

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. M. J. Lohse

**UCP2 und DIPP2 α als differentiell exprimierte Kandidatengene
in einem murinen Modell der Herzinsuffizienz**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Florian Nickel

aus Ebern

Würzburg, Mai 2008

Referent: Prof. Dr. Dr. S. Engelhardt

Koreferent: Prof. Dr. J. Bauernsachs

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2009

Der Promovend ist Arzt

*Meinen Eltern
und Henriette*

Einleitung	1
Das Syndrom der chronischen Herzinsuffizienz	1
Pathophysiologie der Herzinsuffizienz.....	2
β -adrenerge Signaltransduktion in der Herzinsuffizienz.....	2
Neurohumorale Aktivierung in der chronischen Herzinsuffizienz.....	5
Calciumstoffwechsel in der Herzinsuffizienz.....	7
Hypertrophie und differentielle Genexpression	7
Kardiale Energetik in der Herzinsuffizienz	9
Tiermodelle der Herzinsuffizienz	10
Das transgene Mausmodell mit Überexpression β_1 -adrenerger Rezeptoren	11
Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	13
Material und Methoden	13
Material.....	13
Humane Myokardproben	13
Tiermaterial	14
Zelllinien.....	14
Bakterienstämme	14
Plasmidvektoren	15
Oligonukleotidprimer	15
Enzyme	15
Medien und Puffer	16
Chemikalien.....	18
Verbrauchsmaterial.....	19
Methoden	19
Kultur von Zellen	19
Molekularbiologische Methoden.....	21
Proteinanalytische Methoden	28
Generierung transgener Tiere	29
Histologische Methoden	31
Physiologische Methoden.....	32
Ergebnisse.....	32
Differentielle Genexpression von UCP2 und DIPP2 α	32
Vorversuche.....	33
Expression von UCP2 im insuffizienten Herzen und unter β -adrenerger Stimulation in Zellkultur	35
Expression von DIPP2 α im insuffizienten Herzen und unter β -adrenerger Stimulation in Zellkultur	42
Generierung UCP2-transgener Mäuse.....	46
Konstruktion des Transgenvektors und pronukleäre Injektion.....	46
Genotypisierung und Verpaarung.....	48
Initiale Charakterisierung	49
Charakterisierung des Phänotyps von Mäusen mit kardialer UCP2-Überexpression	51
Kardiale Pathologie des Gründer-Tieres TG4	51
Phänotyp der Linie UCP2-TG1	51
Charakterisierung der Linie UCP2-TG3.....	57
UCP2-Expression im Vorhof β_1 AR-transgener Mäuse	58
Generierung DIPP2 α -transgener Mäuse.....	59
Konstruktion des Transgenvektors und pronukleäre Injektion.....	59

Genotypisierung und Verpaarung.....	60
Phänotyp bei Mäusen mit kardialer DIPP2 α -Überexpression.....	61
Diskussion	64
UCP2 als Kandidatengenen der Herzinsuffizienz	64
Funktion von Uncoupling Proteinen.....	64
Regulation und differentielle Expression in Herzinsuffizienzmodellen.....	71
Folgen der transgenen Überexpression.....	75
DIPP2 α als Kandidatengenen der Herzinsuffizienz	76
Verteilung von DIPP-Proteinen.....	76
Regulation und differentielle Expression	77
Funktion und transgene Überexpression	78
Zusammenfassung	84
Literaturverzeichnis	86

Einleitung

Das Syndrom der chronischen Herzinsuffizienz

„...Heart failure may be considered to be the condition in which an abnormality of cardiac function is responsible for the inability of the heart to pump blood at a rate commensurate with the requirements of the metabolizing tissues and/or allows it to do so only from an abnormally elevated ventricular diastolic volume.“ (Braunwald, 2001)

Nach dieser klinischen Definition von Eugene Braunwald handelt es sich bei der Herzinsuffizienz um einen Zustand, bei dem die Pumpleistung des Herzens nicht für die Versorgung stoffwechselaktiver Gewebe mit Blut ausreicht, beziehungsweise nur bei erhöhter diastolischer Ventrikelfüllung.

Die Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten internistischen Erkrankungen. Europaweit leiden ca. 10 Millionen Menschen an einer Herzinsuffizienz, wobei Inzidenz und Prävalenz im Alter ansteigen. In der Altersgruppe von 45-55 Jahren sind weniger als 1% betroffen, von 65-75 Jahren bereits 2-5% und bei über 80-Jährigen 10% (Hoppe et al., 2005). Die Erkrankung ist mit einer hohen Letalität behaftet, die die vieler maligner Erkrankungen übersteigt. In der Liste der häufigsten Todesursachen hat sie inzwischen den akuten Myokardinfarkt an der Spitze abgelöst. Während in Therapiestudien die 1-Jahresletalität bei 7-18% anzusetzen ist (Erdmann, 2003), betrug sie in der Kohorte der Framinghamstudie 20-30%, die 5-Jahresletalität gar 40-60% (Levy et al., 2002). In den USA stellt die Herzinsuffizienz die volkswirtschaftlich teuerste Krankheit dar (Stanley und Chandler, 2002).

Die wichtigsten Risikofaktoren sind eine koronare Herzkrankheit und eine arterielle Hypertonie. Das Syndrom der chronischen Herzinsuffizienz stellt die gemeinsame Endstrecke verschiedener kardialer Erkrankungen dar. Dazu gehören neben der koronaren Herzkrankheit und der arteriellen Hypertonie auch Klappenvitien, Herzrhythmusstörungen, Myokarditiden, Stoffwechselerkrankungen, genetische Herzmuskelerkrankungen, Perikarderkrankungen und medikamentös-toxische Einwirkungen. Wird die zugrunde liegende Ursache nicht behoben, zum Beispiel durch eine Herzklappenoperation oder eine suffiziente antihypertensive Behandlung, so kommt es im Verlauf zu einer irreversiblen Schädigung des Myokards. Der Organismus

versucht über unten dargestellte adaptive Mechanismen eine ausreichende Perfusion der Organe aufrecht zu erhalten. Diese Regulation ist langfristig jedoch maladaptiv und führt zu einer weiteren Progredienz der Erkrankung, auch wenn die auslösende Ursache behoben ist.

Es werden bei der Herzinsuffizienz ein sogenanntes „low output failure“ von einem „high output failure“ unterschieden. Bei letzterem ist die Sauerstoffversorgung der Peripherie trotz erhöhten Herzzeitvolumens zum Beispiel wegen einer arteriovenösen Fistel oder einer Hyperthyreose nicht gewährleistet. Das häufigere und hier betrachtete low output failure ist durch eine Verminderung des Herzzeitvolumens infolge einer myokardialen Funktionsstörung gekennzeichnet. Unterschieden wird eine systolische Funktionsstörung durch Kontraktionsschwäche von einer diastolischen Funktionschwäche durch Relaxationsstörung bei Hypertrophie oder durch Behinderung der Ventrikelfüllung.

Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Wie oben erwähnt kann der Organismus die Abnahme der Auswurfleistung initial auf verschiedenen Ebenen kompensieren, um eine ausreichende Perfusion der Endorgane zu sichern. Viele dieser adaptiven Veränderungen sind jedoch langfristig deletär und führen zu einer progredienten Herzinsuffizienz. Hier sollen einige im Rahmen dieser Arbeit relevante pathophysiologische Mechanismen dargestellt werden.

β-adrenerge Signaltransduktion in der Herzinsuffizienz

Adrenerge Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und besitzen sieben Transmembrandomänen. Bei Aktivierung durch einen Liganden binden diese Rezeptoren an ein GTP-bindendes Protein (G-Protein). G-Proteine sind heterotrimer gebaut und bestehen aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit. Im inaktivierten Zustand ist an die α -Untereinheit GDP gebunden, das nach Aktivierung durch Bindung an den Rezeptor abdissoziiert. Nach der Bindung von GTP an derselben Lokalisation kommt es zur Dissoziation von α - und β/γ -Untereinheit, die jeweils wiederum unterschiedliche Effektorproteine in ihrer Aktivität beeinflussen. Diese umfassen unter anderem die Adenylatzyklase, die Phospholipase C sowie verschiedene Ionenkanäle. Durch die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit wird GTP hydrolysiert, wonach α - und

β/γ -Untereinheit reassoziieren. G-Proteine werden je nach Einfluss ihrer α -Untereinheiten auf die Adenylatzyklase unter anderem in stimulatorische (G_s) und inhibitorische (G_i) G-Proteine aufgeteilt. G_q -Proteine stimulieren die Phospholipase C. Im humanen Herzen werden β_1 - und β_2 -adrenerge Rezeptoren ungefähr im Verhältnis 70:30 exprimiert (Brodde, 1993). Beide Rezeptoren binden an G_s -Proteine und können die Adenylatzyklase aktivieren. β_2 -adrenerge Rezeptoren binden auch an inhibitorische G-Proteine, die die Adenylatzyklase hemmen. Wesentlich bei dieser komplexen Regulation scheint die funktionelle Kompartimentalisierung im Myozyten zu sein (Xiao et al., 1999). Ebenfalls im Herzen nachgewiesene β_3 -adrenerge Rezeptoren scheinen über G_i und Stimulation der NO-Synthetase einen negativ inotropen Effekt auszuüben (Gauthier et al., 1996; Tavernier et al., 2003).

Die Adenylatzyklase katalysiert die Bildung des sogenannten „second messengers“ cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) aus ATP (Adenosintriphosphat). cAMP führt über die Proteinkinase A zur Phosphorylierung von Zielproteinen wie dem L-Typ Calciumkanal, Phospholamban, dem Ryanodinrezeptor-gesteuerten Calciumkanal des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) sowie Troponin I (Übersicht von Opie, in: Braunwald, Heart Disease, 2001). Dadurch wird der Calciumeinstrom aus Extrazellulärraum und SR, die Calciumwiederaufnahme in das SR sowie die Calciumsensitivität des kontraktilen Apparates verstärkt. G_s -Proteine vermitteln so eine positiv chronotrope, inotrope, dromotrope und lusitrope Wirkung. Die Stimulation β -adrenerger Rezeptoren führt also akut und kurzfristig zu einer gesteigerten Herzauswurfleistung und kann initial eine Herzinsuffizienz kompensieren. Tatsächlich sind bei herzinsuffizienten Patienten im Plasma die Katecholaminspiegel erhöht und korrelieren positiv mit der Mortalität (Swedberg et al., 1990). Quantitativ am bedeutsamsten ist dabei am Herzen lokal freigesetztes Noradrenalin, das von autonomen Nervenendigungen und Myokard sezerniert und vermindert rückresorbiert wird.

Während Katecholamine akut die Herzleistung und damit den Energiebedarf steigern kommt es bei der chronischen Herzinsuffizienz im Rahmen dauerhaft erhöhter adrenerger Stimulation zu einem Sensitivitätsverlust (Bristow et al., 1982). Im Vergleich zu gesunden Probanden ist bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz der Anstieg der Ejektionsfraktion unter Dobutamin geringer ausgeprägt (Colucci et al., 1988). An dieser Desensibilisierung sind verschiedene Mechanismen beteiligt:

„Downregulation“ β_1 -adrenerger Rezeptoren, Entkopplung der Rezeptoren von ihren Effektoren und verstärkte Expression des inhibitorischen G-Proteins G_i . Die Abnahme („Downregulation“) β_1 -adrenerger Rezeptoren im insuffizienten Myokard ist gut belegt (Bristow et al., 1982). Mechanismen, die zur Abnahme der Rezeptordichte führen sind eine verminderte Rezeptorsynthese, Destabilisierung der mRNA und vermehrter Rezeptorenabbau (Rockman et al., 2002). Je nach Schweregrad und unabhängig von der zugrunde liegenden Ätiologie der Herzinsuffizienz sind β_1 -Rezeptoren und ihre mRNA auf bis zu 50% reduziert, wobei die β_2 -Subtypen nicht betroffen sind (Lohse et al., 2003; Engelhardt et al., 1996; Ungerer et al., 1993). Aktiviert ein Agonist den Rezeptor, so kommt es über G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und die Proteinkinase A zu einer Phosphorylierung des β -adrenergen Rezeptors. Hier ist vor allem GRK2 beteiligt, auch β -adrenerge Rezeptorkinase 1 (β ARK1) genannt, die in der Herzinsuffizienz verstärkt exprimiert wird. Das cytosolische Protein β -Arrestin bindet an den phosphorylierten Rezeptor (Lohse et al., 1990) und ermöglicht eine Vernetzung mit Clathrin und dem Adaptorprotein 2 (AP2; Rockman et al., 2002). So wird die Endozytose über „clathrin-coated pits“ zum Rezeptorrecycling oder -abbau ermöglicht. Die Phosphorylierung mittels GRKs und die Anlagerung von β -Arrestin führt zudem zu einer funktionellen Entkopplung vom G-Protein und damit von der Signaltransduktionskaskade. Schließlich kommt es bei herzinsuffizienten Patienten auch zu einer Zunahme von inhibitorischen G-Proteinen, die durch ihre hemmende Wirkung auf die Adenylatzyklase β_1 -adrenerge Effekte abschwächen (Neumann et al., 1988).

Ob diese Desensibilisierung deletäre oder protektive Effekte vermittelt wurde lange diskutiert. Einerseits wird durch verminderte adrenerge Signaltransduktion die positiv inotrope Wirkung abgeschwächt und so die Pumpfunktion weiter eingeschränkt. Andererseits vermittelt die β_1 -adrenerge Signalkaskade in der chronischen Herzinsuffizienz eine Reihe ungünstiger Effekte. Zum Beispiel induzieren β -adrenerge Stimuli in Kardiomyozyten den apoptotischen Zelltod (Communal et al., 1998; Shizukuda und Buttrick, 2002a). Außerdem wird der Calciumstoffwechsel beeinflusst. Die Phosphorylierung des L-Typ Calciumkanals und des Ryanodinrezeptors führen zu einem erhöhten Calciumeinstrom aus Extrazellularraum und sarkoplasmatischem Retikulum. Ein gestörter Calciumstoffwechsel mit reduzierten Gradienten und erhöhter diastolischer Calciumkonzentration ist ein wesentlicher Befund bei der chronischen

Herzinsuffizienz (Beuckelmann et al., 1992). Zudem steigt das Risiko von Arrhythmien unter adrenerger Stimulation. Es mehren sich Hinweise, dass Desensibilisierung und „Downregulation“ β_1 -adrenerger Rezeptoren einen langfristig protektiven Mechanismus darstellt. Eine Therapie mit Betablockern senkt die Mortalität entscheidend. Mitte der 70er Jahre wurden erste erfolgreiche klinische Studien publiziert (Waagstein et al., 1975). In den 90ern wurden unter anderem Metoprolol, Bisoprolol und der nicht selektive Betablocker Carvedilol in randomisierten, Placebo-kontrollierten Studien mit Akronymen wie MERIT-HF, CIBIS-II und COPERNICUS erfolgreich getestet (MERIT-HF Study Group, 1999; CIBIS-II Investigators and Committees, 1999; Packer et al., 1996). Unter Betablockade kommt es zu einem Wiederanstieg β_1 -adrenerger Rezeptoren und zu einer Resensibilisierung. Auch die Ejektionsfraktion steigt im Verlauf. Zudem normalisiert sich die Expression verschiedener in der chronischen Herzinsuffizienz differentiell exprimierter Gene (Lohse et al., 2003).

Auch in verschiedenen Tiermodellen konnte der deletäre Effekt einer chronischen adrenergen Stimulation oder einer Aktivierung der entsprechenden Signalkaskade nachgewiesen werden. Mäuse mit transgener kardiospezifischer Überexpression des β_1 -adrenergen Rezeptors entwickeln eine Herzinsuffizienz mit Hypertrophie und interstitieller Fibrose (Engelhardt et al., 1999). Auch chronische Aktivierung der Signalkaskade durch Überexpression der α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins führt zu einem ähnlichen Phänotyp (Iwase et al., 1996). Zudem ist belegt, dass die Gabe positiv inotroper Substanzen wie Katecholamine (Dobutamin, Dopamin) und Phosphodiesterasehemmer (Amrinon, Milrinon) zwar initial hämodynamische Parameter wie Auswurfleistung und Belastungstoleranz verbessert, langfristig jedoch mit einer erhöhten Mortalität verbunden ist (Erdmann, 2003). Deshalb werden sie lediglich als Überbrückung bis zur Herztransplantation oder der Implantation eines „left ventricular assist device“ (LVAD) eingesetzt.

Neurohumorale Aktivierung in der chronischen Herzinsuffizienz

Neben dem sympathischen Nervensystem werden auch andere Systeme in der Herzinsuffizienz aktiviert und tragen zur Progression der Erkrankung bei. Dazu gehört das Renin-Angiotensin-System. Ein Perfusionsabfall führt in der Niere zur Freisetzung von Renin. Dieses aktiviert zirkulierendes und gewebständiges Angiotensinogen zu

Angiotensin I, das von der Endopeptidase „angiotensin converting enzyme“ (ACE) zum aktiven Angiotensin II gespalten wird. Angiotensin II hat vielfältige Wirkungen. Es führt zur Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde und fördert so Salz- und Wasserretention. Angiotensin II ist außerdem ein potenter Vasokonstriktor und steigert so Blutdruck und Nachlast. Auch das sympathische Nervensystem wird aktiviert. Im Myokard führt Angiotensin II über AT₁-Rezeptoren zur Aktivierung von Wachstumssignaltransduktionskaskaden und pathologischem Remodeling mit Hypertrophie und Fibrose. Die Therapie mit ACE-Hemmern und AT₁-Antagonisten führt bei der Herzinsuffizienz zu einer Senkung der Mortalität und beeinflusst das Remodeling günstig (Erdmann, 2003). Auch der Aldosteron-Antagonist Spironolacton senkt die Sterblichkeit und gehört zur Standardtherapie der Herzinsuffizienz (Pitt et al., 1999). Funktionelle Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Systems sind das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das „brain“ natriuretische Peptid. Eine erhöhte Ventrikelwandspannung führt zu deren Freisetzung. Beide wirken als periphere Vasodilatoren, fördern Natriurese und Diurese und hemmen das Renin-Angiotensin-System. Die Plasmakonzentration bei der Herzinsuffizienz korreliert mit der Mortalität (Swedberg et al., 1990). Auch Endothelin-1-Spiegel sind bei der Herzinsuffizienz erhöht und korrelieren mit dem Schweregrad. Diese führen ebenfalls zu einer Vasokonstriktion, Natriumretention und pathologischem myokardialem Remodeling. Die Prüfung der Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan und Enrasentan in klinischen Studien zeigte jedoch im Gegensatz zu positiven tierexperimentellen Befunden nicht den gewünschten Nutzen (Erdmann, 2003). Bei der Pathogenese der chronischen Herzinsuffizienz sind auch proinflammatorische Cytokine beteiligt. Eine wesentliche Rolle spielt Tumornekrosefaktor α (TNF α). TNF α wird ubiquitär von Makrophagen synthetisiert, aber auch vom insuffizienten Herzen ausgeschüttet (Habib et al., 1996). Die Ausschüttung dieses proinflammatorischen Cytokins wird stimuliert durch oxidativen Stress, Druckbelastung des Myokards mit Dehnung der Kardiomyozyten und kardiale Ischämie (Erdmann, 2003). Akut und chronisch appliziert wirkt es negativ inotrop (Mann, 2003). Weitere Folgen eines erhöhten TNF α -Spiegels umfassen myozytäre Hypertrophie mit Aktivierung eines fetalen Genprogramms, Umbau der extrazellulären Matrix mit gestörter Kollagenarchitektur und fortschreitender Zellverlust durch Apoptose und Nekrose (Mann, 2003). Entsprechend

bietet ein transgenes Mausmodell, das TNF α im Herzen überexprimiert, das Bild einer dilatativen Kardiomyopathie (Kubota et al., 1997). In der humanen Herzinsuffizienz sind TNF α wie auch Interleukin-6 erhöht. Die Plasmaspiegel korrelieren mit den Stadien der New York Heart Association (NYHA) und der Mortalität (Torre-Amione et al., 1996; Deswal et al., 2001). Leider ließ sich ein positiver Effekt des TNF α -Antagonisten Etanercept in randomisierten, Placebo-kontrollierten Studien nicht nachweisen (Murray und Pfeffer, 2002).

Calciumstoffwechsel in der Herzinsuffizienz

Dem Calciumstoffwechsel kommt eine wesentliche Funktion bei der Kopplung der Depolarisation der Muskelzelle an die Kontraktion zu. Nach Depolarisation der Zellmembran zu Beginn der Systole strömt Calcium über die L-Typ Calciumkanäle des Sarkolemm ein. Vermittelt über den Ryanodinrezeptor-gesteuerten Calciumkanal wird dadurch die Freisetzung intrazellulärer Calciumspeicher getriggert. Gebunden an Troponin C löst Calcium die Kontraktion der Myofilamente aus. Calcium wird dann energieabhängig über den Natrium-Calcium-Austauscher nach extrazellulär und über die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums in die intrazellulären Speicher zurück transportiert. Dies führt zur Relaxation des Muskels (Opie, in: Braunwald, Heart Disease, 2001). In der chronischen Herzinsuffizienz ist die diastolische Calcium-Konzentration erhöht, die intrazellulären Calcium-Transienten abgeschwächt und der Abfall des Calciums verlängert (Schwinger, 2002). Unter anderem ist als Ursache ein Funktionsverlust und eine verminderte Expression der SERCA in der Herzinsuffizienz gut belegt (De la Bastie et al., 1990; Flesch et al., 1996; Hasenfuss et al., 1994). Calmodulin scheint an der Vermittlung calcium-induzierter Effekte beteiligt zu sein (Frey et al., 2000). Über die Calcium-abhängige Phosphatase Calcineurin fördert der pathologische Calciumstoffwechsel in der Herzinsuffizienz auch die myozytäre Hypertrophie. So führt eine konsistive Calcineurin-Aktivität in murinen Herzen zu Hypertrophie und Herzinsuffizienz (Molkentin et al., 1998).

Hypertrophie und differentielle Genexpression

Im Rahmen der Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz nimmt die Herzmuskelmasse zu. Da Kardiomyozyten terminal differenziert sind und deshalb eine

quantitativ bedeutsame Hyperplasie, das heißt zahlenmäßige Vermehrung, nicht eintritt, kommt es zu einer myozytären Hypertrophie. Hierbei ist sowohl eine Verbreiterung der Zellen durch veränderte Anordnung kontraktile Elemente als auch eine Verlängerung der Kardiomyozyten beschrieben. Wie die neurohumale Aktivierung ist auch die Hypertrophie eine Anpassung an die veränderte Auswurfleistung, die letztendlich bei der Herzinsuffizienz maladaptiv ist. Einerseits ist die Hypertrophie eine Reaktion auf die erhöhte Wandspannung des Ventrikels bei Druck- oder Volumenbelastung. Andererseits vermitteln auch Angiotensin II, Endothelin und Katecholamine eine hypertrophe Antwort der Kardiomyozyten (Molkentin und Dorn, 2001). An den Signalwegen, die die Hypertrophie schließlich auf molekularer Ebene steuern, sind zahlreiche Moleküle beteiligt. Neben anderen Mechanismen sind die sogenannten Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) gut beschrieben (Übersicht bei Sugden und Clerk, 1998; Hunter und Chien, 1999; Ruwhof und van der Laarse, 2000). Zu ihnen gehören die Extrazellulär-Signal-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2), c-Jun-NH₂-terminale Kinasen und p38. So führt deren Phosphorylierung zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression beeinflussen. In kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz ist deshalb das „Genprogramm“ verändert. Diese differentielle Genexpression ist für verschiedene Gene belegt. Dazu gehört auch wie oben beschrieben die SERCA. In Hypertrophie und Herzinsuffizienz wird ein fetales Expressionsmuster der Gene reaktiviert. So werden wieder fetale Isoenzyme des Energiestoffwechsels, wie zum Beispiel die Creatinkinase, exprimiert (Neubauer et al., 1995; van Bilsen, 2004). Unter anderem kommt es auch zu einer Reduktion des kontraktile Filamentes „ α -Myosin-heavy-chain“ (α MHC) zugunsten der im Fetus dominanten β MHC (Ng et al., 1991; Lowes et al., 1997). Begleitet wird die Hypertrophie von Veränderungen der extrazellulären Matrix. Der Kollagengehalt des Myokards nimmt stark zu. Histologisches Korrelat ist eine interstitielle Fibrose. Bei Volumenbelastung kommt es zudem zu einer Gefügedilatation. Dafür wird unter anderem die gesteigerte Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen verantwortlich gemacht. Diese Veränderungen bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz werden als Remodeling bezeichnet. Folge ist letztlich eine weitere Abnahme der Myokardkontraktilität. Dieses Remodeling kann durch Entlastung des Herzens partiell rückgängig gemacht werden (reverses Remodeling). Auch die differentielle

Genexpression kann sich unter Entlastungstherapie normalisieren. Dies wurde für eine mechanische Entlastung durch ein „left ventricular assist device“ (LVAD) gezeigt (Blaxall et al., 2003).

Kardiale Energetik in der Herzinsuffizienz

Neben diesen strukturellen Remodeling-Prozessen findet sich auch ein „metabolisches Remodeling“ bei Energiegewinnung und -verbrauch. Das Herz ist ein Organ mit hoher Arbeitslast und damit hohem Energieverbrauch. Diese Energie wird in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereitgestellt. Mehr als 98% des ATPs wird durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien gewonnen (Stanley und Chandler, 2002). Entsprechend nehmen die Mitochondrien ein Drittel des Zellvolumens ein (Casademont, 2002). Im gesunden Herzen dienen Fettsäuren zu ca. 65%, Glucose zu 30% als Substrat, wobei sich die Utilisation nach dem Angebot richtet (van Bilsen, 2004). Im Citratzyklus werden durch Fettsäuren über die β -Oxidation und durch Kohlehydrate die Reduktionsäquivalente NADH und FADH freigesetzt. Die folgende oxidative Phosphorylierung ist in Abbildung 1 schematisch gezeigt.

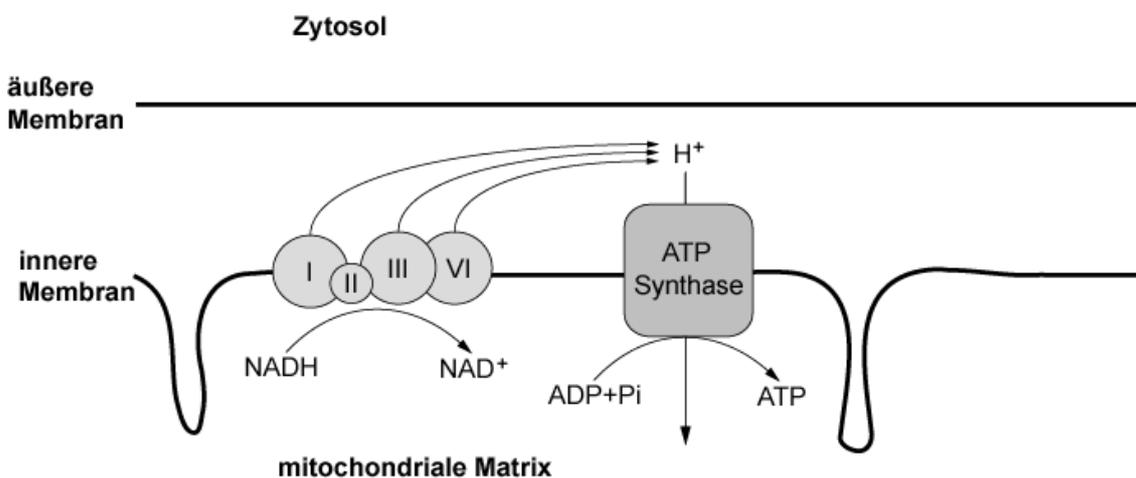


Abbildung 1. Die ATP-Gewinnung mittels oxidativer Phosphorylierung im Mitochondrium.

Von NADH und FADH werden Elektronen auf den Sauerstoff übertragen. Durch die freiwerdende Energie gelangen Protonen nach außen über die für sie nicht permeable innere Mitochondrienmembran. Diese fließen dann entlang ihres elektrochemischen Gradienten zurück ins Mitochondrium. Dabei treiben sie die membranständige ATP-

Synthese an, die aus ADP und Phosphat ATP generiert. Die Creatinkinase phosphoryliert mittels Hydrolyse von ATP Creatin zu Creatinphosphat. Bei Bedarf wird die Phosphatgruppe erneut auf ADP übertragen. Im gesunden Herzen wird so die ATP-Konzentration bei 10 mmol/l konstant gehalten, auch bei drei- bis fünffachem Herzminutenvolumen (Ingwall und Weiss, 2004). Zwei Drittel der so bereitgestellten Energie wird für Kontraktionsarbeit aufgewendet, der Rest für den Calciumtransport in das sarkoplasmatische Retikulum und die Erhaltung des Ionengleichgewichts (Stanley und Chandler, 2002). Für die Herzinsuffizienz sind verschiedene Veränderungen beschrieben worden. Glucose wird vermehrt zur ATP-Gewinnung herangezogen. Die Expression von Genen der Fettsäureutilisation sind einer Downregulation unterworfen (van Bilsen, 2004). Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) scheinen dabei eine wesentliche regulatorische Rolle zu spielen. Unabhängig von der Ätiologie der Erkrankung ist die Aktivität der mitochondrialen Enzyme und damit die Kapazität zur ATP-Produktion zunehmend eingeschränkt (Huss und Kelly, 2005). Entsprechend lässt sich in der humanen Herzinsuffizienz unterschiedlicher Genese mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie eine Reduktion des Verhältnisses von Creatinphosphat zu ATP nachweisen. Dies wurde für Herzklappenerkrankungen (Conway et al., 1991; Conway et al., 1998), ischämische und nicht-ischämische dilatative Kardiomyopathie (Neubauer et al., 1992; Hardy et al., 1991) gezeigt. In der dilatativen Kardiomyopathie ist die Creatinphosphat/ATP-Ratio ein Prädiktor für die gesamte und kardiovaskuläre Mortalität (Neubauer et al., 1997). In Pacing-induziert insuffizienten Hundeherzen war zudem der absolute ATP-Gehalt erniedrigt, wobei dies auf einen insgesamt reduzierten Purin-Pool zurückgeführt wurde (Shen et al., 1999). Auch in humanen Myokardbiopsien ist bei Erkrankung der ATP-Gehalt um 25-30% erniedrigt, ebenfalls bedingt durch einen Verlust an Purinen (Ingwall und Weiss, 2004). Dabei ist das Herz ausreichend oxygeniert. Die Ursache und pathophysiologische Signifikanz dieser Veränderungen sind noch unklar.

Tiermodelle der Herzinsuffizienz

Um pathophysiologische Zusammenhänge auch in vivo unter definierten Bedingungen erforschen zu können wird auf Tiermodelle zurückgegriffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu Mäuse mit homogenem genetischem Hintergrund verwendet. Neben der

Simulation bestimmter Konditionen wie Aortenstenose oder Myokardinfarkt durch operative Eingriffe besteht seit Anfang der 1980er Jahre die technische Möglichkeit, genetisch gezielt modifizierte Tiere zu generieren. Zunächst gelang es, ein spezifisches Gen nach pronukleärer Injektion zu überexprimieren (sogenannte transgene Modelle; Gordon et al., 1980; Palmiter et al., 1982). Später war auch das Ausschalten eines Gens durch homologe Rekombination möglich (sogenannte Knock-out-Modelle; Doetschmann et al., 1987). Ziel neuerer Entwicklungen ist das zeitlich unabhängige Induzieren von Knock-out- und transgenen Tieren. Auch eine gewebsspezifische Überexpression von definierten Genen ist möglich. Dies wird im Herzen durch die pronukleäre Injektion des Gens unter Kontrolle eines herzspezifischen Promotors, hier des α MHC-Promotors, erreicht. Zur Phänotypisierung stehen unter anderem die histologische Aufarbeitung, biochemische Messung von Markern der Herzinsuffizienz und physiologische Messungen von verschiedenen Parametern mittels Mikrokatheter zur Verfügung (James et al., 1998; Rao und Verkman, 2000; Hoit, 2001). Neben Strukturproteinen und kontraktilen Filamenten, deren Mutation zu einer Kardiomyopathie führt, konnten so verschiedene Signaltransduktionswege aufgeklärt werden, die bei der Entstehung von kardialer Hypertrophie und Insuffizienz beteiligt sind (Sugden und Clerk, 1998; Molkentin und Dorn, 2001).

Das transgene Mausmodell mit Überexpression β_1 -adrenerger Rezeptoren

Ausgangspunkt dieser Arbeit war ein transgenes Mausmodell, das β_1 -adrenerge Rezeptoren herzspezifisch 15-fach überexprimierte (Engelhardt et al., 1999). Initial waren die Ventrikel im Vergleich zu den Wildtypen aufgrund der vermehrten adrenergen Stimulation hyperkontraktile. Nach 12 Wochen war jedoch die Pumpfunktion progredient eingeschränkt. Histologische Untersuchungen zeigten eine ausgeprägte myozytäre Hypertrophie mit interstitieller Fibrose. Zudem waren klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz sowie eine erhöhte Mortalität der transgenen Tiere nachweisbar (Engelhardt et al., 1999). Intrazelluläre Calcium-Transienten waren gestört (Engelhardt et al., 2001). Durch Verpaarung mit Phospholamban-Knock-out-Mäusen konnte die Entstehung einer Herzinsuffizienz in den β_1 AR-transgenen Tieren verhindert werden (Engelhardt et al., 2004). Phospholamban fungiert als physiologischer Inhibitor der

SERCA. Das legt nahe, dass die Änderung der Calciumhomöostase bei der Vermittlung des deletären Effektes einer chronischen β_1 -adrenergen Stimulation wesentlich beteiligt ist. Außerdem fand sich bereits in der Frühphase der Erkrankung vor dem manifesten Verlust der Pumpfunktion eine Erniedrigung des Verhältnisses von Creatinphosphat zu ATP (Spindler et al., 2003). Zudem waren der Creatintransporter und die Creatinkinase-Aktivität vermindert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dem gestörten Energiemetabolismus eine wichtige Rolle zukommt. Das β_1 AR-transgene Mausmodell schien aufgrund der klassischen Pathologie und der wesentlichen Beteiligung der β -adrenergen Signaltransduktion in anderen Tiermodellen ein ideales System zu sein, um Mechanismen aufzudecken, die den Weg von der adrenergen Stimulation zur Herzinsuffizienz vermitteln. Dazu wurde nach Schlüsselproteinen bzw. Kandidatengen gesucht, die in der Krankheit differentiell exprimiert werden. Diese differentielle Genexpression könnte einerseits protektive Effekte vermitteln, andererseits aber auch zur weiteren Progression von Hypertrophie und Herzinsuffizienz beitragen. Eine Differenzierung kann über einen Therapieversuch möglich sein, wenn spezifische Inhibitoren des differentiell exprimierten Proteins bekannt sind. Im β_1 AR-transgenen Mausmodell ließ sich eine verstärkte Expression des kardialen Natrium-Protonen-Austauschers (NHE1) auf mRNA- und Proteinebene nachweisen (Engelhardt et al., 2002). Dieser reguliert den pH-Wert der Kardiomyozyten. Bei Anstieg des pH-Wertes zum Beispiel unter ischämischen Bedingungen werden Protonen im Austausch mit Natrium-Ionen nach extrazellulär gepumpt. Durch den so erniedrigten Natriumgradienten sinkt beim Natrium-Calcium-Austauscher wahrscheinlich die treibende Kraft für den Calciumtransport nach außen. Die Calciumhomöostase wird gestört. Eine Behandlung der β_1 AR-transgenen Tieren mit dem NHE1-Inhibitor Cariporide verhinderte die Entwicklung von myozytärer Hypertrophie, interstitieller Fibrose und Pumpversagen (Engelhardt et al., 2002). Um weitere differentiell exprimierte Kandidatengene im β_1 AR-transgenen Modell zu identifizieren wurde ein ungezieltes Screening mittels Gene Arrays durchgeführt. Aus mRNA revers transkribierte radioaktive cDNA-Sonden wurden auf verschiedenen Membranen hybridisiert. Die kommerziell erhältlichen Membranen enthielten 1200 Gene (Firma Clontech). Auch Membranen mit 23000 aufgebrauchten Expressed Sequence Tags (Max-Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin) fanden Verwendung. Zu den dadurch

identifizierten Kandidatengenen gehört der transkriptionelle Repressor Nab1. Durch seine transgene kardiale Überexpression konnte inzwischen seine physiologisch relevante antihypertrophe Wirkung in verschiedenen murinen Herzinsuffizienzmodellen nachgewiesen werden (Buitrago et al., 2005).

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Mittels Gene Array konnten im β_1 AR-transgenen Mausmodell verschiedene differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst das höhere Expressionsniveau zweier Kandidatengene mit spezifischeren Methoden bestätigt werden. Andere Mausmodelle der Herzinsuffizienz sollten untersucht werden, um zu klären, ob die Hochregulation ein spezifischer Effekt des β_1 AR-Transgens oder ein generelles Prinzip bei der Herzinsuffizienz unabhängig von der zugrunde liegenden Ätiologie ist. Auch humane Myokardproben standen zur Analyse zur Verfügung. Die verstärkte Expression der Kandidatengene könnte theoretisch sowohl deletäre als auch protektive Effekte vermitteln. Um diese Frage zu klären, sollten transgene Mauslinien mit kardiospezifischer Überexpression der Kandidaten generiert werden.

Material und Methoden

Material

Humane Myokardproben

Zwei Arten humaner Myokardproben wurden untersucht. Eine Gruppe bildeten terminal insuffiziente Herzen, die im Rahmen einer Herztransplantation explantiert wurden. Als Kontrollgruppe dienten gesunde Spenderherzen. Die zweite Gruppe bestand aus Proben von terminal herzinsuffizienten Patienten, bei denen zur Überbrückung bis zur Herztransplantation ein sogenanntes Left Ventricular Assist Device (LVAD) zur hämodynamischen Entlastung implantiert wurde (Jessup, 2001). Operationstechnisch bedingt entstanden bei Implantation und Entfernung des LVAD Reste linksventrikulären Myokards. Nach Entnahme wurden die Proben jeweils sofort in flüssigen Stickstoff gegeben und bei -80°C gelagert.

Tiermaterial

β_1 AR-transgene Mäuse

Zur Expressionsanalyse wurde Material von transgenen FVB/N-Mäusen unterschiedlichen Alters verwendet, die β_1 -adrenerge Rezeptoren im Herzen überexprimieren (Engelhardt et al., 1999).

β_2 AR-transgene Mäuse

Auch Proben von transgenen FVB-Mäusen, die β_2 -adrenerge Rezeptoren ca. 200-fach myokardial überexprimieren, wurden analysiert (Milano et al., 1994). Diese Population wurde durch die Gruppe von R. J. Lefkowitz (Duke University/North Carolina) zur Verfügung gestellt.

Mäuse für transgene Techniken

Bei der Generierung der transgenen Mauslinien wurden FVB/N Mäuse mit homogenem genetischem Hintergrund und „Ammenmäuse“ der Firma Harlan verwendet.

Ratten

Bei der Präparation neonataler Kardiomyozyten fanden die Herzen 1-2 Tage alter Sprague-Dawley Ratten Verwendung.

Zelllinien

COS-1	SV40-transformierte Nierenzellen des „African green monkey“	Gluzman et al., 1981
DDT ₁ -MF2	Glatte Muskelzellen aus dem Ductus deferens des Syrischen Hamsters	Syms et al., 1983
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen transformiert mit Adenovirus Typ 5-DNA	Graham et al., 1977

Bakterienstämme

Escherichia coli	Stamm DH5 α	Invitrogen
------------------	--------------------	------------

Plasmidvektoren

Bluescript KSII(+)	Optimierter Klonierungsvektor	Stratagene
--------------------	-------------------------------	------------

Oligonukleotidprimer

UCP2-Primer

593f2	5'-GTACCATCCTAACCATGGTG-3'
593r2	5'-GAGGTCATCTGTCATGAGGT-3'
UCP2hf1	5'-GCCCCCGAAGCCTCTACAAT-3'
UCPrf1	5'-GTCCGCGCAGCCTCTACAAT-3'
UCPrr2	5'-GCGGACCTTTACCACATCT-3'
UCPmf4	5'-AGCGAGCTCATGGTTGGTTTCAAGGCCACA-3'
UCPmr5	5'-CGCAGTCGACTCAGAAAGGTGCCTCCCGAGA-3'
mUCP-Sac	5'-AGAGCTCGTGGTCAAGACGAGATACATG-3'
mUCP-Hind	5'-ATCAAGCTTTTGGTAGGCAGCCATTAGGGC-3'
hUCP-Hind	5'-ATCAAGCTTAGTGCAGGCAGCCATGAGGGC-3'

DIPP2 α -Primer

059huF2	5'-TGAGGGAAGTTTATGAGGAGG-3'
059huR2	5'-AACAAAGGCATTATTATCCGG-3'
AA059F1	5'-GACGAGGTGCTGCTGGTGAG-3'
AA059R1	5'-CCAGATACTCTGCGTGGACAG-3'
059rf1	5'-TGCTGCAAGGGAAGTGTATG-3'
059rr1	5'-GAGGGAAGGGACCGTGGGAAT-3'
DIPPmf1	5'-TACGAGCTCATGAAGTTCAAGCCCAACCAG-3'
DIPPmr1	5'-CCAATGCATTGGTTCTGCAGTTCTATCTTATACTGGATGGCA-3'

α MHC-Primer

α MHCmf1	5'-AGGACTTCACATAGAAGCCTAG-3'
-----------------	------------------------------

Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Shrimp	Boehringer Mannheim
-----------------------------------	---------------------

DNase	Qiagen
Proteinase K	Applichem
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
Superscript [®] II Reverse Transkriptase	GibcoBRL
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf
T ₄ -Ligase	New England Biolabs

Medien und Puffer

Medien für die Kultur von E. coli

LB-Medium:	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl pH auf 7,4 mit 1M NaOH
Für Agarplatten:	Zusatz von 1,2 g/100ml Agar zum LB-Medium

Zur Selektion transformierter E. coli wurde 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

Medien für die Kultur eukaryontischer Zellen

Zelllinien:	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 4,5 g/l Glucose 10% (v/v) fetales Kälberserum (FCS) 2 mM L-Glutamin 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin
-------------	---

Neonatale Kardiomyozyten:	Minimal Essential Medium (MEM, Eagle) 5% (v/v) fetales Kälberserum 50 µg/ml Streptomycin 50 U/ml Penicillin 31 µg/ml Bromodeoxyuridin 2 µg/ml Vitamin B12
---------------------------	--

Allgemeine Puffer und Lösungen

Ladepuffer für Agarosegele	10 g Ficoll 400
----------------------------	-----------------

(10x)	1,86 g Na ₂ EDTA, pH 8,0 0,5 g SDS 0,125 g Xylene Cyanol ad 50 ml H ₂ O
TBE-Puffer (10x)	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA pH 8,0
MOPS-Puffer (10x)	104,7 g MOPS 3,7 g EDTA pH 7,0 mit NaOH H ₂ O ad 1000 ml
Ladepuffer für Polyacrylamidgele (3x)	0,25% (m/v) Bromphenolblau 50% (v/v) Glycerin 50% (v/v) Wasser
TAE-Puffer (10x)	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 37,2 g Na ₂ EDTA Wasser ad 1 l
Ladepuffer für RNA	1 ml 10x MOPS 5 ml 100% Formamid 1,84 ml 37% Formaldehyd 1,34 ml 87% Glycerol 50 µl gesättigte Ethidiumbromidlösung etwas Xylencyanol
TES-Puffer (1x)	10 mM Tris 5 mM EDTA 250 mM Dextrose pH 7,5 mit 10 M NaOH
PBS-Puffer (10x)	1,4 M NaCl 300 mM KCl 65 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,3

Paraformaldehydlösung 4%	4 g Paraformaldehyd 10 ml 10x PBS ad 100 ml dH ₂ O einige Tropfen 1 M NaOH
CBFHH (calcium and bicarbonate-free Hanks with Hepes)	20 mM Hepes, pH 7,4 137 mM NaCl 5,4 mM KCl 0,81 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O 5,6 mM Dextrose 0,44 mM KH ₂ PO ₄ 0,34 mM Na ₂ HPO ₄ 50000 U/l Penicillin G 50 mg/l Streptomycin

Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in höchstem erhältlichem Reinheitsgrad bezogen (Sigma, Merck, Aldrich, Roth). Soweit nicht anders angegeben wurde bidestilliertes Wasser aus der Barnstead-Anlage (Werner) verwendet.

[α - ³² P]-dCTP	Amersham Pharmacia Biotech
[α - ³² P]-dUTP	Amersham Pharmacia Biotech
Agarose	Invitrogen
Aprotinin	Sigma
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma
BCA Protein Assay	Biorad
Benzamidin	Sigma
Benzonase	Merck
Bestatin	Sigma
Chelex [®] 100 Resin	Biorad
Chloroform	Merck
Desoxynukleotide (dNTP)	Eppendorf
Ethanol	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma

Formaldehydlösung 37%	Merck
Harnstoff	Sigma
Isoprenalin	Sigma
Leupeptin	Sigma
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Bethesda Research Laboratories
Paraformaldehyd	Applichem
Pepstatin	B.M.
PMSF	Sigma
Rnasin	Promega
TEMED	Sigma
TPCK	Sigma
Trizol	Gibco BRL

Verbrauchsmaterial

Reaktionsgefäße	Eppendorf
Zellkultur-Material	Nalge Nunc International

Methoden

Kultur von Zellen

Kultur von E. coli

5 ml LB-Medium mit Ampicillin wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Rotationsschüttler (200 U/min) inkubiert (Vorkultur). Zur Plasmidpräparation in großem Maßstab wurden 250 µl der Vorkultur in 250 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht in einem 3 l-Erlenmeyerkolben bei 37°C im Rotationsschüttler (180 U/min) herangezogen (Hauptkultur). Agarplatten wurden ebenfalls bei 37°C inkubiert. Die Stammhaltung des Bakterienklons erfolgte in 35% (v/v) Glycerin bei -80°C.

Kultur eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM-Medium mit FCS, L-Glutamin, Streptomycin und Penicillin als Monolayerkulturen gehalten und in dreitägigem Rhythmus passagiert.

Präparation und Kultur neonataler Rattenkardiomyozyten

Die Präparation von Kardiomyozyten neonataler Ratten wurde unter weitgehend sterilen Bedingungen durchgeführt. Medien und Puffer wurden steril filtriert, Geräte und Verbrauchsmaterial autoklaviert. 1-2 Tage alte Ratten wurden desinfiziert und dekapitiert. Die Herzventrikel wurden nach Thorakotomie im Sulcus atrioventricularis abgezipft und in einem Trypsin- und DNase-haltigen Puffer (T/D-Puffer; 150 mg Trypsin und 2 mg DNase in 100 ml CBFHH) gewaschen. Die mit Skalpell zerkleinerten Herzen wurden in 15 ml T/D-Puffer resuspendiert und für 20 min verdaut. Nach Mischen des Ansatzes wurde der zunächst vor allem Bindegewebe enthaltende Überstand verworfen. Dieser Verdau wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das Gewebe in 15 ml T/D-Puffer für jeweils 5 min weiter verdaut. Der nun Kardiomyozyten enthaltende Überstand wurde unter dem Mikroskop durchgemustert und konserviert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis im Überstand keine Herzmuskelzellen mehr zu identifizieren waren. Um Trypsin und DNase zu deaktivieren, wurde jeweils vier Überständen 7,5 ml FCS zugefügt. Nach Zentrifugation (5 min bei 700 g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Kulturmedium (MEM mit 5% (v/v) FCS, Streptomycin, Penicillin, Bromodeoxyuridin und Vitamin B12) resuspendiert. Je drei dieser Zellsuspensionen wurden auf einer Petrischale (Ø 9 cm) ausplattiert und 120 min bei 37°C und 1% CO₂ inkubiert. Fibroblasten hafteten schnell an der Oberfläche und konnten separiert werden, indem der myozytenreiche Überstand abgenommen wurde. Zusätzlich wurde die Fibroblastenproliferation durch das im Kulturmedium enthaltene Bromodesoxyuridin gehemmt. Die Zellzahl wurde nach Färbung in 0,4% Trypanblau-Lösung (Sigma) in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt und 5 Millionen Zellen pro Petrischale (Ø 9 cm) ausplattiert.

Stimulierung von Zellen mit β -adrenergen Rezeptoragonisten

Um den Einfluss β -adrenerger Stimulation auf die Expression von UCP2 und DIPP2 α zu untersuchen, wurden neonatale Rattenkardiomyozyten und andere Zelllinien für 15-

20 h mit Isoprenalin (Endkonzentration in der Regel 10 μ M) inkubiert. Der unspezifische β AR-Agonist wurde zusammen mit dem Antioxidans Ascorbat (Endkonzentration 100 μ M) direkt in die Zellkulturschale gegeben. Das Medium enthielt 0,1-0,5% (v/v) FCS. Die Kardiomyozytenkultur wurde 3 Tage zuvor präpariert und am Vortag in Kulturmedium mit 0,5% (v/v) FCS gehalten.

Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolierung aus Herzgewebe

Um RNA aus Herzgewebe zu isolieren, wurde das RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) verwendet. Direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff gefrorenes Gewebe wurde in 500 μ l Guanidinisocyanat-haltigen RLT-Puffer gegeben und mit einem Homogenisator (Ultraturrax, IKA Labortechnik) sofort aufgeschlossen. Nach Zugabe von 980 μ l Wasser und 20 μ l einer Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) wurde der Ansatz für 10 min bei 55°C inkubiert. Nach Zentrifugation (3 min bei 10000 g) wurden 1300 μ l des Überstands abgenommen und 650 μ l 100% Ethanol zugegeben. Jeweils 700 μ l des Ansatzes wurden auf eine Säule (RNeasy[®] Mini) aufgetragen und zentrifugiert (15 sek bei 8000 g). Um Zellreste zu entfernen wurde die Säule mit 700 μ l RW1-Puffer und 1000 μ l RPE-Puffer gewaschen und schließlich mit 50 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Mit dieser Methode erhielt man ca. 10-20 μ g RNA pro Probe.

RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Um RNA aus Zellkulturen zu isolieren, wurde TRIzol[®] (Total RNA Isolation Reagent; GibcoBRL) verwendet, eine Kombination aus Phenol und Guanidinisocyanat. Die Methode basiert auf der Entwicklung von Chomczynski und Sacchi, 1987. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Schalen mit je 1 ml TRIzol[®] gespült. Der aufgefangenen Menge wurde nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur 200 μ l Chloroform zugegeben. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (15 min bei 12000 g) wurden 500 μ l der Oberphase abgenommen und zur RNA-Fällung mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min bei 12000 g) wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen. Nach der nächsten Zentrifugation (5 min bei 7500 g) wurde der Überstand erneut abgenommen, das Pellet

für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 µl Wasser gelöst. Im Photometer wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen und so die Konzentration bestimmt. Die Menge an gewonnener RNA pro Petrischale betrug je nach Zelldichte 50-200 µg.

Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Um das Ausmaß der Degradation der isolierten RNA durch RNasen zu erfassen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. 1,2 g Agarose wurde in 105 ml Wasser kurz aufgeköcht. Bei ca. 60°C wurden 12 ml 10x MOPS und 3,6 ml 37%iges Formaldehyd zugefügt. Laufpuffer war MOPS. Nach Zugabe des RNA-Ladepuffers zu 1 µg RNA wurde der Ansatz für 10 min bei 60°C denaturiert und anschließend aufgetragen. Bei 90 Volt und 4°C wurde die RNA für 3 h elektrophoretisch aufgetrennt.

Reverse Transkription von RNA (Synthese von cDNA)

Diese Methode ermöglichte die semiquantitative Übertragung von mRNA in die stabilere komplementäre cDNA, die dann in der quantitativen RT-PCR oder zur Synthese eines transgenen Vektors eingesetzt wurde. 0,5 µg RNA und 160 ng Oligo-(dT)-Primer, die an den polyadenylierten Schwanz der mRNA binden, wurden in einem Volumen von 11 ml für 10 min bei 70°C inkubiert, um die Anlagerung des Primers zu gewährleisten. Der anschließend zugegebene Reaktionsansatz enthielt 1 µl Reverse Transkriptase (SuperScript II, GibcoBRL), 4 µl Enzympuffer (first strand buffer, GibcoBRL; 250 mM TRIS-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl DTT (0,1 M; GibcoBRL), 1µl Nukleotide (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,1 µl RNase-Inhibitor (RNasin, Promega) und 0,9 µl Wasser. Bei 42°C erfolgte für 60 min die Synthese der komplementären cDNA. Die Reaktion wurde anschließend durch Inkubation bei 70°C für 10 min beendet.

Präparation genomischer DNA

Zur Genotypisierung transgener Mäuse wurde DNA aus ca. 5 mm langen Schwanzspitzen präpariert. Das Biopsat wurde in 200 µl Lysis-Puffer (2,5 ml 10% Natriumlauroylsarcosin, 1,0 ml 5M NaCl, 2,5 g Chelex[®] 100 Resin (Biorad), Wasser ad 50 ml) mittels 10 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) für mindestens 4 h bei 55°C verdaut. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min bei 18000 g) wurde das Enzym 8 min

bei 100°C inaktiviert. Nach erneuter Zentrifugation (3 min bei 18000 g) wurden 25 µl des Überstandes 1:5 mit Wasser verdünnt und davon 1 µl in die PCR eingesetzt.

Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Präparation in kleinem Maßstab

1,5 ml einer Vorkultur wurden für 10 min bei 19000 g zentrifugiert und der Überstand abgossen. Zur Präparation der Plasmide wurde das Qiagen[®] Plasmid Mini Kit (Qiagen) verwendet. Der Methode lag das Prinzip der alkalischen Bakterienlyse zugrunde. SDS fällte dann denaturierte Bakterien-DNA, Proteine und Membranbestandteile. Die gelöste Plasmid-DNA wurde mittels Isopropanol gefällt und in 70%igem Ethanol gewaschen. Das resultierende Pellet wurde in 30 µl Wasser resuspendiert. In der Regel wurden davon 2,5 µl für den anschließenden Plasmidverdau eingesetzt.

Präparation in großem Maßstab

Nach dem Verdau der Plasmide der Vorkulturen durch Restriktionsenzyme zur Kontrolle wurde aus einem Ansatz mit korrekt ligiertem Plasmid eine Hauptkultur angeimpft. Für die Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab wurde das Qiagen[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Auch hier wurden die Bakterien durch NaOH lysiert und Zellreste mittels SDS gefällt. Nachdem dieser Detritus durch Säulenreinigung beseitigt wurde, erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA in Isopropanol. Nach Waschen in 70%igem Ethanol wurde das Pellet in 250 µl H₂O resuspendiert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die resultierende Menge lag bei den verwendeten high-copy-Plasmiden im Bereich von 300-500 µg.

Endotoxin-freie Präparation in großem Maßstab

Für die Generierung transgener Mauslinien war es notwendig, bei der Plasmidpräparation schädigende Endotoxine von E. coli zu beseitigen. Dies ermöglichte das EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Das Prinzip entsprach der üblichen Plasmidpräparation. Ein spezieller Puffer fing die Endotoxine ab und verhinderte ihr Binden an die Säule. So konnte im Vergleich zur herkömmlichen Plasmidpräparation die Endotoxinkonzentration um den Faktor 100 gesenkt werden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um PCR-Produkte und verdaute Plasmide aus 0,8-1,5%igen Agarose-Gelen zu isolieren, wurde das QIAquick[®] Gel Extraction Kit der Firma Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Das über langwelligem UV-Licht ausgeschnittene Gelstück wurde gewogen und in einer Pufferlösung für 10 min bei 50°C aufgelöst. Ein Volumen Isopropanol wurde hinzugefügt, der Ansatz auf die QIAquick[®] Säule gegeben und zentrifugiert. Dann wurde die Säule mehrmals gewaschen und anschließend die gebundene DNA mit 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) eluiert.

Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Plasmide und PCR-Produkte wurden mit den vom Hersteller New England Biolabs empfohlenen Bedingungen und Puffern verdaut. Pro 1 µg DNA wurden ca. 2 U Enzymaktivität eingesetzt. Bei Mehrfachverdau mit Enzymen unterschiedlicher optimaler Salzkonzentration wurde zunächst das Enzym mit dem niedrigen Optimum eingesetzt, anschließend das zweite Enzym hinzugegeben und die Salzkonzentration entsprechend angehoben. Fand sich zusätzlich zur erwünschten eine zusätzliche Schnittstelle im Plasmid, wurde ein teilweiser Verdau („partial digest“) mit verkürzter Inkubationszeit und höherer Plasmidkonzentration durchgeführt. Anschließend wurden die Restriktionsendonukleasen entsprechend den Herstellerangaben bei 60-80°C inaktiviert.

5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um unspezifische Ligation von DNA-Fragmenten zu verhindern, wurde gegebenenfalls mittels einer alkalischen Phosphatase aus Shrimp der Phosphatrest am 5'-Ende abgespalten. Dazu wurde dem 50-70 µl großen Restriktionsansatz 1 U Phosphatase hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Inaktiviert wurde das Enzym anschließend bei 75°C.

Ligation von DNA-Fragmenten

Bei Ligation von DNA-Fragmenten aus Plasmidverdau und zur Subklonierung von PCR-Produkten wurde derselbe Ansatz verwendet. Die Fragmente wurden zuvor über Agarosegele gereinigt und durch Ethanol-fällung entsalzt. Eingesetzt wurden 100 ng Vektor, Insert in drei- bis fünffacher molarer Konzentration, 1,0 µl T₄-Ligase, 1,5µl 10x

Ligase-Puffer (New England Biolabs) und Wasser ad 15 µl Endvolumen. Als Negativkontrolle diente der Vektor ohne Insert, um den Anteil von Religationen einschätzen zu können. Als am effektivsten erwies sich die Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Direkt anschließend erfolgte die Transformation kompetenter E. coli.

Transformation kompetenter E. coli mit Plasmid-DNA

50 µl der kompetenten E. coli vom Stamm DH5α wurden langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 3 µl des Ligationsansatzes wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert, dann für 20 sec auf 37°C erhitzt. Dabei erfolgte die Aufnahme des Plasmids. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 950 µl LB-Medium ohne Ampicillin hinzupipettiert. Zur Ausbildung der Ampicillin-Resistenz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf Ampicillin-haltigem Selektivagar ausplattiert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stand eine von Kary B. Mullis entwickelte Methode zur Verfügung, um DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. In dieser Arbeit diente die Technik der Genotypisierung transgener Mäuse, der Messung des mRNA-Expressionsniveaus mittels RT-PCR und der Vervielfältigung von cDNA zur Klonierung transgener Vektoren und Herstellung von Sonden für den RNase Protection Assay.

Für die Reaktion wurden 0,1-1 µg cDNA bzw. 1 µl der 1:5 verdünnten Präparation genomischer DNA aus murinen Schwanzspitzen eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 0,5mM der entsprechenden Oligonukleotidprimer, 200 µM dNTPs, 0,1 µl Taq-DNA-Polymerase, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl und 1,5 mM MgCl₂ in einem Endvolumen von 20 µl. Um Verunreinigungen und ungewollte Amplifikation von genomischer DNA zu erfassen, diente Wasser bzw. der Ansatz der reversen Transkription ohne reverse Transkriptase als Negativkontrolle. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA bei 95°C für 5 min denaturiert. Daran schloss sich eine variable Anzahl von Zyklen an (siehe Ergebnisteil). Zu Beginn jedes Zyklus wurde die DNA bei 95°C für eine Minute denaturiert. Die Anlagerung der Primer (Annealing) erfolgte bei der Temperatur mit den besten Resultaten. Sie lag in der Regel 10°C unter dem durchschnittlichen Schmelzpunkt der Primer. Daran schloss sich die Extension der durch das Annealing entstandenen kurzen DNA-Doppelstränge durch die Taq-DNA-

Polymerase an (72°C für 1 min). Im letzten Zyklus wurde der Extensionsschritt auf sieben Minuten verlängert, um die vollständige Fertigstellung der Doppelstrang-DNA sicherzustellen.

Es wurde eine Variante der „Hot Start“ Methode gewählt, bei der die fertigen Reaktionsansätze direkt in das auf 95°C vorgeheizte PCR-Gerät (Thermocycler, Modell 2400 Perkin Elmer/Applied Biosystems) gestellt wurden. Das sollte einerseits Pipettierfehler und Verunreinigungen minimieren, andererseits unspezifisches Annealing der Primer durch zu langsames Ansteigen der Temperatur verhindern (Ausubel et al., 1995).

PCR nach reverser Transkription (RT-PCR)

Die PCR nach reverser Transkription von mRNA in cDNA (RT-PCR) dient der semiquantitativen Bestimmung von spezifischer mRNA. Dem PCR-Ansatz wurde der β -Strahler [α -³²P]dCTP in einer Aktivität von 4,4 kBq zugefügt. Endvolumen und Temperaturabfolge entsprachen der einfachen PCR. Zunächst wurde mit einem cDNA-Pool die Zyklenzahl bestimmt, bei der sich Konzentrationsunterschiede der spezifischen cDNA maximal auswirkten. Dazu wurde nach 21, 24, 27, 30 und 33 Zyklen jeweils ein Ansatz entnommen und die Radioaktivität bestimmt. Die Messung der cDNA-Konzentration der Proben erfolgte dann bei der Zyklenzahl mit der größten Effizienz. Aufgetrennt wurden die Proben mittels Polyacrylamidgelelektrophorese. Diese Methode ließ sich auch semiquantitativ ohne radioaktiv markierte Nukleotide anwenden. Dabei wurde nach Ethidiumbromidfärbung die Intensität der DNA-Banden im Agarosegel abgeschätzt.

Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten aus Plasmidverdau oder PCR erfolgte in 0,8-1,5 %igen Flachbett-Agarosegelen (0,8-1,5 g Agarose, ad 100 g 1x TAE-Puffer, nach Erhitzen 9 μ l Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml)). Als Längenstandards fanden Marker der Firma New England Biolabs Verwendung. Die Proben wurden mit mindestens 10% Ladepuffer versetzt, aufgetragen und für ca. 40 min bei 5-10 V/cm Trennstrecke aufgetrennt. Unter langwelligem UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAA-Gelelektrophorese)

Das 5%ige Polyacrylamidgel (PAA-Gel) wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach zweistündiger Polymerisation wurde es in 1x TBE-Laufpuffer in einer Elektrophoresekammer (Amersham) für 20 min bei 9 Watt vorgewärmt. Die Proben wurden mit einem Volumen Ladepuffer vermischt, aufgetragen und für 1 h bei einer Spannung von 9 Watt aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf Filterpapier bei 80°C getrocknet, auf einer mit Europium beschichteten Platte (Fujifilm) exponiert und anschließend im Phosphoimager (Fujifilm) ausgewertet.

Polyacrylamid-Gel 5%:	7,0 ml 40% Polyacrylamid 275 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat) 38,5 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin) 5,5 ml 10x TBE 18 g Harnstoff ad 55 ml destilliertes Wasser
-----------------------	---

In vitro Transkription zur Synthese von Antisense-RNA

Zur in vitro Transkription von RNA fand der MAXIscript® In vitro Transcription Kit der Firma Ambion Verwendung. Nachdem 2 µl 10x Transkriptionspuffer, je 10 nmol ATP, CTP und GTP, 0,5 pmol UTP und 12,5 pmol radioaktives [α -³²P]-dUTP zu 0,5 µg linearisierter Plasmid-DNA gegeben wurde, wurde die Transkription durch Zugabe von 2 µl RNA-Polymerase gestartet. Nach einstündiger RNA-Synthese bei 37°C wurde die Reaktion bei 95°C angehalten. Die noch enthaltene Plasmid-DNA wurde durch 2 µl DNase für 15 min bei 37°C abgebaut. Anschließend wurde der Ansatz in einem 5%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde kurz auf einem Röntgenfilm exponiert. Mit dem entwickelten Röntgenfilm konnte die das Transkript enthaltende Bande identifiziert und mit Skalpell ausgeschnitten werden. Durch Inkubation in 500 µl Elutionspuffer wurde die im Gelstück enthaltene transkribierte RNA eluiert. Das Gelstück wurde entfernt und die Radioaktivität des Eluats im β -Counter bestimmt.

RNase Protection Assay (RPA)

Um das Transkriptionsniveau spezifischer mRNAs zu quantifizieren, wurde mRNA aus Herzmuskelgewebe und Zellkultur untersucht. Als Sonde diente die mit [α -³²P]-dUTP radioaktiv markierte in vitro transkribierte Antisense-RNA. Reagenzien des RPA III®

Ribonuclease Protection Assays (Ambion) wurden verwendet. Die gereinigte RNA-Sonde und 1-10 µg Gesamt-RNA wurden vermischt und durch Zugabe von von 0,1 Volumen NH₄OAc und 2,5 Volumen Ethanol kopräzipitiert. Auf eine 30 minütige Inkubation bei -80°C folgte ein Zentrifugationsschritt (15 min bei 20000 g). Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 10 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert. Die RNA wurde für 3 min bei 95°C denaturiert. Die Hybridisierung von Sonde und Proben-RNA erfolgte für 12 h bei 45°C. Anschließend wurde einzelsträngige RNA durch Zugabe von RNase A/RNase T1 bei 37°C für 30 min verdaut. Nach erneuter Fällung der RNA-RNA-Hybride wurde das Pellet in 6 µl Ladepuffer gelöst, kurzzeitig auf 95°C erhitzt und auf ein 5%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde anschließend auf ein Filterpapier transferiert, getrocknet und auf einem Röntgenfilm (Biomax MS, Kodak) mit Verstärkerfolie exponiert. Zusätzlich erfolgte dann die quantitative Auswertung einer zuvor exponierten Europium-beschichteten Platte im Phosphoimager.

Proteinanalytische Methoden

Präparation zytosolischer Lysate aus Herzgewebe

Die nach Entnahme in flüssigem Stickstoff gefrorenen Gewebstücke wurden in 800 µl Lysispuffer gegeben und sofort mit einem Gewebshomogenisator (Ultraturrax, IKA-Labortechnik) zerkleinert. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 6%iger Benzonase (10 min Inkubation bei Raumtemperatur) wurde die genomische DNA abgebaut. Anschließend wurde das Homogenisat für 5 min im Ultraschallbad inkubiert und schließlich mittels BCA Protein-Assay (Biorad) die Proteinkonzentration bestimmt. Die Konzentration wurde mit Verdünnungspuffer angeglichen und der Ansatz mit gleichem Volumen 2x Laemmli-Puffer versetzt.

Lysispuffer:	50 mM Tris, pH 6,7 2% SDS 1 mM Na ₃ VO ₄ 2 mM PMSF 10 µg/ml Leupeptin
Verdünnungspuffer:	Lysispuffer mit 2,5% (v/v) Mercaptoethanol

Laemmli-Puffer (2x):	100 mM Tris, pH 6,8 4% (m/v) SDS 20% (v/v) Glycerin 2% (v/v) Mercaptoethanol 0,001% (m/v) Bromphenolblau
----------------------	--

Präparation kardialer Mitochondrien

Eine Präparation kardialer Mitochondrien (nach Pequeur et al., 2001) war für die von B. Miroux und seiner Gruppe durchgeführte Western Blot Analyse notwendig. Die Präparation wurde im Präparationspuffer auf Eis durchgeführt. Die Ventrikel eines murinen Herzens wurden mit Skalpell zerkleinert, dann mit 1 ml Puffer in einem Thomas' Potter zermahlen. Unzerstörte Zellen, Bindegewebe und Zellkerne wurden durch Zentrifugation (10 min bei 750 g, 4°C) entfernt und der Überstand anschließend erneut zentrifugiert (20 min bei 10000 g, 4°C). Das Mitochondrien-Pellet wurde in 1 ml Puffer resuspendiert und die beiden Zentrifugationsschritte wiederholt. Das gereinigte Pellet wurde in 10 µl Pufferlösung resuspendiert. Die mit dem BCA Protein-Assay (Biorad) ermittelte Proteinkonzentration betrug ca. 10 µg/µl.

Präparationspuffer:	TES-Puffer 1 mM Benzamidin 4 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Pepstatin A 2 µg/ml Leupeptin 5 µg/ml Bestatin 50 µg/ml TPCK 0,1 mM PMSF
---------------------	--

Generierung transgener Tiere

Linearisierung und Reinigung des transgenen Vektors

Zur Gewinnung des Plasmids, das den transgenen Expressionsvektor enthält, wurde die oben beschriebene Endotoxin-freie Plasmidpräparation angewandt. Zur Linearisierung des Vektors wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym NotI verdaut und die Fragmente in einem 1%igen low-melting Agarose-Gel bei 70 Volt elektrophoretisch

aufgetrennt (1,0 g peqGold low melt Agarose von peqLab, 1x TAE ad 100 g, 5 µl Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml)). Die Reinigung erfolgte wie oben beschrieben. Der Vektor wurde dann durch eine semipermeable Membran gegen 4 l Dialyselösung für 24 h dialysiert. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung des Dialysates über die Messung der optischen Dichte und den Intensitätsvergleich der Ethidiumbromid-gefärbten Banden im Agarosegel. Als Mengenstandards dienten transgene Vektoren von erfolgreich etablierten Mauslinien (NAB-Vektor und β_2 -Rezeptor-Vektor). Bis zur Injektion wurde der Expressionsvektor bei -20°C gelagert.

Dialyselösung:	10 mmol Tris 0,1 mmol EDTA Aqua ad iniectabilia
----------------	---

Superovulation von Spendermäusen zur Gewinnung befruchteter Oozyten

4-8 Wochen alten FVB-Mäusen wurde zum Mittelpunkt des Zyklus 7,5 Einheiten Gonadotropin intraperitoneal injiziert, um die Reifung möglichst vieler Oozyten zu stimulieren. Nach 48 h wurde die Ovulation durch Gabe von 7,5 Einheiten humanen Choriongonadotropins induziert. Anschließend wurden die Mäuse mit männlichen FVB-Tieren verpaart. Am Tag darauf wurden die Eileiter entnommen. Die Präparation der Oozyten erfolgte in 300 µg/ml Hyaluronidase enthaltendem M2-Medium (Typ IV-S, Sigma) unter der Stereolupe. Der Teil des Eileiters, der die Eizellen enthielt, wurde mit einer Kanülenspitze eröffnet. Die Hyaluronidase ermöglichte die Entfernung der Corona radiata von den Oozyten. Die so gereinigten Oozyten wurden mittels einer Transferkapillare (100 µm Innendurchmesser) in einen Tropfen Hyaluronidase-freies M2-Medium gegeben.

Pronukleäre Injektion und Ovidukttransfer

Pronukleäre Injektion und Ovidukttransfer wurden von Frau Dr. E. Schmitteckert entsprechend des Standards durchgeführt (Engelhardt et al., 1999). Ein Volumen von ca. 1 fl der Vektor-DNA wurde in den Pronukleus der isolierten befruchteten Oozyten injiziert. Je 10-20 der so behandelten Eizellen wurden in die Ampulle des Eileiters von pseudoträchtigen weiblichen CD1-Mäusen (sogenannte „Ammenmäuse“) transferiert, die am Vortag mit durch Vasektomie sterilisierten männlichen Mäusen verpaart wurden. Der Wurf der Ammenmäuse wurde durch PCR genotypisiert, um Tiere zu

identifizieren, die das transgene Konstrukt in ihr Genom aufgenommen haben (sogenannte „Gründertiere“).

Genotypisierung transgener Tiere

Um transgene von Wildtyp-Tieren zu unterscheiden, wurde wie bereits beschrieben DNA aus Schwanzspitzen isoliert und eine PCR durchgeführt. Der Vorwärts-Primer war jeweils α MHCmf1, der Rückwärts-Primer bei UCP2-transgenen Tieren 593r2 und bei DIPP2 α -transgenen Tieren AA059R1. So wurde nur in transgenen Tieren ein PCR-Produkt des Expressionsvektors amplifiziert. Als Positivkontrollen dienten die DNA des Founders und das transgene Konstrukt, als Negativkontrolle Wasser.

Histologische Methoden

Fixation und Schneiden von Gewebe

Zur Fixierung wurde das Gewebe direkt nach Entnahme für 1-2 Tage in 4%ige Paraformaldehydlösung gegeben. Anschließend wurde es im Rahmen des klinischen Routinebetriebes des Instituts für Pathologie (Universität Würzburg) über eine ansteigende Isopropanolreihe und Xylol in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Leica RM2165) wurden in der Regel 5 μ m dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgebracht und für 3 h bei 42°C getrocknet.

Färbung von Paraffinschnitten

Zunächst wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Ethanolreihe gewaschen. Zur Darstellung der Myozytenmorphologie wurden die Schnitte mit Hämatoxylin/Eosin (jeweils 10 Minuten) gefärbt. Zur Analyse von fibrotischem Gewebe wurde die Sirius Rotfärbung angewendet. Die Schnitte wurden hierfür 30 min in Sirius Rot-Lösung (1 Teil 1% Sirius Rot-Lösung, Direct Red 80, Aldrich, 9 Teile gesättigte Pikrinsäurelösung) gegeben. Die Kerne wurden in Weigert'scher Lösung gegengefärbt (1 Teil Hämatoxylin in Ethanol, 1 Teil Weigert-Reagenz (11,6 g Fe III-Cl in 1 l H₂O, 10 ml 10% HCl)). Über eine ansteigende Ethanolreihe wurden die Schnitte wieder in Xylol gebracht und gedeckelt (Histokit, Roth).

Größenmessung von Kardiomyozyten

Um die Kardiomyozytengröße morphometrisch zu erfassen, wurden Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Gewebeschnitte in definierter Vergrößerung digital fotografiert. In einem Bildverarbeitungsprogramm (Adobe Photoshop 6.0) wurden orthograd geschnittene Kardiomyozyten mit dem Cursor umfahren und die enthaltene Pixelanzahl gemessen. Die Auswertung erfolgte geblindet. Es wurden nur solche Zellen vermessen, die einen mittig angeschnittenen Zellkern zeigten.

Physiologische Methoden

Linksherzkatheterisierung von transgenen Mäusen

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Applikation von Tribromethanol (13 μ l einer 2,5%igen Lösung pro g Körpergewicht) anästhesiert und auf einer Wärmeplatte (39°C) fixiert. Nach Präparation der rechten Arteria carotis wurde ein Mikromanometer (Millar Instruments, Houston) eingebracht und über die Aorta in den linken Ventrikel vorgeschoben. Die Drucksignale wurden kontinuierlich aufgenommen und mit der Software Chart 4.2 (ADInstruments, Castle Hill, Australien) ausgewertet.

Elektrokardiogramm (EKG) von transgenen Mäusen

Narkotisierten Mäusen wurden an beiden Vorderläufen Nadelelektroden angebracht und die Spannungskurve mit einem EKG-Gerät ausgewertet.

Ergebnisse

Differentielle Genexpression von UCP2 und DIPP2 α

Die mit dem β_1 AR-transgenen Mausmodell durchgeführten Gene Arrays zeigten eine verstärkte Expression der Gene UCP2 und DIPP2 α . Da diese Methode eine relativ niedrige Spezifität aufweist, wurden die Daten zunächst mittels semiquantitativer RT-PCR und RNase Protection Assay validiert. Um die Relevanz ihrer differentiellen Expression im kranken Herzen zu testen, wurden diese Gene auch in anderen Mausmodellen und in humanen Gewebeproben analysiert. Schließlich wurde in Zellkultur untersucht, ob die Expression von UCP2- und DIPP2 α -mRNA dem Einfluss β -adrenerger Signaltransduktion unterliegt.

Vorversuche

Präparation von mRNA

Um die differentielle Genexpression von UCP2 und DIPP2 α in verschiedenen Systemen untersuchen zu können, musste zunächst RNA isoliert und in ihrer Konzentration angeglichen werden. RNA aus gefrorenem Herzgewebe wurde wie oben beschrieben gewonnen (RNeasy mini protocol, Qiagen). Um RNA aus Zellkulturen zu isolieren wurde das von Chomczynski entwickelte TRIzol[®] (Chomczynski 1993) angewandt. Die RNA-Konzentration der Proben wurde durch Messung der Extinktion bei Licht mit 260 nm Wellenlänge bestimmt. Die Endkonzentration wurde auf 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Je 1 μg RNA wurde für eine Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen eingesetzt (Abbildung 2). Einerseits ließ sich damit die korrekt angeglichene Endkonzentration überprüfen. Andererseits war die Degradation der RNA beurteilbar.

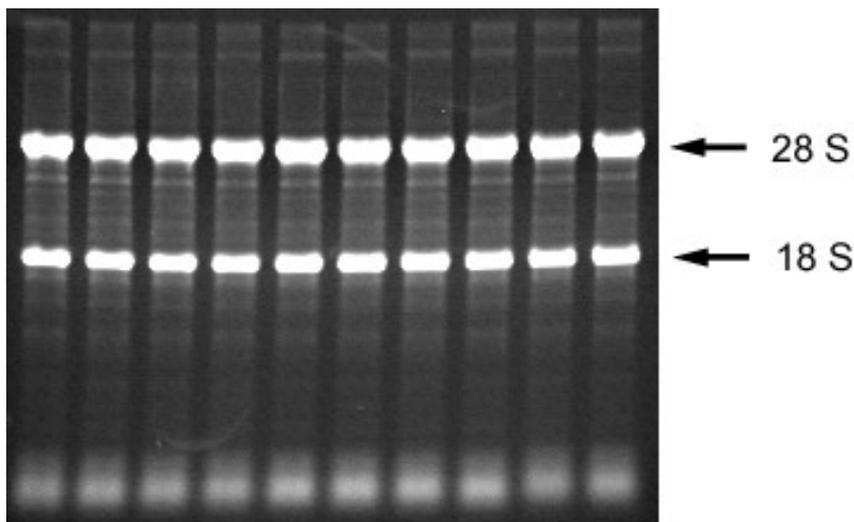


Abbildung 2. Ribosomale RNA von Kardiomyozyten zehn neonataler Ratten, aufgetrennt mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese. Die deutlich ausgeprägten und scharf abgegrenzten 28S- und 18S-Banden der hochmolekularen ribosomalen RNA und die wenigen niedermolekularen Abbauprodukte wiesen auf einen niedrigen Degradationsgrad der isolierten RNA hin.

Vorbereitung der RT-PCR

Zunächst wurde 0,5 μg der mRNA-Präparation revers transkribiert. Ein komplementärer cDNA-Strang entstand nach Anlagerung des Oligo-(dT)-Primers an den polyadenylierten mRNA-Schwanz. Die Konzentrationsunterschiede spezifischer cDNAs sollten durch die PCR möglichst sensitiv erfasst werden. Deshalb wurde zunächst für

jedes Primer-Paar mit einem cDNA-Pool die Anzahl an PCR-Zyklen ermittelt, bei der die Effizienz der Reaktion am größten ist. Im einfachen Agarose-Gel ließ sich dies durch Helligkeitsunterschiede abschätzen (Abbildung 3). Nach einer radioaktiven PCR mit PAA-Gelelektrophorese wurde nach Auswertung im Phosphoimager der Logarithmus der Aktivität der Ansätze gegen die entsprechende Zyklenzahl aufgetragen. Für die Analyse der Proben wurde diejenige Zyklenzahl gewählt, bei der die Steigung des Graphen ihr Maximum erreichte. Bei hohen Zyklenzahlen erreicht die Template-Amplifikation durch Aufbrauchen der Substrate ein Plateau (Lottspeich und Zorbas, 1998). Die eingesetzten niedrigeren Zyklenzahlen stellten sicher, dass sich Konzentrationsunterschiede spezifischer cDNAs nicht anglichen.

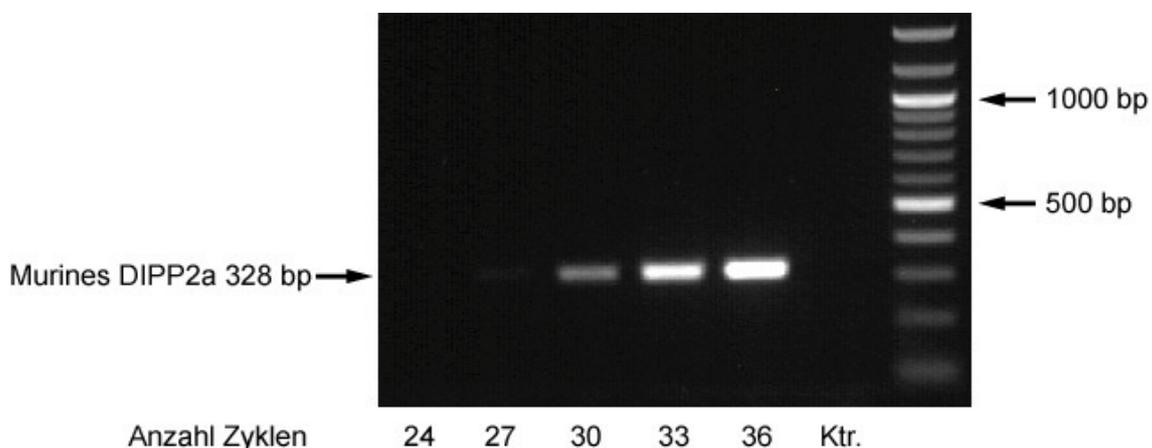


Abbildung 3. PCR von murinem DIPP2 α mit ansteigender Zyklenzahl zur Einschätzung der Zyklenzahl mit effektivster Amplifikation des Templates. Auftrennung im Agarosegel. Für die RT-PCR wurden hier 28 Zyklen gewählt.

Klonierung der Transkriptionsvektoren für die RNase Protection Assays

Die Genexpression verschiedener Gewebe wurde auch mit RNase Protection Assays untersucht. Hierbei wurde die spezifische RNA der Probe mit in vitro-transkribierten, radioaktiv markierten Antisense-RNA-Sonden hybridisiert. RNasen verdauten überschüssige einzelsträngige RNA. Anschließend wurde die Radioaktivität der geschützten Hybride gemessen. Um radioaktiv markierte Antisense-RNA herzustellen, mussten zunächst Abschnitte der entsprechenden cDNA in den Transkriptionsvektor Bluescript KSII(+) subkloniert werden. Über die im Vektor integrierten Promotoren erfolgte die Synthese der Antisense-RNA durch die RNA-Polymerasen T3 und T7. Dieses Transkriptionsvektorsystem wurde für die cDNAs der humanen UCP2-mRNA

(hUCP2), der murinen UCP2-mRNA (mUCP2) und der murinen DIPP2 α -mRNA kloniert.

Zur Klonierung von Bluescript KSII(+)-mUCP2 und Bluescript KSII(+)-hUCP2 wurde dieselbe Strategie gewählt: Zunächst wurde mittels PCR aus einem murinen bzw. humanen cDNA-Pool ein jeweils 217 bp langer cDNA-Abschnitt von UCP2 amplifiziert. Die eingesetzten Primer-Paare (mUCP-Sac/mUCP-Hind bzw. mUCP-Sac/hUCP-Hind) enthielten an ihren Enden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme SacI und HindIII. Diese Enden banden zwar nicht an die cDNA, wurden aber ebenfalls amplifiziert. Wie die so entstandenen Templates wurde auch der Transkriptionsvektor Bluescript KSII(+) mit SacI und HindIII verdaut. Anschließend erfolgte die Klonierung. Zur in vitro-Transkription von Antisense-cDNA wurde die RNA-Polymerase T7 eingesetzt.

Um ein DIPP2 α -Fragment in den Transkriptionsvektor einzusetzen, wurde das DIPP2 α -enthaltende Plasmid pUC-Mae-DIPP verwendet. Es wurde wie auch Bluescript KSII(+) mit KpnI und PstI verdaut. Der 424 Basenpaare lange DIPP2 α -Abschnitt wurde in den Transkriptionsvektor kloniert. Antisense-RNA wurde mit der RNA-Polymerase T3 hergestellt.

Um durch PCR-Amplifikation aufgetretene Fehler der SONDENSEQUENZEN aufzudecken, wurde der fertige Transkriptionsvektor ab der Promotorsequenz von T7 bzw. T3 auswärtig sequenziert (MWG-Biotech AG, Martinsried).

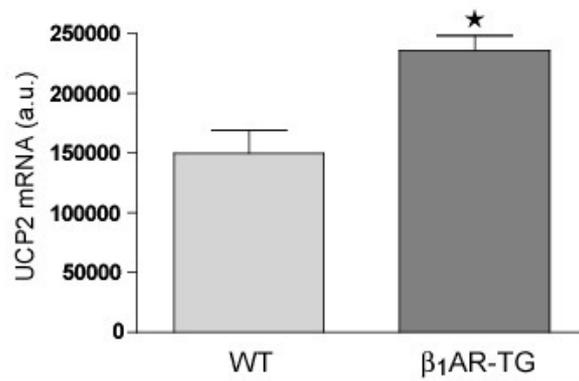
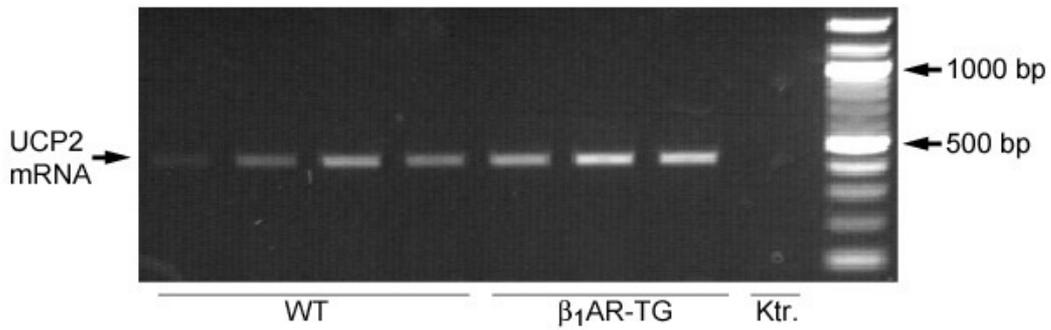
Expression von UCP2 im insuffizienten Herzen und unter β -adrenerger Stimulation in Zellkultur

Regulation im β_1 AR-transgenen Herzinsuffizienzmodell

Mit Gene Arrays wurde im murinen β_1 AR-transgenen Herzinsuffizienzmodell nach im Vergleich zum Wildtyp (WT) differentiell exprimierten Genen gesucht (Engelhardt, 2001). Schon im Frühstadium der Erkrankung (Alter: 12 Wochen) fand sich unter anderem eine erhöhte Expression der UCP2-mRNA. Um die relativ geringe Spezifität der Gene Arrays zu erhöhen, wurden diese zweimal durchgeführt. Trotzdem mussten die UCP2-Daten im β_1 AR-Transgen zunächst mit einer anderen Methode validiert werden. Abbildung 4 zeigt eine RT-PCR von mRNA β_1 AR-transgener Tiere und Wildtypen mit anschließender Auftrennung im Agarosegel, sowie die quantitative

Auswertung der radioaktiven RT-PCR im PAA-Gel. Die optimale Zyklenzahl wurde wie oben beschrieben bestimmt (Primer: 593f2/593r2, jeweils 29 Zyklen). Das erwartete Produkt war 452 bp lang. Um Verunreinigungen des Ansatzes und die unspezifische Amplifikation genomischer DNA zu erfassen, wurde wie in allen PCRs als Negativkontrolle statt cDNA der RT-Ansatz ohne reverse Transkriptase eingesetzt. Die Konzentration der eingesetzten RNA war in allen Proben gleich. Auch hier ließ sich eine verstärkte Expression von UCP2-mRNA in den kranken Tieren nachweisen. Der Effekt war in jungen Tieren (13 Wochen) signifikant ausgeprägt und im Spätstadium (11 Monate) der Erkrankung schwächer.

A



B

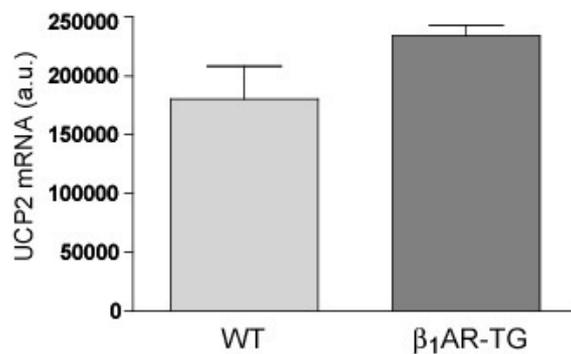
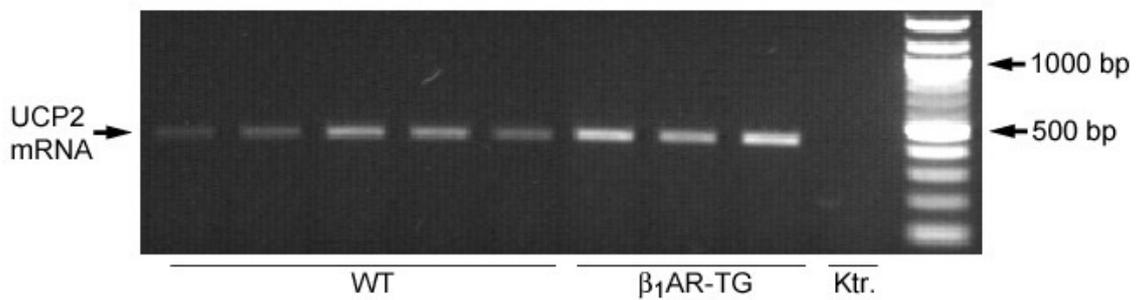


Abbildung 4. In β_1 AR-transgenen Mäusen war die Expression von UCP2 im Vergleich zum Wildtyp vertärkt. RT-PCR mit Agarosegel-Elektrophorese und quantitativer Auswertung einer radioaktiven RT-PCR in Mäusen im Alter von 13 Wochen (**A**) und 11 Monaten (**B**). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Ein ergänzender RNase Protection Assay konnte diese Daten bestätigen (Abbildung 5). Wieder wurde UCP2-mRNA β_1 AR-transgener Mäuse mit der von Wildtypen verglichen. Die Tiere waren sechs Monate alt. Gleichzeitig wurde jeweils die Expression der Glyceraldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) aus derselben Gesamt-cDNA bestimmt und die UCP2-Ergebnisse auf diesen endogenen Standard normalisiert. Die Genexpression der GAPDH, eines sogenannten Housekeeping-Genes, bleibt auch in der Herzinsuffizienz konstant (Ungerer et al., 1993) und eignet sich deshalb zur Standardisierung.

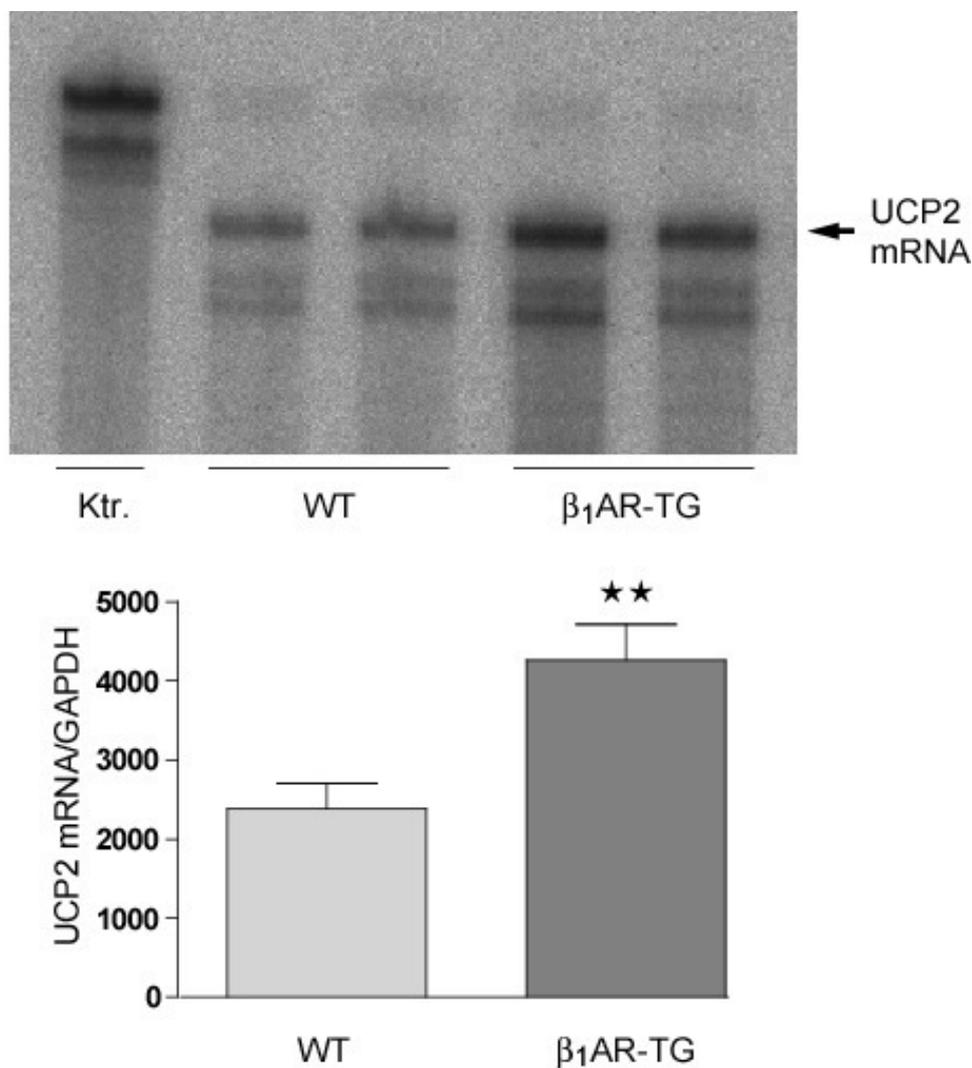


Abbildung 5. Auch ein RNase Protection Assay zeigt eine verstärkte Expression von UCP2-mRNA im β_1 AR-Transgen (Alter sechs Monate). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Regulation im Herzinsuffizienzmodell bei Aortenstenose

Es stellte sich die Frage, ob die verstärkte UCP2-Genexpression ein spezifisches Phänomen des β_1 AR-transgenen Herzinsuffizienzmodells war, oder ob es auch in Insuffizienzmodellen anderer Pathogenese zu verstärkter UCP2-Expression kam. Deshalb wurden Mäuse untersucht, die durch verstärkte Druckbelastung des linken Ventrikels bei artifizieller Aortenstenose eine Herzinsuffizienz entwickeln. Bei acht Wochen alten Mäusen wurde in Tribromethanol-Narkose die Aorta transversa bis auf ein definiertes Restlumen ligiert (sogenanntes Aortenbanding, AB). Die Kontrollgruppe stellten Mäuse, bei denen nur eine Thorakotomie durchgeführt wurde (sogenannte Sham-Operation). Die Operationen wurden durchgeführt von Frau Dienesch, Medizinische Klinik, Universität Würzburg. Nach fünf Wochen wurden die Herzen entnommen, die RNA präpariert und auf eine einheitliche Konzentration eingestellt. Mittels RT-PCR wurde das UCP2-Expressionsniveau analysiert (Abbildung 6).

Auch in in diesem durch Druckbelastung induzierten Herzinsuffizienzmodell zeigte sich eine erhöhte Expression der UCP2-mRNA.

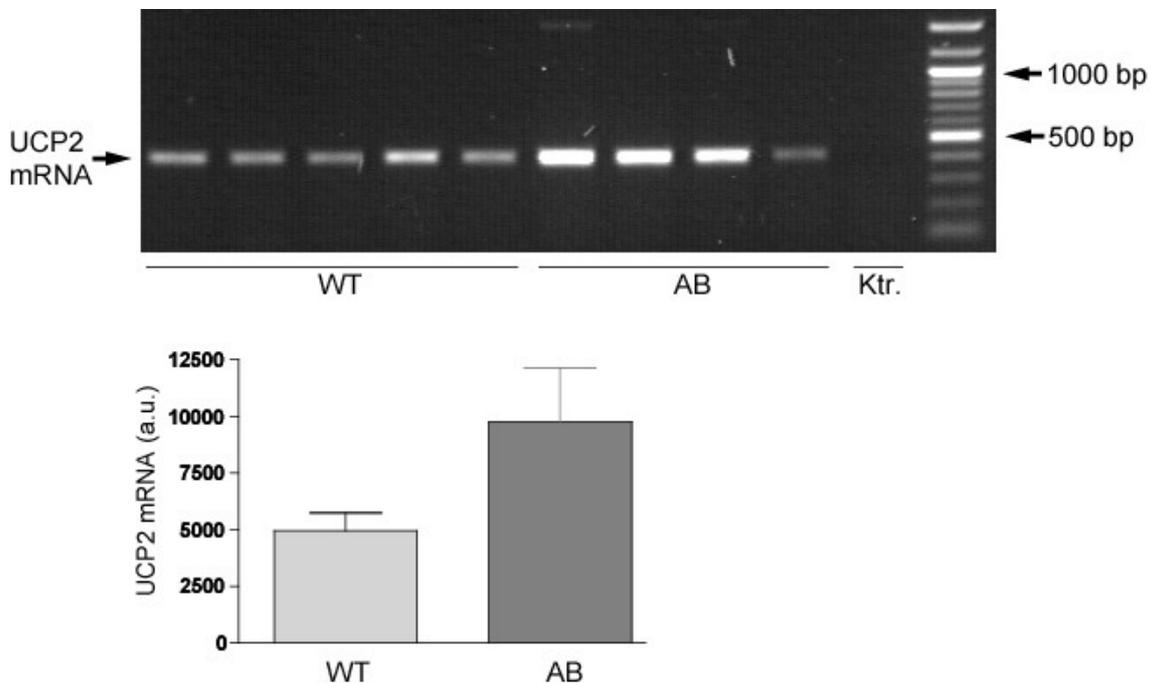


Abbildung 6. Im Herzinsuffizienzmodell nach Aortenbanding kommt es ebenfalls zu einer verstärkten Expression von UCP2-mRNA. RT-PCR mit Agarosegel-Elektrophorese und Auswertung einer radioaktiven RT-PCR von achtwöchigen Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Regulation im β_2 AR-transgenen Mausmodell

Bei der transgenen Überexpression β_2 -adrenerger Rezeptoren im Mauserzen kommt es auf die Konzentration der β_2 -adrenergen Rezeptoren an, ob sich eine Kardiomyopathie manifestiert (Liggett et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Linie mit 200-facher Überexpression von β_2 -adrenergen Rezeptoren untersucht, die erst spät eine Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion entwickelt (Milano et al., 1994). Die Herzinsuffizienz ist allerdings weit schwächer ausgebildet als bei β_1 AR-transgenen Mäusen entsprechenden Alters. Die UCP2-Expression in Herzen von sechs Wochen alten β_2 AR-transgenen Mäusen wurde mittels RT-PCR untersucht. Abbildung 7 zeigt die Auswertung. In diesem frühen Alter ließ sich keine signifikante differentielle Expression von UCP2 feststellen. Inzwischen wurde bestätigt, dass es in diesem Modell erst spät zu einem Anstieg der UCP2-mRNA kommt (Gaussin et al., 2003).

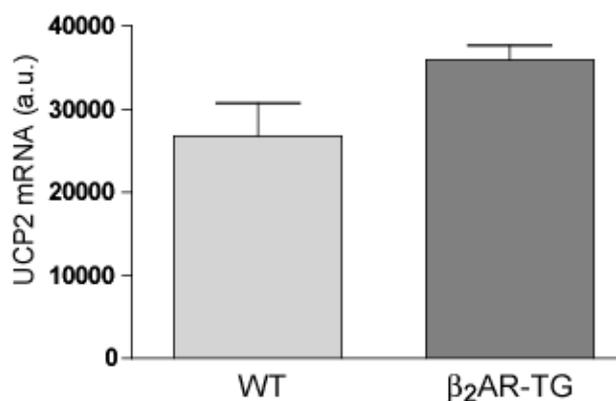


Abbildung 7. In β_2 AR-transgenen Mäusen ließ sich mittels RT-PCR keine signifikant verstärkte Expression von UCP2 nachweisen ($P=0,12$; WT $n=4$, β_2 AR-TG $n=3$). RT-PCR mit Agarosegel-Elektrophorese und Auswertung des radioaktiven Ansatzes. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Regulation bei humaner Herzinsuffizienz

Besonders interessierte die Regulation von UCP2-mRNA in der humanen Herzinsuffizienz. Zunächst wurden Herzen untersucht, die im Rahmen einer Herztransplantation explantiert wurden. Als Kontrollgruppe dienten Herzen von Organspendern, die aus organisatorischen Gründen nicht transplantiert werden konnten. Die RNA wurde präpariert und eine RT-PCR durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte im Agarosegel. Optisch ließ sich kein systematischer Konzentrationsunterschied von UCP2-mRNA feststellen. Eine zweite Gruppe humaner Myokardproben wurde untersucht. Diese stammten von terminal herzinsuffizienten Patienten, deren

Herzfunktion zeitweise mit einem externen Pumpsystem (Left Ventricular Assist Device, LVAD) unterstützt wurde. Bei Implantation und Explantation fielen operationstechnisch bedingt Gewebestücke an. Oben wurde bereits erwähnt, dass das pathologische Muster der Genexpression während der LVAD-Therapie in gewissem Maße reversibel ist. Deshalb wurde hier bei 17 Patienten die UCP2-Expression vor und nach LVAD-Therapie mit radioaktiver RT-PCR verglichen (Abbildung 8). Hier ließ sich ein Trend zur verstärkten Expression von UCP2 nach der LVAD-Therapie nachweisen, der aber nicht signifikant war.

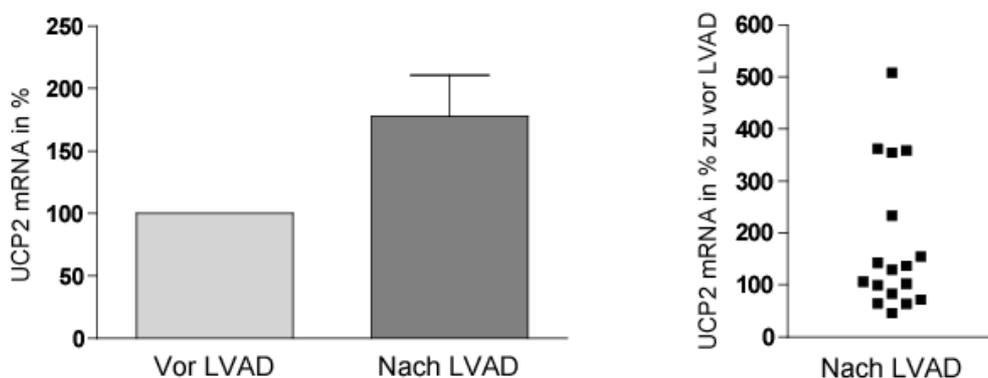


Abbildung 8. UCP2 Expression vor und nach Therapie mit LVAD in humanen Myokardproben, gemessen mittels radioaktiver RT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (links; das Expressionsniveau vor LVAD entspricht 100%) sowie die einzelnen Proben (rechts; in % zum Expressionsniveau vor LVAD). Der Unterschied war nicht signifikant (Wilcoxon Test für gepaarte Stichproben $P=0,31$, T-Test für gepaarte Stichproben $P=0,38$).

Regulation unter β -adrenerger Stimulation in Zellkultur

Die Frage war, ob die verstärkte Expression von UCP2-mRNA in den Mausmodellen einen Effekt der erhöhten β -adrenergen Stimulation darstellte, oder ob UCP2 im Rahmen anderer regulatorischer Mechanismen differentiell exprimiert wurde. Deshalb wurde die Wirkung des β AR-Agonisten Isoprenalin in verschiedenen Zellkulturen untersucht. Zunächst wurden Zellen der Linie HEK293 wie oben beschrieben mit Isoprenalin stimuliert. Die RNA wurde isoliert und eine RT-PCR (Primer: UCP2hf1/593R2; je 27 Zyklen) durchgeführt. Dann wurde die Ethidiumbromidanfärbung im Agarosegel beurteilt. Die HEK-293 Zellen schienen eine leicht verstärkte Expression von UCP2-mRNA zu zeigen (Abbildung 9). Um eine für kardiales Gewebe relevante Aussage machen zu können, wurden auch Kulturen neonataler Rattenkardiomyozyten untersucht. Die Präparation erfolgte wie oben

beschrieben. Teilweise wurden Kulturen von der Medizinischen Klinik, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt. Neben Isoprenalin wurde mit 5% FCS stimuliert und nach RNA-Präparation die Expression mittels RT-PCR (Primer: UCPrf1/UCPr2; 31 Zyklen) gemessen. Im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel konnte keine signifikante Konzentrationsänderung von UCP2-mRNA festgestellt werden (Abbildung 9).

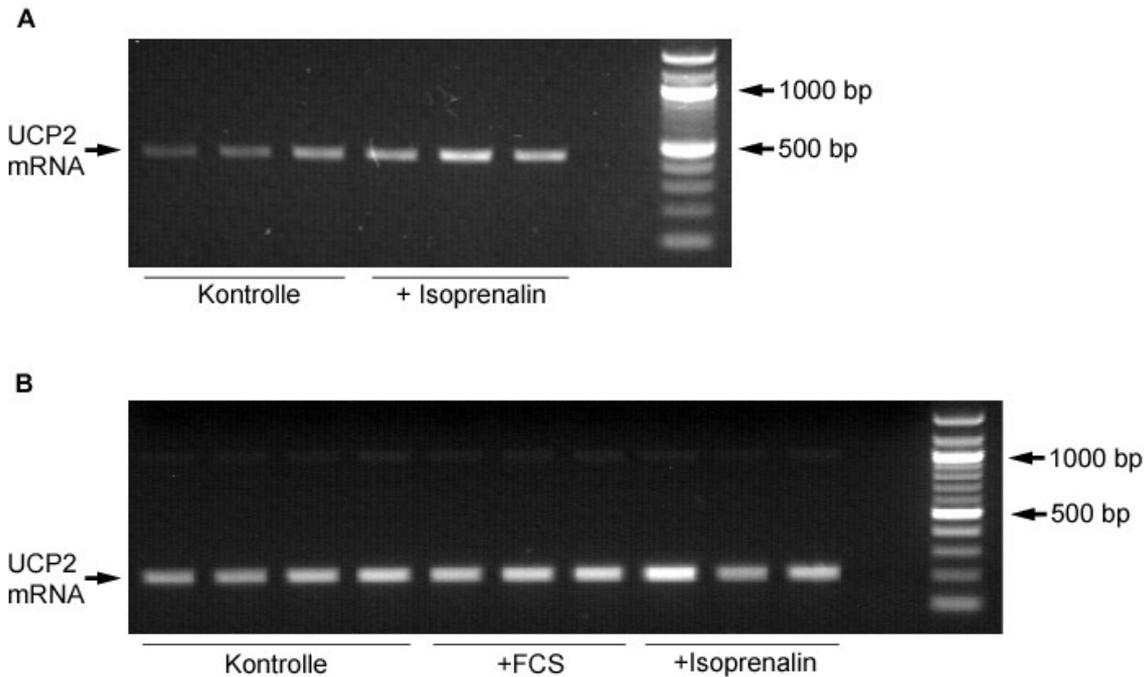


Abbildung 9. RT-PCR von UCP2 in Zellkulturen und Auftrennung im Agarosegel. **A** Nach Stimulation von HEK-Zellen mit Isoprenalin (10 μ M) ließ sich optisch eine verstärkte Expression von UCP2-mRNA feststellen. **B** In Zellkulturen neonataler Rattenkardiomyozyten führte weder die Stimulation mit Isoprenalin (10 μ M) noch mit fetalem Kälberserum (5%) zu einer optisch nachweisbar veränderten Expression von UCP2-mRNA.

Expression von DIPP2 α im insuffizienten Herzen und unter β -adrenerger Stimulation in Zellkultur

Regulation im β_1 AR-transgenen Herzinsuffizienzmodell

In den mit β_1 AR-transgenen Mäusen durchgeführten Gene Arrays konnte mit DIPP2 α ein weiteres Gen identifiziert werden, das im Herzinsuffizienzmodell verstärkt exprimiert wurde. Zunächst mussten die Daten des Gene Arrays im β_1 AR-transgenen Krankheitsmodell bestätigt werden. Herzgewebe von 13 Wochen und 11 Monate alten Mäusen wurde mit RT-PCR (Primer: AA059f1/AA059r1; 28 Zyklen bei RT-PCR mit Agarose-Gelaufreinigung, 26 Zyklen bei radioaktiver RT-PCR) untersucht. Die Länge

des amplifizierten Fragments war 328 bp (Abbildung 10). In beiden Altersgruppen war eine deutlich gesteigerte Genexpression von DIPP2 α nachweisbar.

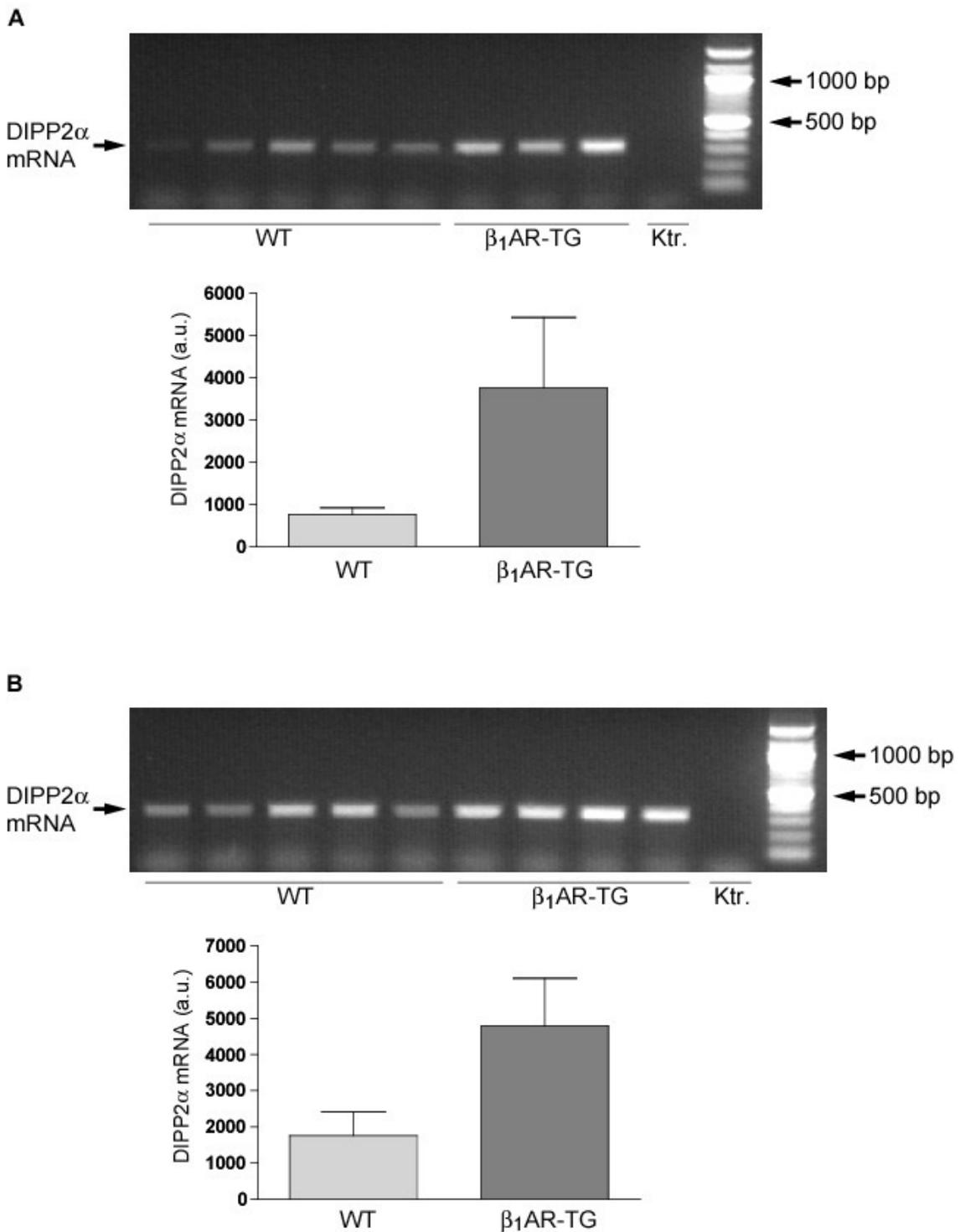


Abbildung 10. Im β_1 AR-transgenen Mausmodell ist im Vergleich zum Wildtyp die Expression von DIPP2 α verstärkt. RT-PCR mit Agarosegel-Elektrophorese und quantitativer Auswertung des radioaktiven Ansatzes in 13-wöchigen (**A**; $P=0,051$) und 11-monatigen (**B**; $P=0,063$) Mäusen. Bei gemeinsamer Analyse der Daten beider Altersgruppen war der Unterschied signifikant ($P<0,01$; T-Test für ungepaarte Stichproben). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Regulation im Herzinsuffizienzmodell bei Aortenstenose

Wie bei dem Kandidatengen UCP2 interessierte auch hier, ob die erhöhte Expression von DIPP2 α isoliert im β_1 AR-transgenen Modell vorkam, oder auch auf andere Herzinsuffizienzmodelle übertragbar war. Deshalb wurde mit radioaktiver RT-PCR die mRNA-Expression im Aortic Banding-Modell untersucht. Das Herzmaterial entsprach dem des Versuchs mit UCP2-mRNA. Eine verstärkte Expression von DIPP2 α -mRNA war auch in diesem druckinduziertem Herzinsuffizienzmodell nachweisbar.

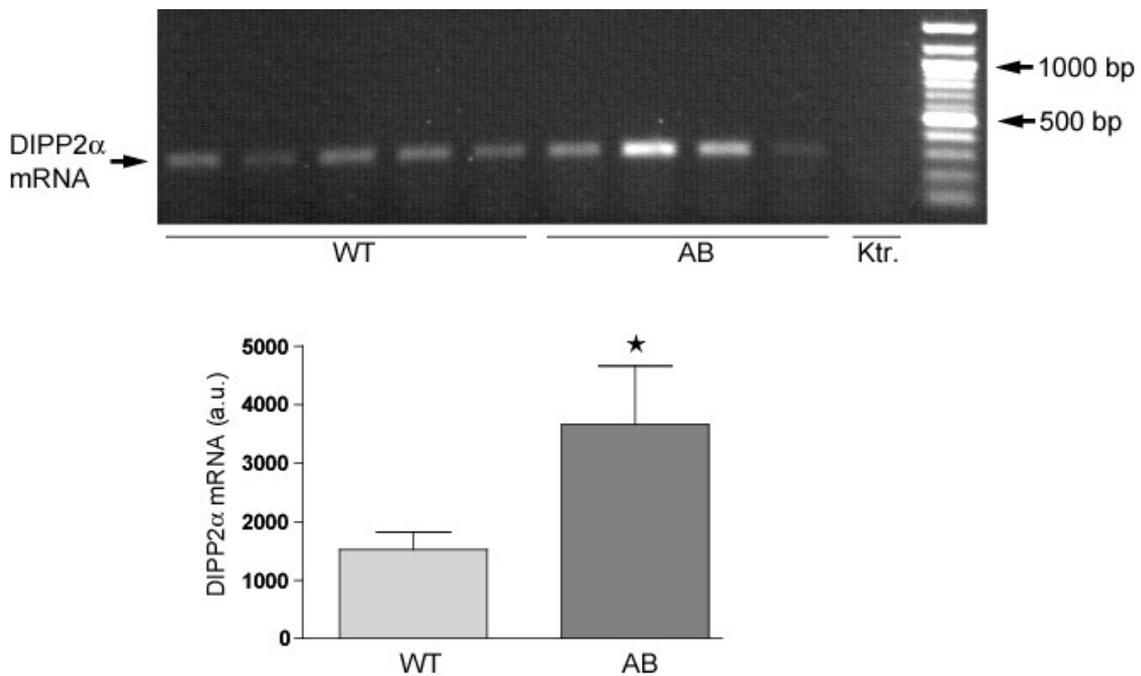


Abbildung 11. Im murinen Herzinsuffizienzmodell nach artifizierter Aortenstenose ließ sich mittels RT-PCR ebenfalls eine verstärkte Expression von DIPP2 α -mRNA nachweisen ($P < 0,05$). Dargestellt ist eine Agarosegel-Elektrophorese sowie die Auswertung der radioaktiven RT-PCR. Das Balkendiagramm entspricht dem Mittelwert \pm SEM.

Regulation im β_2 AR-transgenen Mausmodell

Auch das oben beschriebene β_2 AR-transgene Mausmodell wurde hinsichtlich seiner DIPP2 α -Expression analysiert. Es wurden dieselben Proben wie oben verwendet (200-fache Überexpression des β_2 AR; Alter: sechs Wochen). Abbildung 12 zeigt das Agarosegel und die Auswertung der radioaktiven RT-PCR. Schon in diesem frühen Stadium kam es offensichtlich zu einem Anstieg von DIPP2 α -mRNA in den transgenen Tieren.

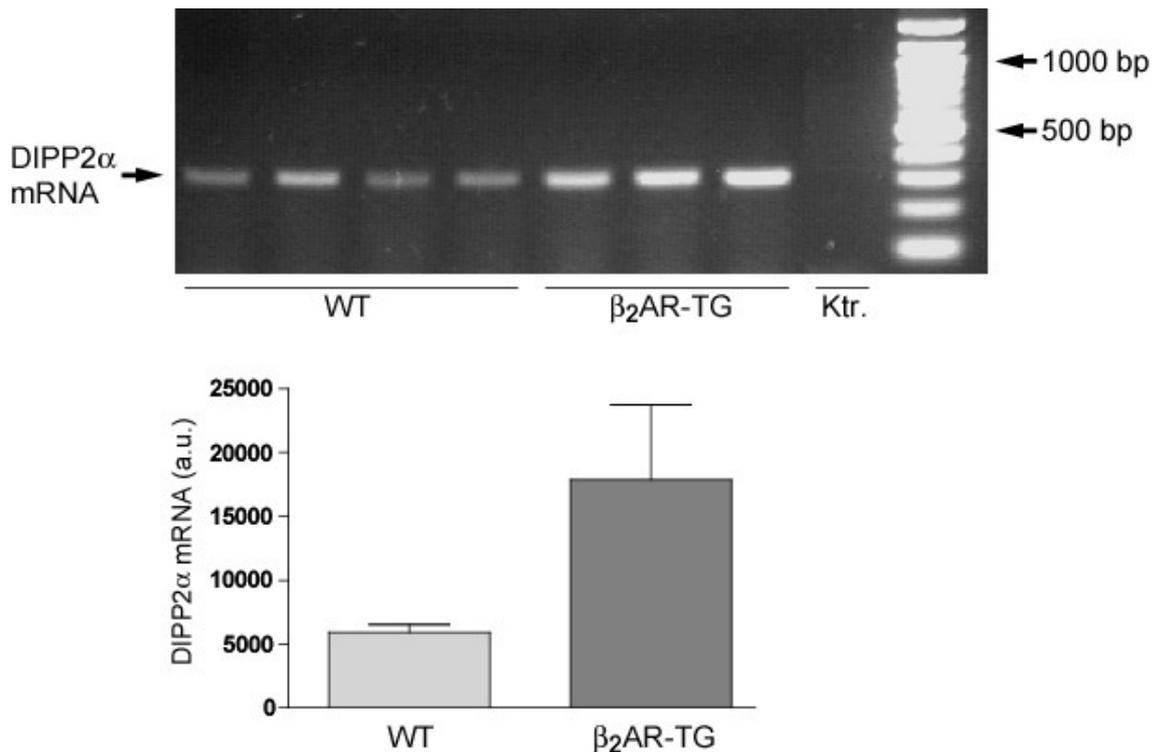


Abbildung 12. In β_2 AR-transgenen Mäusen ließ sich mittels RT-PCR eine verstärkte Expression von DIPP2 α nachweisen, die allerdings nicht statistisch signifikant war. ($P=0,059$; WT $n=4$, β_2 AR-TG $n=3$). RT-PCR mit Agarosegel-Elektrophorese und Auswertung des radioaktiven Ansatzes. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Regulation bei humaner Herzinsuffizienz

Die Expressionsanalyse von DIPP2 α wurde mit den oben beschriebenen Patientenkollektiven mittels RT-PCR durchgeführt. In den Proben der terminal insuffizienten Herzen, die nach Transplantation anfielen, ließ sich im Vergleich zu gesunden Spenderherzen optisch kein Expressionsunterschied feststellen (RT-PCR mit Agarosegel-Auftrennung, Primer: 059huF2/059huR2, Template: 307 bp, 34 Zyklen). Auch in Proben von Patienten bei Implantation und bei Explantation eines Left Ventricular Assist Device (LVAD) wurde die DIPP2 α -mRNA gemessen. Die quantitative Auswertung der radioaktiven RT-PCR (Primer: 059huF2/059huR2, 30 Zyklen) zeigte keinen systematischen Expressionsunterschied.

Regulation unter β -adrenerger Stimulation in Zellkultur

Auch die Expression von DIPP2 α unter β -adrenerger Stimulation in Zellkulturen wurden aus oben genannten Gründen durchgeführt. Die Detektion von DIPP2 α -cDNA durch RT-PCR erwies sich in den Tumorzelllinien als schwierig. Versuche mit COS-1-

und DDT₁-MF2-Linien brachten keine brauchbaren Ergebnisse. Deshalb wurden auch hier Kulturen neonataler Rattenkardiomyozyten mit 5% FCS oder 10 μ M Isoprenalin stimuliert. Allerdings ließ sich auch hier nach RT-PCR (Primer: 059rf1/059rr1, 29 Zyklen) im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel optisch keine verstärkte DIPP2 α -Expression unter Isoprenalin oder 5% FCS feststellen (Abbildung 13).

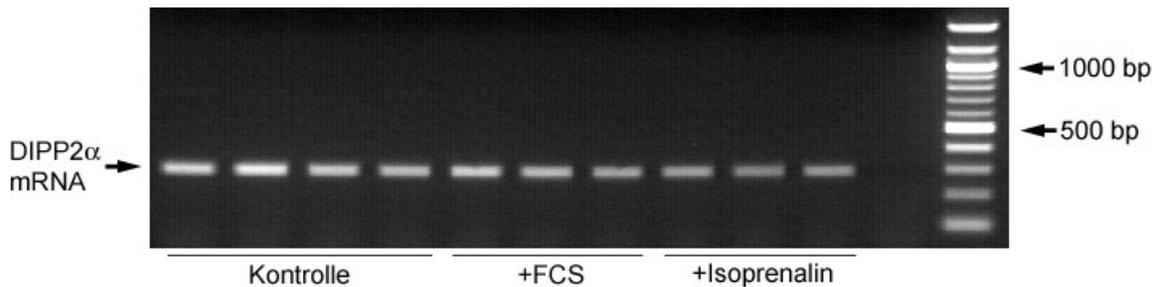


Abbildung 13. In Zellkulturen neonataler Rattenkardiomyozyten ließ sich nach Stimulation mit Isoprenalin (10 μ M) oder mit fetalem Kälberserum (5%) in der Agarose-Gelelektrophorese optisch keine veränderte Expression von DIPP2 α -mRNA nachweisen.

Generierung UCP2-transgener Mäuse

Konstruktion des Transgenvektors und pronukleäre Injektion

In mehreren murinen Herzinsuffizienzmodellen fand sich eine verstärkte Expression von UCP2-mRNA. In β_1 AR-transgenen Mäusen trat sie früh im Krankheitsverlauf noch vor Entwicklung eines Pumpversagens auf. Diese differentielle Expression von UCP2 konnte protektiven oder rein adaptativen Charakter haben, aber auch ein deletärer Effekt bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz war denkbar. Um die Folgen erhöhter UCP2-Expression zu untersuchen, wurden transgene Mauslinien hergestellt, die UCP2 isoliert im Herzen überexprimierten. Der herzspezifische murine Promotor der schweren α -Myosinkette (α -myosin heavy chain, α MHC) wurde verwendet. Da der Promotor an seinem 3'-Ende keine hier brauchbaren Schnittstellen aufwies, war eine Klonierung in zwei Schritten notwendig. Zwei Plasmide, die nach Generierung einer anderen transgenen Linie bereits vorlagen, enthielten je das 3'- (pUC-Mae- β_2) und 5'-Fragment (pBlue- α MHC- β_2 AR-SV40tpolA) des Promotors. Zunächst wurde die kodierende Region von UCP2 aus muriner cDNA mit PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer (UCPmf4/UCPmr5) enthielten an ihren Enden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme SacI und SalI. Das UCP2-Gen besteht aus zwei offenen Leserahmen (open reading

frames, ORF). Zur Herstellung des Transgenvektors wurde die mRNA von ORF2 (Exon 3-8, Länge: 930 bp) verwendet. ORF 1 (Exon 1-2) kodiert für ein 38 Aminosäuren großes Peptid, das wahrscheinlich die Translation von UCP2-mRNA hemmt (Pecqueur et al., 2001). Das Template und das Plasmid pUC-Mae- β_2 wurden mit den Restriktionsenzymen SacI und Sall verdaut und UCP2 hinter das 3'-Ende des α MHC-Promotors kloniert (pUC-Mae-UCP2). Im zweiten Schritt wurde pUC-Mae-UCP2 und das 5'-Ende des α MHC-Promotors enthaltende Plasmid pBlue- α MHC- β_2 AR-SV40tpolA mit HindIII und SacI geschnitten. Durch Ligation der entsprechenden Fragmente erhielt man pBlue- α MHC-UCP2-SV40tpolA, das den kompletten Transgenvektor enthielt. Um die Überlebenswahrscheinlichkeit der Oozyten nach pronukleärer Injektion zu erhöhen, wurde das Plasmid endotoxinfrei präpariert (siehe oben). Anschließend wurde durch Verdau mit NotI der 6914 bp lange Transgenvektor herausgeschnitten und so linearisiert (Abbildung 14).

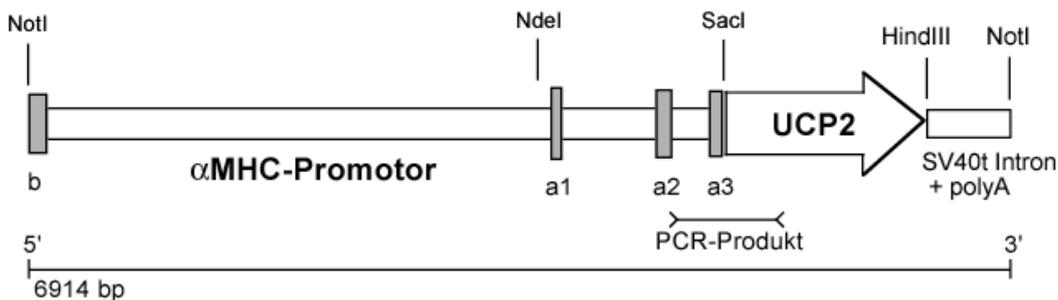


Abbildung 14. Schematische Darstellung des 6914 bp langen Transgenvektors. An das 3'-Ende des α MHC-Promotors wurde die 930 bp lange kodierende Sequenz von UCP2 Exon 3-8 kloniert. Ein folgendes Intron des simian virus 40 sowie ein PolyA-Signal verbesserten Expressionsstärke und Stabilität der transkribierten mRNA. Gezeigt ist auch das PCR-Produkt, das zur Genotypisierung diente.

Am 3'-Ende des UCP2 Konstrukts schloss sich ein dem simian virus 40 (SV40) entstammendes Intron an, das die Expressionsstärke verbesserte. Abgeschlossen wurde das Konstrukt durch ein PolyA-Signal, das die prozessierte mRNA stabilisierte. Wie oben beschrieben wurde der Vektor dialysiert und die Konzentration auf 1,8 ng/ μ l eingestellt. Befruchtete Oozyten wurden nach Superovulation isoliert. Der Injektion des Vektors in den Pronukleus folgte die Einpflanzung der Eizellen in pseudotrchtige Ammenmäuse (Engelhardt et al., 1999). Die Tiere dieses Wurfes werden als Gründer-Tiere oder F0-Generation bezeichnet.

Genotypisierung und Verpaarung

Schwanzbiopsien der F0-Generation wurden durch PCR mit transgenspezifischen Primern (α MHCmf1/593r2, 38 Zyklen, Produktlänge 738 bp) genotypisiert. Ein PCR-Produkt ließ sich nur bei Tieren nachweisen, die das transgene Konstrukt in das somatische Genom integriert hatten. Davon konnten fünf Tiere identifiziert werden (siehe Abbildung 15). Diese wurden als TG 1 bis 5 bezeichnet. Die Gründer-Mäuse TG1, TG2, TG3 und TG5 wurden weiter mit Wildtyp-FVB Mäusen verpaart. Die Nachkommen der Gründer-Tiere TG2 und TG5 (F1-Generation) zeigten keine Integration des Transgenvektors. Diese Gründer-Tiere waren also keine Keimbahnüberträger. Doch mit den Gründer-Mäusen TG1 und TG3 konnten zwei unabhängige transgene Linien etabliert werden. Transgene Tiere wurden immer mit Wildtypen verpaart. Da jedes Elterntier bei Verschmelzung der Gameten je ein Chromosom beiträgt, besteht ein Wurf statistisch zu je 50% transgenen und Wildtyptieren. Die Zucht der Linie UCP2-TG1 gestaltete sich initial schwierig, da weibliche Tiere verzögert trächtig wurden. Kam es doch zum Wurf, starben die Jungen oft in den ersten Tagen. Dieses Problem löste sich schließlich durch männliche Transgene in der F2-Generation, die dann mit weiblichen Wildtyp-Tieren verpaart werden konnten.

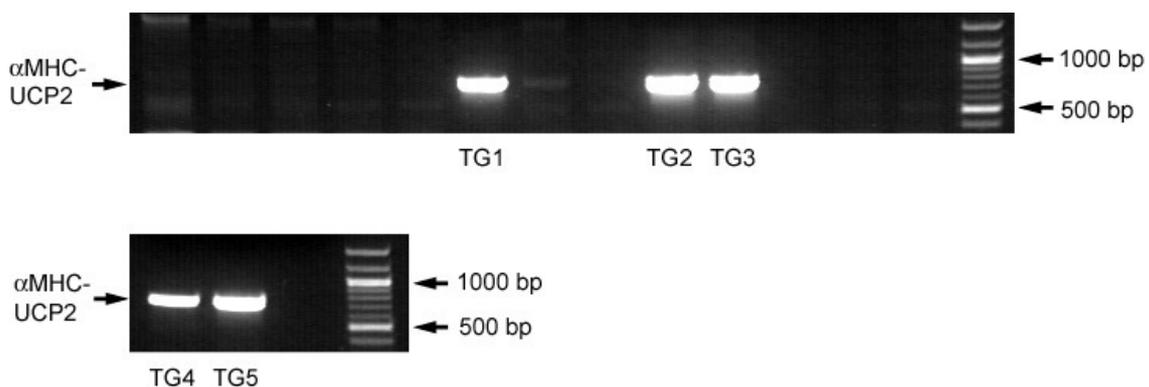


Abbildung 15. PCR zur Genotypisierung der Gründer-Generation (F0). Bei fünf Tieren, die den Transgenvektor in ihr Genom integrierten, ließ sich das in Abbildung 14 dargestellte PCR-Produkt der Länge 738 bp nachweisen.

Initiale Charakterisierung

Nächster Schritt war die Charakterisierung der UCP2-transgenen Mäuse hinsichtlich ihres Expressionsniveaus von UCP2-mRNA. Die RNA von drei Wildtypen (4 Monate), vier UCP2-TG1-Mäusen (4 Monate) und vier UCP2-TG3-Mäusen (2 Monate) wurde jeweils gepoolt. Mit einem RNase Protection Assay wurde die UCP2-mRNA-Konzentration gemessen (Abbildung 16). In beiden transgenen Linien war eine starke Überexpression von UCP2-mRNA sichtbar. Im Vergleich zum Wildtyp war die Expression in der Linie TG1 um den Faktor 65 und in TG3 um den Faktor 57 erhöht. Um zu untersuchen, ob sich die mRNA-Überexpression auch auf Proteinebene widerspiegelt, wurden Western-Blots durchgeführt. Da kommerziell erhältliche UCP2-Antikörper das Protein nur unspezifisch erkennen (Pecqueur et al., 2001), wurde eine Kooperation mit der Gruppe von B. Miroux (Meudon/Frankreich) initiiert. Die Western Blots wurden dort mit einem polyklonalen Antikörper gegen humanes UCP2 durchgeführt. Mäuse, bei denen das UCP2-Gen ausgeschaltet wurde (Knock-Out-Mäuse, UCP2^{-/-}), standen als Negativkontrolle zur Verfügung. Da UCP2 ein mitochondriales Protein ist, wurden für den Western Blot Mitochondrienpräparationen (siehe Methodenteil) verwendet. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis. Positivkontrolle war Lungengewebe, wo UCP2-Protein in großen Mengen vorkommt. Im Wildtyp-Herzen konnte bislang kein UCP2 im Western Blot nachgewiesen werden. Die Analyse der beiden UCP2-transgenen Linien zeigte, dass UCP2-Protein in verschiedener Konzentration translatiert und im Mitochondrium eingebaut wurde. Die Integration des Transgenvektors führte also zu einer Überexpression von UCP2-Protein. Dabei war das Transgenniveau in Linie TG1 höher als in TG3. Die Ergebnisse wurden auf die Cyclooxygenase 1 (COX1) normalisiert.

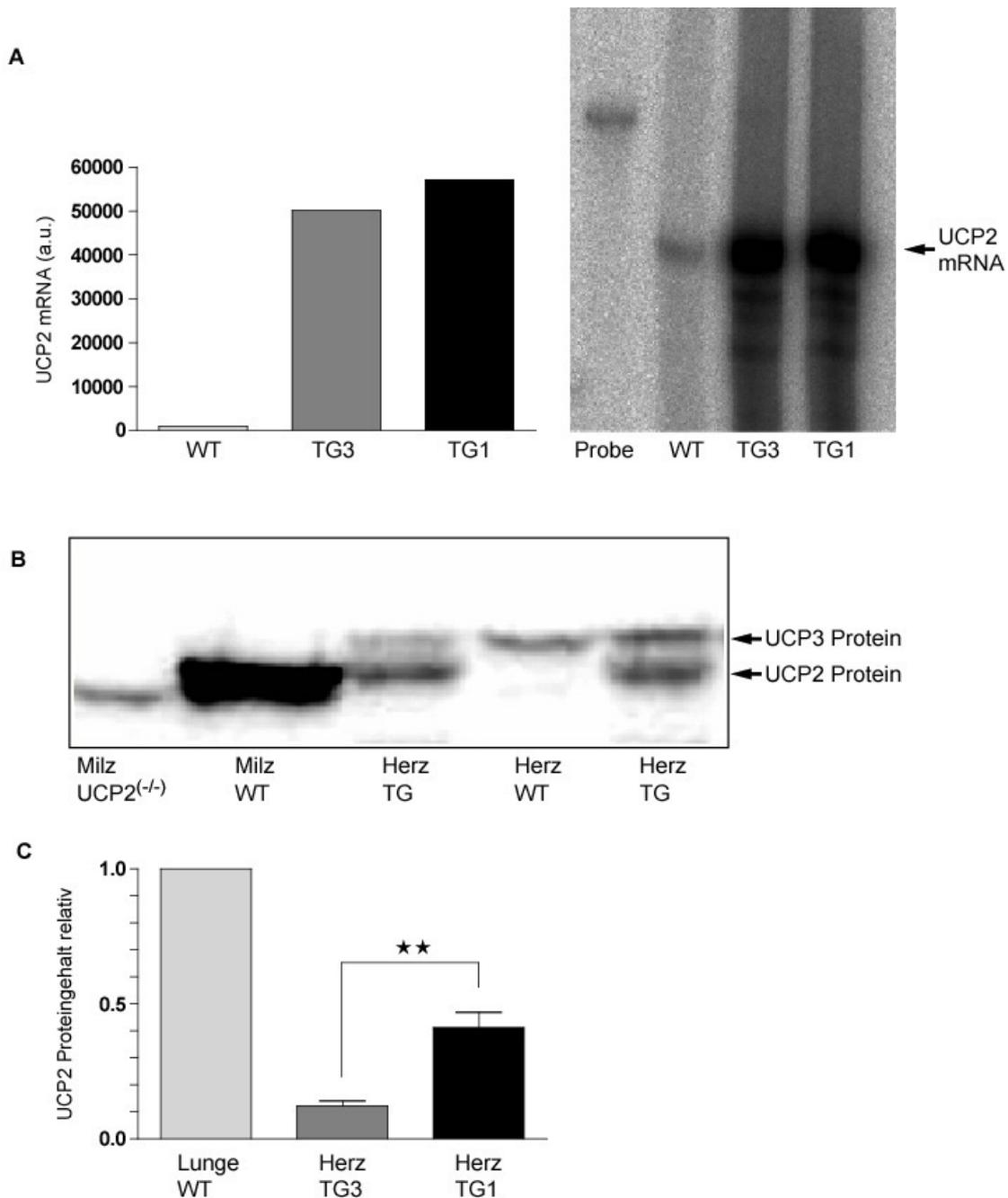


Abbildung 16. A Expressionsniveau von UCP2-mRNA in den Linien UCP2-TG3 und UCP2-TG1. Für den RNase Protection Assay wurde die RNA von drei Wildtypen (4 Monate), vier UCP2-TG1-Mäusen (4 Monate) und vier UCP2-TG3-Mäusen (2 Monate) gepoolt. Im Vergleich zum Wildtyp war die Expression in der Linie TG1 um den Faktor 65 und in TG3 um den Faktor 57 erhöht. **B** Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen humanes UCP2 und UCP3. Als Negativ- und Positivkontrolle diente Milzgewebe von UCP2-Knockout- und Wildtyp-Mäusen. Die Bande im UCP2-Knockout entspricht einer unspezifischen Bindung. In den Herzen der transgenen Linien ließ sich UCP2-Protein nachweisen. Mit dem verwendeten Antikörper wurde im Wildtyp-Herzen kein UCP2 detektiert. **C** Quantitative Auswertung des Western Blots. Der UCP2-Gehalt der Lunge wurde auf 1,0 gesetzt. In Herzen der Linie TG1 (n=2) war UCP2 in höherer Konzentration vorhanden als in TG3-Tieren (n=3; P<0,01). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Der Western Blot und die quantitative Auswertung wurden durchgeführt durch die Gruppe von B. Miroux (Meudon/Frankreich).

Charakterisierung des Phänotyps von Mäusen mit kardialer UCP2-Überexpression

Kardiale Pathologie des Gründer-Tieres TG4

Das männliche Gründer-Tier TG4 wuchs schlecht und war kachektisch. Die Verpaarung mit zwei FVB-Weibchen blieb erfolglos. Als die Maus nach vier Wochen präterminal war, wurde das Herz entnommen. Aus der Brusthöhle entleerte sich ein Pleuraerguss. Das Herz wurde in Paraformaldehyd fixiert und zusammen mit einer gleichaltrigen Wildtyp-Kontrolle fotografiert (Abbildung 17). Beide Vorhöfe waren extrem dilatiert und mit thrombotischem Material gefüllt. Im linken Ventrikel war histologisch interstitielle Fibrose sichtbar.



WT



UCP2-TG4

Abbildung 17. Herz von Wildtyp und Gründer-Tier UCP2-TG4 im Alter von vier Wochen.

Phänotyp der Linie UCP2-TG1

Bei dieser Linie mit hoher kardialer UCP2-Überexpression gestaltete sich wie oben beschrieben die Aufzucht schwierig. Weibliche Transgene waren nach Verpaarung offensichtlich kaum in der Lage, zu werfen und den Wurf groß zu ziehen. Die Mortalität der transgenen Mäuse war jedoch nicht erhöht.

Herzen transgener Mäuse, die nach vier Monaten entnommen wurden, boten einen zu Abbildung 17 ähnlichen Aspekt. HE-gefärbte Gewebeschnitte durch den Vorhof zeigten auch hier eine prominente atriale Vergrößerung, die sich im Verhältnis von Vorhof- zu Körpergewicht niederschlug (Abbildung 18). Unter dem Mikroskop schien die Anzahl der Zellkerne pro Gesichtsfeld in den Vorhöfen der UCP2-TG1-Tiere erhöht, ein Hinweis auf eine eventuell vorliegende Hyperplasie. Des Weiteren wiesen die dilatierten transgenen Vorhöfe eine gestörte Architektur mit randständigen organisierten Thromben auf. Die Veränderungen des Vorhofs waren in männlichen TG1-Tieren stärker ausgeprägt. Schon in drei Monate alten Transgenen ließen sich dilatierte Vorhöfe nachweisen.

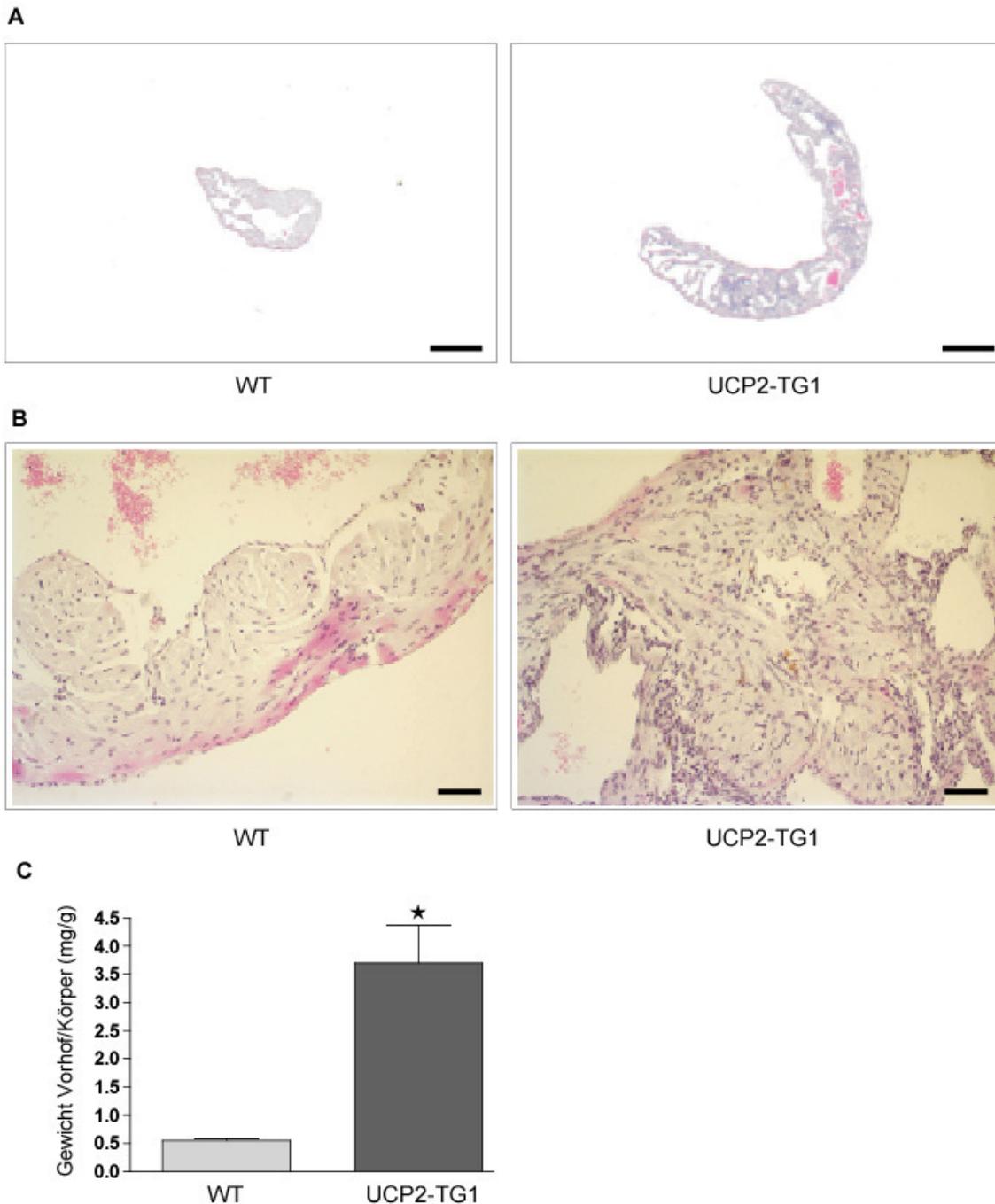


Abbildung 18. **A** Die Vorhöfe der Linie UCP2-TG1 waren dilatiert und mit thrombotischem Material gefüllt. **B** In stärkerer Vergrößerung wird die erhöhte Zellkerndichte in den UCP2-transgenen Vorhöfen sichtbar. **C** Im Vergleich zum Wildtyp war das Verhältnis von Vorhof zum Körpergewicht stark erhöht ($P < 0,05$; Mittelwerte \pm SEM).

Auch die Auswirkungen von transgen überexprimiertem UCP2 im Ventrikel wurden untersucht. Das Gewicht der Herzkammern in Relation zum Körpergewicht war ebenfalls signifikant leicht vergrößert in viermonatigen Tieren der Linie TG1. Deshalb

wurde die Querschnittsgröße kardialer Myozyten in HE-gefärbten Gewebeschnitten von je vier Wildtyp-Tieren und TG1-Tieren bestimmt. Im Alter von vier Monaten ließ sich hier morphometrisch allerdings keine zelluläre Hypertrophie feststellen (Abbildung 19). Um nach Zeichen fibrotischen Umbaus zu suchen wurden Gewebeschnitte achtmonatiger Mäuse mit Sirius-Rot gefärbt. Tatsächlich konnte in den Tieren der Linie TG1 eine diffuse interstitielle Fibrose als Hinweis auf Remodeling-Prozesse festgestellt werden (Abbildung 19).

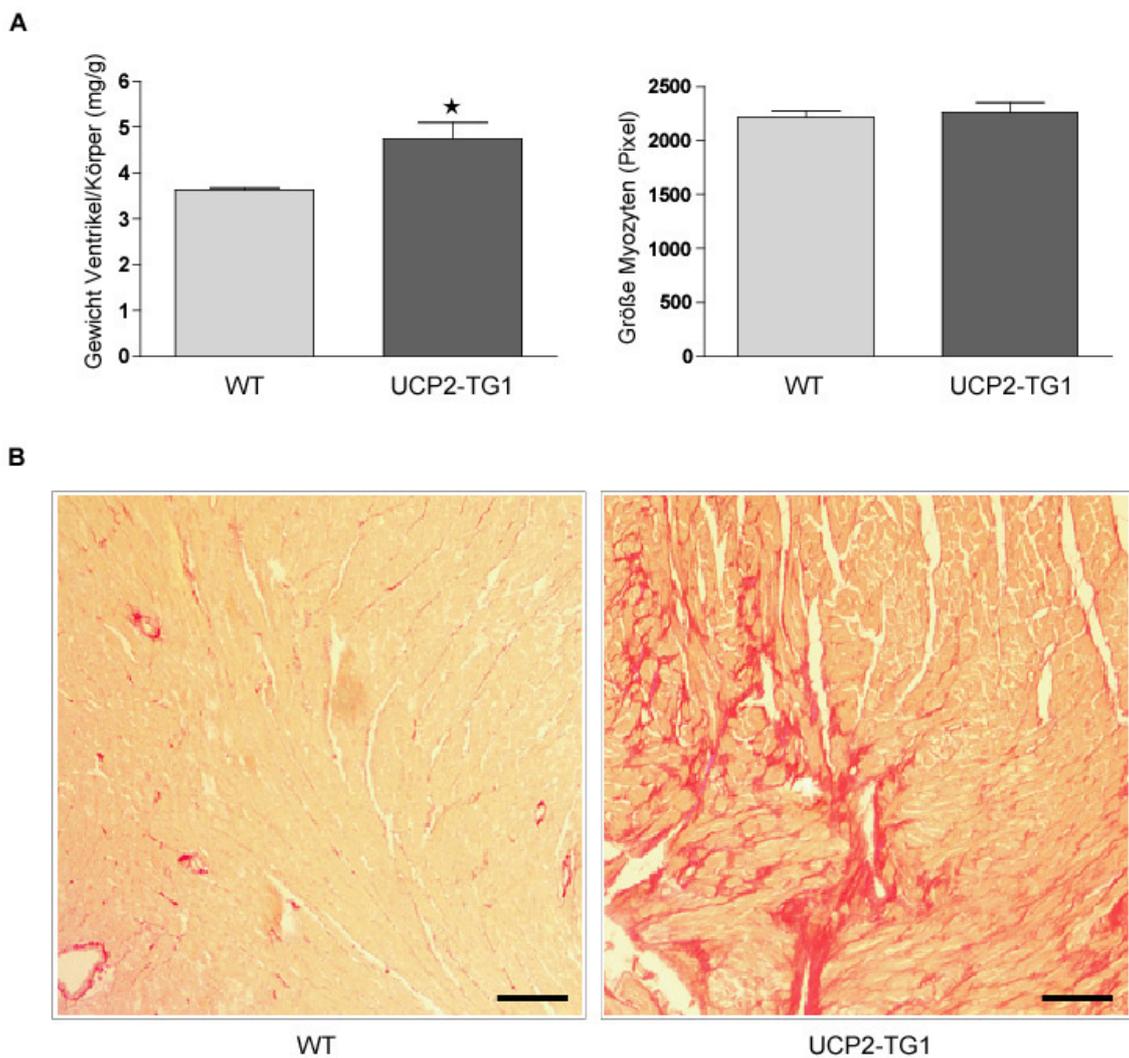


Abbildung 19. A Das Verhältnis von Ventrikel- zu Körpergewicht war in den Tieren der Linie UCP2-TG1 signifikant erhöht ($P < 0,05$). In der morphometrischen Bestimmung der Kardiomyozytengröße ließ sich allerdings kein signifikanter Unterschied feststellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. **B** Sirius-Rot-Färbung linksventrikulären Myokards. Tiere der Linie UCP2-TG1 entwickelten eine interstitielle Fibrose, die hier rot angefärbt ist.

Es stellte sich die Frage, ob diese strukturellen Veränderungen auch mit funktionellen Einschränkungen einhergehen. So wurden Mäuse im Alter von vier Monaten einer Herzkatheteruntersuchung unterworfen. Unter Tribromethanol-Narkose wurde der Katheter in die Arteria carotis eingebracht und in den linken Ventrikel vorgeschoben. Die Analyse der Druckkurven zeigte zunächst einen signifikant niedrigeren systolischen Blutdruck in den Tieren der Linie TG1 (Abbildung 20). Auffällig war auch die niedrige Herzfrequenz der UCP2-transgenen Mäuse. Die maximale Kontraktilität (dp/dt_{max}) war ebenfalls stark reduziert. Dies konnte zumindest partiell auch Folge der langsamen Schlagfrequenz sein. Schließlich war auch die Lusitropie (dp/dt_{min}), d.h. die Fähigkeit des Herzmuskels zur Relaxation, in den transgenen Tieren eingeschränkt.

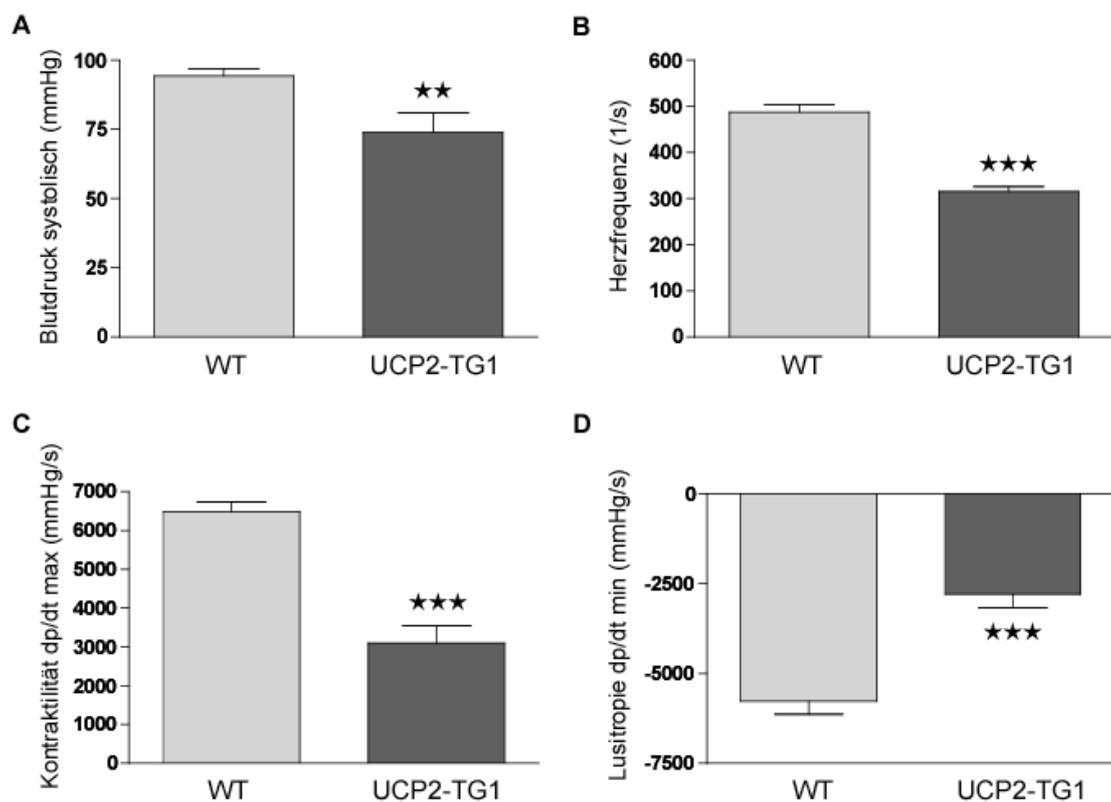


Abbildung 20. Physiologische Untersuchung der Linie UCP2-TG1 mittels Herzkatheter. **A** In den transgenen Mäusen war der systolische Blutdruck reduziert ($P < 0,01$). **B** Ausserdem war die Herzfrequenz im Vergleich zum Wildtyp stark erniedrigt ($P < 0,001$). **C** Die Kontraktilität gemessen als maximaler Anstieg des Druckes über die Zeit (dp/dt_{max}) war in den transgenen Herzen stark eingeschränkt ($P < 0,001$). **D** Auch die Lusitropie, also die Fähigkeit zur schnellen Muskelrelaxation in der Diastole (dp/dt_{min}), war im Transgen reduziert ($P < 0,001$). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SEM (WT $n=4$, TG $n=5$, in **A** WT $n=3$, TG $n=5$).

Die Bradykardie wurde mittels EKG-Registrierung an narkotisierten Mäusen weiter analysiert. Alle untersuchten Mäuse der Linie UCP2-TG1 (Alter 4 Monate) wiesen eine bradykarde Rhythmusstörung auf (Abbildung 21).

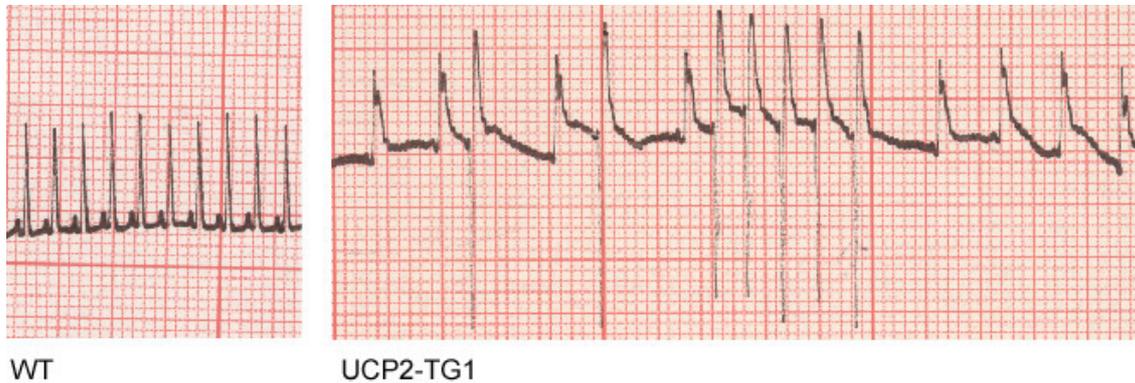


Abbildung 21. Repräsentatives Elektrokardiogramm eines vier Monate alten UCP2-Transgens mit Wildtyp. Bei der Rhythmusstörung im Transgen handelte es sich am ehesten um eine Sinusbradyarrhythmie. Die Salve von fünf Schlägen könnte einer ventrikulären Salve entsprechen.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob sich diese pathologische Herzfunktion auch auf etablierte molekulare Marker der Herzinsuffizienz auswirkte. Aus viermonatigen Wildtyp- und UCP2-TG1- Herzen wurde RNA präpariert. Die mRNA-Konzentration des Atrialen Natriuretischen Faktors (ANF) und der Calcium-ATPase des glatten endoplasmatischen Retikulums (SERCA) wurde durch RNase Protection Assays gemessen (Abbildung 22). Wie in anderen Herzinsuffizienzmodellen führte auch in transgenen Tieren der Linie TG1 die erhöhte Wandspannung in Ventrikel und Atrium zum Anstieg von ANF-mRNA. Für die SERCA, die in der Diastole Calcium energieabhängig zurück in das sarcoplasmatische Retikulum pumpt, konnte gezeigt werden, dass ihre mRNA in anderen Krankheitsmodellen herabreguliert wird. Auch in UCP2-transgenen Tieren der Linie TG1 kam es zu verminderter Expression.

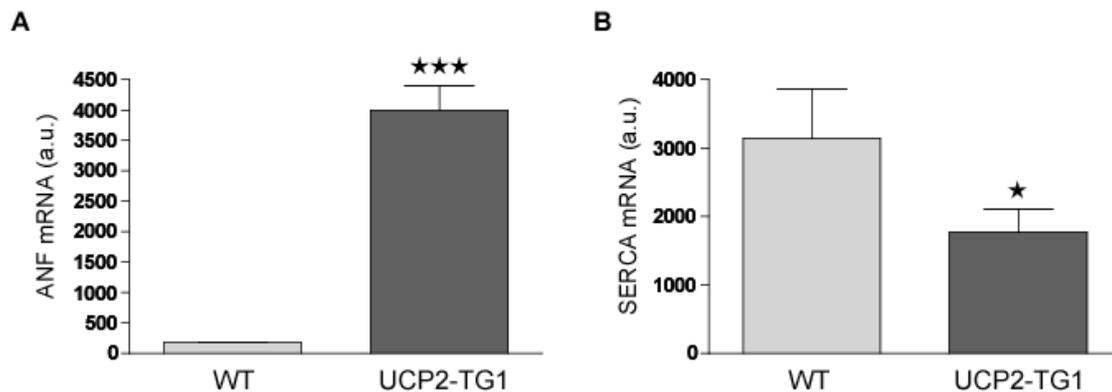


Abbildung 22. In Herzen der Linie UCP2-TG1 wurden etablierte kardiale Marker der Herzinsuffizienz differenziell exprimiert. **A** mRNA des Atrialen Natriuretischen Faktors ließ sich in UCP2-transgenen Herzen verstärkt nachweisen ($P < 0,0001$). **B** Die Expression von SERCA-mRNA war im Transgen vermindert ($P < 0,05$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n=4$ in WT und TG).

Charakterisierung der Linie UCP2-TG3

Verglichen mit Linie TG1 exprimierte die Linie TG3 transgenes UCP2 weniger stark. Der klinische Phänotyp und die Morphologie der Herzen unterschieden sich nicht vom Wildtypen. Die morphometrische Auswertung der Querschnittsflächen der Kardiomyozyten zeigte keine Hypertrophie in den Herzen der Linie TG3. Auch die Herzkatheteruntersuchung erbrachte in 10 Monate alten Tieren keine pathologischen Befunde. Es musste also davon ausgegangen werden, dass eine moderatere kardiale Überexpression von UCP2 unter normalen Bedingungen keine strukturellen und funktionellen Einschränkungen nach sich zieht.

Möglicherweise führte nur leichte Überexpression von UCP2 in Situationen starker kardialer Belastung zu Schäden. Andererseits war für UCP2 in verschiedenen Systemen ein protektiver Effekt durch Abfangen freier Radikale beschrieben (Teshima et al., 2003; Blanc et al., 2003; Mattiasson et al., 2003). Um dies weiter zu untersuchen, wurden UCP2-TG3- und Wildtypiere erhöhter Druckbelastung durch Aortic Banding ausgesetzt. Leider überlebten nur sechs transgene und elf Wildtyp-Mäuse die ersten beiden Tage nach Aortenligierung. In der Kaplan-Meier-Analyse dieser Tiere über 10 Monate ließ sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Mortalitätsunterschied feststellen (Abbildung 23).

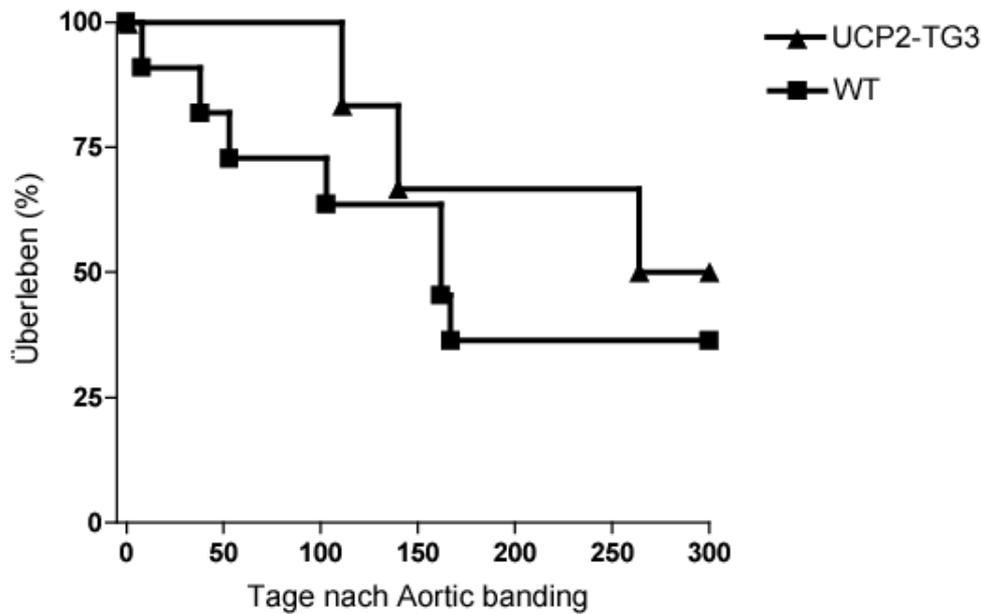


Abbildung 23. Kaplan-Meier-Analyse von Wildtypen und UCP2-TG3-Mäusen, die einer erhöhten Druckbelastung durch Aortic banding ausgesetzt waren. In die Analyse gingen nur die Tiere ein, die die ersten zwei Tage nach dem Eingriff überlebten. Zu keinem Zeitpunkt ließ sich ein signifikanter Mortalitätsunterschied feststellen.

UCP2-Expression im Vorhof β_1 AR-transgener Mäuse

Der dominante atriale Phänotyp der UCP2-TG1-Linie war überraschend. Die Daten der differentiellen UCP2-Expression waren aus Herzventrikeln erhoben worden. Um die UCP2-Expression auch im Vorhof zu untersuchen, wurden RNase Protection Assays mit Material aus Wildtypen und herzinsuffizienten β_1 AR-transgenen Mäusen durchgeführt (Abbildung 24). Im Vergleich zu WT-Ventrikel lag das Expressionsniveau von UCP2-mRNA im WT-Vorhof um ein vielfaches höher. Das wies auf eine wichtige physiologische Rolle von UCP2 im Atrium hin. In den Vorhöfen kranker Herzen der β_1 AR-transgenen Linie kam es verglichen mit gesunden Vorhöfen nochmals zu einer verstärkten Expression.

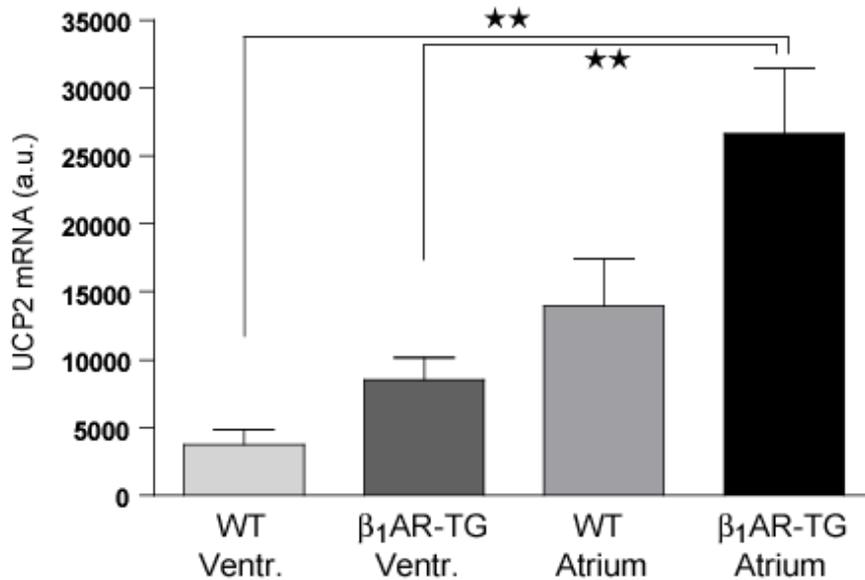


Abbildung 24. RNase Protection Assay von UCP2-mRNA in Ventrikeln und Atria von Wildtypen und β_1 AR-transgenen Mäusen. Die Expression von UCP2 ist jeweils in den Vorhöfen und den β_1 AR-transgenen Tieren verstärkt. Der Unterschied zu Vorhöfen β_1 AR-transgener Mäuse ist für die Ventrikel von Wildtyp und β_1 AR-Transgen signifikant (jeweils $P < 0,01$ im Bonferroni Test; ANOVA für den Unterschied der vier Mittelwerte $P < 0,05$). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM ($n=4$ in allen Gruppen).

Generierung DIPP2 α -transgener Mäuse

Konstruktion des Transgenvektors und pronukleäre Injektion

Wie oben gezeigt werden konnte, war auch DIPP2 α ein Gen, das in verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen frühzeitig verstärkt exprimiert wurde. Auch hier war sowohl ein protektiver als auch ein deletärer Mechanismus denkbar. Deshalb wurden transgene Mauslinien mit herzspezifischer Überexpression von DIPP2 α etabliert. Es wurde entsprechend der Generierung UCP2-transgener Mäuse vorgegangen. Aufgrund der fehlenden verwendbaren Restriktionsschnittstelle des α MHC-Promotors wurde wieder eine Zweischnitt-Klonierung mit den bereits im Labor vorliegenden Plasmiden pUC-Mae- β_2 und pBlue- α MHC- β_2 AR-SV40tpolA angewandt. Die 540 bp lange kodierende Sequenz von DIPP2 α wurde aus Maus-cDNA amplifiziert. Mit entsprechend verlängerten Primern (DIPPmf1/DIPPmr1) wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme SacI und PstI eingeführt. Das Template und das Plasmid mit dem 3'-Ende des α MHC-Promotors (pUC-Mae- β_2) wurden mit SacI/PstI verdaut und DIPP2 α hinter das Fragment des α MHC-Promotors subkloniert. Das entstandene Plasmid pUC-Mae-DIPP2 α wurde nun, wie auch pBlue- α MHC- β_2 AR-SV40tpolA, mit

NdeI und HindIII verdaut. Da die kodierende Sequenz von DIPP2 α eine NdeI-Schnittstelle aufwies, musste ein teilweiser Verdau („partial digest“) durchgeführt werden. Dazu wurde eine große Plasmidmenge unvollständig mit NdeI/HindIII verdaut und aus dem folgenden Agarosegel das Fragment aus der Bande mit der exakten Länge aufgereinigt. Auch pBlue- α MHC- β_2 AR-SV40tpolA wurde mit NdeI/HindIII geschnitten. Die entsprechenden Fragmente wurden dann zu pBlue- α MHC-DIPP2 α -SV40tpolA ligiert, das den gesamten Transgenvektor enthielt (Abbildung 25). Dieser wurde nach der endotoxinfreien Plamidpräparation durch NotI-Verdau linearisiert (Länge: 6520 bp) und dialysiert. Die Konzentration wurde auf 1,2 ng/ μ l eingestellt. Nach pronukleärer Injektion und Implantation in Ammenmäuse wurde die F0- oder Gründer-Generation geboren.

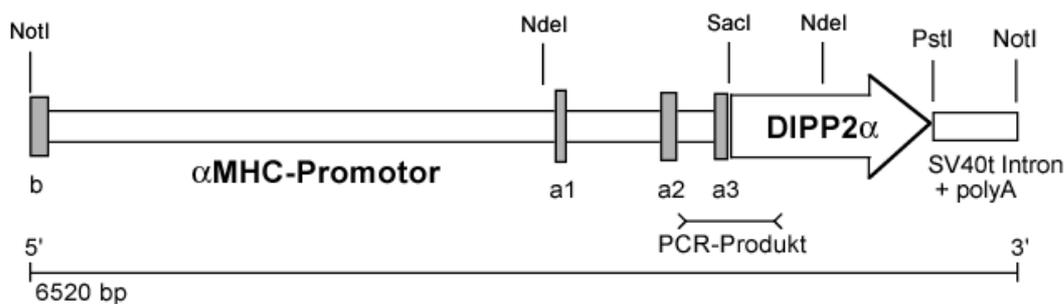


Abbildung 25. Schematische Darstellung des 6520 bp langen Transgenvektors. An das 3'-Ende des α MHC-Promotors wurde die 540 bp lange kodierende Sequenz von DIPP2 α kloniert. Wie im Transgenvektor für UCP2 folgt ein Intron des simian virus 40 sowie ein PolyA-Signal. Auch das PCR-Produkt der Genotypisierungs-PCR ist dargestellt.

Genotypisierung und Verpaarung

Wieder wurden biopsierte Schwanzspitzen der Gründer-Generation in einer PCR mit transgenspezifischen Primern (α MHCmf1/AA059R1, Produktlänge: 592 bp) genotypisiert. Bei 9 Tieren ließ sich das ins Genom integrierte transgene Konstrukt nachweisen. Drei männliche Tiere wurden mit FVB-Weibchen weiter verpaart und erwiesen sich in der Folge als Keimbahnüberträger. So konnten drei voneinander unabhängige DIPP2 α -transgene Linien etabliert werden. Sie wurden als DIPP2 α -TG6, -TG8 und -TG9 bezeichnet.

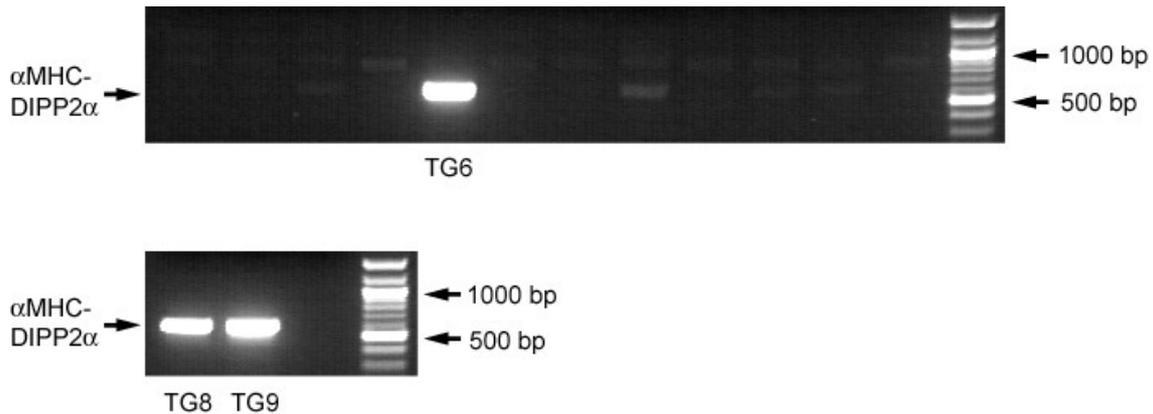


Abbildung 26. PCR zur Genotypisierung der Gründer-Generation. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 592 bp. Bei insgesamt neun Tieren wurde das transgene Konstrukt α MHC-DIPP2 α in das Genom integriert.

Phänotyp bei Mäusen mit kardialer DIPP2 α -Überexpression

Zunächst wurden die Tiere hinsichtlich des Expressionsniveaus von DIPP2 α untersucht. Dies geschah im Rahmen einer Kooperation mit S. Shears (NIEHS/North Carolina). Im Westernblot von TG8 und TG9 zeigte sich eine sichere transgene Überexpression in diesen Linien. In TG9 war die höchste Proteinkonzentration nachweisbar (Abbildung 27). Die Tiere aller Linien waren klinisch unauffällig. Eine erhöhte Mortalität in den transgenen Tieren bestand nicht. Bei der Messung von Herz- und Körpergewicht in drei- bis fünfmonatigen Tieren fiel bereits eine signifikante Vergrößerung des Verhältnisses Herzgewicht/Körpergewicht in allen transgenen Linien auf. Zudem waren als Zeichen der Hypertrophie die Kardiomyozyten in allen untersuchten Linien im Vergleich zum Wildtyp signifikant vergrößert (Abbildung 27).

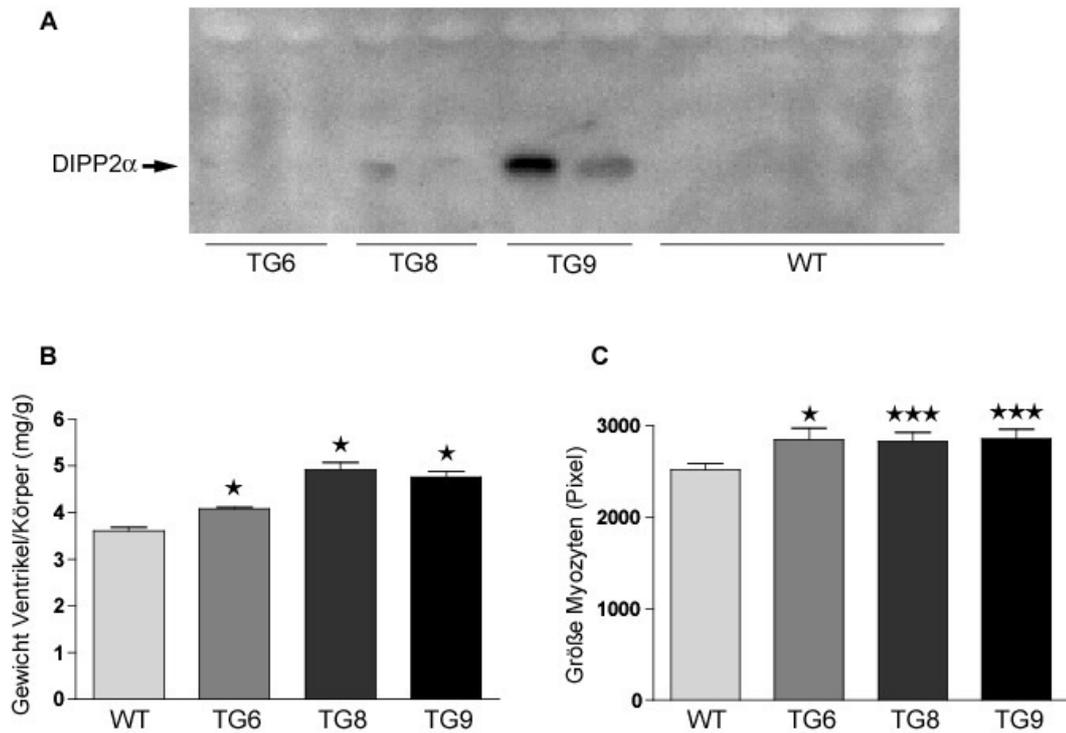


Abbildung 27. A Westernblot von DIPP2 α aus Herzgewebe DIPP2 α -transgener Tiere und Wildtypen. **B** Das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht war in den untersuchten Linien DIPP2 α -TG6, -TG8 und -TG9 im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (jeweils $P < 0,05$ bezogen auf den Wildtyp). **C** In der morphometrischen Analyse zeigten sich als Zeichen der myozytären Hypertrophie in den untersuchten Linien außerdem vergrößerte Kardiomyozyten ($P < 0,05$ für DIPP2 α -TG6, $P < 0,001$ für DIPP2 α -TG8 und -TG9). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Statistisch angewendet wurde der Bonferroni Test.

Tiere der Linie TG9 wurden auch in hohem Alter untersucht. Hier ließ sich die kardiomyozytäre Hypertrophie auch optisch nachvollziehen. Außerdem war in der Sirius-Rot-Färbung eine leichte interstitielle Fibrosierung nachweisbar. In diesen Mäusen wurde ebenfalls eine Herzkatheteruntersuchung durchgeführt. Bereits unter physiologischen Bedingungen war die Kontraktilität der transgenen Herzen signifikant beeinträchtigt. Unter Stimulation mit Dobutamin war in den Transgenen eine eingeschränkte kardiale Reserve mit reduziertem Anstieg der Kontraktilität im Vergleich zu den Wildtypen nachweisbar (Abbildung 28).

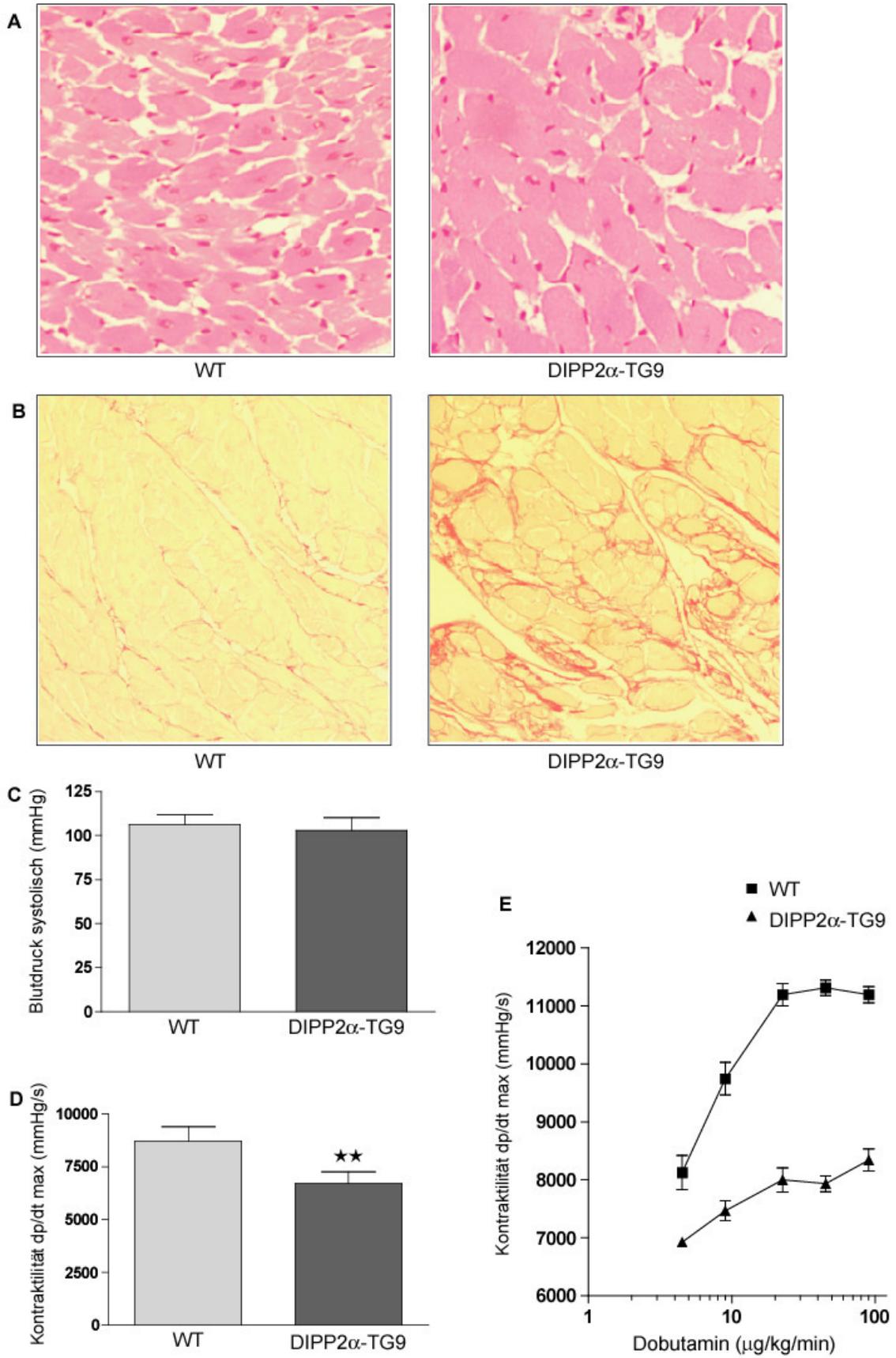


Abbildung 28. **A** Linksventrikuläres Myokard in Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die Kardiomyozyten der Linie DIPP2 α -TG9 waren im Vergleich zum Wildtyp leicht vergrößert. **B** Sirius-Rot-Färbung. In den transgenen Herzen imponierte im hohen Alter eine interstitielle Fibrose (rot angefärbt). **C** In der Herzkatheteruntersuchung ließ sich zwischen Wildtyp und DIPP2 α -Transgen kein Unterschied des systolischen Blutdrucks nachweisen. **D** Aber die Kontraktilität war in den transgenen Tieren signifikant eingeschränkt ($P < 0,01$). **E** Unter steigender positiv inotroper Stimulation mit Dobutamin zeigten die DIPP2 α -transgenen Herzen eine im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eingeschränkte kardiale Reserve. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Diskussion

UCP2 als Kandidatengen der Herzinsuffizienz

Funktion von Uncoupling Proteinen

Uncoupling Proteine (UCP) gehören zur Gruppe der mitochondrialen Anionen-Carrier (Bouillaud et al., 2001). Diese Proteine sind an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und haben sechs Transmembrandomänen (Ricquier und Bouillaud, 2000). Sie gewährleisten den Transport von Adeninnukleotiden, Carnitin, Citrat, Malat, Ornithin, 2-Oxoglutarat und anderen Stoffen durch die unter physiologischen Bedingungen fast dichte Membran (Kroemer und Reed, 2000). Bislang konnten fünf Uncoupling Proteine identifiziert werden. UCP1 wurde schon früh kloniert und mit der Thermogenese im braunen Fettgewebe in Verbindung gebracht (Nicholls und Locke, 1984). Seine Funktion als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung ist gut belegt (Harper und Himms-Hagen, 2001). UCP3 wird vornehmlich in Skelettmuskel, aber auch in braunem Fettgewebe exprimiert (Boss et al., 1997). Das Vorkommen der Isoformen UCP4 und 5 ist auf Nervengewebe beschränkt (Jezek et al., 2004).

Fleury et al. konnten 1997 UCP2 identifizieren. Im Gegensatz zu UCP1, das nur in braunem Fettgewebe exprimiert wird, wurde UCP2-mRNA in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Neben Herz, Skelettmuskel, Lunge, Plazenta, Magen, braunem und weißem Fettgewebe zeigten insbesondere Gewebe des Immunsystems (Milz, Thymus, Knochenmark, Leukozyten) eine starke UCP2-mRNA-Expression. Allerdings war in gesundem Herz und Skelettmuskel mit einem verlässlichen Antikörper bislang kein UCP2-Protein detektierbar (Pecqueur et al., 2001). Die Nachweisgrenze dieses Antikörpers lag jedoch bei 10% des UCP2-Gehalts der Milz, dem Organ mit der höchsten UCP2-Konzentration (Couplan et al., 2002).

Das humane UCP2-Protein besteht aus 309 Aminosäuren, deren Sequenz zu 59% mit UCP1 identisch ist. Mindestens zehn von 12 in UCP1 identifizierten funktionellen Resten sind in UCP2 und UCP3 konserviert (Echtay et al., 2000a). Überexpression von UCP2 in Hefezellen führte zu einer Abnahme des elektrochemischen Potentials der inneren Mitochondrienmembran (Fleury et al., 1997). Deshalb wurde für UCP2 ein zu UCP1 identischer Wirkmechanismus postuliert: Durch die an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Atmungskette werden von den Reduktionsäquivalenten NADH und FADH₂ Elektronen auf Sauerstoff übertragen. Durch die freiwerdende Energie gelangen Protonen in den intermembranösen Raum. Diese fließen entlang ihres elektrochemischen Gradienten zurück ins Mitochondrium und treiben dabei die ATP-Synthase an, die aus ADP und Phosphat ATP generiert (Löffler und Petrides, 1998). UCP2 entkoppelt die oxidative Phosphorylierung, indem es den Protonenfluss ermöglicht, ohne dabei energiereiches ATP zu synthetisieren (Skulachev, 1998).

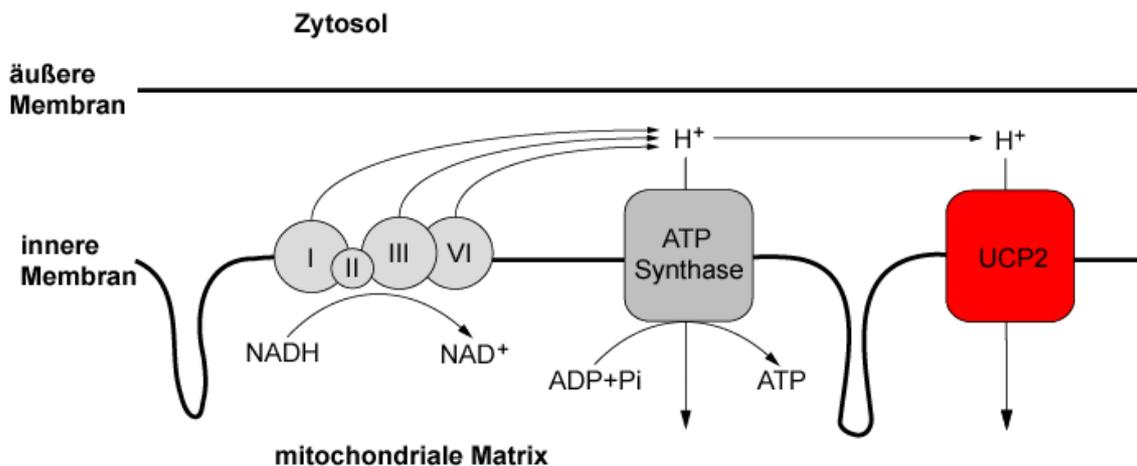


Abbildung 29. UCP2 entkoppelt die oxidative Phosphorylierung im Mitochondrium. Entlang ihres elektrochemischen Gradienten fließen Protonen zurück ins Mitochondrieninnere. Durch die freiwerdende Energie wird die ATP-Synthase angetrieben und ATP synthetisiert. Die Carrier-Funktion von UCP2 ermöglicht den Protonen zurückzugelangen, ohne ATP zu generieren. Dabei wird Energie in Form von Wärme frei.

Diese Carrier-Funktion wurde in verschiedenen Systemen belegt. UCP2 zeigte nach Expression durch *E. coli* in Inclusion Bodies und Liposomen Protonen-Transportaktivität (Echtay et al., 2001; Jaburek et al., 1999). Auch in isolierten Mitochondrien konnte eine UCP2-abhängige Verminderung des Mitochondrien-

Membranpotentials nachgewiesen werden (Echtay et al., 2002a). In Thymozyten von UCP2^(-/-)-Mäusen, in denen das UCP2-Gen durch homologe Rekombination ausgeschaltet wurde, ist der unspezifische Protonen-Fluss an der inneren Mitochondrienmembran im Vergleich zu Wildtypen auf 50% gesunken (Krauss et al., 2002). In transient transfizierten HeLa-Zellen mit ca. dreifacher UCP2-Überexpression fiel die Höhe des Membranpotentials. Außerdem waren NADH- und ATP-Gehalt gesunken (Mills et al., 2002). Diese Befunde sprechen für die Funktion von UCP2 als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung. Diese Transportaktivität ist an die Präsenz von langkettigen Fettsäuren gebunden (Jaburek et al., 1999; Boehm et al., 2001; Echtay et al., 2002b). Auch Coenzym Q (Ubichinon) könnte einen essentiellen Kofaktor von UCP2 darstellen (Echtay et al., 2000b). Dafür fanden andere Autoren allerdings keinen Hinweis (Jaburek und Garlid, 2003).

Dem stehen Berichte gegenüber, die gegen eine physiologisch relevante Entkopplungsaktivität sprechen. In isolierten Mitochondrien aus Milz und Lunge von UCP2-defizienten und Wildtyp-Mäusen unterschied sich die Protonen-Permeabilität der inneren Membran nicht. Auch das ATP/ADP-Verhältnis war in beiden Gruppen gleich (Couplan et al., 2002). Stuart et al. (2001) berichten, dass nur unphysiologisch hohe Konzentrationen von UCP2 die Protonenleitfähigkeit der inneren Mitochondrienmembran erhöhen. Da der UCP2-Inhibitor GDP diese nicht senken konnte, gehen die Autoren von einer durch das hohe Expressionsniveau bedingten artifiziellen Störung der Membranintegrität aus. Bei diesen Versuchen wurde jedoch nicht der Cofaktor Coenzym Q verwendet (Echtay et al., 2000b und 2001). Die Frage, ob UCP2 eine ähnlich potente Protonentransportaktivität besitzt wie UCP1, ist also noch nicht abschließend geklärt. Im Myokard allerdings sind die Produktion und der Verbrauch von energiereichen Phosphaten verglichen mit anderen Geweben sehr hoch. Das spiegelt sich in der hohen Mitochondriendichte wieder. In einem solchen System könnte schon eine leicht reduzierte Effizienz der ATP-Generierung deletäre Auswirkungen auf die Zelle haben.

Mit der Identifizierung der UCP1-Homologe UCP2 und UCP3 hoffte man, zentrale Stoffwechselregulatoren erforschen zu können (Flier und Lowell, 1997). Ihre Funktion als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung von der ATP-Synthese legt die Hypothese nahe, dass Uncoupling Proteine Einfluss auf den Energieverbrauch und

damit auch das Körpergewicht nehmen können. Tatsächlich war die chromosomale Kartierung von UCP2 in drei unabhängigen Tiermodellen koinzident mit quantitativen trait loci (QTL) für Adipositas und Hyperinsulinämie (Fleury et al., 1997). Auch das UCP3-Gen ist in diesem Bereich ca. 7 kb abwärts von UCP2 lokalisiert (Pecqueur et al., 1999). In einer Kopplungsanalyse konnte der humane UCP2/UCP3-Locus hochsignifikant mit einem gesteigerten Grundumsatz in Ruhe in Verbindung gebracht werden (Bouchard et al., 1997). Ein Polymorphismus im UCP2-Promotor, der zu verstärkter UCP2-Expression im Fettgewebe führt, ist mit einem niedrigeren Adipositas-Risiko assoziiert (Esterbauer et al., 2001). Um die physiologische Funktion von UCP2 und UCP3 im Metabolismus weiter aufzuklären, wurden verschiedene transgene Mausmodelle etabliert. Erwartungsgemäß führte die 66-fache Überexpression von UCP3 im murinen Skelettmuskel zu einem Phänotyp, der trotz im Vergleich zum Wildtyp verstärkter Nahrungsaufnahme weniger Körperfett aufwies (Clapham et al., 2000). Der Phänotyp von UCP3^(-/-)-Mäusen, bei denen das UCP3-Gen ausgeschaltet wurde, unterschied sich allerdings nicht von Wildtyp-Tieren (Gong et al., 2000). Das machte für UCP3 eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel unwahrscheinlich. Ebenso wurde für das UCP2-Gen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen ein murines Knockout-Modell generiert (Arsenijevic et al., 2000). Hinsichtlich ihres Körpergewichts unter hochkalorischer Diät und ihrer Fähigkeit zur Thermogenese unterschieden sich die UCP2^(-/-)-Mäuse nicht von Wildtyp-Tieren. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den oben beschriebenen Kopplungs- und Promotorvariantenanalysen. Allerdings konnten Zhang et al. 2001 doch eine Verbindung zwischen UCP2, dem Fettstoffwechsel und der Insulinsekretion herstellen. Sie zeigten, dass UCP2-defiziente Mäuse in den Inselzellen des Pankreas höhere ATP-Konzentrationen und damit verbunden eine stärkere Glucose-induzierte Insulinsekretion aufwiesen. Leptin-defiziente ob/ob-Mäuse, ein Modell für Adipositas-induzierten Diabetes mellitus, das in den β -Zellen des Pankreas eine verstärkte Expression von UCP2 aufweist, wurden mit UCP2^(-/-)-Mäusen verpaart. Die Doppel-Knockout-Tiere zeigten eine im Vergleich zu den ob/ob-Tieren verbesserte Glucosetoleranz.

Da in Geweben des Immunsystems besonders hohe Konzentrationen von UCP2-mRNA nachweisbar waren, untersuchten Arsenijevic et al. (2000) auch die Auswirkung der UCP2-Deletion auf die Abwehr von pathogenen Keimen. Tatsächlich eliminierten

isolierte Makrophagen aus UCP2^(-/-)-Mäusen Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii* effizienter als Wildtyp-Makrophagen. Wurden die Tiere in vivo mit einer definierten Anzahl von *Toxoplasma gondii*-Zysten konfrontiert, zeigten die Wildtyp-Mäuse eine Letalität von 100%, wohingegen alle UCP2^(-/-)-Mäuse überlebten. Für diesen Effekt wurde die gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in UCP2^(-/-)-Zellen verantwortlich gemacht. Die Fähigkeit von Uncoupling Proteinen, die Bildung freier Radikale und damit reaktiver Sauerstoffspezies zu reduzieren, wurde von verschiedenen Gruppen beschrieben (Nègre-Salvayre et al., 1997; Gong et al., 2000; Kizaki et al., 2002). Also bietet die Herabregulation von UCP2-mRNA den Zellen des Immunsystems die Möglichkeit, die Konzentration von bakteriziden ROS und damit die Immunkompetenz zu erhöhen. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass nach Applikation von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) in Makrophagen das UCP2-Transkriptionsniveau sinkt. Bei UCP2-Überexpression in diesen Zellen wurden unter LPS-Stimulation weniger ROS gebildet (Kizaki T et al., 2002).

Natürlich spielen freie Radikale und ROS auch in anderen Bereichen eine wichtige pathophysiologische Rolle. In verschiedenen Organsystemen wird die gesteigerte Konzentration von ROS mit pathologischer Zellfunktion in Verbindung gebracht. Auch im insuffizienten Herzen werden vermehrt ROS freigesetzt. Unter anderem wurden dafür eine mitochondriale Dysfunktion, Folgen der neurohumoralen Aktivierung und entzündliche Faktoren wie TNF α und Interleukine verantwortlich gemacht. Die Folgen schließen Induktion von myozytärer Apoptose, Nekrose und kardialen Arrhythmien sowie eine reduzierte Pumpfunktion mit ein (Shizukuda und Buttrick, 2002b). Hier könnte UCP2 einen protektiven Einfluss ausüben, indem es die Konzentration freier Radikale senkt. Tatsächlich fallen im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung im ganzen Organismus freie Radikale an. Dazu wurde von Skulachev ein Konzept erarbeitet (Skulachev, 1996). In Geweben mit niedrigem ATP- und damit O₂-Verbrauch besteht ein relativer Mangel an ADP, dem Substrat der ATP-Synthase. Dadurch steigt der elektrochemische Gradient der Protonen an der inneren Mitochondrienmembran ($\Delta\Psi$). Dem steht ein hoher O₂-Partialdruck gegenüber. Unter diesen Umständen kommt es gehäuft zum Verlust ungepaarter Elektronen in der Atmungskette. Aus 1-2% der verbrauchten Sauerstoffmoleküle entstehen so Superoxid-Anionen (Jezek et al., 2004). Diese werden großteils von der Superoxid-Dismutase zu Wasserstoff-Peroxid (H₂O₂)

umgesetzt. Außerdem entstehen eine Reihe anderer reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Skulachev postulierte einen Mechanismus, der die Zelle vor hoher ROS-Produktion schützt. Durch „mildes“ Entkoppeln der oxidativen Phosphorylierung könnte der elektrochemische Protonengradient $\Delta\Psi$ und damit auch der Verlust ungepaarter Elektronen reduziert werden (Skulachev, 1998). So führt zum Beispiel in kardialen Gewebe ein $\Delta\Psi$ -Abfall von 10% zur Verminderung der ROS-Konzentration um 55% (Korshunov et al., 1997). Man könnte postulieren, dass UCP2 unter physiologischen Bedingungen durch Regulation des protonenelektrochemischen Gradienten und dadurch der ROS-Produktion einen protektiven Effekt ausübt.

Die UCP2-vermittelte Reduktion von ROS scheint auch in verschiedenen pathophysiologischen Modellen eine schützende Rolle zu spielen. Zum Beispiel postulierten Blanc et al. (2003) einen positiven Effekt von UCP2 auf die Progression atherosklerotischer Plaques. Sie unterzogen LDL-Rezeptor-defizienten Mäuse (LDLR^(-/-)), die schon früh eine ausgeprägte Atherosklerose entwickeln, einer myeloablativen Strahlendosis. Anschließend wurde Knochenmark von UCP2^(-/-) oder Wildtyp-Mäusen transplantiert. Dabei wiesen mit UCP2^(-/-)-Knochenmark transplantierte LDLR^(-/-)-Tiere signifikant größere atherosklerotische Läsionen in der Aorta und gesteigerten oxidativen Stress in den Plaques auf. Es gibt Hinweise, dass die ROS-reduzierende Eigenschaft von UCP2 auch im zentralen Nervensystem eine Rolle spielt. Mattiasson et al. (2003) identifizierten UCP2 als Gen, das nach kurzzeitiger zerebraler Ischämie im Rahmen des „ischemic preconditioning“ verstärkt exprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass transgene Überexpression von UCP2 in vitro und in vivo nach einer Ischämiephase die Mortalität der Neuronen und die Infarktgröße senkt. Auch hier konnte eine verringerte ROS-Produktion und ein vermindertes apoptotisches Caspase-3-Signal in den UCP2-transgenen Zellen ausgemacht werden, wenngleich sich das Membranpotential in Wildtyp- und transgenen Neuronen nicht unterschied. Entsprechend wurde bei Mäusen nach Schädel-Hirn-Trauma eine Induktion von UCP2-mRNA nachgewiesen, die zur apoptotischen Caspase-3-Aktivität in inverser Relation steht (Bechmann et al., 2002). Ähnliche Versuche wurden mit UCP1 in einer embryonalen kardialen Zelllinie durchgeführt (Bienengraeber et al., 2003). Auch im Herzen ist der protektive Effekt des „ischemic preconditioning“ mit einem niedrigeren Membranpotential und damit einer reduzierten ROS-Produktion verbunden (Dzeja et

al., 2001). Mit UCP1 stabil transfizierte Kardiomyoblasten überlebten eine Hypoxiephase signifikant häufiger als nicht transfizierte Zellen, obwohl unter normalen Bedingungen das ADP-abhängige Potential zur ATP-Synthese reduziert war. Der Ischämie-protective Effekt wurde hier ebenfalls auf eine geringere ROS-Produktion in den UCP1-transfizierten Zellen zurückgeführt. Transgene Mäuse, die herzspezifisch UCP1 überexprimierten, reagierten im Vergleich zum Wildtyp nicht empfindlicher auf eine 40-minütige Ischämiephase, obwohl das hohe transgene Expressionsniveau von UCP1 dem des braunen Fettgewebes entsprach (Hoerter et al., 2004). Überraschenderweise war die Kontraktilität der UCP1-transgenen Tiere in der Postischämiephase im Vergleich zum Wildtyp verdoppelt. Interessant in diesem Zusammenhang ist ein Bericht von McLeod et al. (2005), in dem analog zum zerebralen Modell von Mattiasson et al. (2003) auch für das Herz eine auf UCP2 zurückzuführende protective Rolle einer ischämischen Präkonditionierung nachgewiesen wurde.

Dem stehen Ergebnisse von Mills et al. (2002) gegenüber, die zeigten, dass schon eine dreifache Überexpression von UCP2 in HeLa-Zellen zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials an der inneren Mitochondrienmembran und zum konsekutiven Zelltod führt.

Voehringer et al. (2000) brachten UCP2 mit dem programmierten Zelltod, der Apoptose in Verbindung. In einer strahlensensiblen Lymphom-Zelllinie fanden sie eine im Vergleich zu einer strahlenresistenten Linie verstärkte UCP2-mRNA-Expression. Außerdem induzierte die Bestrahlung als proapoptotischer Stimulus die Expression von UCP2. Die Autoren vermuteten, dass UCP2 Teil einer Signalkaskade ist, die in den programmierten Zelltod mündet. Der Selektivitätsverlust der inneren Mitochondrienmembran und insbesondere der Abfall des Membranpotentials stellen einen zentralen Schritt beim apoptotischen sowie beim nekrotischen Zelltod dar (Kroemer und Reed, 2000). Uncoupling Proteine, die offensichtlich die ATP-Produktion drosseln und das Membranpotential senken, werden deshalb zunehmend als mögliche Modulatoren des Zelltods diskutiert (Mattson und Kroemer, 2003). Andererseits besitzen sie die Potenz, ROS effektiv zu senken. Das würde die These einer antiapoptotischen und antinekrotischen Wirkung unterstützen. Man könnte postulieren, dass UCP2, in niedriger Konzentration exprimiert, durch die Reduktion von ROS protective Eigenschaften besitzt. Übersteigt jedoch die Öffnung der inneren

Mitochondrien für Protonen eine kritische Größe, könnte UCP2 für den Organismus deletäre Auswirkungen haben.

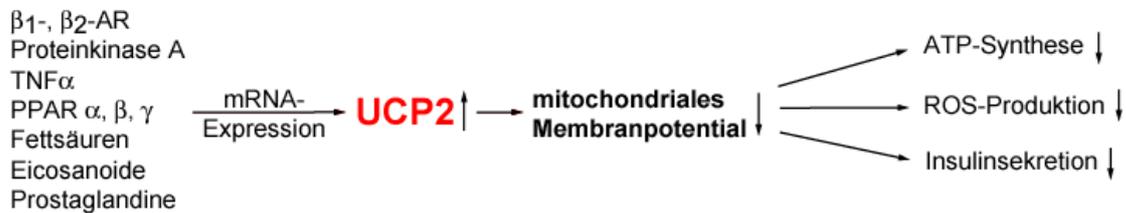


Abbildung 30. Übersicht über Regulatoren der UCP2-mRNA-Expression und über postulierte Konsequenzen einer verstärkten UCP2-Aktivität.

Regulation und differentielle Expression in Herzinsuffizienzmodellen

Entsprechend ihrer Bedeutung als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung sind Uncoupling Proteine einer komplexen Regulation unterworfen. Sehr gut belegt ist die Induktion der UCP2-Expression durch Fettsäuren, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Prostaglandine und Eicosanoide (Jezek, 2002). Diese wird unter anderem vermittelt durch die Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) α , β und γ (Kelly et al., 1998, Chevillotte et al., 2001, Medvedev et al., 2001). Dementsprechend aktivieren auch PPAR-Agonisten wie Thiazolidinedione und Fibrate die UCP2-Expression (Camirand et al., 1998). Auch bei fehlender Nahrungsaufnahme steigt die UCP2-mRNA in Abhängigkeit von der dann physiologischerweise erhöhten Fettsäurekonzentration an (Boss et al., 1997, Collins et al., 2001). Im herzinsuffizienten Organismus erfolgt eine Umstellung der ATP-Gewinnung von der Lipidoxidierung zu vermehrter Kohlenhydratoxidierung. Außerdem ist die Konzentration der freien Fettsäuren im Plasma erhöht (Stanley und Chandler, 2002). Dies könnte erklären, warum bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Herzinsuffizienzmodellen UCP2 verstärkt exprimiert wird.

Auch Schilddrüsenhormone nehmen Einfluss auf das Transkriptionsniveau von UCP2. Insbesondere im Herzen stimuliert Trijodthyronin die UCP2-Expression (Lanni et al., 1997). Es ist bekannt, dass eine hyperthyreotide Stoffwechsellaage zur Steigerung des Grundumsatzes und auch zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führt (Degens et al., 2003). Es gibt Hinweise, dass UCP2 an der Pathogenese beteiligt sein könnte. In Herzen hyperthyreotider Ratten werden UCP2 und 3 verstärkt exprimiert. Nach Zugabe der

Fettsäure Palmitat, eines Aktivators der UCP-Funktion, reduzierte sich die Auswurfleistung und die Arbeitseffizienz isolierter Rattenherzen (Boehm et al., 2001). Auch Zytokine wie TNF α scheinen Auswirkungen auf die UCP2-mRNA-Synthese zu haben. So wird in Hepatozyten der Lipopolysaccharid-induzierte UCP2-Anstieg durch die Gabe von TNF α -Antikörpern praktisch vollständig verhindert (Cortez-Pinto et al., 1998). Das ist deshalb relevant, weil in der Herzinsuffizienz das Myokard selbst TNF α produziert (Habib et al., 1996) und der Serumspiegel von zirkulierendem TNF α mit dem Schweregrad der Erkrankung und der Prognose korreliert (Torre-Amione et al., 1996; Deswal et al., 2001). In den untersuchten Mausmodellen der Herzinsuffizienz könnte also auch TNF α die Expression von UCP2 regulieren. Andererseits könnte eine Depletion energiereicher Phosphate durch UCP2-Entkopplung zum Phänotyp TNF α -transgener Tiere beitragen, die eine linksventrikuläre Dilatation und Herzinsuffizienz entwickeln (Kubota et al., 1997).

Oben wurde auf die Rolle adrenerger Signaltransduktion auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz eingegangen. Bei einem Teil der hier hinsichtlich ihrer differentiellen UCP2-Expression untersuchten Mausmodelle beruhen kardiale Hypertrophie und Pumpversagen auf chronischer β -adrenerger Stimulation. Deshalb interessiert besonders, ob UCP2 einer direkten Regulation durch β -adrenerge Rezeptoren unterliegt. Im braunen Fettgewebe ist für UCP1 seine Induktion durch β_3 -adrenerge Stimulation gut belegt. Cao et al. (2001 und 2004) konnten zeigen, dass dabei die cAMP-abhängige Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) p38 mittels Proteinkinase A einen entscheidenden Schritt darstellt. Signalwege, die die MAP-Kinase p38 beinhalten, sind auch an der Genese kardialer Hypertrophie beteiligt (Sudgen et Clerk, 1998). Auch β_1 - und β_2 -adrenerge Rezeptoren scheinen die UCP1-Expression positiv zu beeinflussen (Commins et al., 2000). Intraventrikuläre Injektion von Leptin führte zu einer Zunahme der UCP1-mRNA in β_3 AR-Knockout Mäusen. Diese wurde durch Propranolol komplett inhibiert.

Diese Berichte legen eine Regulation der UCP2-Expression durch adrenerge Stimuli nahe. Zum Beispiel sinkt die kardiale UCP2-Expression in Mäusen, die durch Ausschaltung der Dopamin- β -Hydroxylase kein Adrenalin oder Noradrenalin synthetisieren können (Thomas et al., 1997). Die Aktivierung der Proteinkinase A, eines Effektorenzyms der β -adrenergen Signalkaskade, durch Forskolin induziert ebenfalls

die UCP2-Expression (Chevillotte et al., 2001). Auch in Versuchen von Nagase et al. (2001) zeigte sich der positive Einfluss β_2 -adrenerger Agonisten auf die Expression von Uncoupling Proteinen. Teshima et al. (1999) untersuchten den Effekt des unselektiven β AR-Agonisten Isoprenalin auf die UCP2-Expression in Kardiomyozytenkulturen neonataler Ratten. In ihren Versuchen stieg die UCP2-mRNA-Konzentration nach Isoprenalininkubation an. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden neonatale Kardiomyozyten mit Isoprenalin stimuliert. Die Ergebnisse von Teshima et al. konnten hier allerdings nicht bestätigt werden. Mittels RT-PCR ließ sich keine Induktion von UCP2 durch Isoprenalin nachweisen. Dies könnte durch die unterschiedlichen Untersuchungsbedingungen verursacht sein. Die Isoprenalinkonzentration lag bei Teshima et al. um den Faktor 100 niedriger. Zudem ließ sich auch nach Stimulation mit fetalem Kälberserum im Rahmen dieser Arbeit keine Induktion von UCP2-mRNA nachweisen, sodass eine Positivkontrolle hier fehlte. Vor kurzem publiziert wurden Analysen der UCP2-Expression in Mausmodellen, die aufgrund transgener Verstärkung des β -adrenergen Signalwegs eine Herzinsuffizienz entwickeln (Gaussin et al., 2003). In den Linien, die herzspezifisch β_1 -, β_2 -adrenerge Rezeptoren oder die α -Untereinheit des stimulierenden G-Proteins G_s überexprimieren, fand sich eine verstärkte UCP2-Expression. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten in β_1 AR-transgenen Mäusen wurden also bestätigt. Interessanterweise führte eine Blockade der β -adrenergen Rezeptoren im $G_{s\alpha}$ -transgenen Modell zu einer Normalisierung der UCP2-Expression.

In einem murinen Herzinsuffizienzmodell, in dem eine artifiziell insuffiziente Aortenklappe zur Volumenüberlastung des Ventrikels führt, konnte ebenfalls eine differentielle UCP2-Expression nachgewiesen werden (Noma et al., 2001). Im Frühstadium, bis sieben Tage nach Punction der Aortenklappe, kam es zunächst zu einem Abfall der UCP2-mRNA, gefolgt von einem robusten Anstieg an den Messpunkten nach 30 und 100 Tagen, der von einer verstärkten TNF α -Expression begleitet wurde. Eine 100-tägige Behandlung der Mäuse mit dem ACE-Hemmer Perindopril führte zu einer partiellen Inhibition der gesteigerten UCP2-Expression (Murakami et al., 2002).

Letztlich sprechen diese experimentellen Befunde für eine Regulation der UCP2-Expression durch das β -adrenerge System. Diese konnte in mehreren Modellen gezeigt

werden. Eine verstärkte UCP2-Expression beschränkt sich nicht nur auf Herzinsuffizienzmodelle mit transgener Aktivierung des adrenergen Systems. Die Tatsache, dass auch im Druckbelastungs-Modell bei Aortenstenose oder bei Volumenüberlastung des linken Ventrikels nach Destruktion der Aortenklappe erhöhte UCP2-Konzentrationen nachweisbar sind, spricht für einen generellen Mechanismus bei Herzinsuffizienz unterschiedlicher Ätiologie, eventuell bedingt durch den erhöhten Sympathikotonus. Auch eine UCP2-Induktion durch die vermehrt anfallenden freien Radikale bei Erschöpfung der Redox-Reserve ist möglich. Zusätzlich sind auch Einflüsse durch humorale und entzündliche Faktoren wie TNF α denkbar.

Die Regulation von UCP2 auf mRNA-Ebene ist verhältnismäßig gut untersucht. Allerdings präsentieren nur wenige Publikationen Daten, die die UCP2-Proteinkonzentration erfassen. Dies mag unter anderem an der mangelnden Spezifität kommerziell erhältlicher Antikörper liegen. Auch auf Translationsebene ist UCP2 einer engen Regulation unterworfen. Pecqueur et al. (2001) konnten zeigen, dass das humane und murine UCP2-Gen zwei offene Leserahmen (ORF) enthält. Während ORF2 mit den Exons 3-8 die Information für die Aminosäuresequenz des UCP2-Proteins enthält, kodiert ORF1 für ein Peptid von 36 Aminosäuren Länge, das die Translation von UCP2 hemmt. Desweiteren wiesen die Autoren darauf hin, dass die mRNA-Konzentration nicht mit der absoluten UCP2-Proteinmenge korreliert. Die intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden führte zu einem mRNA-unabhängigen Anstieg von UCP2-Protein in der Lunge nach zehn Stunden. Die Expressionsanalysen von UCP2 im Rahmen dieser Arbeit beschränkten sich auf die mRNA-Konzentration, da wahrscheinlich aufgrund der mangelnden Sensitivität des verwendeten Antikörpers UCP2-Protein weder in Ventrikeln von Wildtyp- noch von β_1 AR-transgenen Tieren nachgewiesen werden konnte.

Wie oben beschrieben wurden auch verschiedene humane Myokardproben untersucht. Dabei konnte hinsichtlich des UCP2-Expressionsniveaus kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und terminal insuffizienten Herzen, bzw. bei insuffizienten Herzen vor und nach Anlage eines LVADs festgestellt werden. Das könnte einerseits gegen eine systematische Regulation des UCP2-Gens in der humanen Herzinsuffizienz sprechen. Allerdings handelte es sich bei den humanen Myokardproben um ein schlecht charakterisiertes Kollektiv mit mRNA-Proben geringer Qualität. Variablen wie eine

eventuell vorausgegangene inotrope Therapie mit Katecholaminen, interkurrierende Infektionen oder der zeitliche Ablauf der Probenentnahme sind als Größen denkbar, die die Konzentration der UCP2-mRNA beeinflussen und so ihre Messung unzuverlässig machen.

Folgen der transgenen Überexpression

Um die pathophysiologische Rolle einer in unterschiedlichen Mausmodellen der Herzinsuffizienz nachgewiesenen verstärkten Expression von UCP2-mRNA weiter aufzuklären, etablierten wir wie oben beschrieben transgene Mäuse mit herzspezifischer UCP2-Überexpression. Die oben skizzierten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: UCP2-transgene Mäuse mit hohem Expressionsniveau

- weisen eine veränderte Struktur des Vorhofes mit Dilatation, Fibrosierung und Thrombosierung auf.
- leiden regelhaft an einer bradykarden Herzrhythmusstörung.
- entwickeln eine Herzinsuffizienz, die durch verminderte Kontraktilität und Lusitropie, interstitielle Fibrosierung und pathologische Regulation der molekularen Marker SERCA und ANF gekennzeichnet ist.

Eine physiologische Rolle von UCP2 im Vorhof wurde bisher nicht beschrieben. Im Vorhof sind jedoch die deletären Folgen einer UCP2-Überexpression besonders evident. Einerseits könnte dies durch das Aktivitätsmuster des verwendeten α MHC-Promotors bedingt sein. In der Embryogenese ist dieser im Vorhof bereits früher aktiv, sodass sich eine erhöhte UCP2-Konzentration auf die Organogenese auswirken könnte (Lyons et al., 1990). Andererseits könnte besonders das atriale Myokard empfindlich auf eine vermehrte Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung reagieren. Für eine physiologisch bedeutsame Rolle von UCP2 im Vorhof spricht auch das im Vergleich zum Ventrikel starke Expressionsniveau im atrialen Myokard. Die bradykarde Rhythmusstörung ist wahrscheinlich in Zusammenhang mit der strukturellen Atriopathie zu sehen. Alternativ käme eine Beeinträchtigung des Schrittmachersystems im Sinne eines Sick Sinus Syndroms in Frage. Herzkatheterdaten, molekulare Marker und Histologie wiesen bei den UCP2-transgenen Tieren mit hohem Expressionniveau auf eine Herzinsuffizienz hin. Manifest wurde diese in Situationen gesteigerter kardialer Belastung wie zum Beispiel bei trächtigen Tieren. Letztlich ließ sich nicht abschließend

klären, ob die strukturellen und funktionellen Veränderungen im Sinne einer Herzinsuffizienz Folge der bradykarden Rhythmusstörung sind oder ob die hohe Überexpression von UCP2 direkt zu diesen ventrikulären Veränderungen führt. Als Mechanismus wäre eine Depletion energiereicher Phosphate zu postulieren. Veränderungen im Energiemetabolismus mit eingeschränkter Verfügbarkeit energiereicher Phosphate sind neben Hypertrophie und neurohumoraler Aktivierung ein Charakteristikum der Herzinsuffizienz unterschiedlicher Ätiologie (Neubauer, 2007). In der Linie UCP2-TG1 wurde UCP2-mRNA im Vergleich zum Wildtyp 65 mal stärker exprimiert. Eine unspezifische Störung der Integrität der inneren Mitochondrienmembran durch den hohen UCP2-Gehalt ließ sich nicht ausschließen. In der Linie UCP2-TG3 war der UCP2-Proteingehalt in Vergleich zu UCP2-TG1 um den Faktor 3,4 reduziert. Diese Linie hatte keinen auffälligen Phänotyp. Deshalb stellte sich die Frage, ob die Entwicklung einer Herzinsuffizienz abhängig vom Expressionsniveau war, oder ob der Phänotyp der Linie UCP2-TG1 ein Artefakt war. Wenn sich transgene Konstrukte zum Beispiel in DNA-Abschnitte wichtiger Strukturproteine integrieren und diese nicht oder beschädigt translatiert werden, kann dies ebenfalls zur Herzinsuffizienz führen. Gegen ein Artefakt spricht, dass der kranke Founder TG4 ein zur davon unabhängigen Linie TG1 identisches makroskopisches Erscheinungsbild aufwies. Deshalb ist wohl von einem direkten Effekt von UCP2 auszugehen.

Für eine protektive Rolle von UCP2 in der Linie TG3 fand sich in den Versuchen mit dem Druckbelastungs-Modell kein Hinweis. Ursache könnte das zu hohe Expressionsniveau der UCP2-transgenen Tiere gewesen sein, das jenseits des protektiven Effektes durch Reduktion freier Radikale den Verlust energiereicher Phosphate in den Vordergrund rückte.

DIPP2 α als Kandidatengen der Herzinsuffizienz

Verteilung von DIPP-Proteinen

Die Diphosphoinositol-Polyphosphat-Phosphohydrolase 2 alpha (DIPP2 α) gehört zur Familie der Diphosphoinositol-Polyphosphat-Phosphohydrolasen. Den ersten Vertreter der Gruppe identifizierten Safrany et al. 1998 mit DIPP1 auf Chromosom 6, bevor die zwei weitere Isoformen DIPP2 α und DIPP2 β auf Chromosom 1 lokalisiert werden konnten, die sich untereinander nur durch einen Aminosäurenrest unterscheiden

(Caffrey et al., 2000). Phylogenetisch sind diese Enzyme als sehr alt einzustufen, da sie sowohl in Bakterien, Hefen und Amöben als auch in Säugetieren nachgewiesen werden konnten. DIPP1 weist die höchste Konzentration im Gehirn auf, während DIPP2 α und β verstärkt im Herzen exprimiert werden (Caffrey et al., 2000). Außerdem sind die Proteine auch in Skelettmuskel, Niere, Pankreas und Plazenta nachweisbar. 2002 wurden zwei weitere verwandte Enzyme identifiziert, DIPP3 α und DIPP3 β , die hauptsächlich im Hoden und ferner im Gehirn exprimiert werden (Hidaka et al., 2002). DIPPs katalysieren unter anderem die Hydrolyse der energiereichen diphosphorylierten Inositolphosphaten [PP]₂InsP₄, [PP]InsP₅ und [PP]InsP₄ (Shears, 1998). Die enzymatische Aktivität bei dieser Reaktion läßt sich wie folgt darstellen: DIPP1 > DIPP2 α > DIPP2 β . Zudem findet sich im aktiven Zentrum dieser drei Enzyme ein sogenanntes MutT-Motiv (Safrany et al., 1998). Hierbei handelt es sich um eine vom viralen bis zum humanen Genom konservierte Sequenz von 23 Aminosäuren mit der Struktur GX₅EX₇REUXEEXGU, wobei U jeweils I, L oder V darstellt. Diese Domäne wurde bislang in über 17 Proteinen unterschiedlicher Spezies nachgewiesen. Gemeinsam ist diesen Enzymen, dass sie Nukleosiddiphosphate mit unterschiedlichen Resten („X“) hydrolysieren. Deshalb wurde auch der Terminus „Nudix“-Hydrolasen vorgeschlagen (Bessmann et al., 1996). Die Familie der MutT-Proteine wird für die Kontrolle an wichtigen Punkten des Nukleotidphosphatmetabolismus verantwortlich gemacht. So schützen sie die Zelle unter anderem durch Dephosphorylierung von mutagenem 8-oxo-GTP vor AT-CG Transversionsmutationen. In mutT-defizienten E. coli waren diese Mutationen um den Faktor 10⁴ gesteigert (Sekiguchi et al., 1996). MutT-Motive finden sich ebenfalls in Enzymen, die Transkription und Degradation von mRNA regulieren (Dunckley et al., 1999; Gaudon et al., 1999).

Regulation und differentielle Expression

Auch DIPP-Proteine sind vielfältigen Regulationsmechanismen unterworfen. Bislang wurden vor allem Einflüsse auf funktioneller Ebene untersucht. Für DIPP1 wurde eine Hemmung der katalytischen Aktivität durch das Endprodukt InsP₆ gezeigt (Safrany et al., 1998). Auch Flurid inhibiert den Abbau von phosphatierten Inositolpolyphosphaten (Menniti et al., 1993). Im Rahmen des β_1 AR-transgenen Herzinsuffizienzmodells interessierten besonders die Untersuchungen von Safrany und

Shears (1998). Hier konnte in glatten Muskelzellen gezeigt werden, dass Stimulation von β -adrenergen Rezeptoren mit dem Agonisten Isoprenalin zu einem schnellen Abfall der Konzentration von $[PP]_2\text{InsP}_4$ führte, 25% in 5 min und 71% in 60 min. Ein genomischer Effekt kam bei dieser Reaktionszeit nicht in Frage. Auch die zyklischen Mononukleotide cAMP und cGMP provozierten den Abbau des energiereichen Inositolphosphats. Dieser Effekt blieb durch Inhibitoren von Proteinkinase A und C unbeeinflusst. Im Rahmen des $\beta_1\text{AR}$ -transgenen Herzinsuffizienzmodells und des erhöhten adrenergen Tonus bei anderen Tiermodellen könnte es neben einer verstärkten Expression auch zu einer katalytisch aktiveren Konformation von DIPP kommen. Auch die cytosolische Calcium-Konzentration scheint den Stoffwechsel von polyphosphorylierten Inositolphosphaten zu beeinflussen. So reduziert Thapsigargin, das durch Hemmung der Calcium-ATPase des endoplasmatischen Reticulums (SERCA) zu einem Anstieg der cytosolischen Calcium-Konzentration führt (Jackson et al., 1988), die Konzentration von Diphosphoinositol-Polyphosphaten um mehr als 50% (Glennon und Shears, 1993). Da dieser Effekt auch unter Hemmung der DIPP durch Flourid nachweisbar war, wird er wahrscheinlich durch Hemmung von Diphosphoinositol-Polyphosphatkinasen vermittelt, die beschrieben wurden (Voglmaier et al., 1996). Diese Beeinflussung durch Calciumtransienten ist im Kontext der untersuchten Herzinsuffizienzmodelle besonders interessant. Sowohl im Mausmodell als auch bei der humanen Erkrankung kommt es zu einer gestörten Calciumhomöostase im Sinne einer erhöhten diastolischen Konzentration bei verminderten Transienten (Engelhardt et al., 2004; Beuckelmann et al., 1992). Auf funktioneller Ebene ist deshalb eine Regulation von DIPP-Proteinen im Rahmen einer Herzinsuffizienz sowohl durch β -adrenerge Signaltransduktion als auch durch Einflüsse des pathologischen Calciumstoffwechsels plausibel. Welche Parameter im einzelnen Einfluss auf das Expressionsniveau von DIPP2 α in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tiermodellen ausüben wurde bislang nicht untersucht. Die aktuelle Literatur bietet keine Daten zu Regulationsmechanismen der Expression.

Funktion und transgene Überexpression

DIPP-Proteine hydrolysieren wie oben beschrieben Phosphatgruppen diphosphorylierter Inositolphosphate ($[PP]_2\text{InsP}_4$, $[PP]\text{InsP}_5$ und $[PP]\text{InsP}_4$). Produkte sind niedriger

phosphorylierte und damit energieärmere Inositolphosphate (InsP5 und InsP6).
Abbildung 31 zeigt die katalysierten Reaktionsschritte.

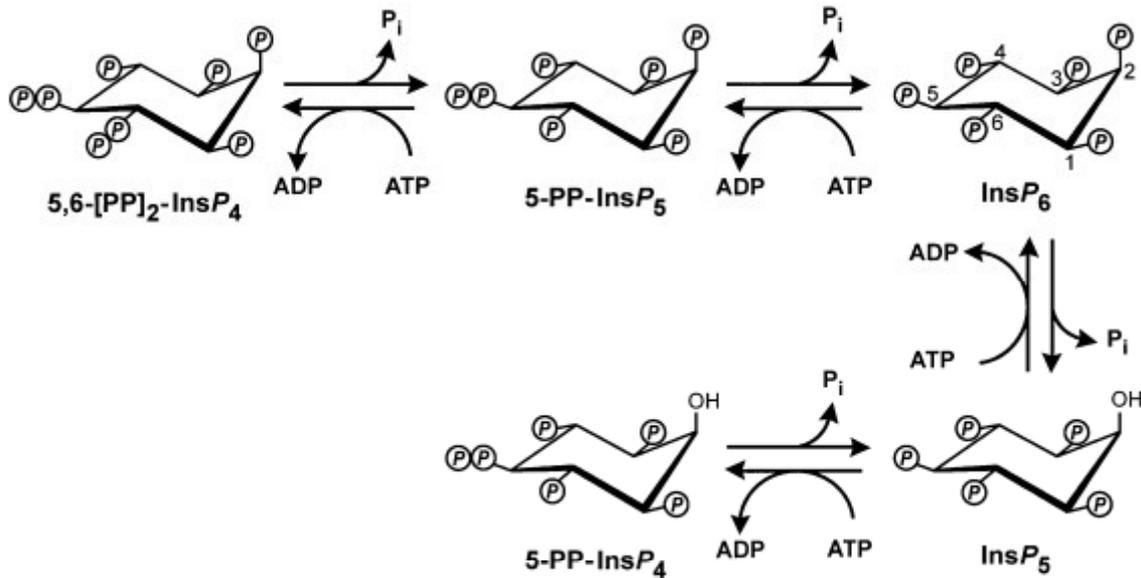


Abbildung 31. Stoffwechsel energiereicher Inositolphosphate. Diphosphoinositol-Polyphosphat-Phosphohydrolasen katalysieren verschiedene Hydrolyseschritte dieser Stoffgruppe (aus Safrany und Shears, 1998).

Versuche zeigten, dass 30-50% des InsP₆-Reservoirs der Zelle binnen einer Stunde zu diphosphorylierten Inositolphosphaten umgesetzt werden (Menniti et al., 1993). Einige Minuten nach Hemmung der DIPP durch Flourid war bereits ein Anstieg nachweisbar. Diese energieaufwendige Phosphorylierungen erfolgen durch oben erwähnte Diphosphoinositol-Polyphosphatkinasen (Voglmaier et al., 1996). Inositolphosphate sind an verschiedenen zentralen zellulären Prozessen beteiligt: Wichtige Schritte des Vesikeltransportes werden von Inositolphosphaten beeinflusst. Das Adapter-Protein 3 (AP-3) zum Beispiel ist ein Synaptosomen-spezifisches Protein, das die Vernetzung von Clathrin-Polymeren vermittelt. Dies führt durch Bildung von „clathrin-coated pits“ und Endozytose zum Recycling entleerter synaptischer Vesikel. [PP]InsP₅ hemmt diese AP-3-vermittelte Polymerisierung, InsP₆ ist ein weniger potenter Inhibitor (Ye et al., 1995). Auch AP-2, das ebenfalls endozytotische Aktivität reguliert, wird von InsP₆ gehemmt (Beck und Keen, 1991). Auch [PP]InsP₅ bindet hier mit hoher Affinität (Shears et al., 1995). Außerdem bindet [PP]InsP₅ stark an Coatomer, einen zytosolischen multimeren Komplex, der den Vesikeltransport zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-

Komplex reguliert (Fleischer et al., 1994), und an ein Proteolipin-Protein im Myelin des zentralen Nervensystems (Yamaguchi et al., 1996). In einem Lipid-Bilayer wirkt Coatomer als Kalium-spezifischer Kanal. Die Leitfähigkeit wird durch IP₆ und [PP]InsP₅ blockiert (Fleischer et al., 1994). Die Bedeutung von Diphosphoinositolphosphaten beim Vesikeltransport illustrieren Untersuchungen von Saiardi et al. (2000). Bei Hefezellen, in denen das Gen der Inositolhexakisphosphatkinase deletiert wurde, waren die Diphosphoinositolpolyphosphate reduziert, das Wachstum verlangsamt und Vakuolen klein und fragmentiert. Nach Injektion von InsP₆ in den Nucleus tractus solitarii kam es in unabhängigen Versuchen zu Bradykardie und Blutdruckabfall (Vallejo et al., 1987; Barraco et al., 1989). Es wurde angenommen, dass es durch Bindung an AP-3 zu einer Hemmung der Signaltransduktion kommt. Da DIPP2 α Diphosphoinositolpolyphosphate hydrolysiert, könnte eine myokardiale Überexpression durch Störung des Vesikeltransportes zur Entstehung von Hypertrophie und Fibrose beitragen. Inositolphosphate scheinen auch den Stoffwechsel G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zu beeinflussen. So binden sie an freies β -Arrestin, das nicht an Rhodopsin gebunden ist (Palczewski et al., 1991). Dieses ist an der Desensibilisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren beteiligt (Lohse et al., 1990). Am Herzen vermittelt β -Arrestin die Entkopplung β -adrenerger Rezeptoren, die zuvor von GRKs (G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen) phosphoryliert wurden. Dies ist neben der „Downregulation“ von β_1 -adrenergen Rezeptoren ein wesentlicher Pathomechanismus bei der Herzinsuffizienz. 1999 identifizierten York et al. mittels eines Hefescreens eine Inositolpolyphosphatkinase, die an dem Transport von mRNA durch die Kernporen beteiligt ist. Diese wurde nahe des „nuclear core complex“ lokalisiert. Das Produkt InsP₆ war notwendig für den mRNA-Transport durch die Kernporen. Entsprechend führte die Deletion einer Inositolphosphatmultikinase, die InsP₃ und InsP₄ phosphoryliert, in Hefezellen zu einem gestörten mRNA-Export mit reduzierter zytosolischer Konzentration von polyadenylierter mRNA (Saiardi et al., 2000). Die genaue Funktion von InsP₆ bei diesem Prozess ist noch unklar. Neben der Dephosphorylierung von Inositolphosphaten katalysieren DIPPs auch die Hydrolyse von 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) zu Ribose-1,5-bisphosphat (Rib-1,5-P₂; Fisher et al., 2002), einem Aktivator des Schrittmacherenzym

Phosphofruktokinase und damit der anaeroben Glykolyse. Unter Hypoxie kam es in Makrophagen Rib-1,5-P2-vermittelt innerhalb einer Minute zu einem Maximum der anaeroben Glykolyse (Kawaguchi et al., 2001). Auch bei der chronischen Herzinsuffizienz wird eine Gewebshypoxie diskutiert. Hier könnte DIPP einen wichtigen Regulator darstellen. Ob bei den DIPP2 α -transgenen Tieren eine vermehrte und im Vergleich zu oxidativen Phosphorylierung weniger effektive anaerobe Glykolyse zu dem oben beschriebenen Phänotyp führt muss aktuell noch offen bleiben.

DIPPs gehören zur Familie der „Nudix“-Hydrolasen. Diese hydrolysieren unter anderem Diadenosinpolyphosphate (Ap n A; Bessmann et al., 1996). Auch für DIPP1 wurde Ap5A und Ap6A als Substrat nachgewiesen (Safrany et al., 1999a). Die Konzentration von Ap n A steigt unter Hitzeschock und oxidativem Stress an (Baker und Jacobson, 1986). Wenn Dinukleosidphosphate akkumulieren vermitteln sie toxische Wirkung durch Hemmung von Nukleotidkinasen, Proteinkinasen und anderen Enzymen (Safrany et al., 1999b). Im Herzen ist insbesondere die Konzentration von Ap5A hoch. Untersuchungen von Jovanovic et al. (1998) zeigten, dass nach einer 10-minütigen Ischämiephase der Ap5A-Gehalt des Ventrikels signifikant von mikromolaren auf submikromolare Konzentrationen sank. Außerdem wurde nachgewiesen, dass in isolierten Membranen physiologische Konzentrationen von Ap5A das Öffnen kardialer ATP-abhängiger Kaliumkanäle (K_{ATP}-Kanäle) inhibiert. Diese Kanäle wirken durch Öffnen unter ischämischen Reizen zytoprotektiv (Nichols und Lederer, 1991). DIPP2 α könnte also theoretisch durch Abbau von Ap5A unter ischämischen Bedingungen mittels einer erhöhten Durchlässigkeit von K_{ATP}-Kanälen zytoprotektive Eigenschaften vermitteln. Auch auf den kardialen Calciumstoffwechsel nehmen Dinukleosidphosphate Einfluss. Der Ryanodinrezeptor bildet den Calciumfreisetzungskanal des sarkoplasmatischen Retikulums. Er steuert calciumsensitiv den für die Kontraktion der Myofilamente notwendigen systolischen Efflux von Calcium ins Zytosol und ist einer Vielzahl von Regulatoren wie der Proteinkinase A, Calstabin, der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) und Proteinphosphatasen unterworfen (Wehrens et al., 2005). Auch Ap4A und Ap5A binden an diesen Ryanodinrezeptor unter anderem im Herzmuskel. Hier steigert Ap4A die spezifische [³H]-Ryanodinbindung um den Faktor drei (Holden et al., 1996). Diese Nukleotidphosphate erhöhen so die Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors/Calciumfreisetzungskanals. Inzwischen

ist bekannt, dass es in der Herzinsuffizienz zu einem diastolischen Leck („leak“) dieses Kanals und damit zu reduzierten intrazellulären Calciumtransienten mit erniedrigter Calciumkonzentration im sarkoplasmatischen Retikulum kommt (Lehnart et al., 2005). Folge ist eine gestörte elektrochemische Kopplung. Dabei könnten Nucleosiddiphosphate einen deletären Effekt ausüben.

Schießlich wurde vor kurzem DIPP1 mit der Signaltransduktion über „extracellular signal-regulated kinases“ 1 und 2 (ERK1/2) in Zusammenhang gebracht. Diese übermitteln Signale, die wahrscheinlich zur kardiomyozytären Hypertrophie führen (Sudgen und Clerk, 1998). In Zelllinien supprimierte die murine DIPP1 ERK-Aktivität, die mit verschiedenen Reportergenen gemessen wurde (Chu et al., 2004). Eine DIPP1-Mutante mit inaktivem katalytischem Zentrum reduzierte ebenfalls die ERK-Aktivität. Auch die ERK-Antwort auf den physiologischen Aktivator der entsprechenden Signalkaskade, den „epidermal growth factor receptor“ konnte durch die rekombinante DIPP1 abgeschwächt werden. Die Autoren gehen von einem direkten Effekt der DIPP1 auf ERK aus ohne Beteiligung von Inositolphosphaten. Was diese Ergebnisse für das DIPP2 α -transgene Herzinsuffizienzmodell bedeutet ist noch unklar. Sollte DIPP2 α hinsichtlich ERK ähnliche Eigenschaften besitzen wie DIPP1 wäre ja ein eher antihypertropher Effekt zu erwarten.

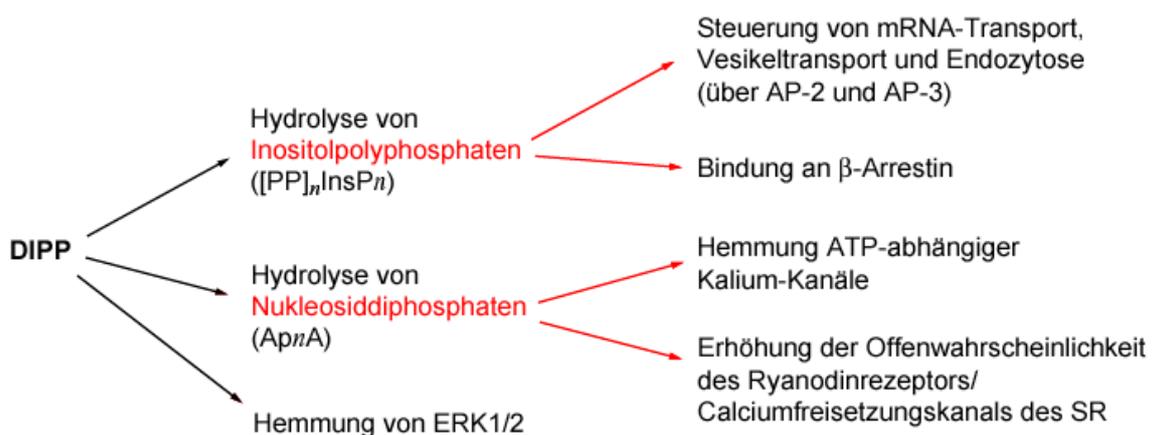


Abbildung 32. Darstellung möglicher Wirkungen von DIPP-Proteinen und ihrer Substrate im Herzen.

In den hier untersuchten drei unabhängigen transgenen Mauslinien DIPP2 α -TG6, -TG8 und -TG9 war eine Vergrößerung der Herzen mit morphometrisch leicht vergrößerten

Kardiomyozyten nachweisbar. In hohem Alter war diese - allerdings diskrete - myozytäre Hypertrophie in der untersuchten Linie TG9 auch funktionell relevant mit eingeschränkter Pumpfunktion und reduzierter kardialer Reserve. Eine kardiale Überexpression stellte also einen hypertrophen Stimulus dar. Außerdem ließ sich eine interstitielle Fibrosierung nachweisen.

DIPP2 α stellt wegen seiner pleiotropen Effekte, die zum Teil grundlegende zelluläre Vorgänge beeinflussen, ein interessantes Kandidateng der Herzinsuffizienz dar. Um zu klären, ob kardiale Hypertrophie, latentes Pumpversagen und interstitielle Fibrose der DIPP2 α -transgenen Tiere mit einem Nukleosiddiphosphat-assoziierten gestörten Calciumstoffwechsel zu erklären sind, wären Messungen von Calciumtransienten und Ap4A bzw. Ap5A im frühen Stadium der Erkrankung weiterführend. Auch Messungen von InsP6 zum Nachweis einer vermehrten DIPP2 α -Aktivität in den transgenen Tieren sind geplant. Dieses Produkt scheint auch für die Herzinsuffizienz relevante Funktionen wie mRNA-Transport, Vesikeltransport und Endozytose zu steuern.

Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist eine der führenden Todesursachen weltweit. Eine auf die neurohumorale Aktivierung zugeschnittene Therapie mit ACE-Hemmern bzw. Angiotensin-Rezeptorantagonisten, Betablockern, Aldosteronantagonisten und Diuretika verbessert zwar die Symptomatik und Prognose. Letztere ist bei Diagnosestellung jedoch immer noch schlechter als die vieler maligner Erkrankungen einzuschätzen. Ziel ist daher die Entwicklung von Medikamenten, die den Krankheitsverlauf des Syndroms Herzinsuffizienz aufhalten bzw. umkehren. Ein Ansatz ist dabei die Analyse sogenannter Kandidatengene, die im kranken Herzen differentiell exprimiert werden und potentiell medikamentös beeinflussbar sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei solcher Kandidatengene charakterisiert. Mäuse mit kardialer Überexpression β_1 -adrenerger Rezeptoren entwickeln eine Herzinsuffizienz mit kardialer Hypertrophie und Fibrose. In Gen Arrays mit 21000 Maus-ESTs zeigten sich unter anderem die Gene des Uncoupling Protein 2 (UCP2) und der Diphosphoinositol-Polyphosphat-Phosphohydrolase 2 alpha (DIPP2 α) aktiviert. Diese Befunde wurden zunächst mittels RNase Protection Assay und RT-PCR bestätigt. Auch andere murine Herzinsuffizienzmodelle wurden untersucht. So ließ sich ebenfalls im druckinduzierten Herzinsuffizienzmodell nach artifizieller Aortenstenose sowie im β_2 -AR überexprimierenden Herzen eine erhöhte Konzentration von UCP2- und DIPP2 α -mRNA messen. Um zu prüfen, ob diese differentielle mRNA-Expression deletäre oder protektive Effekte vermittelt, wurden jeweils transgene Mauslinien mit herzspezifischer Überexpression von UCP2 und DIPP2 α generiert.

Die Linie UCP2-TG1 mit hoher Überexpression sowie ein Gründer-Tier der UCP2-transgenen Mäuse entwickelten eine Herzinsuffizienz mit vergrößertem Herzen, linksventrikulärem Pumpversagen, interstitieller Fibrose und typischen Veränderungen der molekularen Marker ANF und SERCA. Zudem fanden sich dilatierte Vorhöfe sowie eine bradykarde Herzrhythmusstörung. UCP2 ist ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung im Mitochondrium. Im energieintensiven Stoffwechsel des Myokards könnte eine durch UCP2 reduzierte ATP-Synthese zu den genannten Veränderungen führen. Für UCP2 wurden auch protektive Eigenschaften durch das Abfangen freier Radikale beschrieben. Die Linie UCP2-TG3 mit niedrigerem Überexpressionsniveau

und ohne kardialen Phänotyp wurde deshalb einem Aortic banding unterzogen, wo sich in der Überlebenskurve kein protektiver oder deletärer Effekt einer moderat vermehrten Entkopplung im Vergleich zum Wildtyp zeigte.

In drei unabhängigen Linien transgener Mäuse mit herzspezifischer Überexpression von DIPP2 α ließ sich morphometrisch eine kardiale Hypertrophie nachweisen. Die Linie DIPP2 α -TG9 mit dem höchsten Überexpressionsniveau zeigte zudem eine kardiale Fibrose sowie unter Dobutamin eine verminderte kardiale Kontraktilitätsreserve im Vergleich zum Wildtypen. DIPP-Proteine hydrolysieren Inositolphosphate und Nukleosiddiphosphate und greifen so in zentrale Stoffwechselfvorgänge ein, die im einzelnen noch nicht geklärt sind.

Es konnte hier im Mausmodell gezeigt werden, dass UCP2 und DIPP2 α zwei für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz relevante Zielproteine darstellen. Geplant ist die weitere Aufklärung der beteiligten Mechanismen, um diese letztlich auch therapeutisch beeinflussen zu können.

Literaturverzeichnis

- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B. S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M. C., Gubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S. and Ricquier, D. (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* **26**(4): 435-9.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1995). *Short protocols in molecular biology*, John Wiley.
- Baker, J. C. and Jacobson, M. K. (1986). Alteration of adenyl dinucleotide metabolism by environmental stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(8): 2350-2.
- Barraco, R. A., Phillis, J. W. and Simpson, L. L. (1989). Cardiorespiratory effects of inositol hexakisphosphate following microinjections into the nucleus tractus solitarii. *Eur J Pharmacol* **173**(1): 75-84.
- Bechmann, I., Diano, S., Warden, C. H., Bartfai, T., Nitsch, R. and Horvath, T. L. (2002). Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2): a protective stress signal in neuronal injury. *Biochem Pharmacol* **64**(3): 363-7.
- Beck, K. A. and Keen, J. H. (1991). Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. *J Biol Chem* **266**(7): 4442-7.
- Bessman, M. J., Frick, D. N. and O'Handley, S. F. (1996). The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J Biol Chem* **271**(41): 25059-62.
- Beuckelmann, D. J., Nabauer, M. and Erdmann, E. (1992). Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* **85**(3): 1046-55.
- Bienengraeber, M., Ozcan, C. and Terzic, A. (2003). Stable transfection of UCP1 confers resistance to hypoxia/reoxygenation in a heart-derived cell line. *J Mol Cell Cardiol* **35**(7): 861-5.
- Blanc, J., Alves-Guerra, M. C., Esposito, B., Rousset, S., Gourdy, P., Ricquier, D., Tedgui, A., Miroux, B. and Mallat, Z. (2003). Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis. *Circulation* **107**(3): 388-90.
- Blaxall, B. C., Tschannen-Moran, B. M., Milano, C. A. and Koch, W. J. (2003). Differential gene expression and genomic patient stratification following left ventricular assist device support. *J Am Coll Cardiol* **41**(7): 1096-106.
- Boehm, E. A., Jones, B. E., Radda, G. K., Veech, R. L. and Clarke, K. (2001). Increased uncoupling proteins and decreased efficiency in palmitate-perfused hyperthyroid rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(3): H977-83.
- Boss, O., Samec, S., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. and Giacobino, J. P. (1997). Tissue-dependent upregulation of rat uncoupling protein-2 expression in response to fasting or cold. *FEBS Lett* **412**(1): 111-4.

- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. and Giacobino, J. P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* **408**(1): 39-42.
- Bouchard, C., Perusse, L., Chagnon, Y. C., Warden, C. and Ricquier, D. (1997). Linkage between markers in the vicinity of the uncoupling protein 2 gene and resting metabolic rate in humans. *Hum Mol Genet* **6**(11): 1887-9.
- Bouillaud, F., Couplan, E., Pecqueur, C. and Ricquier, D. (2001). Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4. *Biochim Biophys Acta* **1504**(1): 107-19.
- Braunwald, E. (2001). *Heart Disease*. Philadelphia, Saunders.
- Bristow, M. R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R. S., Sageman, W. S., Lurie, K., Billingham, M. E., Harrison, D. C. and Stinson, E. B. (1982). Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* **307**(4): 205-11.
- Brodde, O. E. (1993). Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther* **60**(3): 405-30.
- 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): 837-44.
- Caffrey, J. J., Safrany, S. T., Yang, X. and Shears, S. B. (2000). Discovery of molecular and catalytic diversity among human diphosphoinositol-polyphosphate phosphohydrolases. An expanding Nudt family. *J Biol Chem* **275**(17): 12730-6.
- Camirand, A., Marie, V., Rabelo, R. and Silva, J. E. (1998). Thiazolidinediones stimulate uncoupling protein-2 expression in cell lines representing white and brown adipose tissues and skeletal muscle. *Endocrinology* **139**(1): 428-31.
- Cao, W., Daniel, K. W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A. V., Bai, X., Floering, L. M., Spiegelman, B. M. and Collins, S. (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol* **24**(7): 3057-67.
- Cao, W., Medvedev, A. V., Daniel, K. W. and Collins, S. (2001). beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J Biol Chem* **276**(29): 27077-82.
- Chevillotte, E., Rieusset, J., Roques, M., Desage, M. and Vidal, H. (2001). The regulation of uncoupling protein-2 gene expression by omega-6 polyunsaturated fatty acids in human skeletal muscle cells involves multiple pathways, including the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor beta. *J Biol Chem* **276**(14): 10853-60.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**(3): 532-4, 536-7.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.

- Chu, C., Alapat, D., Wen, X., Timo, K., Burstein, D., Lisanti, M., Shears, S. and Kohtz, D. S. (2004). Ectopic expression of murine diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1 attenuates signaling through the ERK1/2 pathway. *Cell Signal* **16**(9): 1045-59.
- CIBIS-II Investigators and Committees (1999). The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* **353**(9146): 9-13.
- Clapham, J. C., Arch, J. R., Chapman, H., Haynes, A., Lister, C., Moore, G. B., Piercy, V., Carter, S. A., Lehner, I., Smith, S. A., Beeley, L. J., Godden, R. J., Herrity, N., Skehel, M., Changani, K. K., Hockings, P. D., Reid, D. G., Squires, S. M., Hatcher, J., Trail, B., Latcham, J., Rastan, S., Harper, A. J., Cadenas, S., Buckingham, J. A., Brand, M. D. and Abuin, A. (2000). Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* **406**(6794): 415-8.
- Collins, S., Cao, W., Daniel, K. W., Dixon, T. M., Medvedev, A. V., Onuma, H. and Surwit, R. (2001). Adrenoceptors, uncoupling proteins, and energy expenditure. *Exp Biol Med* (Maywood) **226**(11): 982-90.
- Colucci, W. S., Denniss, A. R., Leatherman, G. F., Quigg, R. J., Ludmer, P. L., Marsh, J. D. and Gauthier, D. F. (1988). Intracoronary infusion of dobutamine to patients with and without severe congestive heart failure. Dose-response relationships, correlation with circulating catecholamines, and effect of phosphodiesterase inhibition. *J Clin Invest* **81**(4): 1103-10.
- Commins, S. P., Watson, P. M., Levin, N., Beiler, R. J. and Gettys, T. W. (2000). Central leptin regulates the UCP1 and ob genes in brown and white adipose tissue via different beta-adrenoceptor subtypes. *J Biol Chem* **275**(42): 33059-67.
- Communal, C., Singh, K., Pimentel, D. R. and Colucci, W. S. (1998). Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation* **98**(13): 1329-34.
- Conway, M. A., Allis, J., Ouwerkerk, R., Niioka, T., Rajagopalan, B. and Radda, G. K. (1991). Detection of low phosphocreatine to ATP ratio in failing hypertrophied human myocardium by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Lancet* **338**(8773): 973-6.
- Conway, M. A., Bottomley, P. A., Ouwerkerk, R., Radda, G. K. and Rajagopalan, B. (1998). Mitral regurgitation: impaired systolic function, eccentric hypertrophy, and increased severity are linked to lower phosphocreatine/ATP ratios in humans. *Circulation* **97**(17): 1716-23.
- Cortez-Pinto, H., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Costa, S., Hwang, C. S., Lane, M. D., Bagby, G. and Diehl, A. M. (1998). Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **251**(1): 313-9.
- Couplan, E., del Mar Gonzalez-Barroso, M., Alves-Guerra, M. C., Ricquier, D., Gubern, M. and Bouillaud, F. (2002). No evidence for a basal, retinoic, or superoxide-induced uncoupling activity of the uncoupling protein 2 present in spleen or lung mitochondria. *J Biol Chem* **277**(29): 26268-75.
- Couplan, E., del Mar Gonzalez-Barroso, M., Alves-Guerra, M. C., Ricquier, D., Gubern, M. and Bouillaud, F. (2002). No evidence for a basal, retinoic, or superoxide-

induced uncoupling activity of the uncoupling protein 2 present in spleen or lung mitochondria. *J Biol Chem* **277**(29): 26268-75.

de la Bastie, D., Levitsky, D., Rappaport, L., Mercadier, J. J., Marotte, F., Wisnewsky, C., Brovkovich, V., Schwartz, K. and Lompre, A. M. (1990). Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca²⁺(+)-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* **66**(2): 554-64.

Degens, H., Gilde, A. J., Lindhout, M., Willemsen, P. H., Van Der Vusse, G. J. and Van Bilsen, M. (2003). Functional and metabolic adaptation of the heart to prolonged thyroid hormone treatment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(1): H108-15.

Deswal, A., Petersen, N. J., Feldman, A. M., Young, J. B., White, B. G. and Mann, D. L. (2001). Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* **103**(16): 2055-9.

Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S. and Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* **330**(6148): 576-8.

Dunckley, T. and Parker, R. (1999). The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *Embo J* **18**(19): 5411-22.

Dzeja, P. P., Holmuhamedov, E. L., Ozcan, C., Pucar, D., Jahangir, A. and Terzic, A. (2001). Mitochondria: gateway for cytoprotection. *Circ Res* **89**(9): 744-6.

Echtay, K. S., Murphy, M. P., Smith, R. A., Talbot, D. A. and Brand, M. D. (2002a). Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J Biol Chem* **277**(49): 47129-35.

Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J. C. and Brand, M. D. (2002b). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**(6867): 96-9.

Echtay, K. S., Winkler, E., Bienengraeber, M. and Klingenberg, M. (2000a). Site-directed mutagenesis identifies residues in uncoupling protein (UCP1) involved in three different functions. *Biochemistry* **39**(12): 3311-7.

Echtay, K. S., Winkler, E., Frischmuth, K. and Klingenberg, M. (2001). Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H⁺ transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1416-21.

Echtay, K. S., Winkler, E. and Klingenberg, M. (2000b). Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature* **408**(6812): 609-13.

Engelhardt, S., Bohm, M., Erdmann, E. and Lohse, M. J. (1996). Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol* **27**(1): 146-54.

Engelhardt, S., Boknik, P., Keller, U., Neumann, J., Lohse, M. J. and Hein, L. (2001). Early impairment of calcium handling and altered expression of junctin in hearts of mice overexpressing the beta1-adrenergic receptor. *Faseb J* **15**(14): 2718-20.

- Engelhardt, S., Hein, L., Dyachenkow, V., Kranias, E. G., Isenberg, G. and Lohse, M. J. (2004). Altered calcium handling is critically involved in the cardiotoxic effects of chronic beta-adrenergic stimulation. *Circulation* **109**(9): 1154-60.
- Engelhardt, S., Hein, L., Keller, U., Klambt, K. and Lohse, M. J. (2002). Inhibition of Na(+)-H(+) exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res* **90**(7): 814-9.
- 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): 7059-64.
- Erdmann, E. (2003). *Herzinsuffizienz. Ursachen, Pathophysiologie und Therapie*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Esterbauer, H., Schneitler, C., Oberkofler, H., Ebenbichler, C., Paulweber, B., Sandhofer, F., Ladurner, G., Hell, E., Strosberg, A. D., Patsch, J. R., Krempler, F. and Patsch, W. (2001). A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. *Nat Genet* **28**(2): 178-83.
- Fleischer, B., Xie, J., Mayrleitner, M., Shears, S. B., Palmer, D. J. and Fleischer, S. (1994). Golgi coatomer binds, and forms K(+)-selective channels gated by, inositol polyphosphates. *J Biol Chem* **269**(27): 17826-32.
- Flesch, M., Schwinger, R. H., Schnabel, P., Schiffer, F., van Gelder, I., Bavendiek, U., Sudkamp, M., Kuhn-Regnier, F. and Bohm, M. (1996). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban mRNA and protein levels in end-stage heart failure due to ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Mol Med* **74**(6): 321-32.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D. and Warden, C. H. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* **15**(3): 269-72.
- Flier, J. S. and Lowell, B. B. (1997). Obesity research springs a proton leak. *Nat Genet* **15**(3): 223-4.
- Frey, N., McKinsey, T. A. and Olson, E. N. (2000). Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* **6**(11): 1221-7.
- Gaudon, C., Chambon, P. and Losson, R. (1999). Role of the essential yeast protein PSU1 in p6anscriptional enhancement by the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J* **18**(8): 2229-40.
- Gaussin, V., Tomlinson, J. E., Depre, C., Engelhardt, S., Antos, C. L., Takagi, G., Hein, L., Topper, J. N., Liggett, S. B., Olson, E. N., Lohse, M. J., Vatner, S. F. and Vatner, D. E. (2003). Common genomic response in different mouse models of beta-adrenergic-induced cardiomyopathy. *Circulation* **108**(23): 2926-33.
- Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D. and Le Marec, H. (1996). Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* **98**(2): 556-62.
- Glennon, M. C. and Shears, S. B. (1993). Turnover of inositol pentakisphosphates, inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol polyphosphates in primary cultured hepatocytes. *Biochem J* **293** (Pt 2): 583-90.

- Gong, D. W., Monemdjou, S., Gavrilova, O., Leon, L. R., Marcus-Samuels, B., Chou, C. J., Everett, C., Kozak, L. P., Li, C., Deng, C., Harper, M. E. and Reitman, M. L. (2000). Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem* **275**(21): 16251-7.
- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A. and Ruddle, F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(12): 7380-4.
- Habib, F. M., Springall, D. R., Davies, G. J., Oakley, C. M., Yacoub, M. H. and Polak, J. M. (1996). Tumour necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy. *Lancet* **347**(9009): 1151-5.
- Hardy, C. J., Weiss, R. G., Bottomley, P. A. and Gerstenblith, G. (1991). Altered myocardial high-energy phosphate metabolites in patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* **122**(3 Pt 1): 795-801.
- Harper, M. E. and Himms-Hagen, J. (2001). Mitochondrial efficiency: lessons learned from transgenic mice. *Biochim Biophys Acta* **1504**(1): 159-72.
- Hasenfuss, G., Reinecke, H., Studer, R., Meyer, M., Pieske, B., Holtz, J., Holubarsch, C., Posival, H., Just, H. and Drexler, H. (1994). Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* **75**(3): 434-42.
- Hidaka, K., Caffrey, J. J., Hua, L., Zhang, T., Falck, J. R., Nickel, G. C., Carrel, L., Barnes, L. D. and Shears, S. B. (2002). An adjacent pair of human NUDT genes on chromosome X are preferentially expressed in testis and encode two new isoforms of diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase. *J Biol Chem* **277**(36): 32730-8.
- Hoerter, J., Gonzalez-Barroso, M. D., Couplan, E., Mateo, P., Gelly, C., Cassard-Doulier, A. M., Diolez, P. and Bouillaud, F. (2004). Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage. *Circulation* **110**(5): 528-33.
- Hoit, B. D. (2001). New approaches to phenotypic analysis in adult mice. *J Mol Cell Cardiol* **33**(1): 27-35.
- Holden, C. P., Padua, R. A. and Geiger, J. D. (1996). Regulation of ryanodine receptor calcium release channels by diadenosine polyphosphates. *J Neurochem* **67**(2): 574-80.
- Hoppe, U. C., Bohm, M., Dietz, R., Hanrath, P., Kroemer, H. K., Osterspey, A., Schmaltz, A. A. and Erdmann, E. (2005). Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z Kardiol* **94**(8): 488-509.
- Hunter, J. J. and Chien, K. R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* **341**(17): 1276-83.
- Huss, J. M. and Kelly, D. P. (2005). Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest* **115**(3): 547-55.
- Ingwall, J. S. and Weiss, R. G. (2004). Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res* **95**(2): 135-45.
- Iwase, M., Bishop, S. P., Uechi, M., Vatner, D. E., Shannon, R. P., Kudej, R. K., Wight, D. C., Wagner, T. E., Ishikawa, Y., Homcy, C. J. and Vatner, S. F. (1996). Adverse

- effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression. *Circ Res* **78**(4): 517-24.
- Jaburek, M. and Garlid, K. D. (2003). Reconstitution of recombinant uncoupling proteins: UCP1, -2, and -3 have similar affinities for ATP and are unaffected by coenzyme Q10. *J Biol Chem* **278**(28): 25825-31.
- Jaburek, M., Varecha, M., Gimeno, R. E., Dembski, M., Jezek, P., Zhang, M., Burn, P., Tartaglia, L. A. and Garlid, K. D. (1999). Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem* **274**(37): 26003-7.
- Jackson, T. R., Patterson, S. I., Thastrup, O. and Hanley, M. R. (1988). A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca²⁺ without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells. *Biochem J* **253**(1): 81-6.
- James, J. F., Hewett, T. E. and Robbins, J. (1998). Cardiac physiology in transgenic mice. *Circ Res* **82**(4): 407-15.
- Jessup, M. (2001). Mechanical cardiac-support devices--dreams and devilish details. *N Engl J Med* **345**(20): 1490-3.
- Jezek, P. (2002). Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins--UCPn. *Int J Biochem Cell Biol* **34**(10): 1190-206.
- Jezek, P., Zackova, M., Ruzicka, M., Skobisova, E. and Jaburek, M. (2004). Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies. *Physiol Res* **53** Suppl 1: S199-211.
- Jovanovic, A., Jovanovic, S., Mays, D. C., Lipsky, J. J. and Terzic, A. (1998). Diadenosine 5',5''-P₁,P₅-pentaphosphate harbors the properties of a signaling molecule in the heart. *FEBS Lett* **423**(3): 314-8.
- Kawaguchi, T., Veech, R. L. and Uyeda, K. (2001). Regulation of energy metabolism in macrophages during hypoxia. Roles of fructose 2,6-bisphosphate and ribose 1,5-bisphosphate. *J Biol Chem* **276**(30): 28554-61.
- Kelly, L. J., Vicario, P. P., Thompson, G. M., Candelore, M. R., Doebber, T. W., Ventre, J., Wu, M. S., Meurer, R., Forrest, M. J., Conner, M. W., Cascieri, M. A. and Moller, D. E. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology* **139**(12): 4920-7.
- Kizaki, T., Suzuki, K., Hitomi, Y., Taniguchi, N., Saitoh, D., Watanabe, K., Onoe, K., Day, N. K., Good, R. A. and Ohno, H. (2002). Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9392-7.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. and Starkov, A. A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* **416**(1): 15-8.
- Krauss, S., Zhang, C. Y. and Lowell, B. B. (2002). A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 118-22.

- Kroemer, G. and Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* **6**(5): 513-9.
- Kubota, T., McTiernan, C. F., Frye, C. S., Slawson, S. E., Lemster, B. H., Koretsky, A. P., Demetris, A. J. and Feldman, A. M. (1997). Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res* **81**(4): 627-35.
- Lanni, A., De Felice, M., Lombardi, A., Moreno, M., Fleury, C., Ricquier, D. and Goglia, F. (1997). Induction of UCP2 mRNA by thyroid hormones in rat heart. *FEBS Lett* **418**(1-2): 171-4.
- Lehnart, S. E., Wehrens, X. H. and Marks, A. R. (2005). Defective ryanodine receptor interdomain interactions may contribute to intracellular Ca²⁺ leak: a novel therapeutic target in heart failure. *Circulation* **111**(25): 3342-6.
- Levy, D., Kenchaiah, S., Larson, M. G., Benjamin, E. J., Kupka, M. J., Ho, K. K., Murabito, J. M. and Vasan, R. S. (2002). Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* **347**(18): 1397-402.
- Liggett, S. B., Tepe, N. M., Lorenz, J. N., Canning, A. M., Jantz, T. D., Mitarai, S., Yatani, A. and Dorn, G. W., 2nd (2000). Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* **101**(14): 1707-14.
- Löffler, G. and Petrides, P. E. (1998). *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Springer.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**(4962): 1547-50.
- Lohse, M. J., Engelhardt, S. and Eschenhagen, T. (2003). What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* **93**(10): 896-906.
- Lottspeich, F. and Zorbas, H. (1998). *Bioanalytik*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Lowes, B. D., Minobe, W., Abraham, W. T., Rizeq, M. N., Bohlmeier, T. J., Quaipe, R. A., Roden, R. L., Dutcher, D. L., Robertson, A. D., Voelkel, N. F., Badesch, D. B., Groves, B. M., Gilbert, E. M. and Bristow, M. R. (1997). Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* **100**(9): 2315-24.
- 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): 2427-36.
- Mann, D. L. (2003). Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol* **65**: 81-101.
- Mattiasson, G., Shamloo, M., Gido, G., Mathi, K., Tomasevic, G., Yi, S., Warden, C. H., Castilho, R. F., Melcher, T., Gonzalez-Zulueta, M., Nikolich, K. and Wieloch, T. (2003). Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* **9**(8): 1062-8.

- Mattson, M. P. and Kroemer, G. (2003). Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* **9**(5): 196-205.
- McLeod, C. J., Aziz, A., Hoyt, R. F., Jr., McCoy, J. P., Jr. and Sack, M. N. (2005). Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *J Biol Chem* **280**(39): 33470-6.
- Medvedev, A. V., Snedden, S. K., Raimbault, S., Ricquier, D. and Collins, S. (2001). Transcriptional regulation of the mouse uncoupling protein-2 gene. Double E-box motif is required for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent activation. *J Biol Chem* **276**(14): 10817-23.
- Menniti, F. S., Miller, R. N., Putney, J. W., Jr. and Shears, S. B. (1993). Turnover of inositol polyphosphate pyrophosphates in pancreatoma cells. *J Biol Chem* **268**(6): 3850-6.
- MERIT-HF Study Group (1999). Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* **353**(9169): 2001-7.
- Milano, C. A., Allen, L. F., Rockman, H. A., Dolber, P. C., McMinn, T. R., Chien, K. R., Johnson, T. D., Bond, R. A. and Lefkowitz, R. J. (1994). Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* **264**(5158): 582-6.
- Mills, E. M., Xu, D., Fergusson, M. M., Combs, C. A., Xu, Y. and Finkel, T. (2002). Regulation of cellular oncogenesis by uncoupling protein 2. *J Biol Chem* **277**(30): 27385-92.
- Molkentin, J. D. and Dorn, I. G., 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): 215-28.
- Murakami, K., Mizushige, K., Noma, T., Tsuji, T., Kimura, S. and Kohno, M. (2002). Perindopril effect on uncoupling protein and energy metabolism in failing rat hearts. *Hypertension* **40**(3): 251-5.
- Nagase, I., Yoshida, T. and Saito, M. (2001). Up-regulation of uncoupling proteins by beta-adrenergic stimulation in L6 myotubes. *FEBS Lett* **494**(3): 175-80.
- Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Salvayre, R., Penicaud, L. and Casteilla, L. (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb J* **11**(10): 809-15.
- Neubauer, S. (2007). The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* **356**(11): 1140-51.
- Neubauer, S., Horn, M., Cramer, M., Harre, K., Newell, J. B., Peters, W., Pabst, T., Ertl, G., Hahn, D., Ingwall, J. S. and Kochsiek, K. (1997). Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* **96**(7): 2190-6.
- Neubauer, S., Horn, M., Naumann, A., Tian, R., Hu, K., Laser, M., Friedrich, J., Gaudron, P., Schnackerz, K., Ingwall, J. S. and et al. (1995). Impairment of energy

metabolism in intact residual myocardium of rat hearts with chronic myocardial infarction. *J Clin Invest* **95**(3): 1092-100.

Neubauer, S., Krahe, T., Schindler, R., Horn, M., Hillenbrand, H., Entzeroth, C., Mader, H., Kromer, E. P., Riegger, G. A., Lackner, K. and et al. (1992). ³¹P magnetic resonance spectroscopy in dilated cardiomyopathy and coronary artery disease. Altered cardiac high-energy phosphate metabolism in heart failure. *Circulation* **86**(6): 1810-8.

Neumann, J., Schmitz, W., Scholz, H., von Meyerinck, L., Doring, V. and Kalmar, P. (1988). Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. *Lancet* **2**(8617): 936-7.

Ng, W. A., Grupp, I. L., Subramaniam, A. and Robbins, J. (1991). Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. *Circ Res* **68**(6): 1742-50.

Nicholls, D. G. and Locke, R. M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* **64**(1): 1-64.

Nichols, C. G. and Lederer, W. J. (1991). Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol* **261**(6 Pt 2): H1675-86.

Noma, T., Nishiyama, A., Mizushige, K., Murakami, K., Tsuji, T., Kohno, M., Rahman, M., Fukui, T., Abe, Y. and Kimura, S. (2001). Possible role of uncoupling protein in regulation of myocardial energy metabolism in aortic regurgitation model rats. *Faseb J* **15**(7): 1206-8.

Packer, M., Bristow, M. R., Cohn, J. N., Colucci, W. S., Fowler, M. B., Gilbert, E. M. and Shusterman, N. H. (1996). The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* **334**(21): 1349-55.

Palczewski, K., Pulvermuller, A., Buczylo, J., Gutmann, C. and Hofmann, K. P. (1991). Binding of inositol phosphates to arrestin. *FEBS Lett* **295**(1-3): 195-9.

Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnberg, N. C. and Evans, R. M. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* **300**(5893): 611-5.

Pecqueur, C., Alves-Guerra, M. C., Gelly, C., Levi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F. and Miroux, B. (2001). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* **276**(12): 8705-12.

Pecqueur, C., Cassard-Doulier, A. M., Raimbault, S., Miroux, B., Fleury, C., Gelly, C., Bouillaud, F. and Ricquier, D. (1999). Functional organization of the human uncoupling protein-2 gene, and juxtaposition to the uncoupling protein-3 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **255**(1): 40-6.

Pitt, B., Zannad, F., Remme, W. J., Cody, R., Castaigne, A., Perez, A., Palensky, J. and Wittes, J. (1999). The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* **341**(10): 709-17.

Rao, S. and Verkman, A. S. (2000). Analysis of organ physiology in transgenic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**(1): C1-C18.

- Ricquier, D. and Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* **345** Pt 2: 161-79.
- Rockman, H. A., Koch, W. J. and Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **415**(6868): 206-12.
- Ruwhof, C. and van der Laarse, A. (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* **47**(1): 23-37.
- Safrany, S. T., Caffrey, J. J., Yang, X., Bembenek, M. E., Moyer, M. B., Burkhart, W. A. and Shears, S. B. (1998). A novel context for the 'MutT' module, a guardian of cell integrity, in a diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase. *Embo J* **17**(22): 6599-607.
- Safrany, S. T., Caffrey, J. J., Yang, X. and Shears, S. B. (1999b). Diphosphoinositol polyphosphates: the final frontier for inositide research? *Biol Chem* **380**(7-8): 945-51.
- Safrany, S. T., Ingram, S. W., Cartwright, J. L., Falck, J. R., McLennan, A. G., Barnes, L. D. and Shears, S. B. (1999a). The diadenosine hexaphosphate hydrolases from *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* are homologues of the human diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase. Overlapping substrate specificities in a MutT-type protein. *J Biol Chem* **274**(31): 21735-40.
- Safrany, S. T. and Shears, S. B. (1998). Turnover of bis-diphosphoinositol tetrakisphosphate in a smooth muscle cell line is regulated by beta2-adrenergic receptors through a cAMP-mediated, A-kinase-independent mechanism. *Embo J* **17**(6): 1710-6.
- Saiardi, A., Caffrey, J. J., Snyder, S. H. and Shears, S. B. (2000). Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **468**(1): 28-32.
- Schwinger, R. H. (2002). Calcium and the failing heart. *Basic Res Cardiol* **97** Suppl 1: II-3.
- Sekiguchi, M. (1996). MutT-related error avoidance mechanism for DNA synthesis. *Genes Cells* **1**(2): 139-45.
- Shears, S. B. (1998). The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochim Biophys Acta* **1436**(1-2): 49-67.
- Shears, S. B., Ali, N., Craxton, A. and Bembenek, M. E. (1995). Synthesis and metabolism of bis-diphosphoinositol tetrakisphosphate in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **270**(18): 10489-97.
- Shen, W., Asai, K., Uechi, M., Mathier, M. A., Shannon, R. P., Vatner, S. F. and Ingwall, J. S. (1999). Progressive loss of myocardial ATP due to a loss of total purines during the development of heart failure in dogs: a compensatory role for the parallel loss of creatine. *Circulation* **100**(20): 2113-8.
- Shizukuda, Y. and Buttrick, P. M. (2002a). Subtype specific roles of beta-adrenergic receptors in apoptosis of adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **34**(7): 823-31.

- Shizukuda, Y. and Buttrick, P. M. (2002b). Oxygen free radicals and heart failure: new insight into an old question. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**(2): L237-8.
- Skulachev, V. P. (1996). Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys* **29**(2): 169-202.
- Skulachev, V. P. (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* **1363**(2): 100-24.
- Spindler, M., Engelhardt, S., Niebler, R., Wagner, H., Hein, L., Lohse, M. J. and Neubauer, S. (2003). Alterations in the myocardial creatine kinase system precede the development of contractile dysfunction in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* **35**(4): 389-97.
- Stanley, W. C. and Chandler, M. P. (2002). Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. *Heart Fail Rev* **7**(2): 115-30.
- Stuart, J. A., Harper, J. A., Brindle, K. M., Jekabsons, M. B. and Brand, M. D. (2001). Physiological levels of mammalian uncoupling protein 2 do not uncouple yeast mitochondria. *J Biol Chem* **276**(21): 18633-9.
- Sugden, P. H. and Clerk, A. (1998). Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med* **76**(11): 725-46.
- Swedberg, K., Eneroth, P., Kjekshus, J. and Wilhelmsen, L. (1990). Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* **82**(5): 1730-6.
- Tavernier, G., Toumaniantz, G., Erfanian, M., Heymann, M. F., Laurent, K., Langin, D. and Gauthier, C. (2003). beta3-Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta3-adrenergic receptor. *Cardiovasc Res* **59**(2): 288-96.
- Teshima, Y., Akao, M., Jones, S. P. and Marban, E. (2003). Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* **93**(3): 192-200.
- Teshima, Y., Saikawa, T., Yonemochi, H., Hidaka, S., Yoshimatsu, H. and Sakata, T. (1999). Alteration of heart uncoupling protein-2 mRNA regulated by sympathetic nerve and triiodothyronine during postnatal period in rats. *Biochim Biophys Acta* **1448**(3): 409-15.
- Thomas, S. A. and Palmiter, R. D. (1997). Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline. *Nature* **387**(6628): 94-7.
- Torre-Amione, G., Kapadia, S., Benedict, C., Oral, H., Young, J. B. and Mann, D. L. (1996). Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* **27**(5): 1201-6.
- Ungerer, M., Bohm, M., Elce, J. S., Erdmann, E. and Lohse, M. J. (1993). Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* **87**(2): 454-63.

- Vallejo, M., Jackson, T., Lightman, S. and Hanley, M. R. (1987). Occurrence and extracellular actions of inositol pentakis- and hexakisphosphate in mammalian brain. *Nature* **330**(6149): 656-8.
- van Bilsen, M. (2004). "Energenetics" of heart failure. *Ann N Y Acad Sci* **1015**: 238-49.
- Voehringer, D. W., Hirschberg, D. L., Xiao, J., Lu, Q., Roederer, M., Lock, C. B., Herzenberg, L. A., Steinman, L. and Herzenberg, L. A. (2000). Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2680-5.
- Voglmaier, S. M., Bembenek, M. E., Kaplin, A. I., Dorman, G., Olszewski, J. D., Prestwich, G. D. and Snyder, S. H. (1996). Purified inositol hexakisphosphate kinase is an ATP synthase: diphosphoinositol pentakisphosphate as a high-energy phosphate donor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9): 4305-10.
- Waagstein, F., Hjalmarson, A., Varnauskas, E. and Wallentin, I. (1975). Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *Br Heart J* **37**(10): 1022-36.
- Wehrens, X. H., Lehnart, S. E. and Marks, A. R. (2005). Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol* **67**: 69-98.
- Xiao, R. P., Avdonin, P., Zhou, Y. Y., Cheng, H., Akhter, S. A., Eschenhagen, T., Lefkowitz, R. J., Koch, W. J. and Lakatta, E. G. (1999). Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res* **84**(1): 43-52.
- Yamaguchi, Y., Ikenaka, K., Niinobe, M., Yamada, H. and Mikoshiba, K. (1996). Myelin proteolipid protein (PLP), but not DM-20, is an inositol hexakisphosphate-binding protein. *J Biol Chem* **271**(44): 27838-46.
- Ye, W., Ali, N., Bembenek, M. E., Shears, S. B. and Lafer, E. M. (1995). Inhibition of clathrin assembly by high affinity binding of specific inositol polyphosphates to the synapse-specific clathrin assembly protein AP-3. *J Biol Chem* **270**(4): 1564-8.
- York, J. D., Odom, A. R., Murphy, R., Ives, E. B. and Wenthe, S. R. (1999). A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* **285**(5424): 96-100.
- Zhang, C. Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A. J., Boss, O., Kim, Y. B., Zheng, X. X., Wheeler, M. B., Shulman, G. I., Chan, C. B. and Lowell, B. B. (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* **105**(6): 745-55.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Martin Lohse und Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Bereitstellung der Mittel und Möglichkeiten und die grenzenlose Unterstützung bei meinen Aufenthalten in Oxford und Boston.

Herzlichen Dank an Ursula Keller und Frau Dr. Monika Buitrago für die freundlichen Hilfestellungen im Labor. Danke auch an die ganze Arbeitsgruppe für das stets gute und anspruchsvolle Klima.

Meinen Eltern danke ich sehr für die Unterstützung und die damit verbundenen Freiheiten, die das Studium und diese Arbeit möglich gemacht haben.

Lebenslauf

Florian Tobias Nickel
Burgbergstraße 36
91054 Erlangen

geboren am 04.05.1977 in Coburg

Schulbildung	1983 – 1996	Abitur am Matthias-Grünwald-Gymnasium Würzburg
Zivildienst	1996 – 1997	Abteilung für Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Ebern
Medizinische Ausbildung	1997 – 2004	Medizinische Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	8/1999	Ärztliche Vorprüfung (Note: 1,0)
	8/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)
	3/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)
	5/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)
Famulaturen	insgesamt sieben Monate, unter anderem:	
	3/2002 – 4/2002	Kardiologie, John Radcliffe Hospital, Oxford
	8/2002	Zentrum für Herzinsuffizienz und Herztransplantation, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston
Praktisches Jahr	5/2003 – 4/2004	Chirurgische Abteilung, Bezirksspital Brugg Chirurgische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg Medizinische Poliklinik der Universität Würzburg Medizinische Klinik, Stadtspital Triemli, Zürich Neurologische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg
Ärztliche Weiterbildung	9/2004 – 1/2006	Neurologische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg (Prof. Dr. K. V. Toyka)
	4/2006 – 1/2008	Medizinische Klinik, Stadtspital Triemli, Zürich (Prof. Dr. O. Oelz, Prof. Dr. C. A. Meier)
	seit 3/2008	Neurologische Klinik der Universität Erlangen (Prof. Dr. S. Schwab)