000	
O54724	Polymerase I and transcript release factor	Ptfr	0,9084475	0,24878355	0,9039098	0,32747488	176500000	
P51660	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2;(3R)-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Hsd17b4	1,209517	0,06470117	0,942336	0,57857624	27134000	
Q8K1M6	Dynamin-1-like protein	Dnm1l	0,9471512	0,51001521	1,020624	0,85658893	29544000	
P35700	Peroxisredoxin-1	Prdx1	1,031073	0,77442241	0,9958382	0,99628829	513540000	
A2AMM0	Muscle-related coiled-coil protein	Murc	1,014699	0,8965121	0,9635386	0,74216312	33794000	
Q8CI94	Glycogen phosphorylase, brain form	Pygb	1,032662	0,76291956	0,9699959	0,79408709	339910000	

# Anhang

P63001	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Rac1;Rac3;Ra	1,059261	0,58210622		1,014956	0,88799911		42030000
Q9D1L0	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2, mitochondrial	Chchd2	0,9206374	0,31957627		1,041314	0,74560012		60750000
Q923D2	Flavin reductase (NADPH)	Blvrb	1,172476	0,12278405		1,144322	0,31731051		48620000
P06728	Apolipoprotein A-IV	Apoa4	0,9689669	0,69733696		1,049025	0,70595959		22439000
P11404	Fatty acid-binding protein, heart	Fabp3	1,04797	0,65593913		1,015188	0,88670625		3460400000
O70250	Phosphoglycerate mutase 2	Pgam2	1,03849	0,72133097		0,9983494	0,98189853		713340000
Q78J03	Methionine-R-sulfoxide reductase B2, mitochondrial	Msrb2	0,9601324	0,61885332		1,04143	0,74499513		11645000
P23953	Carboxylesterase 1C	Ces1c	1,320882	0,00675852		1,159799	0,27298496		95262000
Q9JKS4	LIM domain-binding protein 3	Ldb3	0,8941609	0,17986078		0,8379515	0,08004621		327460000
Q8CHP8	Phosphoglycolate phosphatase	Pgp	0,9221072	0,32885573		1,237934	0,11802092		18790000
Q9DAK9	14 kDa phosphohistidine phosphatase	Phpt1	1,11935	0,27579518		0,8837701	0,22683302		23314000
Q9Z1P6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	Ndufa7	1,028397	0,79395124		0,8319492	0,06821429		161290000
P01867	Ig gamma-2B chain C region	Igh-3	1,200246	0,07638188		0,9657512	0,75987497		7223200
P80313	T-complex protein 1 subunit eta	Cct7	1,106536	0,32845552		1,11893	0,40130156		21575000
O09131	Glutathione S-transferase omega-1	Gsto1	0,9630649	0,64456129		1,103433	0,4596569		133580000
Q64433	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspe1	0,9965189	0,95485655		1,042486	0,73950781		296260000
P38060	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial	Hmgcl	0,9572421	0,59388957		0,9191662	0,41859907		23942000
Q11011	Puromycin-sensitive aminopeptidase	Npepps	1,04517	0,67494585		1,016299	0,88052465		28524000
Q9D1G3	Protein-cysteine N-palmitoyltransferase HHAT-like protein	Hhatal	1,003257	0,98469066		0,9003844	0,30820868		26293000
Q9CPU0	Lactoylglutathione lyase	Glo1	0,9243354	0,34322323		1,11705	0,40809388		41877000
Q91WS0	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	Cisd1	1,045725	0,67116002		0,8813532	0,2162985		228020000
Q8BH95	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	Echs1	1,083014	0,44299554		0,8849554	0,23212011		487800000
P18572	Basigin	Bsg	1,228111	0,04588108		1,05265	0,68769133		104000000
P97823	Acyl-protein thioesterase 1	Lypla1	1,032341	0,76523755		0,9975806	0,98629956		36107000
P07309	Transthyretin	Ttr	0,8293965	0,02559365		1,354516	0,02726627		100100000
P23242	Gap junction alpha-1 protein	Gja1	1,060573	0,57383391		0,885353	0,2339116		44284000
Q8BH64	EH domain-containing protein 2	Ehd2	0,9544116	0,56982646		0,9140582	0,38672327		51711000
P62880	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	Gnb2;Gnb4	1,079838	0,46025501		1,102922	0,46166954		27046000
P29758	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	Oat	0,9133736	0,27605978		0,9053646	0,33562547		47002000
Q9CQZ5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	Ndufa6	1,075459	0,48474041		0,8794782	0,20835304		198740000
Q9WVK4	EH domain-containing protein 1	Ehd1	1,050274	0,64049957		0,9343901	0,52109757		33578000
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	1,070544	0,51316995		1,080769	0,55466239		3704500000
P17751	Triosephosphate isomerase	Tpi1	1,037315	0,72963937		1,013752	0,89472138		1062900000
Q9CRD0	OCLIA domain-containing protein 1	Ociad1	0,9920736	0,91272841		1,017287	0,87503421		29792000
Q6PHZ2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta	Camk2d	1,043169	0,68868948		0,9569701	0,6901772		20894000
P32261	Antithrombin-III	Serpinc1	1,06883	0,52331285		1,397389	0,01506349		17898000
Q9CQ60	6-phosphogluconolactonase	Pgls	0,9676698	0,68562909		1,111482	0,42867197		32766000
P07310	Creatine kinase M-type	Ckm	1,011952	0,91751691		0,9396913	0,55917246		2614800000
Q99LB2	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4	Dhrs4	0,9927235	0,91888716		0,9326349	0,50874638		98950000
P28665	Murinoglobulin-1	Mug1	1,024999	0,819009		1,245064	0,10865599		175760000
P07759	Serine protease inhibitor A3K	Serpina3k	1,159714	0,15094855		1,508256	0,00290484		516140000
P53986	Monocarboxylate transporter 1	Slc16a1	0,8565478	0,06423567		1,353141	0,02777787		25277000
O35658	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	C1qbp	1,03343	0,75738676		0,8590454	0,13429713		81052000
Q9CRB9	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial	Chchd3	0,9376647	0,43649726		0,9804503	0,87927104		220650000
Q9CQ69	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	Uqcrc	0,9552281	0,57672776		0,8686395	0,16625922		293130000
P05201	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	Got1	0,9993492	0,98165567		0,9795865	0,87219958		1762900000
P26443	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Glud1	1,034064	0,75282278		1,001011	0,96669403		137550000
P0CG50	Polyubiquitin-C;Ubiquitin	Ubc;Rps27a	1,05189	0,62977916		0,8864902	0,23908464		154550000
P14094	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	Atp1b1	1,050394	0,63970105		0,9859803	0,92459539		135510000
Q88441	Metaxin-2	Mtx2	1,029201	0,78806348		0,9625844	0,7345528		29881000
Q61171	Peroxisome protein 2	Prdx2	1,04521	0,67466962		0,9771176	0,85201319		393580000
P28474	Alcohol dehydrogenase class-3	Adh5	0,9728425	0,73264652		1,178226	0,2266244		61847000
E9Q401	Ryanodine receptor 2	Ryr2	0,9609354	0,62585651		0,9333647	0,51386628		146790000
Q9WUB3	Glycogen phosphorylase, muscle form	Pygm	1,075839	0,48258298		0,9374672	0,54306142		1470900000
O35129	Prohibitin-2	Phb2	1,080618	0,45597801		1,035712	0,77501771		171360000
P56375	Acylphosphatase-2	Acyp2	1,002481	0,99072323		1,076976	0,57165852		45912000
Q9D0F9	Phosphoglucomutase-1	Pgm1	1,018585	0,86702181		0,9684883	0,78190402		412830000
Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Vdac2	1,037828	0,72600994		0,9935352	0,98647341		625950000
Q8BFR5	Elongation factor Tu, mitochondrial	Tufm	1,057201	0,59522554		0,9647839	0,75212066		668420000
P21550	Beta-enolase	Eno3	1,126801	0,24822071		0,9201642	0,42498158		1285000000
P09528	Ferritin heavy chain	Fth1	1,140709	0,20244195		0,9647925	0,75218939		124740000
Q7TQ48	Sarcolumenin	Srl	0,975284	0,75511724		0,9623005	0,73229272		818730000
P04117	Fatty acid-binding protein, adipocyte	Fabp4	1,029442	0,78630543		1,020972	0,85467107		1357600000
P51174	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acadl	0,9840723	0,83712212		0,9243604	0,4523527		3269000000
P38647	Stress-70 protein, mitochondrial	Hspa9	0,9196126	0,31320078		0,9855798	0,92131198		584620000

Q9JHI5	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Ivd	1,006274	0,96127997		0,9917767	0,97209165		68994000
Q9D0K2	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	Oxct1	1,047105	0,66177878		1,025796	0,82827348		743690000
Q55143	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	Atp2a2	0,9530303	0,55823036		0,9056751	0,33738034		5244700000
Q9WTP7	GTP:AMP phosphotransferase, mitochondrial	Ak3	1,181912	0,10489573		1,065543	0,62471855		25153000
Q91VR2	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Atp5c1	1,045969	0,66949662		1,076623	0,573258		1813300000
P51881	ADP/ATP translocase 2	Slc25a5	0,9646943	0,65899901		0,9831568	0,90144556		307320000
Q9CQQ7	ATP synthase subunit b, mitochondrial	Atp5f1	1,074756	0,48874699		0,9241666	0,45106957		832560000
Q9D0M3	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	Cyc1	1,089688	0,40811498		0,9566247	0,6874718		1125800000
O88844	Iso citrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Idh1	1,099236	0,36149931		1,122205	0,38966557		59623000
Q09161	Calsequestrin-2	Casq2	1,031147	0,77388575		0,9734826	0,82237953		438300000
Q8VCT4	Carboxylesterase 1D	Ces1d	1,380149	0,00170294	+	0,9819077	0,89120865		8358300
Q78IK4	Apolipoprotein O-like	Apool	0,8739762	0,10700517		0,9929879	0,98199903		50038000
P52503	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	Ndufs6	0,9702439	0,70891948		0,8979377	0,29524517		212040000
Q8VDN2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Atp1a1	1,084574	0,43467541		0,9689385	0,78553867		541520000
Q62425	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	Ndufa4	1,057809	0,59133892		0,8810827	0,21513981		1310200000
P34914	Epoxide hydrolase 2	Ephx2	1,109411	0,31605409		1,066858	0,61847983		150780000
P99028	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	Uqcrc	0,9681106	0,68960121		0,9737861	0,82484898		365690000
Q35857	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	Timm44	1,004419	0,97566432		0,908754	0,35506415		17020000
Q9DCJ5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	Ndufa8	1,018934	0,86438415		0,9493734	0,6314157		352790000
P09671	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	Sod2	0,9635034	0,64843648		0,9878954	0,94029723		826970000
Q61207	Sulfated glycoprotein 1	Psap	1,047766	0,65731398		0,97846	0,8629839		13335000
Q9CZU6	Citrate synthase, mitochondrial	Cs	1,035746	0,74078961		0,9749129	0,83402552		2263100000
P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Mdh1	1,059123	0,58297815		1,031581	0,79702795		3287900000
Q99KR7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	Ppif	1,036012	0,73889662		0,9390054	0,55418305		111820000
Q8CAQ8	Mitochondrial inner membrane protein	Immt	0,9838597	0,83512146		0,9201645	0,4249831		778160000
P08249	Malate dehydrogenase, mitochondrial	Mdh2	1,019723	0,85843382		0,9287392	0,48180869		5310800000
Q9CPP6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	Ndufa5	1,009621	0,93542676		0,8916636	0,26354461		215030000
P05202	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	Got2	0,9922389	0,91429511		0,9340979	0,51903237		3413900000
P45376	Aldose reductase	Akr1b1	1,025093	0,81830908		0,9925469	0,978393		4195000000
P67778	Prohibitin	Phb	0,9929079	0,9206343		1,086519	0,52948631		2161300000
Q9CQN1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Trap1	0,9161549	0,29225964		1,18825	0,20416556		29659000
Q91Z53	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	Grhpr	0,8260069	0,02255669		0,723977	0,00120161	+	20893000
P63038	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspd1	1,020641	0,85153611		1,001734	0,96257305		906260000
Q9ET78	Junctophilin-2	Jph2	0,8168157	0,01580085		0,8877869	0,24507252		22899000
P19157	Glutathione S-transferase P 1; Glutathione S-transferase P 2	Gstp1;Gstp2	1,048161	0,65465241		0,9690139	0,78614819		134210000
Q99NB1	Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial	Acss1	1,023736	0,82838686		0,9091129	0,35715916		318950000
Q9WUM5	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	Suclg1	0,9529005	0,55714553		0,9635262	0,74206413		593260000
Q9CZR8	Elongation factor Ts, mitochondrial	Tsfm	0,938053	0,43939515		1,115493	0,41377744		234950000
Q9DB77	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Uqcrc2	0,9911931	0,90438637		0,9122859	0,37597913		2351400000
Q9CQA3	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Sdhb	1,019851	0,85746994		0,9210454	0,43065812		509040000
Q9DCT2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	Ndufs3	1,003981	0,97905994		0,9093861	0,35875821		377200000
Q8BMF3	NADP-dependent malic enzyme, mitochondrial	Me3	1,1021	0,3482686		0,8657528	0,15613072		24206000
Q9CQ92	Mitochondrial fission 1 protein	Fis1	0,9396409	0,45134862		0,9568325	0,68909872		10443000
O35855	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial	Bcat2	0,9859499	0,85481039		0,9454256	0,60156675		237710000
P59017	Bcl-2-like protein 13	Bcl2l13	1,103201	0,34327185		1,037955	0,76317674		18924000
Q9Z219	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	Sucla2	0,9519612	0,54932257		1,002064	0,96068854		999940000
Q9D023	Brain protein 44	Brp44	0,9923077	0,91494632		0,8910835	0,26072633		143000000
Q8BGK2	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase-like protein 1	Adprh1	0,9669979	0,67958662		1,043059	0,7365422		155860000
O08749	Dihydropolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	Dld	1,039594	0,71356805		0,9181821	0,41235463		1028800000
Q924M7	Mannose-6-phosphate isomerase	Mpi	0,9538381	0,5650001		1,098908	0,47771462		32653000
Q8R4N0	Citrate lyase subunit beta-like protein, mitochondrial	Clybl	1,068557	0,524944		1,011003	0,91011698		50202000
Q9DCT8	Cysteine-rich protein 2	Crip2	74,77598	0	+	70,39784	2,50E-204	+	199910000
Q99L13	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	Hibadh	0,9764157	0,7655858		1,132277	0,35537465		68794000
P19536	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	Cox5b	0,9712687	0,71825212		0,8981026	0,29610878		608700000

# Anhang

Q9CR68	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial;Cytochrome b-c1 complex subunit 11	Uqcrfs1	1,017864	0,87246661		0,903996	0,32795451		612540000
Q9DC70	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	Ndufs7	0,9391882	0,44792383		0,9389145	0,55352371		126340000
P70296	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1;Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide	Pebp1	1,074263	0,49156967		0,9647841	0,75212255		419470000
Q64105	Septaplerin reductase	Spr	1,031842	0,76885015		1,051642	0,69274853		587360000
P42125	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	Eci1	1,002235	0,99264092		0,972468	0,81413126		666470000
Q9JKB1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3/L4	Uchl3;Uchl4	0,953537	0,56247248		0,9630103	0,73794741		154050000
Q8K2B3	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Sdha	1,024751	0,8208473		0,9736895	0,82406274		2014500000
Q8VEM8	Phosphate carrier protein, mitochondrial	Slc25a3	0,9777715	0,77816786		0,9784203	0,86265978		1258400000
Q9R0Y5	Adenylate kinase isoenzyme 1	Ak1	1,02254	0,83731099		0,9546993	0,67244434		742290000
Q9CQ75	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	Ndufa2	1,014341	0,89923871		1,092224	0,50522553		152320000
Q91VD9	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	Ndufs1	1,01226	0,91515376		0,9396669	0,55899438		1823900000
P47857	6-phosphofructokinase, muscle type	Pfkm	1,045689	0,67140222		1,020328	0,85822114		411020000
Q9CQC7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	Ndufb4	0,9591448	0,61028067		0,9053779	0,33570046		326440000
Q9D855	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	Uqcrb	0,9616898	0,6324611		1,024224	0,83684007		457540000
Q921G7	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	Etfdh	0,9690987	0,69853029		0,8757372	0,1930891		1259400000
Q9D6R2	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	Idh3a	1,002444	0,99101173		0,9273425	0,47231693		1342300000
Q2TPA8	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2	Hsd12	0,9714401	0,71981591		0,9623059	0,7323354		989720000
Q8K3J1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	Ndufs8	0,9589219	0,6083516		1,011243	0,90877293		858710000
Q3TC72	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2A	Fahd2	1,470996	0,00016925	+	1,028459	0,81382959		106510000
Q9DCW4	Electron transfer flavoprotein subunit beta	Etfb	1,057292	0,59464133		1,107371	0,44431472		2540400000
P16125	L-lactate dehydrogenase B chain	Ldhb	1,057862	0,59100023		0,929374	0,48615206		2303800000
P35486	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	Pdha1	1,046534	0,66565125		0,879545	0,20863255		1248200000
Q8BIJ6	Isoleucine-tRNA ligase, mitochondrial	Iars2	0,9748408	0,75102617		1,004256	0,94822761		578820000
Q03265	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Atp5a1	1,002921	0,98730201		0,9330678	0,51178028		13156000000
Q99LC3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Ndufa10	0,9538584	0,56517087		0,9176021	0,40869708		612780000
Q9DCX2	ATP synthase subunit d, mitochondrial	Atp5h	1,035861	0,7399703		0,9923176	0,9765169		2062800000
Q9CPQ1	Cytochrome c oxidase subunit 6C	Cox6c	1,123905	0,25867882		0,7908986	0,01935465		778620000
O35459	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Ech1	1,038294	0,7227156		0,9020656	0,31731051		392810000
O55126	Protein NipSnap homolog 2	Gbas	0,9935272	0,92650369		0,8486626	0,10498795		529160000
P52825	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	Cpt2	1,047289	0,66053718		0,9215392	0,43385602		268040000
Q9Z0X1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	Aifm1	1,049793	0,64370507		0,9188572	0,41663312		188720000
Q08857	Platelet glycoprotein 4	Cd36	1,00129	1		0,8530135	0,11662705		249860000
Q791V5	Mitochondrial carrier homolog 2	Mtch2	0,952646	0,55502127		1,016954	0,87688539		841990000
Q924X2	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform	Cpt1b	0,9256627	0,35195235		0,9273044	0,47205892		704710000
O08709	Peroxisiredoxin-6	Prdx6	1,055645	0,60524046		1,108639	0,43944933		257650000
Q60597	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	Ogdh	0,9944799	0,93553371		0,9361748	0,53378906		2047800000
Q9QYG0	Protein NDRG2	Ndrp2	1,011408	0,9216893		0,8730178	0,18248263		202380000
P48962	ADP/ATP translocase 1	Slc25a4	0,9922582	0,91447754		0,9990008	0,9781721		8082300000
Q9DC69	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	Ndufa9	0,9226326	0,33221071		0,9744047	0,82988492		475460000
Q78ZA7	Nucleosome assembly protein 1-like 4	Nap114	0,8320806	0,02823333		1,062265	0,64042031		250520000
Q9CQ91	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3	Ndufa3	0,9137057	0,27796393		1,089231	0,51786339		134180000
Q9EQ20	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	Aldh6a1	1,075407	0,48503517		0,9493139	0,63096177		372240000
Q9CQH3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial	Ndufb5	0,9716164	0,72142578		0,9357082	0,53045834		216880000
Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1	0,9785791	0,78568184		1,005295	0,94233053		1783400000
Q6PB66	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	Lrpprc	0,9965288	0,95495086		1,065389	0,6254533		128560000
P10518	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	Alad	1,205069	0,07009636		1,186674	0,20757289		254900000
Q9DBG5	Perilipin-3	Plin3	1,145932	0,18707201		0,9006466	0,30961778		264110000
Q8CGK3	Lon protease homolog, mitochondrial	Lonp1	0,9891946	0,88546686		0,9110211	0,36841248		736970000
Q8BMF4	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	Dlat	1,001466	0,99863013		1,014987	0,88782435		654730000
Q9D2G2	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	Dlst	0,9453652	0,49575492		1,075352	0,57903031		556220000

P97807	Fumarate hydratase, mitochondrial	Fh	1,036593	0,73476273	0,9485238	0,62494888	1202300000
P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	Gstm1	1,204576	0,07071678	0,8393319	0,08297745	278100000
Q60931	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	Vdac3	0,9069658	0,24093367	0,9943072	0,99278023	352310000
Q9Z2Z6	Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein	Slc25a20	0,9583738	0,60361807	1,078023	0,56693934	150840000
Q9CZ13	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Uqcrc1	0,973749	0,74097082	1,022443	0,84658915	2803100000
Q9DCS9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	Ndufb10	0,9657694	0,66858239	0,9352363	0,52709927	257300000
P15626	Glutathione S-transferase Mu 2	Gstm2	1,051826	0,63020274	0,9630311	0,7381128	243500000
Q91VM9	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	Ppa2	1,125516	0,25282048	1,088443	0,52122561	76435000
Q8BKZ9	Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial	Pdhx	0,9957688	0,94774922	0,9900075	0,95760607	156500000
Q9QYR9	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial;Acyl-coenzyme A thioesterase 1	Acot2;Acot1	1,022205	0,83981374	0,9339022	0,51765128	206340000
Q9CQ54	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	Ndufc2	1,14053	0,20298529	0,9529655	0,65899811	153930000
P41216	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	Acs11	0,9385191	0,44288698	1,060714	0,64792731	1345800000
P20108	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	Prdx3	1,007736	0,94997227	1,030608	0,80224916	494480000
P50544	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acadvl	0,9566242	0,58860312	1,049162	0,70526613	2382900000
P04247	Myoglobin	Mb	1,185976	0,0978971	0,9699582	0,79378228	6659600000
Q8CHT0	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	Aldh4a1	1,071846	0,50554264	0,9332305	0,51292286	106690000
Q7TMF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	Ndufa12	0,9975964	0,96506361	0,9766855	0,84848475	300740000
P03911	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4	Mtnd4	1,087539	0,41914146	1,119075	0,40078128	58753000
Q9WUR2	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	Eci2	0,9763336	0,76482554	1,043646	0,73350208	69854000
Q61387	Cytochrome c oxidase subunit 7A-related protein, mitochondrial	Cox7a2l	0,9286269	0,37190219	0,6261289	2,40E-06	47942000
Q9DCM2	Glutathione S-transferase kappa 1	Gstk1	1,052979	0,62261067	1,066817	0,61867387	69086000
Q91ZA3	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	Pcca	0,9834834	0,83158317	0,9440799	0,59151169	139290000
P47934	Carnitine O-acetyltransferase	Crat	1,05562	0,60540157	0,9822198	0,893766	322030000
O35215	D-dopachrome decarboxylase	Ddt	1,078105	0,46984674	1,040987	0,7473046	42105000
P58281	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial;Dynamin-like 120 kDa protein, form S1	Opa1	0,9918635	0,91073767	1,016055	0,88187761	79049000
P70404	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma 1, mitochondrial	Idh3g	0,9463823	0,50385351	1,012734	0,90041059	680450000
Q91YT0	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	Ndufv1	0,9341461	0,41068907	0,9799751	0,87538037	1009900000
Q9DB20	ATP synthase subunit O, mitochondrial	Atp5o	0,9626162	0,6406042	1,118786	0,40181929	1275700000
Q63918	Serum deprivation-response protein	Sdpr	1,154231	0,16457522	0,9353479	0,52789278	15977000
O08756	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	Hsd17b10	0,9542457	0,56842866	1,037567	0,76522118	129820000
Q99K10	Aconitate hydratase, mitochondrial	Aco2	1,003077	0,98609215	1,084391	0,53872338	9922800000
P99029	Peroxisome protein 5, mitochondrial	Prdx5	0,9656875	0,66785133	1,106802	0,44651108	607530000
Q8BH59	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	Slc25a12	0,955725	0,58094328	1,016208	0,88102637	453840000
Q9CPQ8	ATP synthase subunit g, mitochondrial	Atp5l	0,889464	0,16043638	0,9390109	0,55422288	340620000
Q91WD5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	Ndufs2	0,9111902	0,26374623	1,041956	0,74226215	640440000
Q9D051	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	Pdhb	1,074109	0,49245169	1,035453	0,77639083	1199700000
P19783	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	Cox4i1	0,9123843	0,27043638	0,9197876	0,42256742	2161700000
Q8BWT1	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	Acaa2	1,08788	0,41737677	0,9936109	0,98709157	3068900000
Q61941	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	Nnt	0,9572569	0,59401625	0,9436905	0,58861435	1437100000
P00405	Cytochrome c oxidase subunit 2	Mtco2	1,118691	0,27834193	0,9532349	0,66108205	950370000
Q9Z2I8	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	Suclg2	0,908561	0,24939154	0,9520215	0,65171238	146950000
Q9DBL1	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acadslb	0,8912872	0,1677912	1,128624	0,36754906	74386000
Q99JY0	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial;3-ketoacyl-CoA thiolase	Hadhb	0,9902777	0,89571791	0,907462	0,34758072	2265600000
P97478	Ubiquinone biosynthesis protein COQ7 homolog	Coq7	0,8228272	0,01998798	1,072601	0,59164325	20213000
Q8BGH2	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	Samm50	0,9672228	0,68160756	0,9841581	0,9096543	211320000
P54071	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	Idh2	0,9938166	0,92924701	0,8870325	0,24157729	5814900000
Q9WTP6	Adenylate kinase 2, mitochondrial	Ak2	0,9251163	0,3483435	1,138462	0,33543285	40223000
Q8R111	Cytochrome b-c1 complex subunit 9	Uqcrc10	0,9035113	0,22326726	1,00666	0,93460312	371390000
Q9D172	ES1 protein homolog, mitochondrial	D10Jhu81e	0,9350051	0,41691312	0,8469515	0,10065621	729620000
Q9CQR4	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	Acot13	1,020849	0,84997055	0,9910867	0,96644398	266260000
Q9CXZ1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	Ndufs4	0,8998668	0,20558799	1,037804	0,76397528	297830000

# Anhang

Q8QZT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	Acat1	0,9515311	0,54575555		0,9971788	0,98860124		988110000
Q9CQJ8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	Ndufb9	0,9925554	0,91729429		1,015621	0,88429486		225000000
Q9ERS2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	Ndufa13	1,075289	0,48570639		0,9416769	0,57371602		268090000
Q9QXX4	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	Slc25a13	1,017346	0,876391		1,012569	0,90133437		144450000
Q9D6J6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	Ndufv2	0,9131055	0,27452897		1,042123	0,74139468		368200000
Q9D8B4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11	Ndufa11	1,017567	0,87471881		1,028894	0,81148146		166370000
P12787	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	Cox5a	0,9965916	0,95554551		0,9514734	0,64749389		1241300000
Q99MN9	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Pccb	1,086681	0,4235978		0,9242301	0,45149		97632000
Q8QZS1	3-hydroxyisobutryl-CoA hydrolase, mitochondrial	Hibch	0,9944973	0,93569868		1,047959	0,71137791		91974000
Q8R404	Protein QIL1	Qil1	0,8598247	0,07103008		0,9966962	0,99136692		39135000
P03921	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	Mtnd5	0,9642611	0,65515005		1,197035	0,18599264		129860000
Q8K4Z3	NAD(P)H-hydrate epimerase	Apoa1bp	1,020295	0,85413126		0,8414272	0,08758302		21346000
Q99MR8	Methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	Mccc1	1,13491	0,22065463		1,164588	0,26028221		125470000
Q99LC5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	Etfalpha	0,982741	0,82460853		0,9834898	0,90417493		2283600000
Q8BZF8	Phosphoglucomutase-like protein 5	Pgm5	1,178339	0,11139147		0,8821546	0,2197549		14588000
Q8K1Z0	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	Coq9	0,9379059	0,43829605		0,9275963	0,47403511		233300000
Q9CR21	Acyl carrier protein, mitochondrial	Ndufab1	1,129497	0,23877853		0,9633892	0,74097023		103440000
Q8BMS1	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	Hadha	0,9385297	0,44296663		0,9886736	0,94667642		3667700000
Q8JZN5	Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	Acad9	0,8916123	0,16912716		1,101827	0,46601		27282000
Q9Z2I0	LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial	Letm1	1,001734	0,99653726		1,089491	0,51675803		78347000
Q8CG76	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	Akr7a2	0,9409613	0,4614108		0,9350009	0,52542657		24233000
P47738	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	Aldh2	0,9264882	0,35744502		0,9497042	0,63393915		262110000
P00397	Cytochrome c oxidase subunit 1	Mtco1	0,8868787	0,15040427		0,9274555	0,47308164		249420000
Q9DCV4	Regulator of microtubule dynamics protein 1	Fam82b	0,7909873	0,00520098		1,399433	0,01463367		21467000
Q9CQ62	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	Decr1	0,9568303	0,59036388		0,9277216	0,47488439		614550000
Q8CIM3	D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial	D2hgdh	0,9081108	0,24698535		0,8919571	0,26497812		14141000
P45952	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acadm	0,9951354	0,9417468		0,9741552	0,82785318		1962500000
Q9CR61	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	Ndufb7	0,9417651	0,46758996		0,9801524	0,87683199		195450000
Q6P8J7	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Ckmt2	0,8978459	0,19620518		1,039485	0,75514862		3074700000
Q07417	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acads	0,9895138	0,88848654		1,078602	0,5643384		623870000
P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Atp5b	1,015272	0,89214444		1,114718	0,41662651		12888000000
Q06185	ATP synthase subunit e, mitochondrial	Atp5i	0,9215649	0,32541381		1,020314	0,85829341		512200000
Q9CZB0	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial	Sdhc	1,080472	0,45677627		0,9075358	0,34800572		110200000
P53395	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex	Dbt	1,107022	0,32633223		1,147519	0,30773901		24250000
Q922B1	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase MACROD1	MacroD1	1,049749	0,64400283		1,031675	0,7965246		166670000
P24472	Glutathione S-transferase A4	Gsta4	1,138135	0,21037341		0,5572679	3,58E-09	+	37870000
P50171	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	Hsd17b8	0,8130106	0,01355572		0,9570692	0,69095381		37210000
Q9CR62	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	Slc25a11	1,004789	0,97278861		1,030607	0,80225301		460430000
P85094	Isochorismatase domain-containing protein 2A, mitochondrial	Isoc2a	1,025198	0,8175325		1,175714	0,23254861		13858000
P03888	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	Mtnd1	0,9488793	0,52398887		1,073825	0,5860124		67823000
Q9D7B6	Isobutyryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acad8	0,8393238	0,0365009		0,9897608	0,95558459		27633000
P28650	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	Adss1	0,9384857	0,44263648		0,8628554	0,14641089		25596000
P50136	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial	Bckdha	1,061473	0,56819451		1,17776	0,22771425		44166000
Q9D6J5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial	Ndufb8	0,9597825	0,61581104		1,065241	0,62615559		337290000
Q9D6K8	FUN14 domain-containing protein 2	Fundc2	0,9228724	0,33374909		0,5504171	1,66E-09	+	15879000
O09111	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial	Ndufb11	0,9856769	0,85223591		0,997677	0,9857476		190080000
P17563	Selenium-binding protein 1;Selenium-binding protein 2	Selenbp1/2	1,112557	0,30287494		0,9902138	0,95929583		162490000
Q3UIU2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	Ndufb6	0,9129192	0,27346766		1,18792	0,20487365		71632000
Q9JLZ3	Methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial	Auh	0,962276	0,63760937		1,074237	0,58412293		78760000



Q9WVA2	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A	Timm8a1	0,9667698	0,67753972		1,529243	0,00209376	+	13938000
Q9CPV4	Glyoxalase domain-containing protein 4	Glod4	1,051322	0,63353969		1,27369	0,07721936		25790000
Q9DCZ4	Apolipoprotein O	ApoO	0,7710378	0,0019544	+	1,184479	0,21239264		69711000
P01865	Ig gamma-2A chain C region, membrane-bound form; Ig gamma-2A chain C region, A allele	Igh-1a:Ighg	0,9239287	0,34057404		2,041205	2,68E-07	+	73909000
P16332	Methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial	Mut	0,9636497	0,64973134		1,070417	0,60176975		60879000
Q3ULD5	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Mccc2	0,9863316	0,85841212		1,154639	0,28720314		29421000
Q61425	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	Hadh	1,104831	0,33597292		1,13861	0,33496503		411800000
Q8BW75	Amine oxidase [flavin-containing] B	Maob	0,9078655	0,24568079		1,09278	0,50289921		30985000
Q71RI9	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 3	Ccb12	1,00067	0,99414706		0,8324362	0,0691203		21800000
Q8BWF0	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	Aldh5a1	0,8977282	0,19566808		1,774378	3,45E-05	+	40840000
P56391	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	Cox6b1	0,8981217	0,19746829		0,8518403	0,11339894		621740000
Q9JHW2	Omega-amidase NIT2	Nit2	0,9037433	0,22442583		0,904769	0,33227461		17494000
Q8BGC4	Zinc-binding alcohol dehydrogenase domain-containing protein 2	Zadh2	0,9973029	0,96228448		0,9734466	0,82208668		24006000
Q8BK30	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial	Ndufv3	1,223177	0,05033293		1,306154	0,05149842		16786000
Q99KQ4	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	Nampt	0,9510854	0,542071		1,065139	0,62664184		50722000
Q9CRB8	Mitochondrial fission process protein 1	Mtfp1	1,109116	0,31731051		1,052157	0,69016288		45935000
Q9JK42	[Pyruvate dehydrogenase [lipoamide]] kinase isozyme 2, mitochondrial	Pdk2	1,057907	0,5907134		1,04306	0,73653357		44503000
Q8K2C6	NAD-dependent protein deacylase sirtuin-5, mitochondrial	Sirt5	1,205581	0,06945545		2,295864	2,14E-09	+	21598000
Q60936	Chaperone activity of bc1 complex-like, mitochondrial	Adck3	1,027335	0,80175364		0,9542565	0,66900279		84197000
Q80XN0	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	Bdh1	1,013679	0,90429667		1,224937	0,13687087		165220000
Q8R0F8	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial	Fahd1	1,170348	0,12715006		0,8590817	0,13440921		28417000
Q8K370	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10	Acad10	0,9628083	0,64229737		1,141889	0,32474327		48953000
Q9CPU4	Microsomal glutathione S-transferase 3	Mgst3	0,8824117	0,13414548		0,9568247	0,68903755		39245000
P63030	Brain protein 44-like protein	Brp44l	0,9273741	0,36339405		1,697524	0,00013117	+	100670000
P97450	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	Atp5j	1,39092	0,00131043	+	1,036759	0,76947968		187640000

**Tab. 7.2: CRP4-Proteom unter Basalbedingungen und nach 7-tägiger Ang II-Dauerinfusion.**

Auflistung der Mittelwerte aller mittels LC-MS/MS detektierten Proteine in Gesamtherzlysaten von CRP4-WT und CRP4-KO Herzen und der Signifikanzniveaus ( $*p < 0,05$ ) der entsprechend im CRP4-WT (Werte  $> 0$ ), bzw. CRP4-KO (Werte  $< 0$ ) Lysat angereicherten Proteine unter basalen ( $n=6$  pro Genotyp) und Ang II-stimulierten ( $n=6$  pro Genotyp) Bedingungen. Signifikant in CRP4-WT oder CRP4-KO Herzen angereicherte Proteinen repräsentieren somit CRP4-abhängig regulierte Proteine und sind entsprechend gekennzeichnet (+).

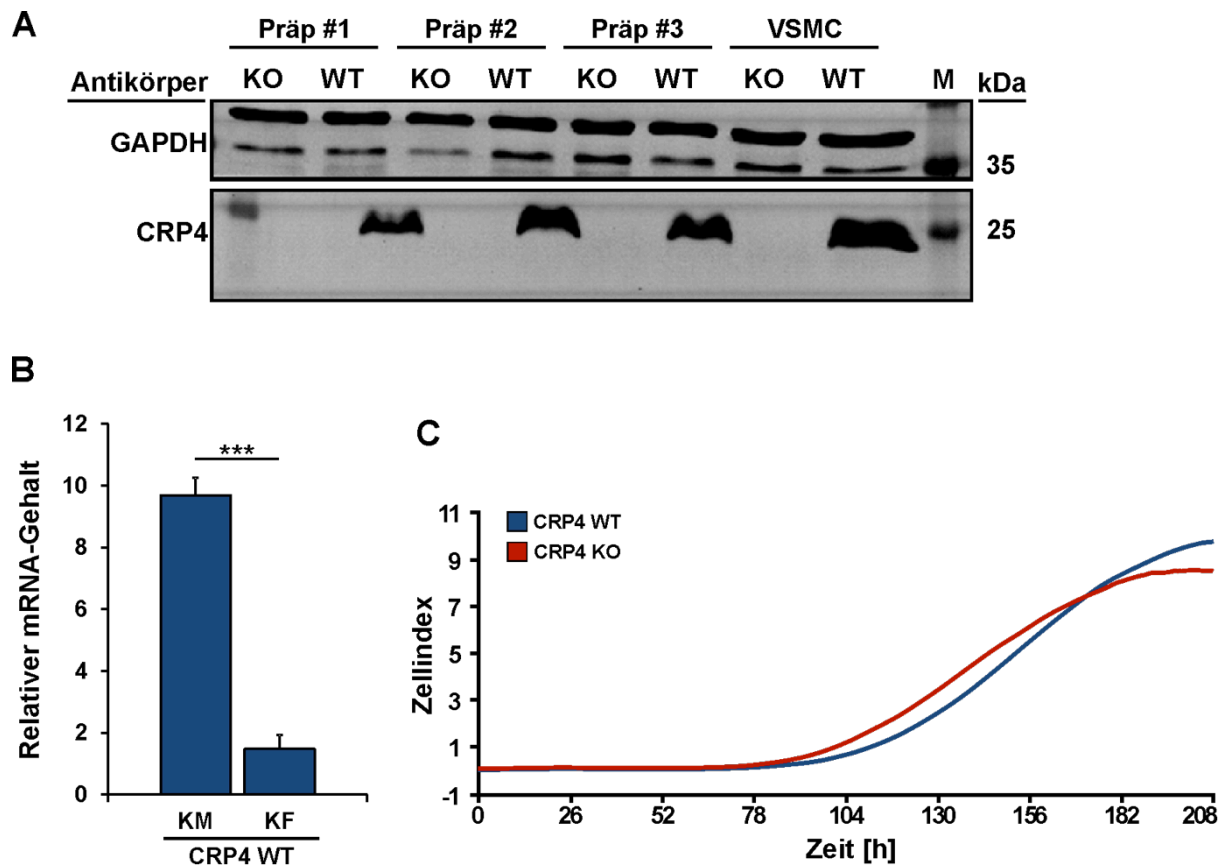
### 7.2.4 Analyse der HOCM-Symptomatik der CRP4-KO Tiere

Proband	gleichmäßiges hypertrophes Wachstum	hypertroph-obstruktives Wachstum	Anzeichen einer apikalen Dilatation
WT 7194	X		
WT 7191	X		X
WT 7170	X		
WT 7311	X		
WT 7298		X	X
WT 7324	X		
WT 7131	X		
WT 7056	X		X
KO 7189	X		X
KO 7193	X		
KO 7155	X		
KO 7058		X	X
KO 7065		X	X
KO 7299		X	X
KO 7167		X	X
KO 7319		X	X
KO 7108		X	X
KO 7283		X	X
KO 7284	X		X
KO 7148		X	

**Tab. 7.3: Beurteilung der HOCM-Symptomatik.**

Bei der echokardiographischen Untersuchung präsentierten sich vor allem CRP4-KO Herzen nach Ang II-Dauerinfusion mit einer Verdickung der basisnahen Ventrikelwände, ein typischer Indikator für das Krankheitsbild einer hypertroph-obstruktiven Kardiomyopathie (HOCM). Die Apex-nahen Regionen zeigten hierbei Anzeichen einer Dilatation (s. Abb. 4.50). Aus diesem Grund wurden alle echokardiographisch erhaltenen B-Mode Aufnahmen dieser Tiere auf Anzeichen eines bulbusnahen Muskelwulst und einer apikalen Dilatation untersucht und zusammengefasst.

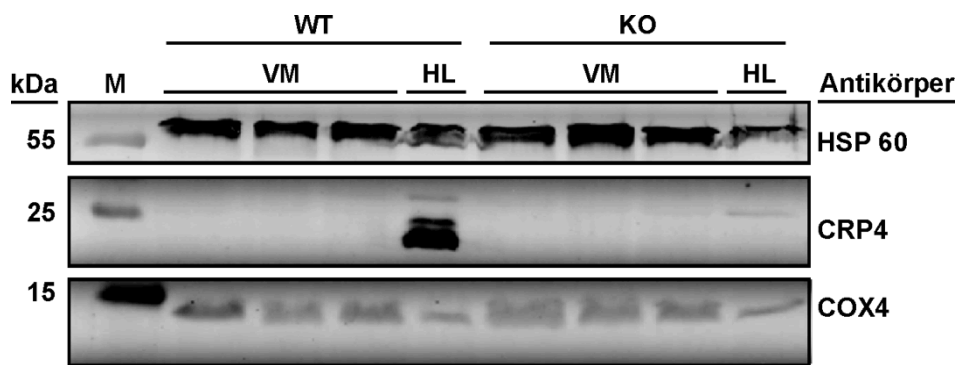
## 7.2.5 CRP4-Expression in kardialen Fibroblasten



**Abb. 7.5: Expressionsanalyse von CRP4 in kardialen Fibroblasten.**

(A) Western Blot-Analyse von kultivierten Fibroblasten aus jeweils n=3 Einzelpräparationen von CRP4-WT und CRP4-KO Herzen, die nach Erreichen einer 90%igen Konfluenz lysiert wurden. Als Positivkontrolle dienten Lysate von Glattmuskelzellen (VSMC, Huber et al. 2000). Erwartungsgemäß waren keine Signale in Proteinlysaten von CRP4-KO Fibroblasten detektierbar. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) diente als Ladungskontrolle. (B) mRNA-Analysen der CRP4-Expression nach Isolation von Kardiomyozyten (KM) und kardialen Fibroblasten (KF) nach Normierung auf HPRT zeigen eine um den Faktor 5 verstärkte Expression von CRP4 im Kardiomyozyt (\*\*p<0,001). (C) In präliminären Versuchen zum Proliferationsverhalten frisch isolierter kardialer Fibroblasten konnten keine Unterschiede zwischen CRP4-WT (blau) und CRP4-KO (rot) beobachtet werden. Grundlage dieses Versuchs war eine Impedanzmessung mit Hilfe des xCELLigence-Systems (Roche).

### 7.2.6 CRP4 wird nicht in Mitochondrien exprimiert



**Abb. 7.6: CRP4 ist in Mitochondrien nicht detektierbar.**

Repräsentativer Western Blot von isolierten Mitochondrien aus Gesamtherzen von je n=3 CRP4-WT und CRP4-KO Mäusen. CRP4 war in den mitochondrialen Fraktionen nicht detektierbar (mittlerer Blot). HSP 60 (oberer Blot) und Cox4 (unterer Blot) wurden als Marker für Mitochondrien verwendet. Erwartungsgemäß wurde CRP4 nur im Gesamtherzlysät von CRP4-WT Mäusen detektiert (VM: Ventrikuläre Mitochondrien; HL: Gesamtherzlysät). Der Versuch wurde freundlicherweise von Angelina Kniess durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adamo, C. M., Dai, D. F., Percival, J. M., Minami, E., Willis, M. S., Patrucco, E., Froehner, S. C. and Beavo, J. A. (2010). "Sildenafil reverses cardiac dysfunction in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A 107(44): 19079-19083.
- Adams, J., Kelso, R. and Cooley, L. (2000). "The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function." Trends Cell Biol 10(1): 17-24.
- Ahmed, S. H., Clark, L. L., Pennington, W. R., Webb, C. S., Bonnema, D. D., Leonardi, A. H., McClure, C. D., Spinale, F. G. and Zile, M. R. (2006). "Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease." Circulation 113(17): 2089-2096.
- Ainscough, J. F., Drinkhill, M. J., Sedo, A., Turner, N. A., Brooke, D. A., Balmforth, A. J. and Ball, S. G. (2009). "Angiotensin II type-1 receptor activation in the adult heart causes blood pressure-independent hypertrophy and cardiac dysfunction." Cardiovasc Res 81(3): 592-600.
- Akazawa, H. and Komuro, I. (2003). "Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy." Circ Res 92(10): 1079-1088.
- Alcalai, R., Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (2008). "Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics." J Cardiovasc Electrophysiol 19(1): 104-110.
- Aljabri, M. B., Songstad, N. T., Lund, T., Serrano, M. C., Andreasen, T. V., Al-Saad, S., Lindal, S., Sitras, V., Acharya, G. and Ytrehus, K. (2011). "Pregnancy protects against antiangiogenic and fibrogenic effects of angiotensin II in rat hearts." Acta Physiol (Oxf) 201(4): 445-456.
- Andersen, M. J., Ersboll, M., Axelsson, A., Gustafsson, F., Hassager, C., Kober, L., Borlaug, B. A., Boesgaard, S., Skovgaard, L. T. and Moller, J. E. (2013). "Sildenafil and diastolic dysfunction after acute myocardial infarction in patients with preserved ejection fraction: the Sildenafil and Diastolic Dysfunction After Acute Myocardial Infarction (SIDAMI) trial." Circulation 127(11): 1200-1208.
- Anderson, M. E. (2005). "Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias." Pharmacol Ther 106(1): 39-55.
- Annexstad, E. J., Lund-Petersen, I. and Rasmussen, M. (2014). "Duchenne muscular dystrophy." Tidsskr Nor Laegeforen 134(14): 1361-1364.
- Antoons, G., Vangheluwe, P., Volders, P. G., Bito, V., Holemans, P., Ceci, M., Wuytack, F., Caroni, P., Mubagwa, K. and Sipido, K. R. (2006). "Increased phospholamban phosphorylation limits the force-frequency response in the MLP-/- mouse with heart failure." J Mol Cell Cardiol 40(3): 350-360.
- Antos, C. L., Frey, N., Marx, S. O., Reiken, S., Gaburjakova, M., Richardson, J. A., Marks, A. R. and Olson, E. N. (2001). "Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a." Circ Res 89(11): 997-1004.
- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O. and Caroni, P. (1998). "Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase." Nature 393(6687): 805-809.
- Arber, S., Halder, G. and Caroni, P. (1994). "Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation." Cell 79(2): 221-231.
- Arber, S., Hunter, J. J., Ross, J., Jr., Hongo, M., Sansig, G., Borg, J., Perriard, J. C., Chien, K. R. and Caroni, P. (1997). "MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure." Cell 88(3): 393-403.
- Axelsson, A., Iversen, K., Vejlstrop, N., Ho, C., Norsk, J., Langhoff, L., Ahtarovski, K., Corell, P., Havndrup, O., Jensen, M. and Bundgaard, H. (2015). "Efficacy and safety of the angiotensin II receptor blocker losartan for hypertrophic cardiomyopathy: the INHERIT randomised, double-blind, placebo-controlled trial." Lancet Diabetes Endocrinol 3(2): 123-131.

## Literaturverzeichnis

---

- Bach, I. (2000). "The LIM domain: regulation by association." Mech Dev 91(1-2): 5-17.
- Balakumar, P. and Jagadeesh, G. (2014). "A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology." Cell Signal 26(10): 2147-2160.
- Balakumar, P., Singh, A. P., Ganti, S. S., Krishan, P., Ramasamy, S. and Singh, M. (2008). "Resident cardiac mast cells: are they the major culprit in the pathogenesis of cardiac hypertrophy?" Basic Clin Pharmacol Toxicol 102(1): 5-9.
- Balligand, J. L. and Hammond, J. (2013). "Protein kinase G type I in cardiac myocytes: unmasked at last?" Eur Heart J 34(16): 1181-1185.
- Banerjee, I., Fuseler, J. W., Price, R. L., Borg, T. K. and Baudino, T. A. (2007). "Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse." Am J Physiol Heart Circ Physiol 293(3): H1883-1891.
- Barefield, D. and Sadayappan, S. (2010). "Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease." J Mol Cell Cardiol 48(5): 866-875.
- Barry, S. P., Davidson, S. M. and Townsend, P. A. (2008). "Molecular regulation of cardiac hypertrophy." Int J Biochem Cell Biol 40(10): 2023-2039.
- Baumhoer, D., Elsner, M., Smida, J., Zillmer, S., Rauser, S., Schoene, C., Balluff, B., Bielack, S., Jundt, G., Walch, A. and Nathrath, M. (2011). "CRIP1 expression is correlated with a favorable outcome and less metastases in osteosarcoma patients." Oncotarget 2(12): 970-975.
- Beckerle, M. C. (1997). "Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion." Bioessays 19(11): 949-957.
- Beltrami, A. P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C. A. and Anversa, P. (2001). "Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction." N Engl J Med 344(23): 1750-1757.
- Bender, A. T. and Beavo, J. A. (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use." Pharmacol Rev 58(3): 488-520.
- Berk, B. C., Fujiwara, K. and Lehoux, S. (2007). "ECM remodeling in hypertensive heart disease." J Clin Invest 117(3): 568-575.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Lipp, P. (1998). "Calcium--a life and death signal." Nature 395(6703): 645-648.
- Bers, D. M. (2000). "Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction." Circ Res 87(4): 275-281.
- Bice, J. S., Keim, Y., Stasch, J. P. and Baxter, G. F. (2014). "NO-independent stimulation or activation of soluble guanylyl cyclase during early reperfusion limits infarct size." Cardiovasc Res 101(2): 220-228.
- Biel, M., Sautter, A., Ludwig, A., Hofmann, F. and Zong, X. (1998). "Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 358(1): 140-144.
- Birkenmeier, E. H. and Gordon, J. I. (1986). "Developmental regulation of a gene that encodes a cysteine-rich intestinal protein and maps near the murine immunoglobulin heavy chain locus." Proc Natl Acad Sci U S A 83(8): 2516-2520.
- Blankenburg, R., Hackert, K., Wurster, S., Deenen, R., Seidman, J. G., Seidman, C. E., Lohse, M. J. and Schmitt, J. P. (2014). "beta-Myosin heavy chain variant Val606Met causes very mild hypertrophic cardiomyopathy in mice, but exacerbates HCM phenotypes in mice carrying other HCM mutations." Circ Res 115(2): 227-237.
- Boateng, S. Y., Belin, R. J., Geenen, D. L., Margulies, K. B., Martin, J. L., Hoshijima, M., de Tombe, P. P. and Russell, B. (2007). "Cardiac dysfunction and heart failure are associated with abnormalities in the subcellular distribution and amounts of oligomeric muscle LIM protein." Am J Physiol Heart Circ Physiol 292(1): H259-269.
- Boateng, S. Y., Senyo, S. E., Qi, L., Goldspink, P. H. and Russell, B. (2009). "Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein." J Mol Cell Cardiol 47(4): 426-435.

- Boldt, K., Mans, D. A., Won, J., van Reeuwijk, J., Vogt, A., Kinkl, N., Letteboer, S. J., Hicks, W. L., Hurd, R. E., Naggert, J. K., Texier, Y., den Hollander, A. I., Koenekoop, R. K., Bennett, J., Cremers, F. P., Gloeckner, C. J., Nishina, P. M., Roepman, R. and Ueffing, M. (2011). "Disruption of intraflagellar protein transport in photoreceptor cilia causes Leber congenital amaurosis in humans and mice." *J Clin Invest* 121(6): 2169-2180.
- Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J. and Cohen, R. A. (1994). "Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle." *Nature* 368(6474): 850-853.
- Boolell, M., Gepi-Attee, S., Gingell, J. C. and Allen, M. J. (1996). "Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction." *Br J Urol* 78(2): 257-261.
- Booz, G. W. (2005). "Putting the brakes on cardiac hypertrophy: exploiting the NO-cGMP counter-regulatory system." *Hypertension* 45(3): 341-346.
- Booz, G. W. and Baker, K. M. (1996). "The role of the renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiac remodeling." *Blood Press Suppl* 2: 10-18.
- Borbely, A., Falcao-Pires, I., van Heerebeek, L., Hamdani, N., Edes, I., Gavina, C., Leite-Moreira, A. F., Bronzwaer, J. G., Papp, Z., van der Velden, J., Stienen, G. J. and Paulus, W. J. (2009). "Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium." *Circ Res* 104(6): 780-786.
- Borgdorff, M. A., Bartelds, B., Dickinson, M. G., van Wiechen, M. P., Steendijk, P., de Vroomen, M. and Berger, R. M. (2014). "Sildenafil treatment in established right ventricular dysfunction improves diastolic function and attenuates interstitial fibrosis independent from afterload." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307(3): H361-369.
- Borlaug, B. A., Melenovsky, V., Marhin, T., Fitzgerald, P. and Kass, D. A. (2005). "Sildenafil inhibits beta-adrenergic-stimulated cardiac contractility in humans." *Circulation* 112(17): 2642-2649.
- Bos, J. M., Will, M. L., Gersh, B. J., Kruisselbrink, T. M., Ommen, S. R. and Ackerman, M. J. (2014). "Characterization of a phenotype-based genetic test prediction score for unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy." *Mayo Clin Proc* 89(6): 727-737.
- Bosman, F. T. and Stamenkovic, I. (2003). "Functional structure and composition of the extracellular matrix." *J Pathol* 200(4): 423-428.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brady, A. J., Warren, J. B., Poole-Wilson, P. A., Williams, T. J. and Harding, S. E. (1993). "Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction." *Am J Physiol* 265(1 Pt 2): H176-182.
- Braunwald, E. (2014). "The war against heart failure: the Lancet lecture." *Lancet*.
- Brigstock, D. R. (2010). "Connective tissue growth factor (CCN2, CTGF) and organ fibrosis: lessons from transgenic animals." *J Cell Commun Signal* 4(1): 1-4.
- Brodde, O. E. and Michel, M. C. (1999). "Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart." *Pharmacol Rev* 51(4): 651-690.
- Brown, R. L., Strassmaier, T., Brady, J. D. and Karpen, J. W. (2006). "The pharmacology of cyclic nucleotide-gated channels: emerging from the darkness." *Curr Pharm Des* 12(28): 3597-3613.
- Bueno, O. F., Wilkins, B. J., Tymitz, K. M., Glascock, B. J., Kimball, T. F., Lorenz, J. N. and Molkentin, J. D. (2002). "Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta<sup>-</sup>deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4586-4591.
- Buitrago, M., Lorenz, K., Maass, A. H., Oberdorf-Maass, S., Keller, U., Schmitteckert, E. M., Ivashchenko, Y., Lohse, M. J. and Engelhardt, S. (2005). "The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy." *Nat Med* 11(8): 837-844.
- Burkhardt, M., Glazova, M., Gambaryan, S., Vollkommer, T., Butt, E., Bader, B., Heermeier, K., Lincoln, T. M., Walter, U. and Palmethofer, A. (2000). "KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity in vitro but not in intact human platelets and rat mesangial cells." *J Biol Chem* 275(43): 33536-33541.

## Literaturverzeichnis

---

- Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Matsuda, N., Nishi, M., Hwang, M., Ko, J. K., Lin, P., Thornton, A., Zhao, X., Pan, Z., Komazaki, S., Brotto, M., Takeshima, H. and Ma, J. (2009). "MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery." Nat Cell Biol 11(1): 56-64.
- Cai, C. L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P. H., Pfaff, S. L., Chen, J. and Evans, S. (2003). "Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart." Dev Cell 5(6): 877-889.
- Calaghan, S. C. and White, E. (1999). "The role of calcium in the response of cardiac muscle to stretch." Prog Biophys Mol Biol 71(1): 59-90.
- Calderone, A., Thaik, C. M., Takahashi, N., Chang, D. L. and Colucci, W. S. (1998). "Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts." J Clin Invest 101(4): 812-818.
- Calvieri, C., Rubattu, S. and Volpe, M. (2012). "Molecular mechanisms underlying cardiac antihypertrophic and antifibrotic effects of natriuretic peptides." J Mol Med (Berl) 90(1): 5-13.
- Cappola, T. P. (2008). "Molecular remodeling in human heart failure." J Am Coll Cardiol 51(2): 137-138.
- Carabello, B. A. (1995). "The relationship of left ventricular geometry and hypertrophy to left ventricular function in valvular heart disease." J Heart Valve Dis 4 Suppl 2: S132-138; discussion S138-139.
- 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. (2002). "Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function." Mol Cell Biol 22(12): 4124-4135.
- Carreno, J. E., Apablaza, F., Ocaranza, M. P. and Jalil, J. E. (2006). "[Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]." Rev Esp Cardiol 59(5): 473-486.
- Castro, L. R., Verde, I., Cooper, D. M. and Fischmeister, R. (2006). "Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes." Circulation 113(18): 2221-2228.
- Cawley, S. M., Kolodziej, S., Ichinose, F., Brouckaert, P., Buys, E. S. and Bloch, K. D. (2011). "sGC $\alpha$ 1 mediates the negative inotropic effects of NO in cardiac myocytes independent of changes in calcium handling." Am J Physiol Heart Circ Physiol 301(1): H157-163.
- Chan, N. Y., Seyedi, N., Takano, K. and Levi, R. (2012). "An unsuspected property of natriuretic peptides: promotion of calcium-dependent catecholamine release via protein kinase G-mediated phosphodiesterase type 3 inhibition." Circulation 125(2): 298-307.
- Chang, D. F., Belaguli, N. S., Iyer, D., Roberts, W. B., Wu, S. P., Dong, X. R., Marx, J. G., Moore, M. S., Beckerle, M. C., Majesky, M. W. and Schwartz, R. J. (2003). "Cysteine-rich LIM-only proteins CRP1 and CRP2 are potent smooth muscle differentiation cofactors." Dev Cell 4(1): 107-118.
- Chang, K. W., Yang, P. Y., Lai, H. Y., Yeh, T. S., Chen, T. C. and Yeh, C. T. (2006). "Identification of a novel actin isoform in hepatocellular carcinoma." Hepatol Res 36(1): 33-39.
- Charron, F., Paradis, P., Bronchain, O., Nemer, G. and Nemer, M. (1999). "Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression." Mol Cell Biol 19(6): 4355-4365.
- Chen, M. M., Lam, A., Abraham, J. A., Schreiner, G. F. and Joly, A. H. (2000). "CTGF expression is induced by TGF- $\beta$  in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis." J Mol Cell Cardiol 32(10): 1805-1819.
- Chiao, Y. A., Ramirez, T. A., Zamilpa, R., Okoronkwo, S. M., Dai, Q., Zhang, J., Jin, Y. F. and Lindsey, M. L. (2012). "Matrix metalloproteinase-9 deletion attenuates myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in ageing mice." Cardiovasc Res 96(3): 444-455.
- Chiu, C., Bagnall, R. D., Ingles, J., Yeates, L., Kennerson, M., Donald, J. A., Jormakka, M., Lind, J. M. and Semsarian, C. (2010). "Mutations in alpha-actinin-2 cause hypertrophic cardiomyopathy: a genome-wide analysis." J Am Coll Cardiol 55(11): 1127-1135.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (2006). "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on." Nat Protoc 1(2): 581-585.



- Chowdhury, D., Tangutur, A. D., Khatua, T. N., Saxena, P., Banerjee, S. K. and Bhadra, M. P. (2013). "A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy: prohibitin identified as a potential biomarker in rats." *J Transl Med* 11: 130.
- Chung, E. and Leinwand, L. A. (2014). "Pregnancy as a cardiac stress model." *Cardiovasc Res* 101(4): 561-570.
- Citro, R., d'Avenia, M., De Marco, M., Giudice, R., Mirra, M., Ravera, A., Silverio, A., Farina, R., Silvestri, F., Gravina, P., Villa, F., Puca, A. A., De Windt, L., De Laurenzi, V., Bossone, E., Turco, M. C. and Piscione, F. (2013). "Polymorphisms of the antiapoptotic protein bag3 may play a role in the pathogenesis of tako-tsubo cardiomyopathy." *Int J Cardiol* 168(2): 1663-1665.
- Clark, L. C., Jr., Wolf, R., Granger, D. and Taylor, Z. (1953). "Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography." *J Appl Physiol* 6(3): 189-193.
- Clucas, J. and Valderrama, F. (2014). "ERM proteins in cancer progression." *J Cell Sci* 127(Pt 2): 267-275.
- Colucci, W. S. (1997). "Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure." *Am J Cardiol* 80(11A): 15L-25L.
- Conti, M., Mika, D. and Richter, W. (2014). "Cyclic AMP compartments and signaling specificity: role of cyclic nucleotide phosphodiesterases." *J Gen Physiol* 143(1): 29-38.
- Corbin, J., Rannels, S., Neal, D., Chang, P., Grimes, K., Beasley, A. and Francis, S. (2003). "Sildenafil citrate does not affect cardiac contractility in human or dog heart." *Curr Med Res Opin* 19(8): 747-752.
- Cousins, R. J. and Lanningham-Foster, L. (2000). "Regulation of cysteine-rich intestinal protein, a zinc finger protein, by mediators of the immune response." *J Infect Dis* 182 Suppl 1: S81-84.
- Cowling, B. S., Cottle, D. L., Wilding, B. R., D'Arcy, C. E., Mitchell, C. A. and McGrath, M. J. (2011). "Four and a half LIM protein 1 gene mutations cause four distinct human myopathies: a comprehensive review of the clinical, histological and pathological features." *Neuromuscul Disord* 21(4): 237-251.
- Cox, G. F. and Kunkel, L. M. (1997). "Dystrophies and heart disease." *Curr Opin Cardiol* 12(3): 329-343.
- Craparo, A., Freund, R. and Gustafson, T. A. (1997). "14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner." *J Biol Chem* 272(17): 11663-11669.
- Crawford, D. C., Chobanian, A. V. and Brecher, P. (1994). "Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat." *Circ Res* 74(4): 727-739.
- Cremers, B., Scheler, M., Maack, C., Wendler, O., Schafers, H. J., Sudkamp, M. and Bohm, M. (2003). "Effects of sildenafil (viagra) on human myocardial contractility, in vitro arrhythmias, and tension of internal mammaria arteries and saphenous veins." *J Cardiovasc Pharmacol* 41(5): 734-743.
- Crowley, S. D., Gurley, S. B., Herrera, M. J., Ruiz, P., Griffiths, R., Kumar, A. P., Kim, H. S., Smithies, O., Le, T. H. and Coffman, T. M. (2006). "Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(47): 17985-17990.
- Curran, J., Hinton, M. J., Rios, E., Bers, D. M. and Shannon, T. R. (2007). "Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase." *Circ Res* 100(3): 391-398.
- Cutroneo, G., Lentini, S., Favalaro, A., Anastasi, G. and Di Mauro, D. (2012). "Costameric proteins: from benchside to future translational cardiovascular research." *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 61(1): 55-60.
- Cygnar, K. D. and Zhao, H. (2009). "Phosphodiesterase 1C is dispensable for rapid response termination of olfactory sensory neurons." *Nat Neurosci* 12(4): 454-462.
- D'Angelo, D. D., Sakata, Y., Lorenz, J. N., Boivin, G. P., Walsh, R. A., Liggett, S. B. and Dorn, G. W., 2nd (1997). "Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(15): 8121-8126.
- Dahlof, B. (1995). "Effect of angiotensin II blockade on cardiac hypertrophy and remodelling: a review." *J Hum Hypertens* 9 Suppl 5: S37-44.

## Literaturverzeichnis

---

- Dahlof, B., Devereux, R., de Faire, U., Fyhrquist, F., Hedner, T., Ibsen, H., Julius, S., Kjeldsen, S., Kristianson, K., Lederballe-Pedersen, O., Lindholm, L. H., Nieminen, M. S., Omvik, P., Oparil, S. and Wedel, H. (1997). "The Losartan Intervention For Endpoint reduction (LIFE) in Hypertension study: rationale, design, and methods. The LIFE Study Group." *Am J Hypertens* 10(7 Pt 1): 705-713.
- Das, A., Xi, L. and Kukreja, R. C. (2005). "Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling." *J Biol Chem* 280(13): 12944-12955.
- Dawid, I. B., Breen, J. J. and Toyama, R. (1998). "LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions." *Trends Genet* 14(4): 156-162.
- De Heer, E., Sijpkens, Y. W., Verkade, M., den Dulk, M., Langers, A., Schutrups, J., Bruijn, J. A. and van Es, L. A. (2000). "Morphometry of interstitial fibrosis." *Nephrol Dial Transplant* 15 Suppl 6: 72-73.
- de Ligst, R. A., Kourounakis, A. P. and AP, I. J. (2000). "Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery." *Br J Pharmacol* 130(1): 1-12.
- Degen, C. V., Bishu, K., Zakeri, R., Ogut, O., Redfield, M. M. and Brozovich, F. V. (2015). "The Emperor's New Clothes: PDE5 and the Heart." *PLoS One* 10(3): e0118664.
- Degerman, E., Belfrage, P. and Manganiello, V. C. (1997). "Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3)." *J Biol Chem* 272(11): 6823-6826.
- Denninger, J. W. and Marletta, M. A. (1999). "Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway." *Biochim Biophys Acta* 1411(2-3): 334-350.
- Depre, C., Vanoverschelde, J. L. and Taegtmeyer, H. (1999). "Glucose for the heart." *Circulation* 99(4): 578-588.
- Deruelle, P., Balasubramaniam, V., Kunig, A. M., Seedorf, G. J., Markham, N. E. and Abman, S. H. (2006). "BAY 41-2272, a direct activator of soluble guanylate cyclase, reduces right ventricular hypertrophy and prevents pulmonary vascular remodeling during chronic hypoxia in neonatal rats." *Biol Neonate* 90(2): 135-144.
- Dickstein, K., Cohen-Solal, A., Filippatos, G., McMurray, J. J., Ponikowski, P., Poole-Wilson, P. A., Stromberg, A., van Veldhuisen, D. J., Atar, D., Hoes, A. W., Keren, A., Mebazaa, A., Nieminen, M., Priori, S. G., Swedberg, K. and Guidelines, E. S. C. C. f. P. (2008). "ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)." *Eur J Heart Fail* 10(10): 933-989.
- Dixon, J. and Dixon, M. J. (2004). "Genetic background has a major effect on the penetrance and severity of craniofacial defects in mice heterozygous for the gene encoding the nucleolar protein Treacle." *Dev Dyn* 229(4): 907-914.
- Dizayee, S., Kaestner, S., Kuck, F., Hein, P., Klein, C., Piekorz, R. P., Meszaros, J., Matthes, J., Bjrnbaumer, L., Nurnberg, B. and Herzig, S. (2011). "Galphai2- and Galphai3-specific regulation of voltage-dependent L-type calcium channels in cardiomyocytes." *PLoS One* 6(9): e24979.
- Domes, K., Patrucco, E., Loga, F., Dietrich, A., Birnbaumer, L., Wegener, J. W. and Hofmann, F. (2014). "Murine cardiac growth, TRPC channels, and cGMP kinase I." *Pflugers Arch*.
- Dorn, G. W., 2nd (2007). "The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy." *Hypertension* 49(5): 962-970.
- Doskeland, S. O., Ogreid, D., Ekanger, R., Sturm, P. A., Miller, J. P. and Suva, R. H. (1983). "Mapping of the two intrachain cyclic nucleotide binding sites of adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase I." *Biochemistry* 22(5): 1094-1101.
- Dunn, A. Y., Melville, M. W. and Frydman, J. (2001). "Review: cellular substrates of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT." *J Struct Biol* 135(2): 176-184.
- Ecarnot-Laubriet, A., De Luca, K., Vandroux, D., Moisant, M., Bernard, C., Assem, M., Rochette, L. and Teyssier, J. R. (2000). "Downregulation and nuclear relocation of MLP during the progression of right ventricular hypertrophy induced by chronic pressure overload." *J Mol Cell Cardiol* 32(12): 2385-2395.

- Edwards, D. C. and Gill, G. N. (1999). "Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton." *J Biol Chem* 274(16): 11352-11361.
- Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kuhl, U., Maisch, B., McKenna, W. J., Monserrat, L., Pankuweit, S., Rapezzi, C., Seferovic, P., Tavazzi, L. and Keren, A. (2008). "Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases." *Eur Heart J* 29(2): 270-276.
- Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F. and Lohse, M. J. (1999). "Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12): 7059-7064.
- Erdmann, J., Stark, K., Esslinger, U. B., Rumpf, P. M., Koesling, D., de Wit, C., Kaiser, F. J., Braunholz, D., Medack, A., Fischer, M., Zimmermann, M. E., Tennstedt, S., Graf, E., Eck, S., Aherrahrou, Z., Nahrstaedt, J., Willenborg, C., Bruse, P., Braenne, I., Nothen, M. M., Hofmann, P., Braund, P. S., Mergia, E., Reinhard, W., Burgdorf, C., Schreiber, S., Balmforth, A. J., Hall, A. S., Bertram, L., Steinhagen-Thiessen, E., Li, S. C., Marz, W., Reilly, M., Kathiresan, S., McPherson, R., Walter, U., CardioGram, Ott, J., Samani, N. J., Strom, T. M., Meitinger, T., Hengstenberg, C. and Schunkert, H. (2013). "Dysfunctional nitric oxide signalling increases risk of myocardial infarction." *Nature* 504(7480): 432-436.
- Eriksson, J. E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H. M. and Goldman, R. D. (2009). "Introducing intermediate filaments: from discovery to disease." *J Clin Invest* 119(7): 1763-1771.
- Eschenhagen, T., Mende, U., Nose, M., Schmitz, W., Scholz, H., Haverich, A., Hirt, S., Doring, V., Kalmar, P., Hoppner, W. and et al. (1992). "Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein alpha subunit Gi alpha-2 in human end-stage heart failure." *Circ Res* 70(4): 688-696.
- Evgenov, O. V., Pacher, P., Schmidt, P. M., Hasko, G., Schmidt, H. H. and Stasch, J. P. (2006). "NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential." *Nat Rev Drug Discov* 5(9): 755-768.
- Feil, S., Zimmermann, P., Knorn, A., Brummer, S., Schlossmann, J., Hofmann, F. and Feil, R. (2005). "Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina." *Neuroscience* 135(3): 863-868.
- Feldman, A. M., Li, Y. Y. and McTiernan, C. F. (2001). "Matrix metalloproteinases in pathophysiology and treatment of heart failure." *Lancet* 357(9257): 654-655.
- Ferdinandy, P., Schulz, R. and Baxter, G. F. (2007). "Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning." *Pharmacol Rev* 59(4): 418-458.
- Fiedler, B., Lohmann, S. M., Smolenski, A., Linnemuller, S., Pieske, B., Schroder, F., Molkentin, J. D., Drexler, H. and Wollert, K. C. (2002). "Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17): 11363-11368.
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J. and Zeller, R. (2008). "Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections." *CSH Protoc* 2008: pdb prot4986.
- Fischer, P. and Hilfiker-Kleiner, D. (2007). "Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT axis." *Basic Res Cardiol* 102(5): 393-411.
- Fischmeister, R., Castro, L. R., Abi-Gerges, A., Rochais, F., Jurevicius, J., Leroy, J. and Vandecasteele, G. (2006). "Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases." *Circ Res* 99(8): 816-828.
- Fisher, D. A., Smith, J. F., Pillar, J. S., St Denis, S. H. and Cheng, J. B. (1998). "Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase." *J Biol Chem* 273(25): 15559-15564.
- Flaherty, M. P., Brown, M., Grupp, I. L., Schultz, J. E., Murphree, S. S. and Jones, W. K. (2007). "eNOS deficient mice develop progressive cardiac hypertrophy with altered cytokine and calcium handling protein expression." *Cardiovasc Toxicol* 7(3): 165-177.
- Flora, D. R. and Potter, L. R. (2010). "Prolonged atrial natriuretic peptide exposure stimulates guanylyl cyclase-a degradation." *Endocrinology* 151(6): 2769-2776.

## Literaturverzeichnis

---

- Foller, M., Feil, S., Ghoreschi, K., Koka, S., Gerling, A., Thunemann, M., Hofmann, F., Schuler, B., Vogel, J., Pichler, B., Kasinathan, R. S., Nicolay, J. P., Huber, S. M., Lang, F. and Feil, R. (2008). "Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A 105(18): 6771-6776.
- Fraccarollo, D., Galuppo, P., Motschenbacher, S., Ruetten, H., Schafer, A. and Bauersachs, J. (2014). "Soluble guanylyl cyclase activation improves progressive cardiac remodeling and failure after myocardial infarction. Cardioprotection over ACE inhibition." Basic Res Cardiol 109(4): 421.
- Frank, D., Kuhn, C., Brors, B., Hanselmann, C., Ludde, M., Katus, H. A. and Frey, N. (2008). "Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program." Hypertension 51(2): 309-318.
- Frantz, S., Klaiber, M., Baba, H. A., Oberwinkler, H., Volker, K., Gabetaner, B., Bayer, B., Abebetaer, M., Schuh, K., Feil, R., Hofmann, F. and Kuhn, M. (2013). "Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I." Eur Heart J 34(16): 1233-1244.
- Fredj, S., Bescond, J., Louault, C. and Potreau, D. (2005). "Interactions between cardiac cells enhance cardiomyocyte hypertrophy and increase fibroblast proliferation." J Cell Physiol 202(3): 891-899.
- French, P. J., Bijman, J., Edixhoven, M., Vaandrager, A. B., Scholte, B. J., Lohmann, S. M., Nairn, A. C. and de Jonge, H. R. (1995). "Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II." J Biol Chem 270(44): 26626-26631.
- Frey, N., Katus, H. A., Olson, E. N. and Hill, J. A. (2004). "Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?" Circulation 109(13): 1580-1589.
- Frey, N., McKinsey, T. A. and Olson, E. N. (2000). "Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function." Nat Med 6(11): 1221-1227.
- Frey, N. and Olson, E. N. (2003). "Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly." Annu Rev Physiol 65: 45-79.
- Freyd, G., Kim, S. K. and Horvitz, H. R. (1990). "Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*." Nature 344(6269): 876-879.
- Frezza, C., Cipolat, S. and Scorrano, L. (2007). "Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts." Nat Protoc 2(2): 287-295.
- Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A. and Koesling, D. (2007). "Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A 104(18): 7699-7704.
- Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature 288(5789): 373-376.
- Fyhrquist, F., Metsarinne, K. and Tikkanen, I. (1995). "Role of angiotensin II in blood pressure regulation and in the pathophysiology of cardiovascular disorders." J Hum Hypertens 9 Suppl 5: S19-24.
- Galie, N., Muller, K., Scalise, A. V. and Grunig, E. (2015). "PATENT PLUS: a blinded, randomised and extension study of riociguat plus sildenafil in PAH." Eur Respir J.
- Gamm, D. M., Francis, S. H., Angelotti, T. P., Corbin, J. D. and Uhler, M. D. (1995). "The type II isoform of cGMP-dependent protein kinase is dimeric and possesses regulatory and catalytic properties distinct from the type I isoforms." J Biol Chem 270(45): 27380-27388.
- Garbers, D. L., Koesling, D. and Schultz, G. (1994). "Guanylyl cyclase receptors." Mol Biol Cell 5(1): 1-5.
- Garcia-Castro, M., Coto, E., Reguero, J. R., Berrazueta, J. R., Alvarez, V., Alonso, B., Sainz, R., Martin, M. and Moris, C. (2009). "[Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy]." Rev Esp Cardiol 62(1): 48-56.
- Gaudin, C., Ishikawa, Y., Wight, D. C., Mahdavi, V., Nadal-Ginard, B., Wagner, T. E., Vatner, D. E. and Homcy, C. J. (1995). "Overexpression of Gs alpha protein in the hearts of transgenic mice." J Clin Invest 95(4): 1676-1683.

- Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J. N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J. L. and Le Marec, H. (1998). "The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle." J Clin Invest 102(7): 1377-1384.
- Gazzerro, E., Sotgia, F., Bruno, C., Lisanti, M. P. and Minetti, C. (2010). "Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases." Eur J Hum Genet 18(2): 137-145.
- Geier, C., Perrot, A., Ozcelik, C., Binner, P., Counsell, D., Hoffmann, K., Pilz, B., Martiniak, Y., Gehmlich, K., van der Ven, P. F., Furst, D. O., Vornwald, A., von Hodenberg, E., Nurnberg, P., Scheffold, T., Dietz, R. and Osterziel, K. J. (2003). "Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy." Circulation 107(10): 1390-1395.
- Geiselhoringer, A., Werner, M., Sigl, K., Smital, P., Worner, R., Acheo, L., Stieber, J., Weinmeister, P., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F. and Schlossmann, J. (2004). "IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase." EMBO J 23(21): 4222-4231.
- Geisterfer, A. A., Peach, M. J. and Owens, G. K. (1988). "Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells." Circ Res 62(4): 749-756.
- Geisterfer-Lowrance, A. A., Christe, M., Conner, D. A., Ingwall, J. S., Schoen, F. J., Seidman, C. E. and Seidman, J. G. (1996). "A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy." Science 272(5262): 731-734.
- Gether, U. and Kobilka, B. K. (1998). "G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation." J Biol Chem 273(29): 17979-17982.
- Ghofrani, H. A., Simonneau, G., Rubin, L. J., Authors of, C. and Patent (2013). "Riociguat for pulmonary hypertension." N Engl J Med 369(23): 2268.
- Gomez, L. and Breitenbucher, J. G. (2013). "PDE2 inhibition: potential for the treatment of cognitive disorders." Bioorg Med Chem Lett 23(24): 6522-6527.
- Goraya, T. A. and Cooper, D. M. (2005). "Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): current perspectives." Cell Signal 17(7): 789-797.
- Gotz, K. R., Sprenger, J. U., Perera, R. K., Steinbrecher, J. H., Lehnart, S. E., Kuhn, M., Gorelik, J., Balligand, J. L. and Nikolaev, V. O. (2014). "Transgenic mice for real-time visualization of cGMP in intact adult cardiomyocytes." Circ Res 114(8): 1235-1245.
- Gradman, A. H. and Alfayoumi, F. (2006). "From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease." Prog Cardiovasc Dis 48(5): 326-341.
- Groneberg, D., Konig, P., Wirth, A., Offermanns, S., Koesling, D. and Friebe, A. (2010). "Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice." Circulation 121(3): 401-409.
- Grzeskowiak, R., Witt, H., Drungowski, M., Thermann, R., Hennig, S., Perrot, A., Osterziel, K. J., Klingbiel, D., Scheid, S., Spang, R., Lehrach, H. and Ruiz, P. (2003). "Expression profiling of human idiopathic dilated cardiomyopathy." Cardiovasc Res 59(2): 400-411.
- Gunkel, S., Heineke, J., Hilfiker-Kleiner, D. and Knoll, R. (2009). "MLP: a stress sensor goes nuclear." J Mol Cell Cardiol 47(4): 423-425.
- Guo, D. F., Sun, Y. L., Hamet, P. and Inagami, T. (2001). "The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins." Cell Res 11(3): 165-180.
- Hammond, J. and Balligand, J. L. (2012). "Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: from contractility to remodeling." J Mol Cell Cardiol 52(2): 330-340.
- Hanford, D. S., Thuerauf, D. J., Murray, S. F. and Glembotski, C. C. (1994). "Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes." J Biol Chem 269(42): 26227-26233.
- Hardman, J. G. and Sutherland, E. W. (1969). "Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate." J Biol Chem 244(23): 6363-6370.

## Literaturverzeichnis

---

- Harris, S. P., Lyons, R. G. and Bezold, K. L. (2011). "In the thick of it: HCM-causing mutations in myosin binding proteins of the thick filament." *Circ Res* 108(6): 751-764.
- Hartzell, H. C. and Fischmeister, R. (1986). "Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca<sup>2+</sup> current in single heart cells." *Nature* 323(6085): 273-275.
- Harvey, P. A. and Leinwand, L. A. (2011). "The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy." *J Cell Biol* 194(3): 355-365.
- Hasenfuss, G., Meyer, M., Schillinger, W., Preuss, M., Pieske, B. and Just, H. (1997). "Calcium handling proteins in the failing human heart." *Basic Res Cardiol* 92 Suppl 1: 87-93.
- Hasenfuss, G. and Schillinger, W. (2004). "Is modulation of sodium-calcium exchange a therapeutic option in heart failure?" *Circ Res* 95(3): 225-227.
- Hautala, N., Tenhunen, O., Szokodi, I. and Ruskoaho, H. (2002). "Direct left ventricular wall stretch activates GATA4 binding in perfused rat heart: involvement of autocrine/paracrine pathways." *Pflugers Arch* 443(3): 362-369.
- Hayashi, T., Arimura, T., Ueda, K., Shibata, H., Hohda, S., Takahashi, M., Hori, H., Koga, Y., Oka, N., Imaizumi, T., Yasunami, M. and Kimura, A. (2004). "Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy." *Biochem Biophys Res Commun* 313(1): 178-184.
- Heiman-Patterson, T. D., Blankenhorn, E. P., Sher, R. B., Jiang, J., Welsh, P., Dixon, M. C., Jeffrey, J. I., Wong, P., Cox, G. A. and Alexander, G. M. (2015). "Genetic Background Effects on Disease Onset and Lifespan of the Mutant Dynactin p150Glued Mouse Model of Motor Neuron Disease." *PLoS One* 10(3): e0117848.
- Hein, L., Stevens, M. E., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Kobilka, B. K. and Dzau, V. J. (1997). "Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12): 6391-6396.
- Hein, S., Kostin, S., Heling, A., Maeno, Y. and Schaper, J. (2000). "The role of the cytoskeleton in heart failure." *Cardiovasc Res* 45(2): 273-278.
- Heineke, J., Auger-Messier, M., Correll, R. N., Xu, J., Benard, M. J., Yuan, W., Drexler, H., Parise, L. V. and Molkentin, J. D. (2010). "CIB1 is a regulator of pathological cardiac hypertrophy." *Nat Med* 16(8): 872-879.
- Heineke, J., Auger-Messier, M., Xu, J., Oka, T., Sargent, M. A., York, A., Klevitsky, R., Vaikunth, S., Duncan, S. A., Aronow, B. J., Robbins, J., Crombleholme, T. M. and Molkentin, J. D. (2007). "Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart." *J Clin Invest* 117(11): 3198-3210.
- Heineke, J. and Molkentin, J. D. (2006). "Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(8): 589-600.
- Heineke, J., Wollert, K. C., Osinska, H., Sargent, M. A., York, A. J., Robbins, J. and Molkentin, J. D. (2010). "Calcineurin protects the heart in a murine model of dilated cardiomyopathy." *J Mol Cell Cardiol* 48(6): 1080-1087.
- Heling, A., Zimmermann, R., Kostin, S., Maeno, Y., Hein, S., Devaux, B., Bauer, E., Klovekorn, W. P., Schlepper, M., Schaper, W. and Schaper, J. (2000). "Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium." *Circ Res* 86(8): 846-853.
- Henderson, J. R., Macalma, T., Brown, D., Richardson, J. A., Olson, E. N. and Beckerle, M. C. (1999). "The LIM protein, CRP1, is a smooth muscle marker." *Dev Dyn* 214(3): 229-238.
- Hervy, M., Hoffman, L. and Beckerle, M. C. (2006). "From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins." *Curr Opin Cell Biol* 18(5): 524-532.
- Hess, P. (1988). "Elementary properties of cardiac calcium channels: a brief review." *Can J Physiol Pharmacol* 66(9): 1218-1223.
- Higuchi, S., Ohtsu, H., Suzuki, H., Shirai, H., Frank, G. D. and Eguchi, S. (2007). "Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology." *Clin Sci (Lond)* 112(8): 417-428.
- Hill, J. A. and Olson, E. N. (2008). "Cardiac plasticity." *N Engl J Med* 358(13): 1370-1380.

- Hingorany, S. and Frishman, W. H. (2011). "Soluble guanylate cyclase activation with cinaciguat: a new approach to the treatment of decompensated heart failure." *Cardiol Rev* 19(1): 23-29.
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G. and Chaponnier, C. (2001). "Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity." *Mol Biol Cell* 12(9): 2730-2741.
- Hirota, H., Chen, J., Betz, U. A., Rajewsky, K., Gu, Y., Ross, J., Jr., Muller, W. and Chien, K. R. (1999). "Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress." *Cell* 97(2): 189-198.
- Ho, C. Y., Charron, P., Richard, P., Girolami, F., Van Spaendonck-Zwarts, K. Y. and Pinto, Y. (2015). "Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art." *Cardiovasc Res* 105(4): 397-408.
- Hobbs, A., Foster, P., Prescott, C., Scotland, R. and Ahluwalia, A. (2004). "Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide." *Circulation* 110(10): 1231-1235.
- Hobert, O. and Westphal, H. (2000). "Functions of LIM-homeobox genes." *Trends Genet* 16(2): 75-83.
- Hofmann, F., Ammendola, A. and Schlossmann, J. (2000). "Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases." *J Cell Sci* 113 ( Pt 10): 1671-1676.
- Hofmann, F., Dostmann, W., Keilbach, A., Landgraf, W. and Ruth, P. (1992). "Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase." *Biochim Biophys Acta* 1135(1): 51-60.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. and Schlossmann, J. (2006). "Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion." *Physiol Rev* 86(1): 1-23.
- Hofmann, F. and Wegener, J. W. (2013). "cGMP-dependent protein kinases (cGK)." *Methods Mol Biol* 1020: 17-50.
- Holtwick, R., van Eickels, M., Skryabin, B. V., Baba, H. A., Bubikat, A., Begrow, F., Schneider, M. D., Garbers, D. L. and Kuhn, M. (2003). "Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A." *J Clin Invest* 111(9): 1399-1407.
- Houser, S. R. and Molkentin, J. D. (2008). "Does contractile Ca<sup>2+</sup> control calcineurin-NFAT signaling and pathological hypertrophy in cardiac myocytes?" *Sci Signal* 1(25): pe31.
- Huber, A., Neuhuber, W. L., Klugbauer, N., Ruth, P. and Allescher, H. D. (2000). "Cysteine-rich protein 2, a novel substrate for cGMP kinase I in enteric neurons and intestinal smooth muscle." *J Biol Chem* 275(8): 5504-5511.
- Huggins, J. P., Landgraf, W., Hofmann, F. and Pelton, J. T. (1991). "Secondary structure and conformational changes associated with substrate-binding and the N-terminus in cyclic GMP-dependent protein kinase." *Biochem Soc Trans* 19(2): 163S.
- Hunter, J. J., Tanaka, N., Rockman, H. A., Ross, J., Jr. and Chien, K. R. (1995). "Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice." *J Biol Chem* 270(39): 23173-23178.
- Hutson, P. H., Finger, E. N., Magliaro, B. C., Smith, S. M., Converso, A., Sanderson, P. E., Mullins, D., Hyde, L. A., Eschle, B. K., Turnbull, Z., Sloan, H., Guzzi, M., Zhang, X., Wang, A., Rindgen, D., Mazzola, R., Vivian, J. A., Eddins, D., Uslaner, J. M., Bednar, R., Gambone, C., Le-Mair, W., Marino, M. J., Sachs, N., Xu, G. and Parmentier-Batteur, S. (2011). "The selective phosphodiesterase 9 (PDE9) inhibitor PF-04447943 (6-[(3S,4S)-4-methyl-1-(pyrimidin-2-ylmethyl)pyrrolidin-3-yl]-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one) enhances synaptic plasticity and cognitive function in rodents." *Neuropharmacology* 61(4): 665-676.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. and Chaudhuri, G. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24): 9265-9269.
- Irvine, J. C., Ganthavee, V., Love, J. E., Alexander, A. E., Horowitz, J. D., Stasch, J. P., Kemp-Harper, B. K. and Ritchie, R. H. (2012). "The soluble guanylyl cyclase activator bay 58-2667 selectively limits cardiomyocyte hypertrophy." *PLoS One* 7(11): e44481.

## Literaturverzeichnis

---

- Ito, M., Oliverio, M. I., Mannon, P. J., Best, C. F., Maeda, N., Smithies, O. and Coffman, T. M. (1995). "Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene." Proc Natl Acad Sci U S A 92(8): 3521-3525.
- Izumiya, Y., Araki, S., Usuku, H., Rokutanda, T., Hanatani, S. and Ogawa, H. (2012). "Chronic C-Type Natriuretic Peptide Infusion Attenuates Angiotensin II-Induced Myocardial Superoxide Production and Cardiac Remodeling." Int J Vasc Med 2012: 246058.
- Izumo, S., Nadal-Ginard, B. and Mahdavi, V. (1988). "Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload." Proc Natl Acad Sci U S A 85(2): 339-343.
- Jackson, B. C., Nebert, D. W. and Vasiliou, V. (2010). "Update of human and mouse matrix metalloproteinase families." Hum Genomics 4(3): 194-201.
- Jaffer, F., Murphy, S. M., Scoto, M., Healy, E., Rossor, A. M., Brandner, S., Phadke, R., Selcen, D., Jungbluth, H., Muntoni, F. and Reilly, M. M. (2012). "BAG3 mutations: another cause of giant axonal neuropathy." J Peripher Nerv Syst 17(2): 210-216.
- Jain, M. K., Fujita, K. P., Hsieh, C. M., Endege, W. O., Sibinga, N. E., Yet, S. F., Kashiki, S., Lee, W. S., Perrella, M. A., Haber, E. and Lee, M. E. (1996). "Molecular cloning and characterization of SmLIM, a developmentally regulated LIM protein preferentially expressed in aortic smooth muscle cells." J Biol Chem 271(17): 10194-10199.
- Janostiak, R., Pataki, A. C., Brabek, J. and Rosel, D. (2014). "Mechanosensors in integrin signaling: the emerging role of p130Cas." Eur J Cell Biol 93(10-12): 445-454.
- Jennissen, K., Siegel, F., Liebig-Gonglach, M., Hermann, M. R., Kipschull, S., van Dooren, S., Kunz, W. S., Fassler, R. and Pfeifer, A. (2012). "A VASP-Rac-soluble guanylyl cyclase pathway controls cGMP production in adipocytes." Sci Signal 5(239): ra62.
- Jiang, L., Phang, J. M., Yu, J., Harrop, S. J., Sokolova, A. V., Duff, A. P., Wilk, K. E., Alkhamici, H., Breit, S. N., Valenzuela, S. M., Brown, L. J. and Curmi, P. M. (2014). "CLIC proteins, ezrin, radixin, moesin and the coupling of membranes to the actin cytoskeleton: a smoking gun?" Biochim Biophys Acta 1838(2): 643-657.
- Jiang, W., Wang, P. Z., Yu, H. T., Zhang, Y., Zhao, K., Du, H. and Bai, X. F. (2014). "Development of a SYBR Green I based one-step real-time PCR assay for the detection of Hantaan virus." J Virol Methods 196: 145-151.
- Joyce, N. C., DeCamilli, P., Lohmann, S. M. and Walter, U. (1986). "cGMP-dependent protein kinase is present in high concentrations in contractile cells of the kidney vasculature." J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res 11(3): 191-198.
- Kadmas, J. L. and Beckerle, M. C. (2004). "The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus." Nat Rev Mol Cell Biol 5(11): 920-931.
- Kakkar, R. and Lee, R. T. (2010). "Intramyocardial fibroblast myocyte communication." Circ Res 106(1): 47-57.
- Kaplan, M. L., Cheslow, Y., Vikstrom, K., Malhotra, A., Geenen, D. L., Nakouzi, A., Leinwand, L. A. and Buttrick, P. M. (1994). "Cardiac adaptations to chronic exercise in mice." Am J Physiol 267(3 Pt 2): H1167-1173.
- Karim, M. A., Ohta, K., Egashira, M., Jinno, Y., Niikawa, N., Matsuda, I. and Indo, Y. (1996). "Human ESP1/CRP2, a member of the LIM domain protein family: characterization of the cDNA and assignment of the gene locus to chromosome 14q32.3." Genomics 31(2): 167-176.
- Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohlsson, H. and Edlund, T. (1990). "Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain." Nature 344(6269): 879-882.
- Kass, D. A. (2012). "Cardiac role of cyclic-GMP hydrolyzing phosphodiesterase type 5: from experimental models to clinical trials." Curr Heart Fail Rep 9(3): 192-199.
- Kass, D. A., Takimoto, E., Nagayama, T. and Champion, H. C. (2007). "Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling." Cardiovasc Res 75(2): 303-314.
- Katrakha, I. A. (2013). "Human cardiac troponin complex. Structure and functions." Biochemistry (Mosc) 78(13): 1447-1465.



- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C. and Murad, F. (1977). "Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine." J Cyclic Nucleotide Res 3(1): 23-35.
- Katz, D. H., Beussink, L., Sauer, A. J., Freed, B. H., Burke, M. A. and Shah, S. J. (2013). "Prevalence, clinical characteristics, and outcomes associated with eccentric versus concentric left ventricular hypertrophy in heart failure with preserved ejection fraction." Am J Cardiol 112(8): 1158-1164.
- Kehat, I. and Molkenin, J. D. (2010). "Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation." Circulation 122(25): 2727-2735.
- Keilbach, A., Ruth, P. and Hofmann, F. (1992). "Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies." Eur J Biochem 208(2): 467-473.
- Kemp, B. E. and Pearson, R. B. (1990). "Protein kinase recognition sequence motifs." Trends Biochem Sci 15(9): 342-346.
- Keravis, T. and Lugnier, C. (2012). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments." Br J Pharmacol 165(5): 1288-1305.
- Khurana, T., Khurana, B. and Noegel, A. A. (2002). "LIM proteins: association with the actin cytoskeleton." Protoplasma 219(1-2): 1-12.
- Kilic, A., Bubikat, A., Gassner, B., Baba, H. A. and Kuhn, M. (2007). "Local actions of atrial natriuretic peptide counteract angiotensin II stimulated cardiac remodeling." Endocrinology 148(9): 4162-4169.
- Kilic, A., Velic, A., De Windt, L. J., Fabritz, L., Voss, M., Mitko, D., Zwiener, M., Baba, H. A., van Eickels, M., Schlatter, E. and Kuhn, M. (2005). "Enhanced activity of the myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice." Circulation 112(15): 2307-2317.
- Kim, S. and Iwao, H. (2000). "Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases." Pharmacol Rev 52(1): 11-34.
- Kimura, H. and Murad, F. (1974). "Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart." J Biol Chem 249(21): 6910-6916.
- Kinoshita, H., Kuwahara, K., Nishida, M., Jian, Z., Rong, X., Kiyonaka, S., Kuwabara, Y., Kurose, H., Inoue, R., Mori, Y., Li, Y., Nakagawa, Y., Usami, S., Fujiwara, M., Yamada, Y., Minami, T., Ueshima, K. and Nakao, K. (2010). "Inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart." Circ Res 106(12): 1849-1860.
- Kirchhof, P., Fabritz, L., Kilic, A., Begrow, F., Breithardt, G. and Kuhn, M. (2004). "Ventricular arrhythmias, increased cardiac calmodulin kinase II expression, and altered repolarization kinetics in ANP receptor deficient mice." J Mol Cell Cardiol 36(5): 691-700.
- Kirchner, J., Forbush, K. A. and Bevan, M. J. (2001). "Identification and characterization of thymus LIM protein: targeted disruption reduces thymus cellularity." Mol Cell Biol 21(24): 8592-8604.
- Kishimoto, I., Rossi, K. and Garbers, D. L. (2001). "A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A 98(5): 2703-2706.
- Klaiber, M., Dankworth, B., Kruse, M., Hartmann, M., Nikolaev, V. O., Yang, R. B., Volker, K., Gassner, B., Oberwinkler, H., Feil, R., Freichel, M., Groschner, K., Skryabin, B. V., Frantz, S., Birnbaumer, L., Pongs, O. and Kuhn, M. (2011). "A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide." Proc Natl Acad Sci U S A 108(45): 18500-18505.
- Klaiber, M., Kruse, M., Volker, K., Schroter, J., Feil, R., Freichel, M., Gerling, A., Feil, S., Dietrich, A., Londono, J. E., Baba, H. A., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., Penninger, J. M., Pongs, O. and Kuhn, M. (2010). "Novel insights into the mechanisms mediating the local antihypertrophic effects of cardiac atrial natriuretic peptide: role of cGMP-dependent protein kinase and RGS2." Basic Res Cardiol 105(5): 583-595.

## Literaturverzeichnis

---

- Kleppisch, T., Pfeifer, A., Klatt, P., Ruth, P., Montkowski, A., Fassler, R. and Hofmann, F. (1999). "Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase." J Neurosci 19(1): 48-55.
- Kleppisch, T., Wolfsgruber, W., Feil, S., Allmann, R., Wotjak, C. T., Goebbels, S., Nave, K. A., Hofmann, F. and Feil, R. (2003). "Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory." J Neurosci 23(14): 6005-6012.
- Knoll, R., Buyandelger, B. and Lab, M. (2011). "The sarcomeric Z-disc and Z-discopathies." J Biomed Biotechnol 2011: 569628.
- Knoll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H. M., Person, V., Lorenzen-Schmidt, I., Bang, M. L., Hayashi, T., Shiga, N., Yasukawa, H., Schaper, W., McKenna, W., Yokoyama, M., Schork, N. J., Omens, J. H., McCulloch, A. D., Kimura, A., Gregorio, C. C., Poller, W., Schaper, J., Schultheiss, H. P. and Chien, K. R. (2002). "The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy." Cell 111(7): 943-955.
- Knowles, J. W., Esposito, G., Mao, L., Hagaman, J. R., Fox, J. E., Smithies, O., Rockman, H. A. and Maeda, N. (2001). "Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice." J Clin Invest 107(8): 975-984.
- Koitabashi, N., Aiba, T., Hesketh, G. G., Rowell, J., Zhang, M., Takimoto, E., Tomaselli, G. F. and Kass, D. A. (2010). "Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition." J Mol Cell Cardiol 48(4): 713-724.
- Konersman, C. G., Bordini, B. J., Scharer, G., Lawlor, M. W., Zangwill, S., Southern, J. F., Amos, L., Geddes, G. C., Kliegman, R. and Collins, M. P. (2015). "BAG3 myofibrillar myopathy presenting with cardiomyopathy." Neuromuscul Disord 25(5): 418-422.
- Kong, P., Christia, P. and Frangogiannis, N. G. (2014). "The pathogenesis of cardiac fibrosis." Cell Mol Life Sci 71(4): 549-574.
- Kostek, M. C., Chen, Y. W., Cuthbertson, D. J., Shi, R., Fedele, M. J., Esser, K. A. and Rennie, M. J. (2007). "Gene expression responses over 24 h to lengthening and shortening contractions in human muscle: major changes in CSRFP3, MUSTN1, SIX1, and FBXO32." Physiol Genomics 31(1): 42-52.
- Krenz, M. and Robbins, J. (2004). "Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress." J Am Coll Cardiol 44(12): 2390-2397.
- Kruger, M., Kotter, S., Grutzner, A., Lang, P., Andresen, C., Redfield, M. M., Butt, E., dos Remedios, C. G. and Linke, W. A. (2009). "Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs." Circ Res 104(1): 87-94.
- Krumenacker, J. S., Hanafy, K. A. and Murad, F. (2004). "Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase." Brain Res Bull 62(6): 505-515.
- Kuhn, C., Frank, D., Dierck, F., Oehl, U., Krebs, J., Will, R., Lehmann, L. H., Backs, J., Katus, H. A. and Frey, N. (2012). "Cardiac remodeling is not modulated by overexpression of muscle LIM protein (MLP)." Basic Res Cardiol 107(3): 262.
- Kuhn, M. (2003). "Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A." Circ Res 93(8): 700-709.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
- Langmesser, S., Franken, P., Feil, S., Emmenegger, Y., Albrecht, U. and Feil, R. (2009). "cGMP-dependent protein kinase type I is implicated in the regulation of the timing and quality of sleep and wakefulness." PLoS One 4(1): e4238.
- Laviades, C., Varo, N., Fernandez, J., Mayor, G., Gil, M. J., Monreal, I. and Diez, J. (1998). "Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension." Circulation 98(6): 535-540.

- Layland, J., Li, J. M. and Shah, A. M. (2002). "Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes." *J Physiol* 540(Pt 2): 457-467.
- Layland, J., Solaro, R. J. and Shah, A. M. (2005). "Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation." *Cardiovasc Res* 66(1): 12-21.
- Leask, A. and Abraham, D. J. (2004). "TGF-beta signaling and the fibrotic response." *FASEB J* 18(7): 816-827.
- Lee, D. I., Zhu, G., Sasaki, T., Cho, G. S., Hamdani, N., Holewinski, R., Jo, S. H., Danner, T., Zhang, M., Rainer, P. P., Bedja, D., Kirk, J. A., Ranek, M. J., Dostmann, W. R., Kwon, C., Margulies, K. B., Van Eyk, J. E., Paulus, W. J., Takimoto, E. and Kass, D. A. (2015). "Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease." *Nature* 519(7544): 472-476.
- Lee, H. R., Henderson, S. A., Reynolds, R., Dunnmon, P., Yuan, D. and Chien, K. R. (1988). "Alpha 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression." *J Biol Chem* 263(15): 7352-7358.
- Lefkowitz, R. J. (2007). "Seven transmembrane receptors: a brief personal retrospective." *Biochim Biophys Acta* 1768(4): 748-755.
- Leinwand, L. A. (2001). "Calcineurin inhibition and cardiac hypertrophy: a matter of balance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 2947-2949.
- Leiss, V., Friebe, A., Welling, A., Hofmann, F. and Lukowski, R. (2011). "Cyclic GMP kinase I modulates glucagon release from pancreatic alpha-cells." *Diabetes* 60(1): 148-156.
- Li, A., Ponten, F. and dos Remedios, C. G. (2012). "The interactome of LIM domain proteins: the contributions of LIM domain proteins to heart failure and heart development." *Proteomics* 12(2): 203-225.
- Li, Y., Kishimoto, I., Saito, Y., Harada, M., Kuwahara, K., Izumi, T., Takahashi, N., Kawakami, R., Tanimoto, K., Nakagawa, Y., Nakanishi, M., Adachi, Y., Garbers, D. L., Fukamizu, A. and Nakao, K. (2002). "Guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 1A receptor-mediated cardiac remodeling, an endogenous protective mechanism in the heart." *Circulation* 106(13): 1722-1728.
- Li, Y. Y., McTiernan, C. F. and Feldman, A. M. (2000). "Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling." *Cardiovasc Res* 46(2): 214-224.
- Liebhauer, S. A., Emery, J. G., Urbanek, M., Wang, X. K. and Cooke, N. E. (1990). "Characterization of a human cDNA encoding a widely expressed and highly conserved cysteine-rich protein with an unusual zinc-finger motif." *Nucleic Acids Res* 18(13): 3871-3879.
- Lilly, B., Clark, K. A., Yoshigi, M., Pronovost, S., Wu, M. L., Periasamy, M., Chi, M., Paul, R. J., Yet, S. F. and Beckerle, M. C. (2010). "Loss of the serum response factor cofactor, cysteine-rich protein 1, attenuates neointima formation in the mouse." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(4): 694-701.
- Lin, C. S., Lin, G., Xin, Z. C. and Lue, T. F. (2006). "Expression, distribution and regulation of phosphodiesterase 5." *Curr Pharm Des* 12(27): 3439-3457.
- Lincoln, T. M., Komalavilas, P., Boerth, N. J., MacMillan-Crow, L. A. and Cornwell, T. L. (1995). "cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases." *Adv Pharmacol* 34: 305-322.
- Lip, G. Y. (2001). "Regression of left ventricular hypertrophy and improved prognosis: some hope now . . . or hype?" *Circulation* 104(14): 1582-1584.
- Liu, Y., Leri, A., Li, B., Wang, X., Cheng, W., Kajstura, J. and Anversa, P. (1998). "Angiotensin II stimulation in vitro induces hypertrophy of normal and postinfarcted ventricular myocytes." *Circ Res* 82(11): 1145-1159.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R., Carnethon, M., De Simone, G., Ferguson, T. B., Flegal, K., Ford, E., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Nichol, G., O'Donnell, C., Roger, V., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Steinberger, J., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N., Wylie-Rosett, J., Hong, Y., American Heart Association Statistics, C. and Stroke Statistics, S. (2009). "Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." *Circulation* 119(3): 480-486.

## Literaturverzeichnis

---

- Lohmann, S. M., Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Walter, U. and De Jonge, H. R. (1997). "Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases." Trends Biochem Sci 22(8): 307-312.
- London, B. (2006). "Natriuretic peptides and cardiac hypertrophy." J Am Coll Cardiol 48(3): 506-507.
- Lorell, B. H. and Carabello, B. A. (2000). "Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis." Circulation 102(4): 470-479.
- Louis, H. A., Pino, J. D., Schmeichel, K. L., Pomies, P. and Beckerle, M. C. (1997). "Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression." J Biol Chem 272(43): 27484-27491.
- Louvet-Vallee, S. (2000). "ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling." Biol Cell 92(5): 305-316.
- Lowes, B. D., Simon, M. A., Tsvetkova, T. O. and Bristow, M. R. (2000). "Inotropes in the beta-blocker era." Clin Cardiol 23(3 Suppl): III11-16.
- Lu, L., Zhang, Q., Timofeyev, V., Zhang, Z., Young, J. N., Shin, H. S., Knowlton, A. A. and Chiamvimonvat, N. (2007). "Molecular coupling of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel to L-type Ca<sup>2+</sup> channels via alpha-actinin2." Circ Res 100(1): 112-120.
- Ludyga, N., Englert, S., Pflieger, K., Rauser, S., Braselmann, H., Walch, A., Auer, G., Hofler, H. and Aubele, M. (2013). "The impact of cysteine-rich intestinal protein 1 (CRIP1) in human breast cancer." Mol Cancer 12: 28.
- Lukowski, R., Krieg, T., Rybalkin, S. D., Beavo, J. and Hofmann, F. (2014). "Turning on cGMP-dependent pathways to treat cardiac dysfunctions: boom, bust, and beyond." Trends Pharmacol Sci 35(8): 404-413.
- Lukowski, R., Rybalkin, S. D., Loga, F., Leiss, V., Beavo, J. A. and Hofmann, F. (2010). "Cardiac hypertrophy is not amplified by deletion of cGMP-dependent protein kinase I in cardiomyocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 107(12): 5646-5651.
- Lukowski, R., Weinmeister, P., Bernhard, D., Feil, S., Gotthardt, M., Herz, J., Massberg, S., Zerneck, A., Weber, C., Hofmann, F. and Feil, R. (2008). "Role of smooth muscle cGMP/cGKI signaling in murine vascular restenosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 28(7): 1244-1250.
- Luther, P. K. (2009). "The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling." J Muscle Res Cell Motil 30(5-6): 171-185.
- Lutz, S. Z., Hennige, A. M., Feil, S., Peter, A., Gerling, A., Machann, J., Krober, S. M., Rath, M., Schurmann, A., Weigert, C., Haring, H. U. and Feil, R. (2011). "Genetic ablation of cGMP-dependent protein kinase type I causes liver inflammation and fasting hyperglycemia." Diabetes 60(5): 1566-1576.
- Lyons, G. E., Schiaffino, S., Sassoon, D., Barton, P. and Buckingham, M. (1990). "Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle." J Cell Biol 111(6 Pt 1): 2427-2436.
- Mackenzie, I. S., Wilkinson, I. B. and Cockcroft, J. R. (2002). "Assessment of arterial stiffness in clinical practice." QJM 95(2): 67-74.
- Maisch, B. and Mahrholdt, H. (2014). "[The 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy : what is new?]." Herz 39(8): 919-930.
- Majalahti, T., Suo-Palosaari, M., Sarman, B., Hautala, N., Pikkarainen, S., Tokola, H., Vuolteenaho, O., Wang, J., Paradis, P., Nemer, M. and Ruskoaho, H. (2007). "Cardiac BNP gene activation by angiotensin II in vivo." Mol Cell Endocrinol 273(1-2): 59-67.
- Mamidi, R., Li, J., Gresham, K. S. and Stelzer, J. E. (2014). "Cardiac myosin binding protein-C: a novel sarcomeric target for gene therapy." Pflugers Arch 466(2): 225-230.
- Marletta, M. A. (1994). "Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis." Cell 78(6): 927-930.
- Maron, B. J., Towbin, J. A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A. J., Seidman, C. E., Young, J. B., American Heart Association, Council on Clinical Cardiology, H. F., Transplantation, C., Quality of, C., Outcomes, R., Functional, G., Translational Biology Interdisciplinary Working, G., Council on, E. and Prevention (2006). "Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee;

Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention." *Circulation* 113(14): 1807-1816.

Marsh, N. and Marsh, A. (2000). "A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27(4): 313-319.

Martin, E., Berka, V., Tsai, A. L. and Murad, F. (2005). "Soluble guanylyl cyclase: the nitric oxide receptor." *Methods Enzymol* 396: 478-492.

Martin, F. L., Sangaralingham, S. J., Huntley, B. K., McKie, P. M., Ichiki, T., Chen, H. H., Korinek, J., Harders, G. E. and Burnett, J. C., Jr. (2012). "CD-NP: a novel engineered dual guanylyl cyclase activator with anti-fibrotic actions in the heart." *PLoS One* 7(12): e52422.

Martinez, S. E., Beavo, J. A. and Hol, W. G. (2002). "GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides." *Mol Interv* 2(5): 317-323.

Marttila, M., Hautala, N., Paradis, P., Toth, M., Vuolteenaho, O., Nemer, M. and Ruskoaho, H. (2001). "GATA4 mediates activation of the B-type natriuretic peptide gene expression in response to hemodynamic stress." *Endocrinology* 142(11): 4693-4700.

Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N. and Marks, A. R. (2000). "PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts." *Cell* 101(4): 365-376.

Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F. and Hofmann, F. (1999). "Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I." *J Exp Med* 189(8): 1255-1264.

Mazzolai, L., Nussberger, J., Aubert, J. F., Brunner, D. B., Gabbiani, G., Brunner, H. R. and Pedrazzini, T. (1998). "Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system." *Hypertension* 31(6): 1324-1330.

McAllister-Lucas, L. M., Sonnenburg, W. K., Kadlecsek, A., Seger, D., Trong, H. L., Colbran, J. L., Thomas, M. K., Walsh, K. A., Francis, S. H., Corbin, J. D. and et al. (1993). "The structure of a bovine lung cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone." *J Biol Chem* 268(30): 22863-22873.

McDermott, P. J. and Morgan, H. E. (1989). "Contraction modulates the capacity for protein synthesis during growth of neonatal heart cells in culture." *Circ Res* 64(3): 542-553.

McDermott, P. J., Rothblum, L. I., Smith, S. D. and Morgan, H. E. (1989). "Accelerated rates of ribosomal RNA synthesis during growth of contracting heart cells in culture." *J Biol Chem* 264(30): 18220-18227.

McMullen, J. R. and Jennings, G. L. (2007). "Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(4): 255-262.

McMurray, J. J., Packer, M., Desai, A. S., Gong, J., Lefkowitz, M. P., Rizkala, A. R., Rouleau, J. L., Shi, V. C., Solomon, S. D., Swedberg, K., Zile, M. R., Investigators, P.-H. and Committees (2014). "Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure." *N Engl J Med* 371(11): 993-1004.

Mehel, H., Emons, J., Vettel, C., Wittkopper, K., Seppelt, D., Dewenter, M., Lutz, S., Sossalla, S., Maier, L. S., Lechene, P., Leroy, J., Lefebvre, F., Varin, A., Eschenhagen, T., Nattel, S., Dobrev, D., Zimmermann, W. H., Nikolaev, V. O., Vandecasteele, G., Fischmeister, R. and El-Armouche, A. (2013). "Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts beta-adrenergic responses in cardiomyocytes." *J Am Coll Cardiol* 62(17): 1596-1606.

Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A. L., Lambert, J. P., St-Denis, N. A., Li, T., Miteva, Y. V., Hauri, S., Sardi, M. E., Low, T. Y., Halim, V. A., Bagshaw, R. D., Hubner, N. C., Al-Hakim, A., Bouchard, A., Faubert, D., Fermin, D., Dunham, W. H., Goudreault, M., Lin, Z. Y., Badillo, B. G., Pawson, T., Durocher, D., Coulombe, B., Abersold, R., Superti-Furga, G., Colinge, J., Heck, A. J., Choi, H., Gstaiger, M., Mohammed, S., Cristea, I. M., Bennett, K. L., Washburn, M. P., Raught, B., Ewing, R. M., Gingras, A. C. and Nesvizhskii, A. I. (2013). "The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data." *Nat Methods* 10(8): 730-736.

Mercadier, J. J., Lompre, A. M., Duc, P., Boheler, K. R., Fraysse, J. B., Wisnewsky, C., Allen, P. D., Komajda, M. and Schwartz, K. (1990). "Altered sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure." *J Clin Invest* 85(1): 305-309.

## Literaturverzeichnis

---

- Mergia, E., Russwurm, M., Zoidl, G. and Koesling, D. (2003). "Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain." *Cell Signal* 15(2): 189-195.
- Messerli, J. M., Eppenberger-Eberhardt, M. E., Rutishauser, B. M., Schwarb, P., von Arx, P., Koch-Schneidemann, S., Eppenberger, H. M. and Perriard, J. C. (1993). "Remodelling of cardiomyocyte cytoarchitecture visualized by three-dimensional (3D) confocal microscopy." *Histochemistry* 100(3): 193-202.
- Methner, C., Lukowski, R., Grube, K., Loga, F., Smith, R. A., Murphy, M. P., Hofmann, F. and Krieg, T. (2013). "Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G." *Basic Res Cardiol* 108(2): 337.
- Michel, J. B., Feron, O., Sase, K., Prabhakar, P. and Michel, T. (1997). "Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase." *J Biol Chem* 272(41): 25907-25912.
- Miller, C. L., Oikawa, M., Cai, Y., Wojtovich, A. P., Nagel, D. J., Xu, X., Xu, H., Florio, V., Rybalkin, S. D., Beavo, J. A., Chen, Y. F., Li, J. D., Blaxall, B. C., Abe, J. and Yan, C. (2009). "Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy." *Circ Res* 105(10): 956-964.
- Mineo, C. and Shaul, P. W. (2012). "Regulation of eNOS in caveolae." *Adv Exp Med Biol* 729: 51-62.
- Miner, E. C. and Miller, W. L. (2006). "A look between the cardiomyocytes: the extracellular matrix in heart failure." *Mayo Clin Proc* 81(1): 71-76.
- Mishra, P. K., Givvimani, S., Chavali, V. and Tyagi, S. C. (2013). "Cardiac matrix: a clue for future therapy." *Biochim Biophys Acta* 1832(12): 2271-2276.
- Miyata, S., Minobe, W., Bristow, M. R. and Leinwand, L. A. (2000). "Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart." *Circ Res* 86(4): 386-390.
- Miyazawa, T., Ogawa, Y., Chusho, H., Yasoda, A., Tamura, N., Komatsu, Y., Pfeifer, A., Hofmann, F. and Nakao, K. (2002). "Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification." *Endocrinology* 143(9): 3604-3610.
- Mohapatra, B., Jimenez, S., Lin, J. H., Bowles, K. R., Coveler, K. J., Marx, J. G., Chrisco, M. A., Murphy, R. T., Lurie, P. R., Schwartz, R. J., Elliott, P. M., Vatta, M., McKenna, W., Towbin, J. A. and Bowles, N. E. (2003). "Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis." *Mol Genet Metab* 80(1-2): 207-215.
- Molkentin, J. D. (2004). "Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs." *Cardiovasc Res* 63(3): 467-475.
- Molkentin, J. D. and Dorn, G. W., 2nd (2001). "Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy." *Annu Rev Physiol* 63: 391-426.
- Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R. and Olson, E. N. (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." *Cell* 93(2): 215-228.
- Mongillo, M., Tocchetti, C. G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Y. F., Dostmann, W. R., Pozzan, T., Kass, D. A., Paolocci, N., Houslay, M. D. and Zaccolo, M. (2006). "Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway." *Circ Res* 98(2): 226-234.
- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J. W., Hofmann, F. and Klugbauer, N. (2003). "Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation." *EMBO J* 22(22): 6027-6034.
- Mori, T., Kawara, S., Shinozaki, M., Hayashi, N., Kakinuma, T., Igarashi, A., Takigawa, M., Nakanishi, T. and Takehara, K. (1999). "Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model." *J Cell Physiol* 181(1): 153-159.
- Morisco, C., Seta, K., Hardt, S. E., Lee, Y., Vatner, S. F. and Sadoshima, J. (2001). "Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes." *J Biol Chem* 276(30): 28586-28597.
- Morisco, C., Zebrowski, D. C., Vatner, D. E., Vatner, S. F. and Sadoshima, J. (2001). "Beta-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the beta(1)-subtype in the rat heart." *J Mol Cell Cardiol* 33(3): 561-573.

- Movsesian, M., Stehlik, J., Vandeput, F. and Bristow, M. R. (2009). "Phosphodiesterase inhibition in heart failure." *Heart Fail Rev* 14(4): 255-263.
- Muller, J. M., Metzger, E., Greschik, H., Bosserhoff, A. K., Mercep, L., Buettner, R. and Schule, R. (2002). "The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus." *EMBO J* 21(4): 736-748.
- Mullershausen, F., Russwurm, M., Koesling, D. and Friebe, A. (2004). "In vivo reconstitution of the negative feedback in nitric oxide/cGMP signaling: role of phosphodiesterase type 5 phosphorylation." *Mol Biol Cell* 15(9): 4023-4030.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Murphy, R. T. and Starling, R. C. (2005). "Genetics and cardiomyopathy: where are we now?" *Cleve Clin J Med* 72(6): 465-466, 469-470, 472-463 passim.
- Nag, A. C. (1980). "Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution." *Cytobios* 28(109): 41-61.
- Nagase, H., Visse, R. and Murphy, G. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." *Cardiovasc Res* 69(3): 562-573.
- Nagayama, T., Hsu, S., Zhang, M., Koitabashi, N., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Takimoto, E. and Kass, D. A. (2009). "Sildenafil stops progressive chamber, cellular, and molecular remodeling and improves calcium handling and function in hearts with pre-existing advanced hypertrophy caused by pressure overload." *J Am Coll Cardiol* 53(2): 207-215.
- Nagayama, T., Zhang, M., Hsu, S., Takimoto, E. and Kass, D. A. (2008). "Sustained soluble guanylate cyclase stimulation offsets nitric-oxide synthase inhibition to restore acute cardiac modulation by sildenafil." *J Pharmacol Exp Ther* 326(2): 380-387.
- Nagendran, J., Archer, S. L., Soliman, D., Gurtu, V., Moudgil, R., Haromy, A., St Aubin, C., Webster, L., Rebeyka, I. M., Ross, D. B., Light, P. E., Dyck, J. R. and Michelakis, E. D. (2007). "Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility." *Circulation* 116(3): 238-248.
- Nakamura, T. Y., Iwata, Y., Arai, Y., Komamura, K. and Wakabayashi, S. (2008). "Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 is sufficient to generate Ca<sup>2+</sup> signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure." *Circ Res* 103(8): 891-899.
- Nakamura, Y., Makino, H. and Morishita, R. (1999). "[Distribution and function of angiotensin receptor subtypes in cardiovascular system]." *Nihon Rinsho* 57(5): 1032-1035.
- Nakayama, H., Bodi, I., Maillet, M., DeSantiago, J., Domeier, T. L., Mikoshiba, K., Lorenz, J. N., Blatter, L. A., Bers, D. M. and Molkenkin, J. D. (2010). "The IP<sub>3</sub> receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli." *Circ Res* 107(5): 659-666.
- Nakayama, H., Fujio, Y. and Yamaguchi, O. (2013). "[Calcium dependent signaling in cardiac hypertrophy and cell death]." *Clin Calcium* 23(4): 505-515.
- Nathan, C. and Xie, Q. W. (1994). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." *Cell* 78(6): 915-918.
- Nicol, R. L., Frey, N. and Olson, E. N. (2000). "From the sarcomere to the nucleus: role of genetics and signaling in structural heart disease." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1: 179-223.
- Nikolaev, V. O., Gambaryan, S., Engelhardt, S., Walter, U. and Lohse, M. J. (2005). "Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells: hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis." *J Biol Chem* 280(3): 1716-1719.
- Nikolaev, V. O., Moshkov, A., Lyon, A. R., Miragoli, M., Novak, P., Paur, H., Lohse, M. J., Korchev, Y. E., Harding, S. E. and Gorelik, J. (2010). "Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation." *Science* 327(5973): 1653-1657.

## Literaturverzeichnis

---

- Nishida, M., Watanabe, K., Sato, Y., Nakaya, M., Kitajima, N., Ide, T., Inoue, R. and Kurose, H. (2010). "Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition." J Biol Chem 285(17): 13244-13253.
- Nishikimi, T., Maeda, N. and Matsuoka, H. (2006). "The role of natriuretic peptides in cardioprotection." Cardiovasc Res 69(2): 318-328.
- Nix, D. A., Fradelizi, J., Bockholt, S., Menichi, B., Louvard, D., Friederich, E. and Beckerle, M. C. (2001). "Targeting of zyxin to sites of actin membrane interaction and to the nucleus." J Biol Chem 276(37): 34759-34767.
- Nyui, N., Tamura, K., Mizuno, K., Ishigami, T., Kihara, M., Ochiai, H., Kimura, K., Umemura, S., Ohno, S., Taga, T. and Ishii, M. (1998). "gp130 is involved in stretch-induced MAP kinase activation in cardiac myocytes." Biochem Biophys Res Commun 245(3): 928-932.
- O'Connor, C. M., Starling, R. C., Hernandez, A. F., Armstrong, P. W., Dickstein, K., Hasselblad, V., Heizer, G. M., Komajda, M., Massie, B. M., McMurray, J. J., Nieminen, M. S., Reist, C. J., Rouleau, J. L., Swedberg, K., Adams, K. F., Jr., Anker, S. D., Atar, D., Battler, A., Botero, R., Bohidar, N. R., Butler, J., Clausell, N., Corbalan, R., Costanzo, M. R., Dahlstrom, U., Deckelbaum, L. I., Diaz, R., Dunlap, M. E., Ezekowitz, J. A., Feldman, D., Felker, G. M., Fonarow, G. C., Gennevois, D., Gottlieb, S. S., Hill, J. A., Hollander, J. E., Howlett, J. G., Hudson, M. P., Kociol, R. D., Krum, H., Laucevicius, A., Levy, W. C., Mendez, G. F., Metra, M., Mittal, S., Oh, B. H., Pereira, N. L., Ponikowski, P., Tang, W. H., Tanomsup, S., Teerlink, J. R., Triposkiadis, F., Troughton, R. W., Voors, A. A., Whellan, D. J., Zannad, F. and Califf, R. M. (2011). "Effect of nesiritide in patients with acute decompensated heart failure." N Engl J Med 365(1): 32-43.
- O'Rourke, B., Kass, D. A., Tomaselli, G. F., Kaab, S., Tunin, R. and Marban, E. (1999). "Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies." Circ Res 84(5): 562-570.
- Offermanns, S., Zhao, L. P., Gohla, A., Sarosi, I., Simon, M. I. and Wilkie, T. M. (1998). "Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice." EMBO J 17(15): 4304-4312.
- Ogawa, Y., Tamura, N., Chusho, H. and Nakao, K. (2001). "Brain natriuretic peptide appears to act locally as an antifibrotic factor in the heart." Can J Physiol Pharmacol 79(8): 723-729.
- Oka, T. and Komuro, I. (2008). "Molecular mechanisms underlying the transition of cardiac hypertrophy to heart failure." Circ J 72 Suppl A: A13-16.
- Okano, I., Yamamoto, T., Kaji, A., Kimura, T., Mizuno, K. and Nakamura, T. (1993). "Cloning of CRP2, a novel member of the cysteine-rich protein family with two repeats of an unusual LIM/double zinc-finger motif." FEBS Lett 333(1-2): 51-55.
- Oliveira, E. M., Sasaki, M. S., Cerencio, M., Barauna, V. G. and Krieger, J. E. (2009). "Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 10(1): 15-23.
- Oliver, P. M., Fox, J. E., Kim, R., Rockman, H. A., Kim, H. S., Reddick, R. L., Pandey, K. N., Milgram, S. L., Smithies, O. and Maeda, N. (1997). "Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A." Proc Natl Acad Sci U S A 94(26): 14730-14735.
- Omori, K. and Kotera, J. (2007). "Overview of PDEs and their regulation." Circ Res 100(3): 309-327.
- Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T. and Kurose, H. (2006). "TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy." EMBO J 25(22): 5305-5316.
- Packer, M., Carver, J. R., Rodeheffer, R. J., Ivanhoe, R. J., DiBianco, R., Zeldis, S. M., Hendrix, G. H., Bommer, W. J., Elkayam, U., Kukin, M. L. and et al. (1991). "Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group." N Engl J Med 325(21): 1468-1475.
- Paradis, P., Dali-Youcef, N., Paradis, F. W., Thibault, G. and Nemer, M. (2000). "Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling." Proc Natl Acad Sci U S A 97(2): 931-936.
- Park, S., Mathis, K. W. and Lee, I. K. (2014). "The physiological roles of apolipoprotein J/clusterin in metabolic and cardiovascular diseases." Rev Endocr Metab Disord 15(1): 45-53.



- Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F. J., Nicol, R. L., McKinsey, T. A., Overbeek, P., Richardson, J. A., Grant, S. R. and Olson, E. N. (2000). "CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo." *J Clin Invest* 105(10): 1395-1406.
- Patrucco, E., Domes, K., Sbroglio, M., Blaich, A., Schlossmann, J., Desch, M., Rybalkin, S. D., Beavo, J. A., Lukowski, R. and Hofmann, F. (2014). "Roles of cGMP-dependent protein kinase I (cGKI) and PDE5 in the regulation of Ang II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(35): 12925-12929.
- Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S. D., Silengo, L., Altruda, F., Wetzker, R., Wymann, M. P., Lembo, G. and Hirsch, E. (2004). "PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects." *Cell* 118(3): 375-387.
- Paul, C., Schoberl, F., Weinmeister, P., Micale, V., Wotjak, C. T., Hofmann, F. and Kleppisch, T. (2008). "Signaling through cGMP-dependent protein kinase I in the amygdala is critical for auditory-cued fear memory and long-term potentiation." *J Neurosci* 28(52): 14202-14212.
- Pauschinger, M., Chandrasekharan, K., Li, J., Schwimmbeck, P. L., Noutsias, M. and Schultheiss, H. P. (2002). "[Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]." *Herz* 27(7): 677-682.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M. H. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* 22(2): 153-183.
- Pelliccia, A., Maron, B. J., De Luca, R., Di Paolo, F. M., Spataro, A. and Culasso, F. (2002). "Remodeling of left ventricular hypertrophy in elite athletes after long-term deconditioning." *Circulation* 105(8): 944-949.
- Penela, P., Murga, C., Ribas, C., Tutor, A. S., Peregrin, S. and Mayor, F., Jr. (2006). "Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease." *Cardiovasc Res* 69(1): 46-56.
- Pennica, D., Shaw, K. J., Swanson, T. A., Moore, M. W., Shelton, D. L., Zioncheck, K. A., Rosenthal, A., Taga, T., Paoni, N. F. and Wood, W. I. (1995). "Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex." *J Biol Chem* 270(18): 10915-10922.
- Perbal, B. (2004). "CCN proteins: multifunctional signalling regulators." *Lancet* 363(9402): 62-64.
- Perera, R. K., Sprenger, J. U., Steinbrecher, J. H., Hubscher, D., Lehnart, S. E., Abesser, M., Schuh, K., El-Armouche, A. and Nikolaev, V. O. (2015). "Microdomain switch of cGMP-regulated phosphodiesterases leads to ANP-induced augmentation of beta-adrenoceptor-stimulated contractility in early cardiac hypertrophy." *Circ Res* 116(8): 1304-1311.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R. and Hofmann, F. (1998). "Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice." *EMBO J* 17(11): 3045-3051.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. and Hofmann, F. (1999). "Structure and function of cGMP-dependent protein kinases." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135: 105-149.
- Piacentini, L., Gray, M., Honbo, N. Y., Chentoufi, J., Bergman, M. and Karliner, J. S. (2000). "Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C." *J Mol Cell Cardiol* 32(4): 565-576.
- Piggott, L. A., Hassell, K. A., Berkova, Z., Morris, A. P., Silberbach, M. and Rich, T. C. (2006). "Natriuretic peptides and nitric oxide stimulate cGMP synthesis in different cellular compartments." *J Gen Physiol* 128(1): 3-14.
- Pluim, B. M., Zwiderman, A. H., van der Laarse, A. and van der Wall, E. E. (2000). "The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function." *Circulation* 101(3): 336-344.
- Pokreisz, P., Vandenwijngaert, S., Bito, V., Van den Bergh, A., Lenaerts, I., Busch, C., Marsboom, G., Gheysens, O., Vermeersch, P., Biesmans, L., Liu, X., Gillijns, H., Pellens, M., Van Lommel, A., Buys, E., Schoonjans, L., Vanhaecke, J., Verbeken, E., Sipido, K., Herijgers, P., Bloch, K. D. and Janssens, S. P. (2009). "Ventricular phosphodiesterase-5 expression is increased in patients with advanced heart failure and contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction in mice." *Circulation* 119(3): 408-416.

## Literaturverzeichnis

---

- Pomies, P., Louis, H. A. and Beckerle, M. C. (1997). "CRP1, a LIM domain protein implicated in muscle differentiation, interacts with alpha-actinin." *J Cell Biol* 139(1): 157-168.
- Potter, L. R. (2011). "Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation." *FEBS J* 278(11): 1808-1817.
- Prinz, C., Farr, M., Hering, D., Horstkotte, D. and Faber, L. (2011). "The diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy." *Dtsch Arztebl Int* 108(13): 209-215.
- Proud, C. G. (2004). "Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy." *Cardiovasc Res* 63(3): 403-413.
- Puccini, J., Dorstyn, L. and Kumar, S. (2013). "Genetic background and tumour susceptibility in mouse models." *Cell Death Differ* 20(7): 964.
- Pusapati, G. V., Hughes, C. E., Dorn, K. V., Zhang, D., Sugianto, P., Aravind, L. and Rohatgi, R. (2014). "EFCAB7 and IQCE regulate hedgehog signaling by tethering the EVC-EVC2 complex to the base of primary cilia." *Dev Cell* 28(5): 483-496.
- Qvigstad, E., Moltzau, L. R., Aronsen, J. M., Nguyen, C. H., Hougen, K., Sjaastad, I., Levy, F. O., Skomedal, T. and Osnes, J. B. (2010). "Natriuretic peptides increase beta1-adrenoceptor signalling in failing hearts through phosphodiesterase 3 inhibition." *Cardiovasc Res* 85(4): 763-772.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M. and Moncada, S. (1990). "Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 10043-10047.
- Raeymaekers, L., Hofmann, F. and Casteels, R. (1988). "Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle." *Biochem J* 252(1): 269-273.
- Raju, T. N. (2000). "The Nobel chronicles. 1998: Robert Francis Furchgott (b 1911), Louis J Ignarro (b 1941), and Ferid Murad (b 1936)." *Lancet* 356(9226): 346.
- Ravenscroft, G., Miyatake, S., Lehtokari, V. L., Todd, E. J., Vornanen, P., Yau, K. S., Hayashi, Y. K., Miyake, N., Tsurusaki, Y., Doi, H., Saitsu, H., Osaka, H., Yamashita, S., Ohya, T., Sakamoto, Y., Koshimizu, E., Imamura, S., Yamashita, M., Ogata, K., Shiina, M., Bryson-Richardson, R. J., Vaz, R., Ceyhan, O., Brownstein, C. A., Swanson, L. C., Monnot, S., Romero, N. B., Amthor, H., Kresoje, N., Sivadurai, P., Kiraly-Borri, C., Haliloglu, G., Talim, B., Orhan, D., Kale, G., Charles, A. K., Fabian, V. A., Davis, M. R., Lammens, M., Sewry, C. A., Manzur, A., Muntoni, F., Clarke, N. F., North, K. N., Bertini, E., Nevo, Y., Willichowski, E., Silberg, I. E., Topaloglu, H., Beggs, A. H., Allcock, R. J., Nishino, I., Wallgren-Pettersson, C., Matsumoto, N. and Laing, N. G. (2013). "Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy." *Am J Hum Genet* 93(1): 6-18.
- Redfern, C. H., Degtyarev, M. Y., Kwa, A. T., Salomonis, N., Cotte, N., Nanevicz, T., Fidelman, N., Desai, K., Vranizan, K., Lee, E. K., Coward, P., Shah, N., Warrington, J. A., Fishman, G. I., Bernstein, D., Baker, A. J. and Conklin, B. R. (2000). "Conditional expression of a Gi-coupled receptor causes ventricular conduction delay and a lethal cardiomyopathy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4826-4831.
- Redfield, M. M., Chen, H. H., Borlaug, B. A., Semigran, M. J., Lee, K. L., Lewis, G., LeWinter, M. M., Rouleau, J. L., Bull, D. A., Mann, D. L., Deswal, A., Stevenson, L. W., Givertz, M. M., Ofili, E. O., O'Connor, C. M., Felker, G. M., Goldsmith, S. R., Bart, B. A., McNulty, S. E., Ibarra, J. C., Lin, G., Oh, J. K., Patel, M. R., Kim, R. J., Tracy, R. P., Velazquez, E. J., Anstrom, K. J., Hernandez, A. F., Mascette, A. M., Braunwald, E. and Trial, R. (2013). "Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial." *JAMA* 309(12): 1268-1277.
- Reid, I. A., Morris, B. J. and Ganong, W. F. (1978). "The renin-angiotensin system." *Annu Rev Physiol* 40: 377-410.
- Rhoads, A. R. and Friedberg, F. (1997). "Sequence motifs for calmodulin recognition." *FASEB J* 11(5): 331-340.
- Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Goodwin, J., Gyarfás, I., Martin, I. and Nordet, P. (1996). "Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies." *Circulation* 93(5): 841-842.

- Ritchie, R. H., Irvine, J. C., Rosenkranz, A. C., Patel, R., Wendt, I. R., Horowitz, J. D. and Kemp-Harper, B. K. (2009). "Exploiting cGMP-based therapies for the prevention of left ventricular hypertrophy: NO\* and beyond." Pharmacol Ther 124(3): 279-300.
- Rivard, K., Paradis, P., Nemer, M. and Fiset, C. (2008). "Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization." Cardiovasc Res 78(1): 53-62.
- Robertson, J., McElduff, P., Pearson, S. A., Henry, D. A., Inder, K. J. and Attia, J. R. (2012). "The health services burden of heart failure: an analysis using linked population health data-sets." BMC Health Serv Res 12: 103.
- Roger, V. L. (2010). "The heart failure epidemic." Int J Environ Res Public Health 7(4): 1807-1830.
- Rosca, M. G., Tandler, B. and Hoppel, C. L. (2013). "Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure." J Mol Cell Cardiol 55: 31-41.
- Rose, B. A., Force, T. and Wang, Y. (2010). "Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale." Physiol Rev 90(4): 1507-1546.
- Rosenkranz, A. C., Woods, R. L., Dusting, G. J. and Ritchie, R. H. (2003). "Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP." Cardiovasc Res 57(2): 515-522.
- Rosenkranz, S. (2004). "TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling." Cardiovasc Res 63(3): 423-432.
- Rost, R. and Hollmann, W. (1983). "Athlete's heart--a review of its historical assessment and new aspects." Int J Sports Med 4(3): 147-165.
- Ruetten, H., Dimmeler, S., Gehring, D., Ihling, C. and Zeiher, A. M. (2005). "Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload." Cardiovasc Res 66(3): 444-453.
- Russwurm, M. and Koesling, D. (2004). "NO activation of guanylyl cyclase." EMBO J 23(22): 4443-4450.
- Ruth, P., Landgraf, W., Keilbach, A., May, B., Egleme, C. and Hofmann, F. (1991). "The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini." Eur J Biochem 202(3): 1339-1344.
- Rybalkin, S. D., Yan, C., Bornfeldt, K. E. and Beavo, J. A. (2003). "Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function." Circ Res 93(4): 280-291.
- Sabbah, H. N., Sharov, V. G., Lesch, M. and Goldstein, S. (1995). "Progression of heart failure: a role for interstitial fibrosis." Mol Cell Biochem 147(1-2): 29-34.
- Sackner-Bernstein, J. D., Kowalski, M., Fox, M. and Aaronson, K. (2005). "Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials." JAMA 293(15): 1900-1905.
- Sadoshima, J. and Izumo, S. (1993). "Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype." Circ Res 73(3): 413-423.
- Sadoshima, J., Xu, Y., Slayter, H. S. and Izumo, S. (1993). "Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro." Cell 75(5): 977-984.
- Sagave, J. F., Moser, M., Ehler, E., Weiskirchen, S., Stoll, D., Gunther, K., Buttner, R. and Weiskirchen, R. (2008). "Targeted disruption of the mouse *Csrp2* gene encoding the cysteine- and glycine-rich LIM domain protein CRP2 result in subtle alteration of cardiac ultrastructure." BMC Dev Biol 8: 80.
- Sakai, N., Wada, T., Furuichi, K., Shimizu, K., Kokubo, S., Hara, A., Yamahana, J., Okumura, T., Matsushima, K., Yokoyama, H. and Kaneko, S. (2006). "MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes." J Leukoc Biol 79(3): 555-563.
- Salazar, N. C., Chen, J. and Rockman, H. A. (2007). "Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts." Biochim Biophys Acta 1768(4): 1006-1018.

## Literaturverzeichnis

---

- Sampson, L. J., Plane, F. and Garland, C. J. (2001). "Involvement of cyclic GMP and potassium channels in relaxation evoked by the nitric oxide donor, diethylamine NONOate, in the rat small isolated mesenteric artery." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 364(3): 220-225.
- Sandmann, S. and Unger, T. (2002). "[Pathophysiological and clinical implications of AT(1)/AT(2) angiotensin II receptors in heart failure and coronary and renal failure]." Drugs 62 Spec No 1: 43-52.
- Sano, M., Fukuda, K., Kodama, H., Pan, J., Saito, M., Matsuzaki, J., Takahashi, T., Makino, S., Kato, T. and Ogawa, S. (2000). "Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes." J Biol Chem 275(38): 29717-29723.
- Santiago, J. J., Dangerfield, A. L., Rattan, S. G., Bathe, K. L., Cunnington, R. H., Raizman, J. E., Bedosky, K. M., Freed, D. H., Kardami, E. and Dixon, I. M. (2010). "Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts." Dev Dyn 239(6): 1573-1584.
- Sausbier, M., Arntz, C., Bucurenciu, I., Zhao, H., Zhou, X. B., Sausbier, U., Feil, S., Kamm, S., Essin, K., Sailer, C. A., Abdullah, U., Krippeit-Drews, P., Feil, R., Hofmann, F., Knaus, H. G., Kenyon, C., Shipston, M. J., Storm, J. F., Neuhuber, W., Korth, M., Schubert, R., Gollasch, M. and Ruth, P. (2005). "Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice." Circulation 112(1): 60-68.
- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P. and Hofmann, F. (2000). "Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation." Circ Res 87(9): 825-830.
- Schannwell, C. M., Schneppenheim, M., Plehn, G., Marx, R. and Strauer, B. E. (2002). "Left ventricular diastolic function in physiologic and pathologic hypertrophy." Am J Hypertens 15(6): 513-517.
- Schiemann, A. L. and Stimpel, M. (1997). "[Significance of left ventricular hypertrophy in primary hypertension and therapeutic modification by antihypertensive drugs]." Praxis (Bern 1994) 86(27-28): 1101-1106.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. and Ruth, P. (2000). "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I $\beta$ ." Nature 404(6774): 197-201.
- Schlossmann, J. and Hofmann, F. (2005). "cGMP-dependent protein kinases in drug discovery." Drug Discov Today 10(9): 627-634.
- Schmeichel, K. L. and Beckerle, M. C. (1997). "Molecular dissection of a LIM domain." Mol Biol Cell 8(2): 219-230.
- Schmidt, H., Werner, M., Heppenstall, P. A., Henning, M., More, M. I., Kuhbandner, S., Lewin, G. R., Hofmann, F., Feil, R. and Rathjen, F. G. (2002). "cGMP-mediated signaling via cGK $\alpha$  is required for the guidance and connectivity of sensory axons." J Cell Biol 159(3): 489-498.
- Schmidtko, A., Gao, W., Sausbier, M., Rauhmeier, I., Sausbier, U., Niederberger, E., Scholich, K., Huber, A., Neuhuber, W., Allescher, H. D., Hofmann, F., Tegeder, I., Ruth, P. and Geisslinger, G. (2008). "Cysteine-rich protein 2, a novel downstream effector of cGMP/cGMP-dependent protein kinase I-mediated persistent inflammatory pain." J Neurosci 28(6): 1320-1330.
- Schneider, A. G., Sultan, K. R. and Pette, D. (1999). "Muscle LIM protein: expressed in slow muscle and induced in fast muscle by enhanced contractile activity." Am J Physiol 276(4 Pt 1): C900-906.
- Schorb, W., Booz, G. W., Dostal, D. E., Conrad, K. M., Chang, K. C. and Baker, K. M. (1993). "Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts." Circ Res 72(6): 1245-1254.
- Schroder, F., Klein, G., Fiedler, B., Bastein, M., Schnasse, N., Hillmer, A., Ames, S., Gambaryan, S., Drexler, H., Walter, U., Lohmann, S. M. and Wollert, K. C. (2003). "Single L-type Ca(2+) channel regulation by cGMP-dependent protein kinase type I in adult cardiomyocytes from PKG I transgenic mice." Cardiovasc Res 60(2): 268-277.
- Schulz, S. (2005). "C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor." Peptides 26(6): 1024-1034.
- Schwam, E. M., Nicholas, T., Chew, R., Billing, C. B., Davidson, W., Ambrose, D. and Altstiel, L. D. (2014). "A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of the PDE9A inhibitor, PF-04447943, in Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res 11(5): 413-421.

- Schwede, F., Brustugun, O. T., Zorn-Kruppa, M., Doskeland, S. O. and Jastorff, B. (2000). "Membrane-permeant, bioactivatable analogues of cGMP as inducers of cell death in IPC-81 leukemia cells." Bioorg Med Chem Lett 10(6): 571-573.
- Scott, J. D. (1991). "Cyclic nucleotide-dependent protein kinases." Pharmacol Ther 50(1): 123-145.
- Sebastiani, M., Giordano, C., Nediani, C., Travaglini, C., Borchi, E., Zani, M., Feccia, M., Mancini, M., Petrozza, V., Cossarizza, A., Gallo, P., Taylor, R. W. and d'Amati, G. (2007). "Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies." J Am Coll Cardiol 50(14): 1362-1369.
- Seferian, A. and Simonneau, G. (2013). "Therapies for pulmonary arterial hypertension: where are we today, where do we go tomorrow?" Eur Respir Rev 22(129): 217-226.
- Seidman, C. E. and Seidman, J. G. (2011). "Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history." Circ Res 108(6): 743-750.
- Selcen, D., Muntoni, F., Burton, B. K., Pegoraro, E., Sewry, C., Bite, A. V. and Engel, A. G. (2009). "Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy." Ann Neurol 65(1): 83-89.
- Selzman, C. H., Madden, J. L., Healy, A. H., McKellar, S. H., Koliopoulou, A., Stehlik, J. and Drakos, S. G. (2015). "Bridge to removal: a paradigm shift for left ventricular assist device therapy." Ann Thorac Surg 99(1): 360-367.
- Seth, M., Zhang, Z. S., Mao, L., Graham, V., Burch, J., Stiber, J., Tsiokas, L., Winn, M., Abramowitz, J., Rockman, H. A., Birnbaumer, L. and Rosenberg, P. (2009). "TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart." Circ Res 105(10): 1023-1030.
- Shah, A. M. and Mann, D. L. (2011). "In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science." Lancet 378(9792): 704-712.
- Shah, A. M., Spurgeon, H. A., Sollott, S. J., Talo, A. and Lakatta, E. G. (1994). "8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca<sup>2+</sup> in intact cardiac myocytes." Circ Res 74(5): 970-978.
- Shioi, T., Kang, P. M., Douglas, P. S., Hampe, J., Yballe, C. M., Lawitts, J., Cantley, L. C. and Izumo, S. (2000). "The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice." EMBO J 19(11): 2537-2548.
- Singh, A. K., Spiessberger, B., Zheng, W., Xiao, F., Lukowski, R., Wegener, J. W., Weinmeister, P., Saur, D., Klein, S., Schemann, M., Krueger, D., Seidler, U. and Hofmann, F. (2012). "Neuronal cGMP kinase I is essential for stimulation of duodenal bicarbonate secretion by luminal acid." FASEB J 26(4): 1745-1754.
- Sipido, K. R., Maes, M. and Van de Werf, F. (1997). "Low efficiency of Ca<sup>2+</sup> entry through the Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger as trigger for Ca<sup>2+</sup> release from the sarcoplasmic reticulum. A comparison between L-type Ca<sup>2+</sup> current and reverse-mode Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange." Circ Res 81(6): 1034-1044.
- Sjoblom, B., Salmazo, A. and Djinovic-Carugo, K. (2008). "Alpha-actinin structure and regulation." Cell Mol Life Sci 65(17): 2688-2701.
- Slepkov, E. and Fliegel, L. (2002). "Structure and function of the NHE1 isoform of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger." Biochem Cell Biol 80(5): 499-508.
- Smith, W. B., 2nd, McCaslin, I. R., Gokce, A., Mandava, S. H., Trost, L. and Hellstrom, W. J. (2013). "PDE5 inhibitors: considerations for preference and long-term adherence." Int J Clin Pract 67(8): 768-780.
- Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Honig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H. and Walter, U. (1998). "Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody." J Biol Chem 273(32): 20029-20035.
- Soderling, S. H., Bayuga, S. J. and Beavo, J. A. (1998). "Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases." J Biol Chem 273(25): 15553-15558.
- Soeki, T., Kishimoto, I., Okumura, H., Tokudome, T., Horio, T., Mori, K. and Kangawa, K. (2005). "C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction." J Am Coll Cardiol 45(4): 608-616.
- Soltysinska, E., Bentzen, B. H., Barthmes, M., Hattel, H., Thrush, A. B., Harper, M. E., Qvortrup, K., Larsen, F. J., Schiffer, T. A., Losa-Reyna, J., Straubinger, J., Kniess, A., Thomsen, M. B., Bruggemann, A., Fenske, S., Biel, M.,

## Literaturverzeichnis

---

- Ruth, P., Wahl-Schott, C., Boushel, R. C., Olesen, S. P. and Lukowski, R. (2014). "KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury." *PLoS One* 9(7): e103402.
- Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. (2000). "Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II." *J Physiol* 522 Pt 2: 177-185.
- Somlyo, A. P., Wu, X., Walker, L. A. and Somlyo, A. V. (1999). "Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 134: 201-234.
- Sonnenburg, W. K., Seger, D., Kwak, K. S., Huang, J., Charbonneau, H. and Beavo, J. A. (1995). "Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases." *J Biol Chem* 270(52): 30989-31000.
- Souders, C. A., Bowers, S. L. and Baudino, T. A. (2009). "Cardiac fibroblast: the renaissance cell." *Circ Res* 105(12): 1164-1176.
- Spach, M. S. and Boineau, J. P. (1997). "Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias." *Pacing Clin Electrophysiol* 20(2 Pt 2): 397-413.
- Spiessberger, B., Bernhard, D., Herrmann, S., Feil, S., Werner, C., Lippa, P. B. and Hofmann, F. (2009). "cGMP-dependent protein kinase II and aldosterone secretion." *FEBS J* 276(4): 1007-1013.
- Spinale, F. G., Coker, M. L., Heung, L. J., Bond, B. R., Gunasinghe, H. R., Etoh, T., Goldberg, A. T., Zellner, J. L. and Crumbley, A. J. (2000). "A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure." *Circulation* 102(16): 1944-1949.
- Spitzer, M., Wildenhain, J., Rappsilber, J. and Tyers, M. (2014). "BoxPlotR: a web tool for generation of box plots." *Nat Methods* 11(2): 121-122.
- Sprenger, J. U., Perera, R. K., Steinbrecher, J. H., Lehnart, S. E., Maier, L. S., Hasenfuss, G. and Nikolaev, V. O. (2015). "In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor-microdomain communication in cardiac disease." *Nat Commun* 6: 6965.
- Stangherlin, A., Gesellchen, F., Zoccarato, A., Terrin, A., Fields, L. A., Berrera, M., Surdo, N. C., Craig, M. A., Smith, G., Hamilton, G. and Zaccolo, M. (2011). "cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes." *Circ Res* 108(8): 929-939.
- Stangherlin, A. and Zaccolo, M. (2012). "cGMP-cAMP interplay in cardiac myocytes: a local affair with far-reaching consequences for heart function." *Biochem Soc Trans* 40(1): 11-14.
- Stasch, J. P., Schmidt, P., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowski, K., Haerter, M., Heil, M., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., Schramm, M., Schroeder, W., Schroder, H., Stahl, E., Steinke, W. and Wunder, F. (2002). "NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle." *Br J Pharmacol* 136(5): 773-783.
- Stingo, A. J., Clavell, A. L., Heublein, D. M., Wei, C. M., Pittelkow, M. R. and Burnett, J. C., Jr. (1992). "Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma." *Am J Physiol* 263(4 Pt 2): H1318-1321.
- Straubinger, J., Schottle, V., Bork, N., Subramanian, H., Dunnes, S., Russwurm, M., Gawaz, M., Friebe, A., Nemer, M., Nikolaev, V. O. and Lukowski, R. (2015). "Sildenafil does not prevent heart hypertrophy and fibrosis induced by cardiomyocyte AT1R signaling." *J Pharmacol Exp Ther*.
- Sugden, M. C., Holness, M. J. and Howard, R. M. (1993). "Changes in lipoprotein lipase activities in adipose tissue, heart and skeletal muscle during continuous or interrupted feeding." *Biochem J* 292 ( Pt 1): 113-119.
- Sugden, P. H. and Fuller, S. J. (1991). "Correlations between cardiac protein synthesis rates, intracellular pH and the concentrations of creatine metabolites." *Biochem J* 273(Pt 2): 339-346.
- Sumii, K. and Sperelakis, N. (1995). "cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes." *Circ Res* 77(4): 803-812.
- Sun, J., Steenbergen, C. and Murphy, E. (2006). "S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress." *Antioxid Redox Signal* 8(9-10): 1693-1705.

- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W. and Gilman, A. G. (1996). "Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases." Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 461-480.
- Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., Tang, K. M., Ito, M., Lincoln, T. M. and Mendelsohn, M. E. (1999). "Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase  $\alpha$ ." Science 286(5444): 1583-1587.
- Sutton, M. G. and Sharpe, N. (2000). "Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy." Circulation 101(25): 2981-2988.
- Takeda, N. and Manabe, I. (2011). "Cellular Interplay between Cardiomyocytes and Nonmyocytes in Cardiac Remodeling." Int J Inflam 2011: 535241.
- Takimoto, E. (2012). "Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes." Circ J 76(8): 1819-1825.
- Takimoto, E., Belardi, D., Tocchetti, C. G., Vahebi, S., Cormaci, G., Ketner, E. A., Moens, A. L., Champion, H. C. and Kass, D. A. (2007). "Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5." Circulation 115(16): 2159-2167.
- Takimoto, E., Champion, H. C., Belardi, D., Moslehi, J., Mongillo, M., Mergia, E., Montrose, D. C., Isoda, T., Aufiero, K., Zaccolo, M., Dostmann, W. R., Smith, C. J. and Kass, D. A. (2005). "cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism." Circ Res 96(1): 100-109.
- Takimoto, E., Champion, H. C., Li, M., Belardi, D., Ren, S., Rodriguez, E. R., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Wang, Y. and Kass, D. A. (2005). "Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy." Nat Med 11(2): 214-222.
- Takimoto, E., Koitabashi, N., Hsu, S., Ketner, E. A., Zhang, M., Nagayama, T., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Blanton, R., Siderovski, D. P., Mendelsohn, M. E. and Kass, D. A. (2009). "Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice." J Clin Invest 119(2): 408-420.
- Talwar, S., Squire, I. B., Downie, P. F., O'Brien, R. J., Davies, J. E. and Ng, L. L. (2000). "Elevated circulating cardiotrophin-1 in heart failure: relationship with parameters of left ventricular systolic dysfunction." Clin Sci (Lond) 99(1): 83-88.
- Tamargo, J., Duarte, J., Caballero, R. and Delpon, E. (2010). "Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator for the potential treatment of acute heart failure." Curr Opin Investig Drugs 11(9): 1039-1047.
- Tamura, N., Ogawa, Y., Chusho, H., Nakamura, K., Nakao, K., Suda, M., Kasahara, M., Hashimoto, R., Katsuura, G., Mukoyama, M., Itoh, H., Saito, Y., Tanaka, I., Otani, H. and Katsuki, M. (2000). "Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide." Proc Natl Acad Sci U S A 97(8): 4239-4244.
- Tang, P., Cao, C., Xu, M. and Zhang, L. (2007). "Cytoskeletal protein radixin activates integrin  $\alpha$ (M) $\beta$ (2) by binding to its cytoplasmic tail." FEBS Lett 581(6): 1103-1108.
- Tardiff, J. C., Factor, S. M., Tompkins, B. D., Hewett, T. E., Palmer, B. M., Moore, R. L., Schwartz, S., Robbins, J. and Leinwand, L. A. (1998). "A truncated cardiac troponin T molecule in transgenic mice suggests multiple cellular mechanisms for familial hypertrophic cardiomyopathy." J Clin Invest 101(12): 2800-2811.
- Tarone, G., Balligand, J. L., Bauersachs, J., Clerk, A., De Windt, L., Heymans, S., Hilfiker-Kleiner, D., Hirsch, E., Iaccarino, G., Knoll, R., Leite-Moreira, A. F., Lourenco, A. P., Mayr, M., Thum, T. and Tocchetti, C. G. (2014). "Targeting myocardial remodeling to develop novel therapies for heart failure: a position paper from the Working Group on Myocardial Function of the European Society of Cardiology." Eur J Heart Fail 16(5): 494-508.
- Tegeder, I., Del Turco, D., Schmidtko, A., Sausbier, M., Feil, R., Hofmann, F., Deller, T., Ruth, P. and Geisslinger, G. (2004). "Reduced inflammatory hyperalgesia with preservation of acute thermal nociception in mice lacking cGMP-dependent protein kinase I." Proc Natl Acad Sci U S A 101(9): 3253-3257.
- Ter-Avetisyan, G., Rathjen, F. G. and Schmidt, H. (2014). "Bifurcation of axons from cranial sensory neurons is disabled in the absence of Npr2-induced cGMP signaling." J Neurosci 34(3): 737-747.

## Literaturverzeichnis

---

- Texier, Y., Toedt, G., Gorza, M., Mans, D. A., van Reeuwijk, J., Horn, N., Willer, J., Katsanis, N., Roepman, R., Gibson, T. J., Ueffing, M. and Boldt, K. (2014). "Elution profile analysis of SDS-induced subcomplexes by quantitative mass spectrometry." Mol Cell Proteomics 13(5): 1382-1391.
- Theeuwes, F. and Yum, S. I. (1976). "Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations." Ann Biomed Eng 4(4): 343-353.
- Tokudome, T., Kishimoto, I., Horio, T., Arai, Y., Schwenke, D. O., Hino, J., Okano, I., Kawano, Y., Kohno, M., Miyazato, M., Nakao, K. and Kangawa, K. (2008). "Regulator of G-protein signaling subtype 4 mediates antihypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart." Circulation 117(18): 2329-2339.
- Vaandrager, A. B., Ehlert, E. M., Jarchau, T., Lohmann, S. M. and de Jonge, H. R. (1996). "N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II." J Biol Chem 271(12): 7025-7029.
- Vaandrager, A. B., Hogema, B. M. and de Jonge, H. R. (2005). "Molecular properties and biological functions of cGMP-dependent protein kinase II." Front Biosci 10: 2150-2164.
- Vallur, R., Kalbacher, H. and Feil, R. (2014). "Catalytic activity of cGMP-dependent protein kinase type I in intact cells is independent of N-terminal autophosphorylation." PLoS One 9(6): e98946.
- van Heerebeek, L., Hamdani, N., Falcao-Pires, I., Leite-Moreira, A. F., Begieneman, M. P., Bronzwaer, J. G., van der Velden, J., Stienen, G. J., Laarman, G. J., Somsen, A., Verheugt, F. W., Niessen, H. W. and Paulus, W. J. (2012). "Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction." Circulation 126(7): 830-839.
- Van Vliet, B. N., Chafe, L. L., Antic, V., Schnyder-Candrian, S. and Montani, J. P. (2000). "Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure." J Pharmacol Toxicol Methods 44(2): 361-373.
- Vandeput, F., Krall, J., Ockaili, R., Salloum, F. N., Florio, V., Corbin, J. D., Francis, S. H., Kukreja, R. C. and Movsesian, M. A. (2009). "cGMP-hydrolytic activity and its inhibition by sildenafil in normal and failing human and mouse myocardium." J Pharmacol Exp Ther 330(3): 884-891.
- Vandeput, F., Wolda, S. L., Krall, J., Hambleton, R., Uher, L., McCaw, K. N., Radwanski, P. B., Florio, V. and Movsesian, M. A. (2007). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1C1 in human cardiac myocytes." J Biol Chem 282(45): 32749-32757.
- Vasile, V. C., Edwards, W. D., Ommen, S. R. and Ackerman, M. J. (2006). "Obstructive hypertrophic cardiomyopathy is associated with reduced expression of vinculin in the intercalated disc." Biochem Biophys Res Commun 349(2): 709-715.
- Vasile, V. C., Ommen, S. R., Edwards, W. D. and Ackerman, M. J. (2006). "A missense mutation in a ubiquitously expressed protein, vinculin, confers susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy." Biochem Biophys Res Commun 345(3): 998-1003.
- Vila-Petroff, M. G., Younes, A., Egan, J., Lakatta, E. G. and Sollott, S. J. (1999). "Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes." Circ Res 84(9): 1020-1031.
- Villard, E., Perret, C., Gary, F., Proust, C., Dilanian, G., Hengstenberg, C., Ruppert, V., Arbustini, E., Wichter, T., Germain, M., Dubourg, O., Tavazzi, L., Aumont, M. C., DeGroot, P., Fauchier, L., Trochu, J. N., Gibelin, P., Aupetit, J. F., Stark, K., Erdmann, J., Hetzer, R., Roberts, A. M., Barton, P. J., Regitz-Zagrosek, V., Cardiogenics, C., Aslam, U., Duboscq-Bidot, L., Meyborg, M., Maisch, B., Madeira, H., Waldenstrom, A., Galve, E., Cleland, J. G., Dorent, R., Roizes, G., Zeller, T., Blankenberg, S., Goodall, A. H., Cook, S., Tregouet, D. A., Tiret, L., Isnard, R., Komajda, M., Charron, P. and Cambien, F. (2011). "A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy." Eur Heart J 32(9): 1065-1076.
- Villarreal, F. J. and Dillmann, W. H. (1992). "Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen." Am J Physiol 262(6 Pt 2): H1861-1866.
- Vincenz, C. and Dixit, V. M. (1996). "14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules." J Biol Chem 271(33): 20029-20034.
- Visse, R. and Nagase, H. (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res 92(8): 827-839.



- Volpe, M., Rubattu, S. and Burnett, J., Jr. (2014). "Natriuretic peptides in cardiovascular diseases: current use and perspectives." Eur Heart J 35(7): 419-425.
- von Lueder, T. G., Wang, B. H., Kompa, A. R., Huang, L., Webb, R., Jordaan, P., Atar, D. and Krum, H. (2015). "Angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 attenuates cardiac remodeling and dysfunction after myocardial infarction by reducing cardiac fibrosis and hypertrophy." Circ Heart Fail 8(1): 71-78.
- Wachten, S., Masada, N., Ayling, L. J., Ciruela, A., Nikolaev, V. O., Lohse, M. J. and Cooper, D. M. (2010). "Distinct pools of cAMP centre on different isoforms of adenylyl cyclase in pituitary-derived GH3B6 cells." J Cell Sci 123(Pt 1): 95-106.
- Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F. and Kurtz, A. (1998). "Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression." J Clin Invest 102(8): 1576-1582.
- Waldmann, R., Bauer, S., Gobel, C., Hofmann, F., Jakobs, K. H. and Walter, U. (1986). "Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets." Eur J Biochem 158(1): 203-210.
- Wallis, R. M., Corbin, J. D., Francis, S. H. and Ellis, P. (1999). "Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro." Am J Cardiol 83(5A): 3C-12C.
- Wang, X. and Proud, C. G. (2006). "The mTOR pathway in the control of protein synthesis." Physiology (Bethesda) 21: 362-369.
- Watkins, H., Ashrafian, H. and Redwood, C. (2011). "Inherited cardiomyopathies." N Engl J Med 364(17): 1643-1656.
- Way, J. C. and Chalfie, M. (1988). "mec-3, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*." Cell 54(1): 5-16.
- Weber, K. T. (1989). "Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network." J Am Coll Cardiol 13(7): 1637-1652.
- Weber, S., Bernhard, D., Lukowski, R., Weinmeister, P., Worner, R., Wegener, J. W., Valtcheva, N., Feil, S., Schlossmann, J., Hofmann, F. and Feil, R. (2007). "Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme." Circ Res 101(11): 1096-1103.
- Weeks, K. L. and McMullen, J. R. (2011). "The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes?" Physiology (Bethesda) 26(2): 97-105.
- Wegener, J. W., Nawrath, H., Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, C., Hofmann, F. and Feil, R. (2002). "cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium." Circ Res 90(1): 18-20.
- Wei, J., Gorman, T. E., Liu, X., Ith, B., Tseng, A., Chen, Z., Simon, D. I., Layne, M. D. and Yet, S. F. (2005). "Increased neointima formation in cysteine-rich protein 2-deficient mice in response to vascular injury." Circ Res 97(12): 1323-1331.
- Wei, T. C., Lin, H. Y., Lu, C. C., Chen, C. M. and You, L. R. (2011). "Expression of Crip2, a LIM-domain-only protein, in the mouse cardiovascular system under physiological and pathological conditions." Gene Expr Patterns 11(7): 384-394.
- Weinmeister, P., Lukowski, R., Linder, S., Traidl-Hoffmann, C., Hengst, L., Hofmann, F. and Feil, R. (2008). "Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase I promotes adhesion of primary vascular smooth muscle cells." Mol Biol Cell 19(10): 4434-4441.
- Weiskirchen, R. and Bister, K. (1993). "Suppression in transformed avian fibroblasts of a gene (crp) encoding a cysteine-rich protein containing LIM domains." Oncogene 8(9): 2317-2324.
- Weiskirchen, R. and Gunther, K. (2003). "The CRP/MLP/TLP family of LIM domain proteins: acting by connecting." Bioessays 25(2): 152-162.
- Weiskirchen, R., Pino, J. D., Macalma, T., Bister, K. and Beckerle, M. C. (1995). "The cysteine-rich protein family of highly related LIM domain proteins." J Biol Chem 270(48): 28946-28954.

## Literaturverzeichnis

---

- Wells, Q. S., Ausborn, N. L., Funke, B. H., Pfothner, J. P., Fredi, J. L., Baxter, S., Disalvo, T. D. and Hong, C. C. (2011). "Familial dilated cardiomyopathy associated with congenital defects in the setting of a novel VCL mutation (Lys815Arg) in conjunction with a known MYPBC3 variant." Cardiogenetics 1(1).
- Wenzel, S., Rohde, C., Wingerning, S., Roth, J., Kojda, G. and Schluter, K. D. (2007). "Lack of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide formation favors hypertrophy in adult ventricular cardiomyocytes." Hypertension 49(1): 193-200.
- Werner, C., Raivich, G., Cowen, M., Strelakova, T., Sillaber, I., Buters, J. T., Spanagel, R. and Hofmann, F. (2004). "Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol." Eur J Neurosci 20(12): 3498-3506.
- Westermann, D., Becher, P. M., Lindner, D., Savvatis, K., Xia, Y., Frohlich, M., Hoffmann, S., Schultheiss, H. P. and Tschope, C. (2012). "Selective PDE5A inhibition with sildenafil rescues left ventricular dysfunction, inflammatory immune response and cardiac remodeling in angiotensin II-induced heart failure in vivo." Basic Res Cardiol 107(6): 308.
- Wettschureck, N., Rutten, H., Zywiets, A., Gehring, D., Wilkie, T. M., Chen, J., Chien, K. R. and Offermanns, S. (2001). "Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galphi11 in cardiomyocytes." Nat Med 7(11): 1236-1240.
- Williams, J. S. and Williams, G. H. (2003). "50th anniversary of aldosterone." J Clin Endocrinol Metab 88(6): 2364-2372.
- Williams, T. M. and Lisanti, M. P. (2004). "The Caveolin genes: from cell biology to medicine." Ann Med 36(8): 584-595.
- Willott, R. H., Gomes, A. V., Chang, A. N., Parvatiyar, M. S., Pinto, J. R. and Potter, J. D. (2010). "Mutations in Troponin that cause HCM, DCM AND RCM: what can we learn about thin filament function?" J Mol Cell Cardiol 48(5): 882-892.
- Wimalawansa, S. J. (2008). "Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indications." Expert Opin Pharmacother 9(11): 1935-1954.
- Wolfsgruber, W., Feil, S., Brummer, S., Kuppinger, O., Hofmann, F. and Feil, R. (2003). "A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A 100(23): 13519-13524.
- Wollert, K. C., Yurukova, S., Kilic, A., Begrow, F., Fiedler, B., Gambaryan, S., Walter, U., Lohmann, S. M. and Kuhn, M. (2003). "Increased effects of C-type natriuretic peptide on contractility and calcium regulation in murine hearts overexpressing cyclic GMP-dependent protein kinase I." Br J Pharmacol 140(7): 1227-1236.
- Xiang, Y. and Kobilka, B. K. (2003). "Myocyte adrenoceptor signaling pathways." Science 300(5625): 1530-1532.
- Xie, G. X. and Palmer, P. P. (2007). "How regulators of G protein signaling achieve selective regulation." J Mol Biol 366(2): 349-365.
- Xu, J., Morris, L., Thapa, A., Ma, H., Michalakos, S., Biel, M., Baehr, W., Peshenko, I. V., Dizhoor, A. M. and Ding, X. Q. (2013). "cGMP accumulation causes photoreceptor degeneration in CNG channel deficiency: evidence of cGMP cytotoxicity independently of enhanced CNG channel function." J Neurosci 33(37): 14939-14948.
- Xu, Y., Pan, J., Sun, J., Ding, L., Ruan, L., Reed, M., Yu, X., Klabnik, J., Lin, D., Li, J., Chen, L., Zhang, C., Zhang, H. and O'Donnell, J. M. (2015). "Inhibition of phosphodiesterase 2 reverses impaired cognition and neuronal remodeling caused by chronic stress." Neurobiol Aging 36(2): 955-970.
- Yamamoto, R., Akazawa, H., Ito, K., Toko, H., Sano, M., Yasuda, N., Qin, Y., Kudo, Y., Sugaya, T., Chien, K. R. and Komuro, I. (2007). "Angiotensin II type 1a receptor signals are involved in the progression of heart failure in MLP-deficient mice." Circ J 71(12): 1958-1964.
- Yang, L., Liu, G., Zakharov, S. I., Bellinger, A. M., Mongillo, M. and Marx, S. O. (2007). "Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits." Circ Res 101(5): 465-474.
- Yang, T. T., Xiong, Q., Enslin, H., Davis, R. J. and Chow, C. W. (2002). "Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases." Mol Cell Biol 22(11): 3892-3904.

- Yasuda, N., Akazawa, H., Ito, K., Shimizu, I., Kudo-Sakamoto, Y., Yabumoto, C., Yano, M., Yamamoto, R., Ozasa, Y., Minamino, T., Naito, A. T., Oka, T., Shiojima, I., Tamura, K., Umemura, S., Paradis, P., Nemer, M. and Komuro, I. (2012). "Agonist-independent constitutive activity of angiotensin II receptor promotes cardiac remodeling in mice." *Hypertension* 59(3): 627-633.
- Yet, S. F., Folta, S. C., Jain, M. K., Hsieh, C. M., Maemura, K., Layne, M. D., Zhang, D., Marria, P. B., Yoshizumi, M., Chin, M. T., Perrella, M. A. and Lee, M. E. (1998). "Molecular cloning, characterization, and promoter analysis of the mouse Crp2/SmLim gene. Preferential expression of its promoter in the vascular smooth muscle cells of transgenic mice." *J Biol Chem* 273(17): 10530-10537.
- Yeves, A. M., Garcarena, C. D., Nolly, M. B., Chiappe de Cingolani, G. E., Cingolani, H. E. and Ennis, I. L. (2010). "Decreased activity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger by phosphodiesterase 5A inhibition is attributed to an increase in protein phosphatase activity." *Hypertension* 56(4): 690-695.
- Yu, T. S., Moctezuma-Anaya, M., Kubo, A., Keller, G. and Robertson, S. (2002). "The heart LIM protein gene (Hlp), expressed in the developing and adult heart, defines a new tissue-specific LIM-only protein family." *Mech Dev* 116(1-2): 187-192.
- Yuasa, K., Michibata, H., Omori, K. and Yanaka, N. (1999). "A novel interaction of cGMP-dependent protein kinase I with troponin T." *J Biol Chem* 274(52): 37429-37434.
- Zaccolo, M. and Movsesian, M. A. (2007). "cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology." *Circ Res* 100(11): 1569-1578.
- Zemljic-Harpf, A. E., Miller, J. C., Henderson, S. A., Wright, A. T., Manso, A. M., Elsherif, L., Dalton, N. D., Thor, A. K., Perkins, G. A., McCulloch, A. D. and Ross, R. S. (2007). "Cardiac-myocyte-specific excision of the vinculin gene disrupts cellular junctions, causing sudden death or dilated cardiomyopathy." *Mol Cell Biol* 27(21): 7522-7537.
- Zewail, A. M., Nawar, M., Vrtovec, B., Eastwood, C., Kar, M. N. and Delgado, R. M., 3rd (2003). "Intravenous milrinone in treatment of advanced congestive heart failure." *Tex Heart Inst J* 30(2): 109-113.
- Zhang, M., Koitabashi, N., Nagayama, T., Rambaran, R., Feng, N., Takimoto, E., Koenke, T., O'Rourke, B., Champion, H. C., Crow, M. T. and Kass, D. A. (2008). "Expression, activity, and pro-hypertrophic effects of PDE5A in cardiac myocytes." *Cell Signal* 20(12): 2231-2236.
- Zhang, M., Takimoto, E., Hsu, S., Lee, D. I., Nagayama, T., Danner, T., Koitabashi, N., Barth, A. S., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Wang, Y. and Kass, D. A. (2010). "Myocardial remodeling is controlled by myocyte-targeted gene regulation of phosphodiesterase type 5." *J Am Coll Cardiol* 56(24): 2021-2030.
- Zhang, T., Zhuang, S., Casteel, D. E., Looney, D. J., Boss, G. R. and Pilz, R. B. (2007). "A cysteine-rich LIM-only protein mediates regulation of smooth muscle-specific gene expression by cGMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 282(46): 33367-33380.
- Zhou, X. B., Arntz, C., Kamm, S., Motejlek, K., Sausbier, U., Wang, G. X., Ruth, P. and Korth, M. (2001). "A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase." *J Biol Chem* 276(46): 43239-43245.
- Zolk, O., Caroni, P. and Bohm, M. (2000). "Decreased expression of the cardiac LIM domain protein MLP in chronic human heart failure." *Circulation* 101(23): 2674-2677.

## 9 Publikationen und Kongressbeiträge

### 9.1 Publikationen

Soltysinska, E., Bentzen, B. G., Barthmes, M., Hattel, H., Thrush, A. B., Harper, M. E., Qvortrup, K., Larsen, F. J., Schiffer, T. A., Losa-Reyna, J., Straubinger, J., Kniess, A., Thomsen, M.B., Bruggemann, A., Fenske, S., Biel, M., Ruth, P., Wahl-Schott, C., Boushel, R. C., Olesen, S. P. and Lukowski, R. (2014). "KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury." PLoS One 9(7):e103402

Straubinger, J., Schottle, V., Bork, N., Subramanian, H., Dunnes, S., Russwurm, M., Gawaz, M., Friebe, A., Nemer, M., Nikolaev, V. O. and Lukowski, R. (2015). "Sildenafil does not prevent heart hypertrophy and fibrosis induced by cardiomyocyte AT<sub>1</sub>R signaling." J Pharmacol Exp Ther (*Epub ahead of print*).

Straubinger, J., Bork, N., Boldt, K., Ueffing, M., Ruth, P., Lukowski, R. "Cardiac cysteine-rich LIM-only protein 4 (CRP4) is a new antihypertrophic and antifibrotic factor in Ang II-induced cardiac hypertrophy." (*In preparation*).

### 9.2 Kongressbeiträge

Straubinger, J., Majer, M., Steinle, M., Ruth, P., Lukowski, R. "Cardiac cysteine-rich LIM-only protein 4 (CRP4) exerts anti-fibrotic effects of cGMP kinase I." 78. Jahrestagung der DGPT (03/2012), Dresden (Poster).

Straubinger, J., Majer, M., Ruth, P., Lukowski, R. "Cardiac cysteine-rich LIM-only protein 4 (CRP4) opposes Angiotensin II induced pathological heart hypertrophy and fibrosis." Jahrestagung der DPhG (09/2012), Greifswald (Poster).

Straubinger, J., Ruth, P., Lukowski, R. "Cardiac cGMP/cGMP-dependent protein kinase I signaling requires cysteine-rich LIM-only protein 4 (CRP4) to oppose Angiotensin II induced hypertrophy and fibrosis." *6th International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications* (06/2013), Erfurt (Kurzvortrag & Poster).

Straubinger, J., Schottle, V., Bork, N., Ruth, P., Lukowski, R. "Cardiac cGMP/cGMP-dependent protein kinase I signaling requires cysteine-rich LIM-only protein 4 (CRP4) to oppose Angiotensin II induced hypertrophy and fibrosis." Summer School für biomedizinische Nachwuchsforscher: *Tracking fast signaling processes in vivo - mechanisms, targets and tools* (07/2014), Kloster Frauenchiemsee (Poster).

Straubinger, J., Schottle, V., Bork, N., Gawaz, M., Lukowski, R. "Sildenafil does not prevent cardiomyocyte AT<sub>1</sub>R signaling induced heart hypertrophy and fibrosis." *DFG FOR 2060 Meeting on New Developments in Signal Transduction & cGMP Research* (01/2015), Rottenburg (Vortrag & Poster).

## 10 Lebenslauf

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen. Die Promotionszeit wird mir immer in sehr guter Erinnerung bleiben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn JProf. Dr. Robert Lukowski für die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertation und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Sein großes Engagement und seine Begeisterung für die Wissenschaft haben mich stets motiviert und in meiner Arbeit bestärkt.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Peter Ruth für die Möglichkeit, die Dissertation an seinem Lehrstuhl anfertigen zu können, für sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit und für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau PD Dr. Susanne Ammon-Treiber und Herrn Prof. Dr. Dirk Schwarzer für ihre Bereitschaft, als weitere Prüfer zu fungieren, herzlich bedanken.

Herrn Dr. Karsten Boldt und seinem Arbeitskreis am Proteom-Zentrum für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Tübingen danke ich für die zielführende Zusammenarbeit und der Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen sowie für die Hilfe bei der Dateninterpretation.

Für die Möglichkeit, die echokardiographischen Messungen in der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Tübingen anzufertigen bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gawaz, für die Einweisung und die viele nützlichen Tipps beim „Schallen“ danke ich Drs. med. vet. Tanja Schönberger und Katja Metzger.

Bei Herrn Dr. Matthias Desch möchte ich mich für seine geduldige Einführung in die OP-Technik zur Transmitter-Implantation bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev und Herrn Dr. Hariharan Subramanian (Experimentelle Kardiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) für die Durchführung der FRET-Messungen bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Anne und Friederike für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Vielen Dank an alle Diplomanden, Master- und Wahlpflichtfach-Studenten für ihren Beitrag zu dieser Arbeit, speziell bei Verena und Nadja für die tolle Zusammenarbeit an unserem AT1-Projekt. Außerdem möchte ich mich bei unseren Technischen Assistenten Isolde, Frau Proksch, Katrin und Michael für ihre Hilfsbereitschaft, die Organisation des Laboralltags sowie die Unterstützung bei den Genotypisierungen bedanken. Clement danke ich darüber

## Danksagung

---

hinaus für seine wertvollen Tipps für Labor und Leben. Unseren Tierpflegern Loni und Herrn Bröckel danke ich für ihre wichtige Arbeit im Tierstall zur Versorgung der Mäuse.

Herzlichen Dank allen aktuellen und ehemaligen Doktoranden, Postdocs, Diplomanden und Masterstudenten der siebten und neunten Ebene für die stets gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere Angi, Annie, Armin, Becky, Christina, Corinna, Friedl, Julia, Leni, Kati, Marc, Markus, Mario, Michael, Nadja, Sandra, Steffi, Tanja und Verena. Unsere zahlreichen Unternehmungen und die entstandenen Freundschaften würde ich nicht missen wollen.

Meiner Familie danke ich von Herzen für jegliche Unterstützung und den mir gebotenen Rückhalt und dafür, dass ihr mir stets alles ermöglicht habt. Marcus, dir danke ich dafür, dass du immer an meiner Seite stehst, dein großes Verständnis und deine Geduld.