

**TGF- $\beta$ 1 INDUZIERTE DEPOSITION EXTRAZELLULÄRER  
MATRIXPROTEINE IM TIERMODELL  
TRANSGENER ENOS<sup>+/-</sup> MÄUSE**

**SVENJA FORST**



**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. J. Roth**

**und**

**dem Physiologischen Institut  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. K.-D. Schlüter**

**TGF- $\beta_1$  induzierte Deposition extrazellulärer Matrixproteine im  
Tiermodell transgener eNOS<sup>+/-</sup> Mäuse**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität, Gießen

eingereicht von

**Svenja Forst**

Tierärztin aus Lüdenscheid

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität, Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. J. Roth  
Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation: 08.09.2009

Meinen Eltern

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	1
<b>1. Einleitung</b> .....	5
1.1 <b>Herzinsuffizienz: Epidemiologie und Pathophysiologie</b> .....	5
1.1.1 <b>Neurohormonale Kompensationsmechanismen</b> .....	7
1.1.2 <b>Das Herzinsuffizienz-Modell in dieser Arbeit</b> .....	8
1.2 <b>Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS)</b> .....	9
1.2.1 <b>Die endotheliale NO-Synthase</b> .....	10
1.2.2 <b>NO in Kardiomyozyten</b> .....	11
1.3 <b>Der Transforming Growth Factor</b> .....	12
1.3.1 <b>Wirkungen von TGF-<math>\beta_1</math></b> .....	12
1.4 <b>Die extrazelluläre Matrix</b> .....	14
1.4.1 <b>Die extrazellulären Matrixproteine</b> .....	15
1.5 <b>Fragestellung dieser Arbeit</b> .....	16
<b>2. Material</b> .....	19
2.1 <b>Chemikalien</b> .....	19
2.1.1 <b>Antikörper</b> .....	21
2.1.2 <b>Primer</b> .....	21
2.2 <b>Geräte</b> .....	23
2.3 <b>Verbrauchsmaterialien</b> .....	25
2.4 <b>EDV</b> .....	25
2.5 <b>Versuchstiere</b> .....	25
<b>3. Methoden</b> .....	27
3.1 <b>Einstufung der Tiere nach Distress-Score Schema</b> .....	27
3.2 <b>Genotypisierung mittels Schwanzbiopsie bei der Maus</b> .....	28
3.3 <b>Blutdruckmessung bei der Maus</b> .....	31
3.4 <b>Real-time PCR am icycler<sup>®</sup></b> .....	32
3.4.1 <b>RNA-Isolierung aus Mäuseherzen</b> .....	32
3.4.1.1 <b>Präparation der Mäuseherzen</b> .....	32
3.4.1.2 <b>Gewinnung von RNA aus Mäuseherzen</b> .....	33
3.4.2 <b>Bestimmung der RNA-Konzentration</b> .....	33
3.4.3 <b>cDNA-Synthese (Reverse Transkription)</b> .....	34
3.4.4 <b>Real-time Polymerase Kettenreaktion (Real-time PCR)</b> .....	35
3.4.5 <b>Auswertung</b> .....	36
3.5 <b>Western Blot</b> .....	37
3.5.1 <b>Präparation der Mäuseherzen</b> .....	37
3.5.2 <b>Proteingewinnung aus Mäuse-Kardiomyozyten</b> .....	37
3.5.3 <b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</b> .....	38

3.5.4	Western Blot Verfahren .....	40
3.5.5	Immunologischer Proteinnachweis .....	41
3.5.6	Auswertung .....	42
3.6	Bestimmung der Creatinin-Konzentration aus Mäuseplasma .....	43
3.7	Computerprogramme und Statistik .....	45
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
4.1	Darstellung der Zuchtergebnisse .....	46
4.1.1	Nachkommen der Zuchtansätze A und B .....	46
4.1.2	Überlebensraten der Nachkommen über 6 Monate .....	47
4.1.3	Beurteilung des Gesundheitszustandes (nach Distress Score-Schema) .....	48
4.2	Ergebnisse der Blutdruckmessung .....	50
4.3	Organuntersuchung .....	51
4.3.1	Untersuchung von Herz, Lunge und Niere .....	51
4.3.2	Ergebnisse der Creatinin-Untersuchung aus Plasmaproben .....	53
4.4	PCR Untersuchung von Herz, Lunge und Niere .....	54
4.4.1	Genexpression der Matrixproteine in eNOS <sup>+/-</sup> + TGF-β <sub>1</sub> NTG Tieren .....	55
4.4.2	Genexpression der Matrixproteine in eNOS <sup>+/-</sup> + TGF-β <sub>1</sub> TG Tieren .....	59
4.4.3	Genexpression von MMP-12 bei Männchen und Weibchen im Vergleich .....	63
4.4.4	Genexpression von ANP und BNP bei Männchen und Weibchen im Vergleich .....	64
4.4.5	Genexpression von eNOS und ODC bei Weibchen und Männchen .....	66
4.4.6	Genexpression von Bcl-2 und Bax bei Weibchen und Männchen .....	67
4.4.7	Genexpression von Serca 2A und NCX bei Weibchen und Männchen .....	69
4.4.8	Genexpression von Phospholamban bei Weibchen und Männchen .....	71
4.5	Ergebnisse der Western Blot-Untersuchung .....	73
4.5.1	Proteinexpression von Elastin und Kollagen-1 in eNOS <sup>+/-</sup> + TGF-β <sub>1</sub> NTG Tieren .....	73
4.5.2	Proteinexpression von Elastin und Kollagen-1 in eNOS <sup>+/-</sup> + TGF-β <sub>1</sub> TG Tieren .....	75
4.5.3	Proteinexpression von Bcl-2 und Bax in eNOS <sup>+/-</sup> + TGF-β <sub>1</sub> NTG Tieren .....	76
4.5.4	Proteinexpression von Bcl-2 und Bax in eNOS <sup>+/-</sup> + TGF-β <sub>1</sub> TG Tieren .....	77
4.5.5	Proteinexpression von Serca 2A in eNOS <sup>+/-</sup> + TGF-β <sub>1</sub> NTG Tieren .....	78
4.5.6	Proteinexpression von Serca 2A in eNOS <sup>+/-</sup> + TGF-β <sub>1</sub> TG Tieren .....	79
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>80</b>
5.1	Beurteilung der Zuchtergebnisse und des Gesundheitszustandes .....	80
5.2	Beurteilung der PCR und Western Blot Untersuchungen .....	82
5.2.1	Fibrosemarker .....	82
5.2.2	Hypertrophiemarker .....	84
5.2.3	Apoptosemarker .....	87
5.2.4	Calcium-Handling Proteine .....	88
5.2.5	Gewebespezifische Veränderungen .....	89
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>

<b>7. Summary .....</b>	<b>93</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>95</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
Ang II	Angiotensin II
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammonium Persulfat
a.b. (aqua bidest.)	zweifach destilliertes Wasser
bax	Bcl-2-associated-X-Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BSA	Bovines Serum-Albumin
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
Ct-Wert	Cycle-Treshold (Schwellenwert Zyklus)
°C	Grad Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ECM	Extrazelluläre Matrixproteine
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale Stickoxid-Synthase
ESC	European Society of Cardiology
EtOH	Ethanol

---

fw-Primer	forward Primer
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HW/BW	Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht (heart weight / body weight)
KCl	Kaliumchlorid
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
KW/BW	Verhältnis von Nieren- zu Körpergewicht (kidney weight / body weight)
l	Liter
LW/BW	Verhältnis von Lungen- zu Körpergewicht (lung weight / body weight)
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
$\text{MgCl}_2$	Magnesium-Chlorid
$\text{Mg}_2\text{SO}_4$	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
Mmol	Millimol
MMP-12	Matrix-Metalloproteinase 12
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mw	Molekulargewicht (molecular weight)
$\mu\text{g}$	Mikrogramm

---

µl	Mikroliter
n	Anzahl der Tiere
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
NTG	Nicht Transgen
ODC	Ornithin-Decarboxylase
Oligo-dT	Oligo-desoxy-Thymidin
PCR <sup>®</sup>	Polymerase Kettenreaktion
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
PLB	Phospholamban
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
%	Prozent
rev-Primer	reverse primer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
rcf	Relative Centrifugal Force, Relative Zentrifugalbeschleunigung
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Serca 2A	Sarkoplasmatische Retikulum Ca-ATPase
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer

Taq	Termus aquaticus
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TG	Transgen
TGF- $\beta_1$	Transforming growth factor- $\beta_1$
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
UCP2	mitochondriales Entkopplerprotein 2
UV	Ultra Violett
V	Volt
vol/vol	Volume/Volume
wt/vol	Weight/Volume
ZnCl <sub>2</sub>	Zinkchlorid

## 1. Einleitung

### 1.1 Herzinsuffizienz: Epidemiologie und Pathophysiologie

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems gehören in den Industrieländern nach wie vor zu den wichtigsten Todesursachen. Im Jahr 2006 erlag in Deutschland fast jeder zweite Verstorbene einer Herz-Kreislauf-Erkrankung (43,7%); vergleichend starb nur jeder vierte an einer Tumorerkrankung (25,7%) (Statistisches Bundesamt).

Hierbei zeigt sich, dass die Herzinsuffizienz die häufigste diagnostizierte Erkrankung bei Patienten über dem 65. Lebensjahr ist (2-5%), wobei beachtet werden muß, dass Männer im Gegensatz zu Frauen häufiger betroffen sind (ca. 1,5:1).

Unter Herzinsuffizienz versteht man eine unzureichende Funktion des Herzens, bei der das Herz nicht mehr in der Lage ist, eine den Anforderungen entsprechende Förderleistung zu erbringen (Pschyrembel; 259.Auflage, 2002). Der Grund hierfür liegt entweder in einer gestörten Füllung oder einer beeinträchtigten Kontraktion/Entleerung der Ventrikel, oder in einer Kombination aus beidem. Ursachen hierfür sind u.a. Myokardschäden (z.B. nach Infarkt oder durch eine Minderdurchblutung des Herzmuskels an sich, wie bei der koronaren Herzkrankheit), Klappendefekte (Stenosen oder Insuffizienzen) oder Reiz-Leitungs-Störungen.

Im Allgemeinen wurde früher zwischen akuter und chronischer Herzinsuffizienz unterschieden. Da der Begriff „akut“ jedoch teilweise missverständlich verwendet wurde, von einigen um den zeitlichen Verlauf der Herzinsuffizienz zu beschreiben, von anderen, um ihren Schweregrad zu charakterisieren, hat man sich in den ESC Guidelines 2008 darauf geeinigt, zwischen „New onset“ (neu aufgetretener Herzinsuffizienz), „Transient“ (Symptome einer Herzinsuffizienz über einen kurzen Zeitraum hinweg) und „Chronic“ (chronische Herzinsuffizienz mit klinischer Symptomatik) zu unterscheiden. Die „New onset“ Herzinsuffizienz äußert sich in dem plötzlichen Auftreten klinischer Symptome einer akuten kardialen Dysfunktion. Ursache ist in den meisten Fällen die Dekompensation einer bereits bestehenden, jedoch klinisch nicht auffälligen chronischen Herzinsuffizienz. Die Ursachen für eine chronische Herzinsuffizienz sind vielfältig; in ca. 90 % der Fälle sind sie durch eine arteriellen Hypertonie oder einer Arteriosklerose der Herzkranzgefäße (koronare Herzkrankheit) bedingt. Als Multisystemerkrankung ist nicht nur die Funktion des

Herzens an sich, sondern auch der gesamte Kreislauf, die Nieren, die Skelettmuskulatur und die Lungen direkt betroffen. Im Anfangsstadium der chronischen Herzinsuffizienz versucht der Körper mit speziellen Kompensationsmechanismen die verminderte Pumpleistung des Herzens und die dadurch entstehende Abnahme des Herzminutenvolumens auszugleichen. Kurzfristig wird über Sympathikusaktivierung die Herzfrequenz erhöht, mittelfristig kommt es zu ventrikulärer Dilatation, welche langfristig in myokardialen Umbauprozessen mit kardialer Fibrose, Myokardhypertrophie und Apoptose-Prozessen gipfelt. Weitere Kompensationsmechanismen sind ein aktiviertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (Abb. 1.1), eine erhöhte Endothelin- und Zytokinfreisetzung und Vasokonstriktion zur Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdruckes. Somit wird kurzfristig eine Stabilisierung der Myokardfunktion gewährleistet. Auf Dauer jedoch tragen diese Systeme zur Progression der Herzinsuffizienz bei, es entsteht ein *circulus vitiosus* (Cohn et al. 2000).

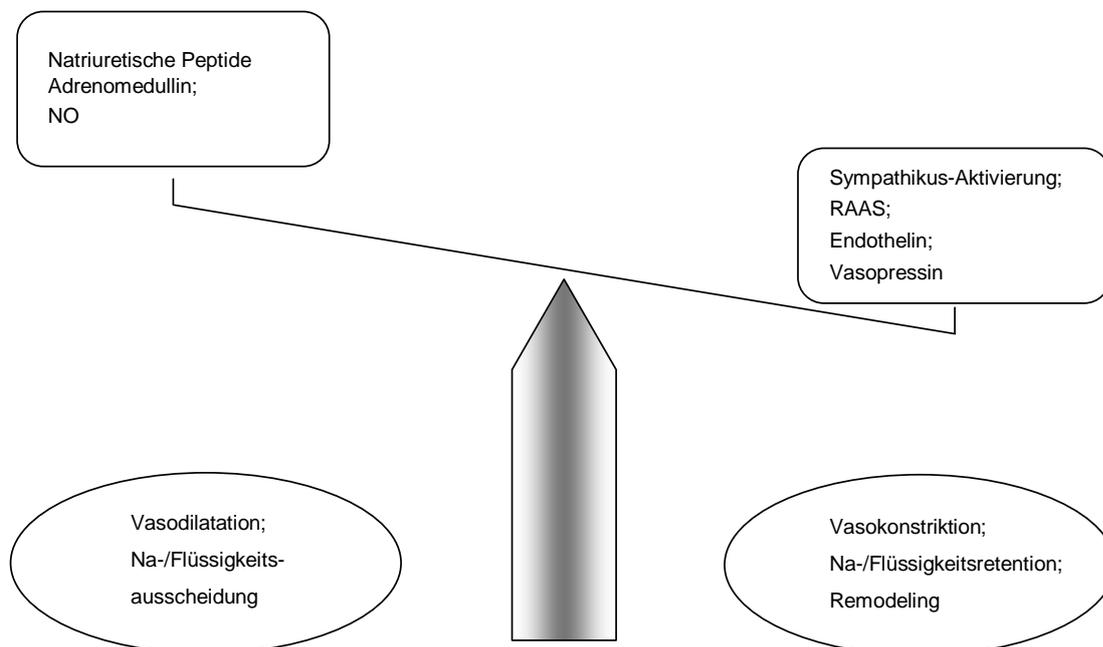


Abb. 1.1 Durch eine Herzinsuffizienz werden bestimmte neurohormonale Systeme aktiviert. In gesunden Herzen halten sich vasokonstriktorisch und vasodilatatorisch wirkende Systeme die Waage; bei fortschreitender Krankheit überwiegen jedoch die vasokonstriktorischen und antinatriuretischen Systeme. Kardiale Remodeling-Prozesse forcieren letztendlich den Prozess der Verschlechterung.

### 1.1.1 Neurohormonale Kompensationsmechanismen

#### Das sympathische Nervensystem

Durch das Herzinsuffizienzgeschehen werden Chemo-, Metabo- und Barorezeptoren des sympathischen Nervensystems aktiviert, wodurch sich der Sympathikotonus erhöht. Hierdurch kommt es zur Stimulation myokardialer  $\beta$ -Rezeptoren, welche eine erhöhte kardiale Kontraktilität, Tachykardie und Vasokonstriktion bewirken (Brum et al., 2006). Kurzzeitig wird so das Herzzeitvolumen aufrecht erhalten, langfristig fördert ein chronisch erhöhter Sympathikotonus jedoch die Progression der Herzinsuffizienz. Durch die erhöhte Schlagfrequenz des Herzens kommt es zu einer verkürzten Diastole und somit zu verminderter Durchblutung der Koronargefäße, was eine Minderversorgung des Myokards bei gleichzeitig erhöhtem Sauerstoff- und Energiebedarf zur Folge hat. Somit kommt es zu oxidativem Stress und Unterversorgung des Myokards.

Mit fortschreitendem Krankheitsgeschehen kommt es zur Änderung der Signaltransduktion der  $\beta$ -Rezeptoren, die vor allem durch eine Desensibilisierung des adrenergen Systems charakterisiert ist. Es kommt zur Runterregulation der  $\beta_1$ -Rezeptoren, zur Entkopplung der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren und zur Hochregulation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptorkinase (Bristow et al., 1982; Lohse et al., 2003). Alles in allem führt dies zu einem 50-60%igem Verlust der Signalkapazität der  $\beta$ -Rezeptoren.

Eine weitere Schädigung entsteht durch die erhöhten Katecholaminspiegel im insuffizienten Herzen. Diese wirken toxisch auf die Kardiomyozyten und ändern deren Genexpression. Außerdem kommt es durch sie zu einer Störung des Calcium-Haushaltes, was sich zum einen in einer Störung der Kontraktion und Relaxation der Myofibrillen, zum anderen in myozytären Nekrosen und Apoptose äußert.

Letztendlich beeinflusst das chronisch aktivierte sympathische Nervensystem das kardiale Remodeling, dessen Hauptmerkmale auf zellulärer Ebene die Hypertrophie der Myozyten und die Zunahme an fibrotischem Gewebe sind. In der Klinik zeigt sich ein fortschreitendes funktionelles Versagen des Herzens, begleitet von einer im Röntgenbild sichtbaren Änderung der Ventrikelform und -größe von der Elipse hin zur Kugel.

### Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Durch die verminderte Pumpleistung des Herzens im Insuffizienzgeschehen kommt es zunächst zu einem Blutdruckabfall. Die verminderte Perfusion der Niere wird durch renale Barorezeptoren registriert. Die Niere reagiert hierauf mit Ausschüttung von Renin, welches die Bildung von Angiotensin I aus Angiotensinogen katalysiert. Angiotensin I wiederum wird durch das Angiotensin-Converting-Enzym in seine biologische Form, das Angiotensin II, überführt, welches die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde und somit eine verstärkte Natrium- und Wasserretention bewirkt. Durch die so herbeigeführte Zunahme des Blutvolumens kommt es zum Blutdruckanstieg und zur Erhöhung der Vor- und Nachlast. Außerdem wirkt Angiotensin II im Herzen und als potenter Vasokonstriktor am Endothel, wodurch der Blutdruck zusätzlich ansteigt. Bei anhaltender Hypertonie reagiert das Herz auf diese Druckbelastung mit Remodeling-Prozessen, die Hypertrophie, Fibrose, Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine und Änderung der Genexpression beinhalten (Swynghedauw, 1999; Sudgen et al., 1998).

#### **1.1.2 Das Herzinsuffizienz-Modell in dieser Arbeit**

Eine wichtige Funktion bei der chronischen Herzinsuffizienz spielt Stickstoffmonoxid (NO). NO wird in endothelialen Zellen und Kardiomyozyten durch verschiedene NO-Synthasen, besonders die endotheliale NO-Synthase (eNOS), synthetisiert und nimmt eine wichtige Rolle in der Regulation des vaskulären Blutdrucks, sowie in der Regulation der Funktionsabläufe der Kardiomyozyte ein. Eine weitere wichtige Komponente im Insuffizienzgeschehen stellt TGF- $\beta_1$  dar, welches auf Kardiomyozyten und –fibroblasten wirkt und den Prozess des kardialen Remodelings entscheidend vorantreibt.

Vorangegangene Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten der Ratte haben bereits in vitro gezeigt, dass TGF- $\beta_1$  die Expression kardialer Matrixproteine entscheidend beeinflusst (Wenzel et al., 2009, submitted). Ebenso konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an endothelialer NO-Synthase, und somit ein Mangel an NO, in adulten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte zu Hypertrophie führt (Wenzel et al., 2007). Da sich aber in vitro gewonnene Ergebnisse nicht immer 1:1 auf die in vivo-Situation übertragen lassen, ist es erforderlich, die kardialen

Wirkungen von TGF- $\beta_1$ , kombiniert mit einem NO-Defizit in einem in vivo-Modell zu überprüfen. Eine Möglichkeit hierfür bietet die Zuhilfenahme eines transgenen Tier-Modells. Hierbei werden den entsprechenden Tieren klonierte Gene in die Keimbahn eingebaut, z.B. durch Blastozysteninjektion, Pronukleusinjektion oder retrovirale Infektion. Diese Gene werden dann stabil von Generation zu Generation weitervererbt. In der aktuellen Forschung werden hierfür zumeist Ratten oder Mäuse benutzt, obwohl auch andere Tierarten in Frage kommen.

Im hier durchgeführten Forschungsprojekt wurde ein neuartiges Modell der Herzinsuffizienz bei transgenen Mäusen verwendet. Hierfür wurden Mäuse mit einem Defizit der endothelialen NO-Synthase mit TGF- $\beta_1$ -überexprimierenden Mäusen gekreuzt (siehe 2.5). Aus dieser Kreuzung resultierende Tiere entwickelten mit zunehmendem Alter eine Herzinsuffizienz, ohne dass chirurgisch (Setzen eines Infarktes oder Erzeugung einer Hypertonie mittels Abklemmen eines Gefäßes) oder medikamentös eingegriffen werden musste.

## **1.2 Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS)**

Das vielfältigste aller Vasodilatoren ist zweifelsfrei das NO. Es wirkt als Signalmolekül, Neurotransmitter und Hormon, kann jedoch, in Abhängigkeit von der Konzentration, durchaus zytotoxische Effekte auslösen. Im Unterschied zu vielen anderen körpereigenen Botenstoffen wird NO nicht vesikulär gespeichert, sondern nach Bedarf synthetisiert. Die hierfür verantwortlichen Enzyme sind die NO-Synthasen, die in drei Isoformen im menschlichen Körper vorkommen: NOS I, NOS II und NOS III bzw. nNOS, iNOS und eNOS. Die Namen der jeweiligen Isoformen lassen sich auf das Gewebe zurückführen, in dem sie zuerst nachgewiesen wurden (nNOS in Nervengewebe, iNOS in einer Zelllinie immunaktiver Makrophagen und eNOS im vaskulären Endothel). Inzwischen wurden die drei Isoformen aber auch in anderen Geweben nachgewiesen (Michel et al., 1997).

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit richtet sich dabei auf die eNOS, da sie mit ihrem Sitz im Endothel und in den Kardiomyozyten die entscheidende Rolle bei der NO-vermittelten Blutdruckregulation sowie der NO-vermittelten Vorgänge in Herzmuskelzellen spielt.

### 1.2.1 Die endotheliale NO-Synthase

In den achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts postulierten Furchgott und Zawadzki, dass es in gesundem Endothel einen Botenstoff geben müsse, der zu einer Vasodilatation und somit zu einer Senkung des Blutdruckes führt. Dieser Stoff wurde von ihnen, gemäß seiner Funktion als „*Endothel-derived relaxing factor*“ (EDRF) bezeichnet (Furchgott und Zawadzki, 1980). Einige Jahre später wurde EDRF zeitgleich von verschiedenen Arbeitsgruppen als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987; Kelm et al., 1988).

Die endotheliale NO-Synthase, welche in spezialisierten Mikrodomänen innerhalb der Plasmamembran, den sogenannten Caveolae lokalisiert ist, wird konstitutiv in Endothelzellen, Kardiomyozyten und Thrombozyten exprimiert. Sie liefert den wichtigsten Stoff für die Endothel-vermittelte Gefäßtonusmodulation, da sie auch unter Ruhebedingungen kontinuierlich NO bildet und somit der sympathisch-adrenergen Vasokonstriktion entgegenwirkt. Belegt wird dies durch Untersuchungen an Hypertonikern, die im Vergleich zu Nihthypertonikern eine herabgesetzte endothelabhängige Vasodilatation zeigen (Panza et al., 1990). Manning et al. (1993) konnten zeigen, dass eine mehrtägige Blockade der NO-Synthase durch L-NAME zu Hypertonie bei Ratten führt. Untermauert werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen an eNOS „knock-out“ Mäusen (hier wurde das Gen für die endotheliale NO-Synthase ausgeschaltet), die im Vergleich mit eNOS heterozygoten und eNOS Wildtyp Mäusen einen signifikant höheren Blutdruck hatten (Smithies et al., 1996).

Die Aktivität der eNOS kann infolge neurohormonaler Faktoren (siehe Abb. 1.2) wie erhöhte Katecholamin-, Vasopressin- oder Bradykininspiegel gesteigert werden (Boulanger et al., 1997). Die Expression der eNOS hingegen wird u.a. durch Scherkräfte am Endothel oder erhöhte Östrogenspiegel während der Gravidität erhöht (Awolesi et al., 1995; Kleinert et al., 1998). Eine wichtige Rolle bei der Erhöhung der Expression sowie der Aktivität der eNOS nimmt der Transforming Growth factor- $\beta_1$  ein, der über den Transkriptionsfaktor SMAD-2 wirkt, welcher direkt an eine spezifische Region des eNOS-Promoters bindet (Saura et al., 2002; Schwartz et al., 2005).

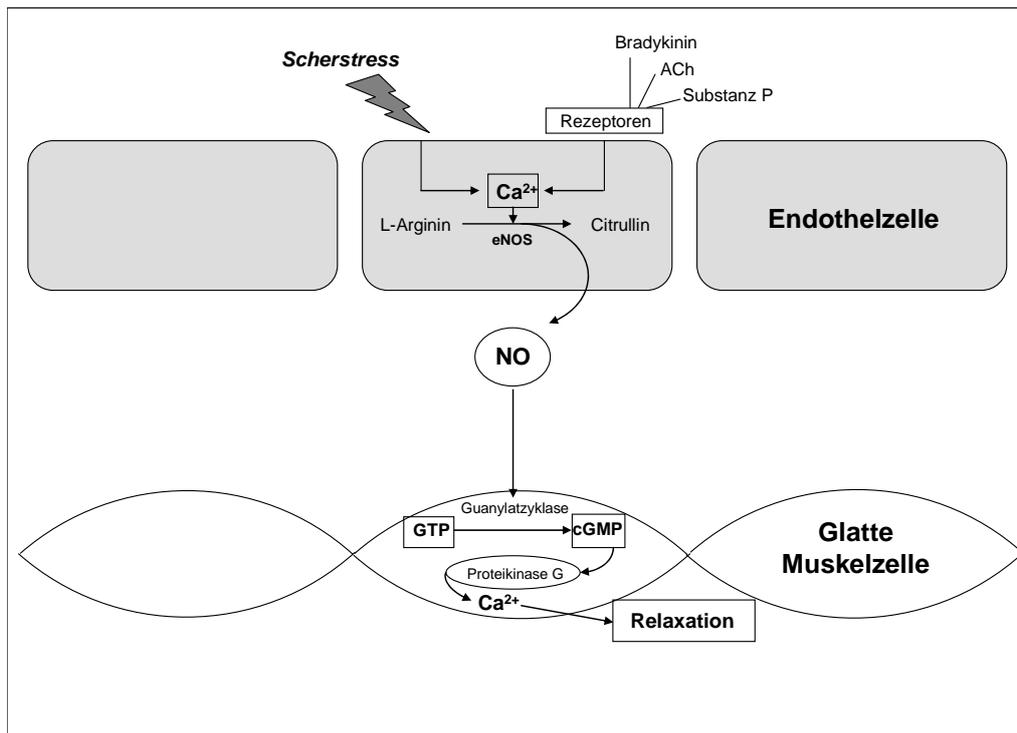


Abb. 1.2 Durch exogene Reize wie Stress oder bestimmte Hormone kommt es zur Aktivierung der endothelialen NO-Synthase, die L-Arginin in CitruLLin und NO umwandelt. Das hierbei entstehende NO wirkt auf die in den glatten Muskelzellen lokalisierte NO-sensitive Guanylatzyklase, welche die Umwandlung von GTP in cGMP katalysiert. Dieses wiederum aktiviert die Proteinkinase G, welche dann durch Freisetzung von intrazellulärem Calcium eine Relaxation der glatten Muskelzelle bewirkt.

### 1.2.2 NO in Kardiomyozyten

In Kardiomyozyten hat NO entscheidenden Einfluss auf verschiedene Vorgänge. So konnte in früheren in vitro Studien eine positive Beeinflussung der Kontraktilität nach elektrischer Stimulation ventrikulärer Rattenkardiomyozyten durch niedrige NO-Konzentrationen, sowie eine negative Beeinflussung bei hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (Kojda et al., 1996).

In hohen Konzentrationen verursacht NO zudem kardiomyozytäre Apoptose (Ing et al., 1999; Taimor et al., 2001). Diese NO-induzierten Apoptosevorgänge unterscheiden sich in adulten und neonatalen Kardiomyozyten. So ist die Apoptose durch NO in adulten Kardiomyozyten cGMP-vermittelt und führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Taimor et al., 2000; Taimor et al., 2001). In neonatalen Kardiomyozyten hingegen ist dieser Signalweg cGMP-unabhängig, jedoch abhängig von Peroxynitrat-Formationen (Ing et al., 1999).

Ein Mangel an NO, wie er bei eNOS knock-out Mäusen oder durch die Gabe von L-NNA vorkommt führt in Kardiomyozyten zu Hypertrophie, Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies und Induktion der p-38 MAP Kinase, die wiederum die Expression des Transforming Growth Factor- $\beta_1$  erhöht (Wenzel et al., 2007).

### **1.3 Der Transforming Growth Factor**

Der Transforming Growth Factor gehört zu den Zytokinen und spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung und Differenzierung von Zellen und Geweben. Zur TGF- $\beta$  Super-Familie gehören u.a. Activin/Inhibin, BMP's (Bone Morphogenetic Proteins) und die verschiedenen TGF- $\beta$ -Isoformen (Machida et al., 2000). Der Transforming Growth Factor- $\beta$  wurde in fünf Isoformen nachgewiesen: TGF- $\beta_{1-3}$  in Säugetieren, TGF- $\beta_4$  im Huhn und TGF- $\beta_5$  im Krallenfrosch. Annähernd alle Zellen des Körpers, einschließlich Epithel-, Endothel- und Bindegewebszellen, sowie hämatopoetische und neuronale Zellen, produzieren TGF- $\beta$  und haben Rezeptoren für ihn (Lim and Zhu, 2006). TGF- $\beta$  nimmt eine Schlüsselrolle in wichtigen biologischen Prozessen, wie Zellwachstum, Differenzierung und Entwicklung, sowie in Reparatur und Apoptose ein (Wells, 2000; Grande, 1997; Cheng and Grande, 2002).

#### **1.3.1 Wirkungen von TGF- $\beta_1$**

Für diese Arbeit interessierten besonders die Auswirkungen von TGF- $\beta_1$  auf die Expression der extrazellulären Matrixproteine im Herzen in vivo. Die aktive Form des TGF- $\beta_1$  ist ein 25kDa Homodimer, bestehend aus zwei identischen Untereinheiten aus jeweils 112 Aminosäuren, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Massague et al., 1990).

TGF- $\beta_1$  mRNA wird in Endothelzellen, hämatopoetischen Zellen und Bindegewebszellen exprimiert; seine Wirkungen auf die extrazellulären Matrixproteine sind vielfältig. So führt ein Anstieg der TGF- $\beta_1$ -Konzentration zur gesteigerten Synthese der wichtigsten Matrixproteine und verstärkter Zelladhäsion,

während gleichzeitig die Synthese von Matrix-abbauenden proteolytischen Enzymen durch die Synthese von Inhibitoren dieser Enzyme vermindert wird (Border and Noble, 1994). Diese Isoform ist somit wesentlich in fibrotische Prozesse in Herz, Leber, Niere und Lunge einbezogen. Rosenkranz et al. (2002) wiesen an TGF- $\beta_1$  überexprimierenden Mäusen nach, dass diese eine signifikante Herzhypertrophie mit interstitieller Fibrose im Vergleich zu Wildtypmäusen ausbildeten. Die transgenen Tiere zeigten außerdem eine erhöhte Expression Hypertrophie-assoziiierter Proteine wie ANP und ein vermindertes  $\beta$ -adrenerges Signalling, trotz verstärkter  $\beta$ -Adrenorezeptor-Dichte bei gleichzeitiger Runterregulation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptorkinase 1 und inhibitorischer G-Proteine.

Zu einem Anstieg der TGF- $\beta_1$ -Konzentration im Herzen mit den oben genannten Folgen kommt es unter verschiedenen Bedingungen; hierzu zählen u.a. Verletzungen (Sun and Weber, 2000), Bluthochdruck (Kawahara et al., 2002), Angiotensin II-Stimulation (Wenzel et al., 2001) und NO-Inhibition (Koyanagi et al., 2000).

Angiotensin II und TGF- $\beta_1$  spielen auf molekularer Ebene eine Schlüsselrolle bei der Adaptation des Herzens auf hämodynamische Drucküberbelastung (Abb. 1.3). Sie wirken dabei jedoch nicht unabhängig voneinander, sondern fungieren als Teil eines Netzwerkes, welches das kardiale Remodeling vorantreibt (Rosenkranz, 2004). Verschiedene Studien an adulten Kardiomyozyten zeigten, dass Angiotensin II selbst nicht zu Hypertrophie der Zellen führt (Wada et al., 1996; Sadoshima et al., 1993), ließen jedoch vermuten, dass Angiotensin II indirekt über eine gesteigerte TGF- $\beta_1$ -Expression zu Hypertrophie führt, da TGF- $\beta_1$  am Herzen als autokriner und parakriner Mediator fungiert (Wenzel et al., 2001). Schultz et al. (2002) erbrachten an TGF- $\beta_1$   $-/-$  bzw. TGF- $\beta_1$   $+/+$  Mäusen den Beweis, dass Angiotensin II über Induktion von TGF- $\beta_1$  zur kardialen Hypertrophie führt (bei den TGF- $\beta_1$   $-/-$  Tieren ließ sich im Gegensatz zu den  $+/+$  Wildtyptieren keine Hypertrophie durch Gabe von Angiotensin II induzieren). Angiotensin II wirkt dabei über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor, der sowohl in kardialen Fibroblasten als auch in Kardiomyozyten exprimiert wird (Tomita et al., 1998).

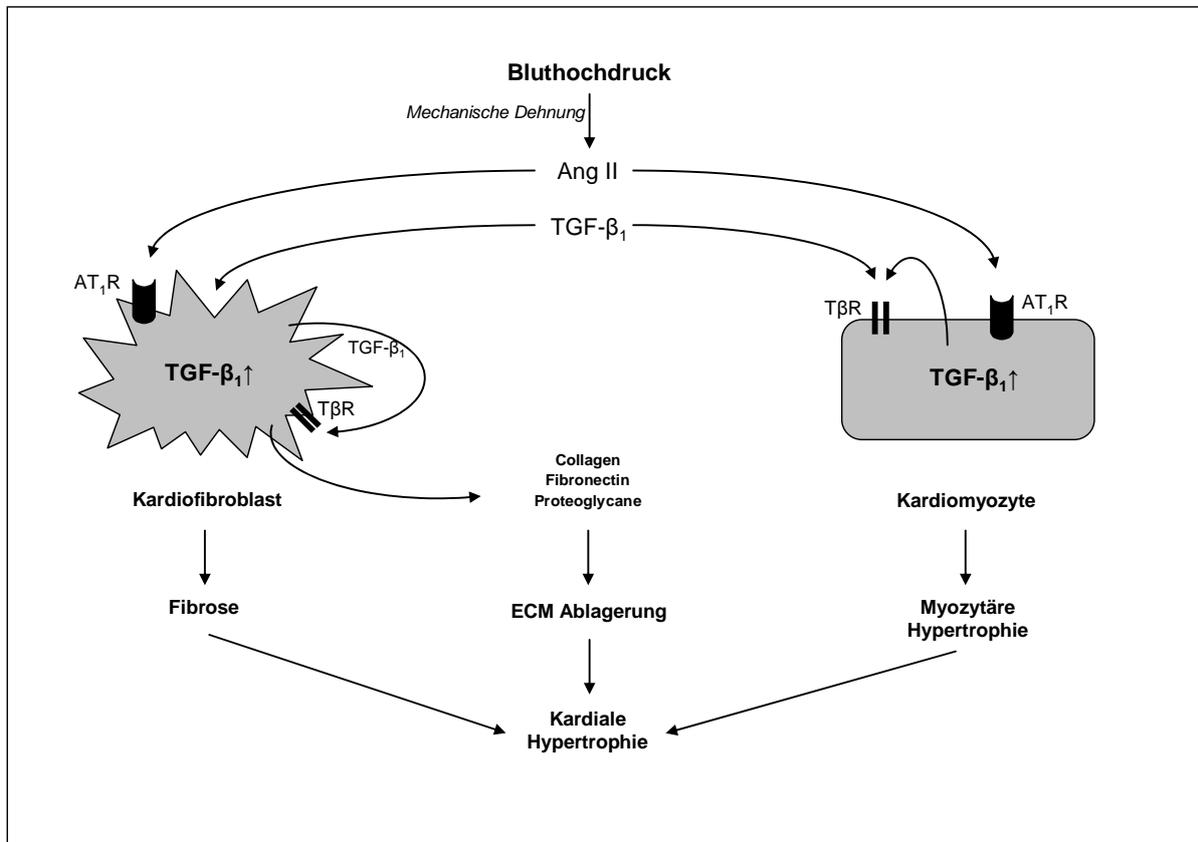


Abb. 1.3 Darstellung der Wechselwirkung von Angiotensin II und TGF- $\beta_1$  auf Kardiomyozyten und -fibroblasten (modifiziert nach Rosenkranz, 2004). Bei Bluthochdruck kommt es zu mechanischer Dehnung der Gefäße und zur Aktivierung des RAAS. Das nun zirkulierende Angiotensin II wirkt auf Kardiomyozyten und -fibroblasten, indem es deren TGF- $\beta_1$ -Expression steigert. Das entstehende TGF- $\beta_1$  wirkt als autokriner und parakriner Mediator; es bindet an den TGF- $\beta_1$ -Rezeptor (T $\beta$ R) und löst bestimmte Signalkaskaden aus. Im Kardiofibroblasten führt dies zur Fibrose; gleichzeitig werden extrazelluläre Matrixproteine (ECM) exprimiert und lagern sich ab. Im Kardiomyozyten kommt es zur Zellhypertrophie. Insgesamt führen all diese Prozesse zur Hypertrophie des gesamten Herzens und somit zu Funktionseinschränkungen.

#### 1.4 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexes Geflecht aus Makromolekülen, welches in menschlichen und tierischen Geweben den Raum zwischen den einzelnen Zellen ausfüllt. Als organisierter Raum sorgt sie für den Zusammenhalt von Zellen und Geweben, für deren mechanische Festigkeit und, über Zell-Zell-Verbindungen, für den Kontakt der Zellen untereinander. Sie beeinflusst maßgeblich den Wassergehalt von Geweben, dient als Zytokinreservoir und ist am Wundheilungsprozess beteiligt.

Dabei ist ihr Aufbau nicht immer gleich, sondern den Funktionsansprüchen des jeweiligen Gewebes angepasst.

#### 1.4.1 Die extrazellulären Matrixproteine

Bestandteile der extrazellulären Matrix sind zum einen Polysaccharide vom Glykosaminoglykan-Typ, die für gewöhnlich kovalent an Proteine gebunden sind (Proteoglykane), zum anderen faserförmige Proteine, die Struktur- und Bindungsfunktionen übernehmen. Daneben finden sich verschiedene Adhäsionsproteine, die vor allem für den Kontakt der Zellen mit dem Extrazellulärraum verantwortlich sind. Zu den in dieser Studie untersuchten faserförmigen Proteinen gehören Kollagen I und Elastin sowie die Glykoproteine Laminin und Fibronectin.

Kollagen I ist ein Hauptbestandteil von Haut und Knochen. Es besteht aus einer langen unbeweglichen Polypeptidkette mit Helicalstruktur ( $\alpha$ -Kette). Drei dieser  $\alpha$ -Ketten sind wiederum zu einer Superhelix (Tripelhelix), mit einem Durchmesser von 1,5 nm, umeinander gewunden. Als Kollagenfibrille bezeichnet man eine Zusammenlagerung mehrerer Superhelices; sie kann einen Durchmesser von 10-300 nm und eine Länge von mehreren 100  $\mu$ m erreichen. Kollagenfasern (2-20  $\mu$ m im Durchmesser) bestehen aus mehreren Kollagenfibrillen; sie verleihen dem Gewebe Zugfestigkeit, da sie so gut wie nicht dehnbar sind.

Elastin findet sich vor allem in Geweben, die einerseits stark, andererseits aber auch sehr elastisch sein müssen. Dies sind z.B. Haut, Blutgefäße und Lunge. Die Elastinfasern bilden netzartige Strukturen und sorgen nach einer Dehnung dafür, dass sich das Netz wieder zusammenzieht. Eingelagerte Kollagenfasern begrenzen bei einer Dehnung die Elastizität des Gewebes und verhindern somit ein Zerreißen. Daher ist ein organspezifisches optimales Elastin-Kollagen-Verhältnis unerlässlich für die ungestörte Funktion des entsprechenden Organs. Ein gestörtes, bzw. verändertes Elastin-Kollagen-Verhältnis beeinflusst also entscheidend die Funktion eines Organs und führt in der Regel zur Verschlechterung der Leistungsfähigkeit.

Laminine sind Glykoproteine, die sich v.a. in der Basallamina, einer spezialisierten Form der extrazellulären Matrix, finden. Die Basallamina ist eine Proteinschicht, die Oberflächenepithelien gegenüber dem Bindegewebe abgrenzt; sie umschließt aber

auch Muskelzellen und Nervenfasern. Sie besteht hauptsächlich aus den Proteinen Kollagen IV und Laminin.

Das Glykoprotein Fibronectin gehört zur Gruppe der Adhäsionsproteine. Seine Aufgabe besteht darin, den Kontakt zwischen Zelle und extrazellulärem Raum herzustellen.

## **1.5 Fragestellung dieser Arbeit**

Bei einer Herzinsuffizienz zeigen sich in Myozyten und im Myokard reduzierte eNOS-Expression und gesteigerte TGF- $\beta_1$ -Expression. Auffallend ist jedoch, dass weder eNOS-defizitäre Mäuse, noch TGF- $\beta_1$ -überexprimierende Mäuse einen Phänotyp entwickeln, der auf eine Kardiomyopathie schließen lässt.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob und inwieweit sich eine reduzierte eNOS-Expression, kombiniert mit einer gesteigerten TGF- $\beta_1$ -Expression auf die Ausbildung einer Herzinsuffizienz auswirken. Als Grundlage diente ein Mausmodell mit transgenen Tieren, bei denen ein eNOS-Defizit mit einer gesteigerten Freisetzung von aktivem TGF- $\beta_1$  aus Hepatozyten kombiniert wurde. Da die TGF- $\beta_1$ -Überexpression Y-chromosomal gebunden ist, wurde das Hauptaugenmerk auf die männlichen Nachkommen gerichtet (Zuchtansatz: siehe Abb. 1.4). Die weiblichen eNOS +/- und +/+, sowie die männlichen eNOS +/+ TGF- $\beta_1$  TG Tiere dienten als Kontrollgruppen.

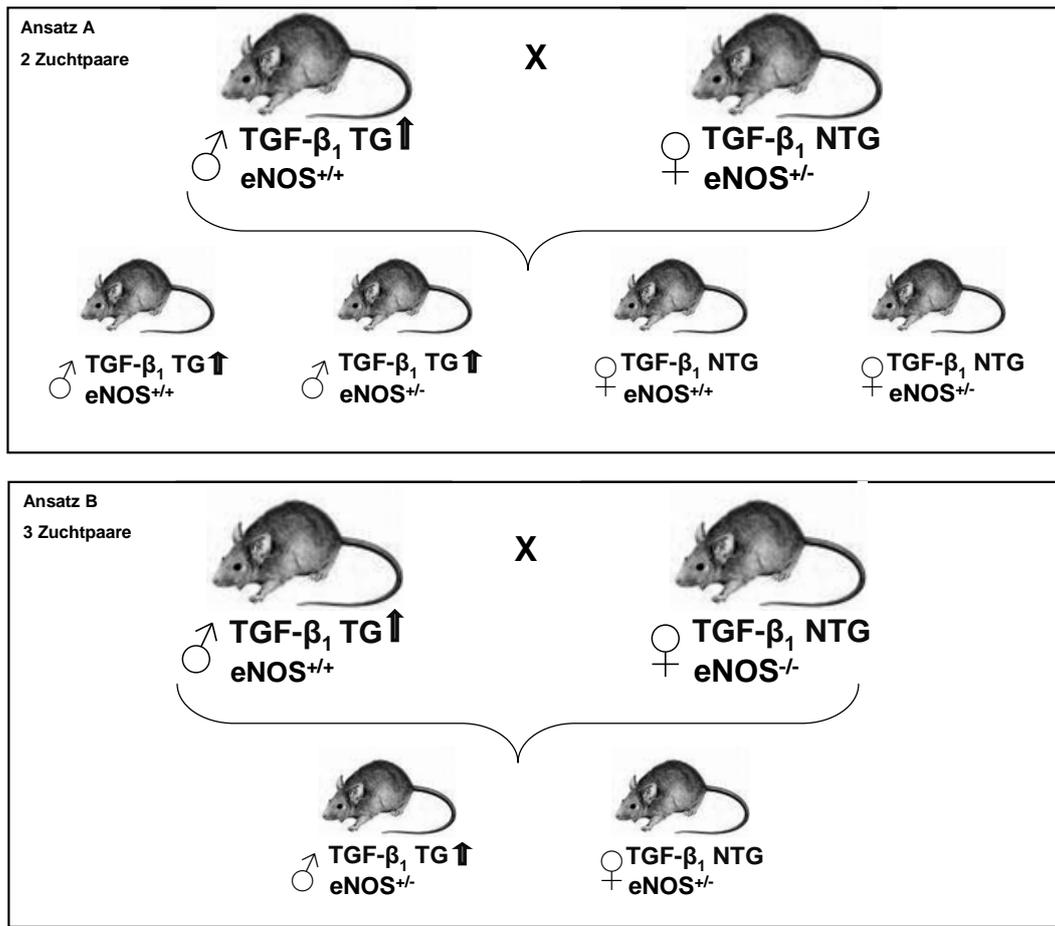


Abb. 1.4 Darstellung des Zuchtansatzes dieser Arbeit. Die Zuchtpaare unterschieden sich lediglich im eNOS-Status der Weibchen. Ausgangspunkt waren 2 Zuchtpaare (Ansatz A) mit heterozygoten eNOS-Weibchen (eNOS $^{+/-}$ ) und 3 Zuchtpaare (Ansatz B) mit homozygoten eNOS-knock-out Weibchen (eNOS $^{-/-}$ ). Die männlichen Tiere wiesen alle eine hepatozytäre Überexpression von aktivem TGF- $\beta_1$  auf (TGF- $\beta_1$  TG $\uparrow$ ); ihr eNOS-Status entspricht dem Wildtyp und wird als eNOS $^{+/+}$  bezeichnet. Da die TGF- $\beta_1$ -Überexpression Y-chromosomal gebunden ist, wiesen auch nur die männlichen Nachkommen diese Eigenschaft auf. Alle weiblichen Tiere hatten physiologische TGF- $\beta_1$ -Werte, sie werden im Folgenden als TGF- $\beta_1$ -NTG bzw. als TGF- $\beta_1$ -Wildtyp bezeichnet.

Der Gesundheitszustand der Tiere wurde über einen Zeitraum von 6 Monaten beobachtet und beurteilt. Anschließend wurden die Tiere getötet und Körper-, Herz-, Lungen- und Nierengewicht ermittelt. Des Weiteren wurde Blut zur Plasmagewinnung genommen. Anschließend wurden linker und rechter Ventrikel und Vorhof getrennt voneinander mittels PCR und Western Blot-Verfahren auf Gen- und Proteinexpression der Matrixproteine, sowie verschiedener Fibrose-, Apoptose und Hypertrophie-Marker untersucht. Genauso wurde mit Lunge und Niere verfahren.

In einem 2. Zuchtansatz wurde versucht, eine männliche  $TGF-\beta_1$  TG +  $eNOS^{-/-}$  Maus zu erhalten. Hierzu wurden männliche  $TGF-\beta_1$ -TG +  $eNOS^{+/-}$  -Tiere der  $F_1$ -Generation mit  $TGF-\beta_1$ -NTG +  $eNOS^{-/-}$  -Weibchen gekreuzt (siehe Abb. 1.5).

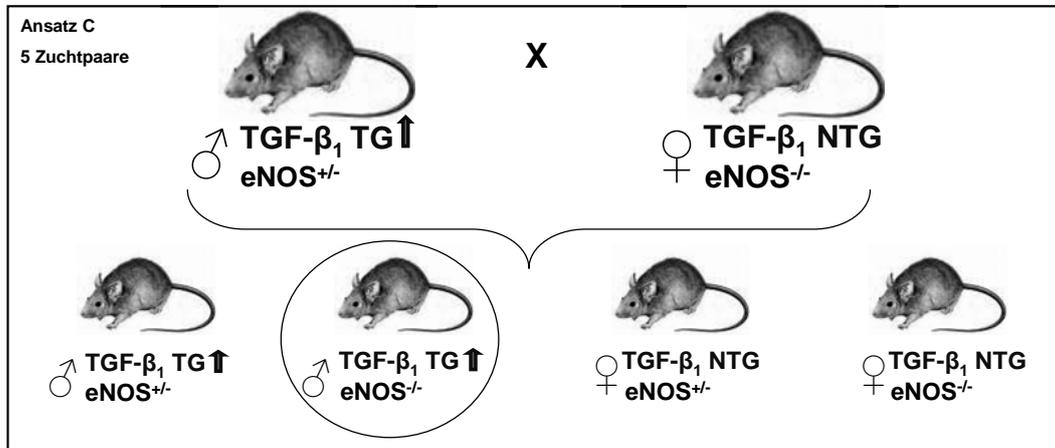


Abb. 1.5 Darstellung des 2. Zuchtansatzes. Männliche  $TGF-\beta_1$ -TG +  $eNOS^{+/-}$  -Tiere aus der  $F_1$ -Generation von Ansatz A oder B wurden mit weiblichen  $TGF-\beta_1$ -NTG +  $eNOS^{-/-}$  -Tieren gekreuzt. Ziel war eine männliche  $TGF-\beta_1$ -TG +  $eNOS^{-/-}$  Maus.

Mit dem hier gewählten Versuchsansatz wurde die Hypothese getestet, dass die Kombination von  $eNOS$ -Defizit und  $TGF-\beta_1$  Aktivierung das Schlüsselereignis für die Genese einer Herzinsuffizienz darstellt. Der Versuchsansatz erlaubte zudem, den Ort des Krankheitsgeschehens auf die Vitalorgane Herz (mit seinen Substrukturen Vorhof, rechter Ventrikel und linker Ventrikel) und Lunge sowie Niere zu lokalisieren.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	qbiogene, Heidelberg
6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat	Calbiochem, Schwalbach i.T.
Bisacrylamid	Merck, Darmstadt
Bovines Serum-Albumin	Sigma, Taufkirchen
100bp DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Cacodylsäure	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen <sup>®</sup>	Linde, Pullach
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Diethylaether	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
Dithiotreitol	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe

---

Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Roth, Karlsruhe
100bp Ladder	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Methanol	Roth, Karlsruhe
$\text{MgCl}_2$	Invitrogen, Karlsruhe
$\text{MgSO}_4$	
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker	GE Healthcare, Freiburg
$\text{NaHCO}_3$	Merck, Darmstadt
$\text{NaN}_3$	Merck, Darmstadt
Natrium-Chlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Dodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Nitro Blue Tetrazolium	Roche, Mannheim
Oligo-dt	Roche, Mannheim
Proteinase K	Applichem, Darmstadt
RNA-sin	Promega, Madison
5x RT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Spermidine	Sigma, Taufkirchen
SYBR <sup>®</sup> Green Supermix	BioRad, München
SYBR <sup>®</sup> Safe DNA Gel stain	Invitrogen, Karlsruhe
Temed	Serva, Heidelberg
TriFast <sup>®</sup> Reagenz	PEQLAB, Erlangen
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

Alle übrigen Salze und Chemikalien wurden in der jeweils höchsten Qualität bezogen und entsprechend den Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt. Die Anbieter waren Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Sigma (Taufkirchen) und Calbiochem (Bad Soden). Soweit nicht anders angegeben, wurde aqua bidest als Lösungsmittel für Lösungen, Medien und Puffer verwendet.

### 2.1.1 Antikörper

#### Primäre Antikörper:

Anti-Collagen, Type I, Fetal Mouse Skin	Calbiochem
Elastin (A-19):sc- 17580	Santa Cruz Biotechnology, INC.
Anti-Actin	Sigma, Taufkirchen
Serca2 (C-20); sc-8094	Santa Cruz Biotechnology, INC.
Bax	BD Biosciences, Heidelberg
Bcl-2 (N-19); sc-492	Santa Cruz Biotechnology, INC.

#### Sekundäre Antikörper

Donkey anti-goat gG-AP:sc-2022	Santa Cruz Biotechnology, INC.
Anti-Rabbit IgG	Sigma, Taufkirchen

### 2.1.2 Primer

Alle hier aufgeführten Primer wurden von der Firma Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe bezogen.

---

Actin	forward	5'-AGA GTG GGC AGA GAC AGC AAA-3'
	reverse	5'-ATG GAG AAG GAG CCC ATG C-3'
ANF	forward	5'-GGC TTC TTC CTC GTC TTG G-3'
	reverse	5'-GCT TCC TCA GTC TGC TCA C-3'
Bax	forward	5'-TAC AGG GTT TCA TCC AGG-3'
	reverse	5'-ATT GCT ATC CAG TTC ATC TC-3'
Bcl-2	forward	5'-TCG CAG AGA TGT CAA GTC-3'
	reverse	5'-CCC ACC GAA CTC AAA GAA G-3'
BNP	forward	5'-AGC CAG TCT CCA GAG CAA TTC-3'
	reverse	5'-TGC TGC CTT GAG ACC GAA G-3'
Collagen 1	forward	5'-TTC TCC TGG R AAA GAT GGT GC-3'
	reverse	5'-GGA CCA GCA TCA CCT TTA ACA-3'
Elastin	forward	5'-CTG CTG CTA AGG CTG CTA AG-3'
	reverse	5'-CCA CCA ACA CCA GGA ATG C-3'
Fibronectin	forward	5'-ACA GAG CTC AAC CTC CCT GA-3'
	reverse	5'-TGT GCT CTC CTG GTT CTC CT-3'
Laminin	forward	5'-GAG CCA GCA TCA CCT TTA ACA-3'
	reverse	5'-ATG TTC CTG GCC CTG TAG TG-3'
MMP-12	forward	5'-TGA TGC AGC TGT CTT TGA CC-3'
	reverse	5'-TGG GAA GTG TGT GGA AAT CA-3'
NCX 1	forward	5'-CTA CCA GGT CCT AAG TCA ACA G-3'
	reverse	5'-TGC GTG CCT CTT CAA GAT G-3'

ODC	forward	5'-GAA GAT GAG TCA AAT GAA CA-3'
	reverse	5'-AGT AGA TGT TTG GCC TCT GG-3'
PLB	forward	5'-CGA ATA CCT CAC TCG CTC GGC TAT C-3'
	reverse	5'-TGG AGA TTC TGA CGT GCT TGC TGA G-3'
Serca 2A	forward	5'-TGA CTG GTG ATG GTG TGA ATG-3'
	reverse	5'-GAT GAG GTA GCG GAT GAA CTG-3'
TGF- $\beta_1$	forward	5'-GTC CTT GCC CTC TAC AAC CA-3'
	reverse	5'-GTT GGA CAA CTG CTC CAC CT-3'

### Primer zur Genotypisierung (eNOS-Status) der Versuchstiere

IMR0094	5'-TGG CTA CCC GTG ATA TTG CT-3'
oIMR1823	5'-ATT TCC TGT CCC CTG CCT TC-3'
oIMR1824	5'-GGC CAG TCT CAG AGC CAT AC-3'

## 2.2 Geräte

### Allgemein verwendete Geräte

Anlage für deionisiertes Wasser	Millipore, Eschborn
Glasgeräte	Schott, Mainz
Magnetheizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schüttler	Biometra, Göttingen
Ultra-Turrax <sup>®</sup> (Ultra-Zerkleinerer)	IKA-Werke, Staufen
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Thermo Fischer, Langenselbold

Spezielle Geräte und GebrauchsgegenständeBlutdruckmessung

Messplattform	TSE-Systems, Bad Homburg
Steuereinheit	TSE-Systems, Bad Homburg
Auswertungsprogramm	TSE-Systems, Bad Homburg
Blutdruckmanschetten	TSE-Systems, Bad Homburg

Western Blot:

Hoefer-Elektrophoresekammer	GE Healthcare, Freiburg
Hoefer-Glasplatten	GE Healthcare, Freiburg
Hoefer-Plattenklemmen	GE Healthcare, Freiburg
Hoefer-Profilformer	GE Healthcare, Freiburg
Hoefer-Spacer	GE Healthcare, Freiburg
Immobilon P (PVDF-Membran)	Millipore, Eschborn
Netzgerät	Biometrische Analytik, Göttingen
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
Filterpapier	Biotec Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (50µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz

PCR:

Thermo Cycler	Techne, Wertheim-Bestenheid
iCycler	BioRad, München
Nano Drop <sup>®</sup> ND-1000	PEQLAB, Erlangen
Elektrophoresekammer	GE Healthcare, Freiburg

Creatinin-Bestimmung:

Creatinin Test; PAP, enzymatisch	E. Lehmann, Labor+Technik, Berlin
ELISA-Reader	Tecan GmbH, Crailsheim

### 2.3 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2,0 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
0, 2 ml Thermo-strip (tubes+cups)	ABgene <sup>®</sup> , Hamburg

### 2.4 EDV

Image Quant	Molecular Dynamics, Krefeld
Microsoft Excel 2002 <sup>®</sup>	Microsoft Corp., USA
Microsoft Word 2002 <sup>®</sup>	Microsoft Corp., USA
iCycler <sup>™</sup> iQ Optical System Software	BioRad, München
Nano Drop	PEQLAB, Erlangen
ELISA Reader	Tecan GmbH, Crailsheim
SPSS	SPSS Statistics 17.0

### 2.5 Versuchstiere

#### Mäuse

Als Ausgangspunkt für die Zucht wurden transgene Mäuse der Linie Nos3<sup>tm1Unc</sup> (weibliche Tiere) mit Alb/TGF- $\beta_1$  (männliche Tiere) gekreuzt (siehe 1.5).

Die Alb/TGF- $\beta_1$ -Mäuse tragen ein modifiziertes TGF- $\beta_1$ -Gen, welches eine Überexpression von TGF- $\beta_1$  in Hepatozyten induziert, wodurch diese Tiere einen erhöhten Plasma-TGF- $\beta_1$ -Spiegel im Vergleich zu Wildtypmäusen ausbilden. Das TGF- $\beta_1$ -Gen ist Y-Chromosomal gebunden, weswegen auch in den folgenden Generationen nur die Männchen einer TGF- $\beta_1$ -Überexpression unterliegen.

Bei den weiblichen Tieren handelt es sich um C57BL/6J-Mäuse, die eine Mutation des Gens der endothelialen NO-Synthase aufweisen. Diese Zuchtlinie wird als Nos3<sup>tm1Unc</sup> bezeichnet und wurde von „The Jackson Laboratory“ bezogen. Da beide Allele des eNOS-Gens ausgeschaltet wurden, werden diese Tiere im Folgenden als eNOS<sup>-/-</sup> bezeichnet.

Die 1. Nachkommengeneration ( $F_1$ ) dieser Zuchtpaare hat also folgenden genetischen Hintergrund: ♂  $eNOS^{+/-}$  TGF- $\beta_1$ -TG; ♀  $eNOS^{+/-}$  TGF- $\beta_1$ -NTG.

Zusätzlich wurden heterozygote  $eNOS^{+/-}$ -Weibchen mit TGF- $\beta_1$ -TG-Männchen gekreuzt um in der  $F_1$ -Generation  $eNOS^{+/+}$  + TGF- $\beta_1$ -TG oder NTG als Kontrolltiere zu erhalten.

Im Alter von 6 Monaten gingen die Tiere in den Versuch.

### 3. Methoden

#### 3.1 Einstufung der Tiere nach Distress-Score Schema

Um eine einheitliche Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere zu gewährleisten, wurden diese nach einem speziell entwickelten Distress-Score Schema eingestuft:

<b>Appearance</b>	
Normal	0
General lack of grooming, dull, yellowing coat	1
Coat staring, ocular/nasal discharge	2
Pinched features, dehydrated, pale eyes	3
<b>Bodyweight</b>	
Normal (stagnation is already a sign of illness)	1
Body wt. ↓ < 5%	2
Body wt. 5 – 10%	3
Body wt. 10 – 15%	4
<b>Clinical Signs</b>	
Normal respiratory rate and pattern	0
Slight changes, increased rate	1
Dyspnea, Tachypnea with abdominal breathing	2
Marked abdominal breathing with cyanosis	3
<b>Natural Behaviour</b>	
Normal	0
Minor changes	1
Less alert	2
Isolation or very still	3
<b>Provoked Behaviour</b>	
Normal	0
Minor depression or exaggerated response	1
Moderate change	2
Reacts on handling violently/ vocalisation or very still	3
<b>Score Adjustment</b>	
If scored 3 more than once score 1 point for each 3	
<b>Total</b>	

Tabelle 3.1 Distress score Schema zur Beurteilung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere. Modifiziert nach Lloyd und Wolfensohn (1999).

Ab einem Score von 5 Punkten zeigten die Tiere meist so deutliche Krankheitsanzeichen, dass sie getötet wurden um ihnen Leiden zu ersparen. Tiere, die unter der 5-Punkte-Grenze lagen wurden als gesund eingestuft.

### 3.2 Genotypisierung mittels Schwanzbiopsie bei der Maus

#### Gewinnung von genomischer DNA

Zur Ermittlung des eNOS-Genotyps wird eine Biopsie des Schwanzes (ca. 2mm der Schwanzspitze) entnommen und über Nacht bei 55°C in 400µl Mastermix verwahrt.

*Mastermix:*            375 µl Cutting buffer  
                              20 µl 20% SDS  
                              5 µl Proteinase K (20mg/ml)

*Cutting buffer:*    2,5 ml 1M Tris pH 7,5  
                              5,0 ml 0,5M EDTA pH 8,0  
                              1,0 ml 5M NaCl  
                              250 µl 1M DTT  
                              127 µl Spermidine (500mg/ml) → 63,5mg  
                              Auf 50 ml aqua bidest. Auffüllen

Nach Abzentrifugation der Haare (14.000 rpm, 2 Min. bei Raumtemperatur) wird der Überstand in 400 µl Isopropanol gegeben und zum Ausfällen der DNA geschwenkt. Durch erneute Zentrifugation (wie oben) entsteht ein sichtbares Pellet. Dieses wird, nach dekantieren des Isopropanols, mit 70% EtOH überschichtet und zentrifugiert (12.000 rpm., 10 Min. bei 4°C). Anschließend wird der Ethanol dekantiert und das Pellet luftgetrocknet. Durch abschließende Resuspension in 500 µl TE-Puffer erhält man genomische DNA. Diese DNA wird mittels PCR am Thermo-Cycler vervielfältigt.

*TE-Puffer:*            10mM Tris  
                              1mM EDTA  
                              pH 8,0

#### Polymerase-Ketten-Reaktion

*Reaktionsansatz:* 57,1 µl aqua bidest.  
*(für 10 Probe)*    12 µl 10xPCR Puffer (-MgCl)  
                              12 µl 25mM MgCl  
                              9,6 µl 2,5mM dNTP's  
                              9,0 µl Primermix (aus gleichen Teilen der Primer IMR0094,

oIMR1823, oIMR1824 in einer Verdünnung von 1:5 in a.b.)

0,3 µl Taq

Zu 10 µl des genannten Reaktionsansatzes werden je 2 µl der genomischen DNA gegeben. Zusätzlich wird eine Leerkontrolle (10 µl Reaktionsansatz + 2 µl Aqua bidest) pipettiert. Diese zeigt im nachfolgenden Agarose-Gel an, ob die entstandenen Banden echte DNA-Amplifikate oder bloße Primerdimere sind. Die PCR wird daraufhin am Thermo-Cycler mit folgenden Parametern durchgeführt:

Zyklus 1 (1x)	Step 1	94°C für 3 Minuten
Zyklus 2 (35x)	Step 1	94°C für 35 Sekunden
	Step 2	65°C für 1 Minute
	Step 3	72°C für 1 Minute
Zyklus 3 (1x)	Step 1	72°C für 2 Minuten

Abschließend werden die Proben auf 10°C heruntergekühlt und im folgenden Schritt in einem 1,5%igen Agarose-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente

Zur Herstellung des Gels werden 1,1g Agarose in 75ml kochendem 1xTAE-Puffer gelöst und mit 3,75 µl SYBR® Safe versetzt. Das Gel-Gemisch wird in eine Plastikwanne gegossen und zur Aussparung der Geldaschen werden Plastikämme eingesetzt. Nach dem Aushärten werden die Ämme entfernt und das Gel in eine Elektrophorese-Kammer mit 1xTAE-Gelpuffer überführt. In die 1. Tasche werden 10µl 100bp-Marker pipettiert, in die übrigen Taschen folgen je 10 µl der Proben, welche zuvor mit 2 µl eines Auftragspuffers gemischt wurden.

*Auftragspuffer:* 1 ml 10xTAE  
0,5 ml Glycerin  
1/10 Spatelspitze BPB

*100bp-Marker:* 5 µl 100bp DNA Ladder  
10 µl Auftragspuffer  
58 µl 1xTAE

50xTAE-Puffer    242 g Tris  
                      57,1 ml Eisessig  
                      100 ml EDTA 0,5 M  
                      auf 1 Liter mit Aqua bidest auffüllen

Die Elektrophorese wird bei ca. 96 Volt für 1 Stunde durchgeführt, anschließend werden die DNA-Fragmente im UV-Licht bei 366 nm sichtbar gemacht. Bei Tieren, die das eNOS-Wildtyp-Gen ( $+/+$ ) tragen, entsteht ein DNA-Fragment von 442 Basenpaaren, heterozygote eNOS  $+/-$  Tiere erzeugen zwei Fragmente bei 442 und 500 Basenpaaren, homozygote eNOS  $-/-$  werden durch ein Fragment von 500 Basenpaaren charakterisiert.

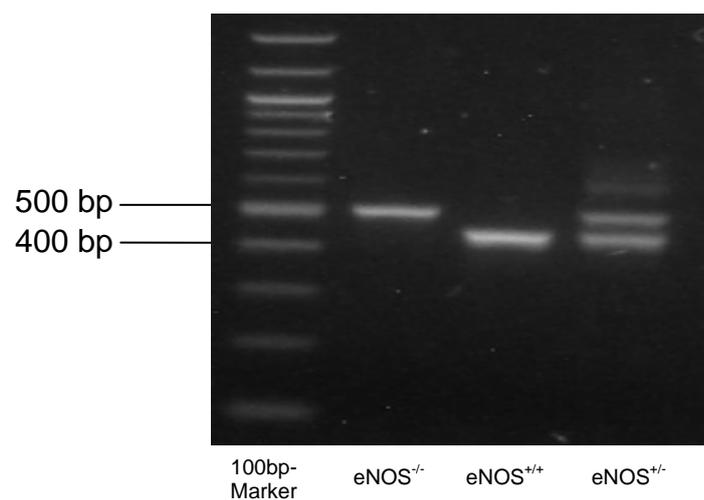


Abb. 3.1 Ausschnitt aus einem Agarose-Gel. Der Bandenmarker ist ein 100 bp-Marker. Dargestellt sind die Banden der DNA-Amplifikate für die Genotypen eNOS<sup>-/-</sup> (Bande bei 500 bp), eNOS<sup>+/+</sup> (Bande bei 442 bp) und eNOS<sup>+/-</sup> (Bande bei 442 und 500 bp). Nicht dargestellt ist die Leerkontrolle, da hier keine Bande entstanden ist. Die Leerkontrolle diente der Überprüfung, ob die entstandenen Banden echte DNA-Amplifikate oder bloße Primerdimere waren.

### 3.3 Blutdruckmessung bei der Maus

Für die Blutdruckmessung wird das entsprechende Tier in einen speziellen Messkäfig verbracht. Dieser Käfig befindet sich auf einer Plattform, die auf eine Temperatur von 35°C erwärmt wird (optimale Temperatur für die Blutdruckmessung durch Dilatation der Arterie). Die Messung an sich erfolgt Non-invasiv am wachen Tier mittels Tailcuff-Methode an der Arteria caudalis und ist völlig schmerzfrei. Nach der Fixation des Tieres in dem größenverstellbaren Käfig wird eine Blutdruckmanschette über den Schwanz bis hin zum Schwanzansatz geschoben. Der Schwanz wird nun über einen Sensor (Infrarot-Leuchtdiodenkombination) gelegt, der in vertikaler Richtung die Pulsation der Arteria caudalis misst. Die durch Blutdruckschwankungen verursachten Änderungen im Durchmesser der Arterie führen zu einer veränderten Lichtdurchlässigkeit, die vom Sensor registriert und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Das Schwanzende wird mittels Leukoplast<sup>®</sup> fixiert um bewegungsbedingte Messstörungen zu vermeiden.

Die komplette Messanlage ist mit einem Steuerteil verbunden, der einen Druckgenerator enthält und den Druck der Blutdruckmanschette steuert. Die Manschette wird zur Messung schrittweise aufgeblasen. Durch die kontinuierliche Druckerhöhung wird die Schwanzarterie nach und nach abgeklemmt (arterielle Okklusion). Dadurch wird der Blutfluss verringert. Die Amplitude des Pulssignals wird dabei kontinuierlich kleiner. Ist die Arterie verschlossen, so erkennt der Pulssensor keine Pulsation mehr: der zugehörige Druck wird als systolischer Blutdruck (Sys) registriert. Anschließend wird der Druck in der Manschette wieder abgelassen. Insgesamt werden so pro Durchgang 4 Messungen gemacht. Für jedes Tier wurden 3 Messreihen mit je 4 Messungen durchgeführt, wodurch am Ende 12 einzelne Blutdruckdaten pro Tier feststanden, aus denen dann der Mittelwert gebildet wurde.

Mit einem speziellen Programm (TSE-Systems) werden die Daten kontinuierlich auf dem Computer angezeigt und gespeichert. Neben dem systolischen Druck wird auch die Herzfrequenz ermittelt (sie wird vom Programm durch Mittelwertbildung aus dem Pulssignal errechnet).

Als Normwert für C57BL/6-Mäuse gilt ein Blutdruck von 122 – 127 mmHg (Nguyen, 2008).

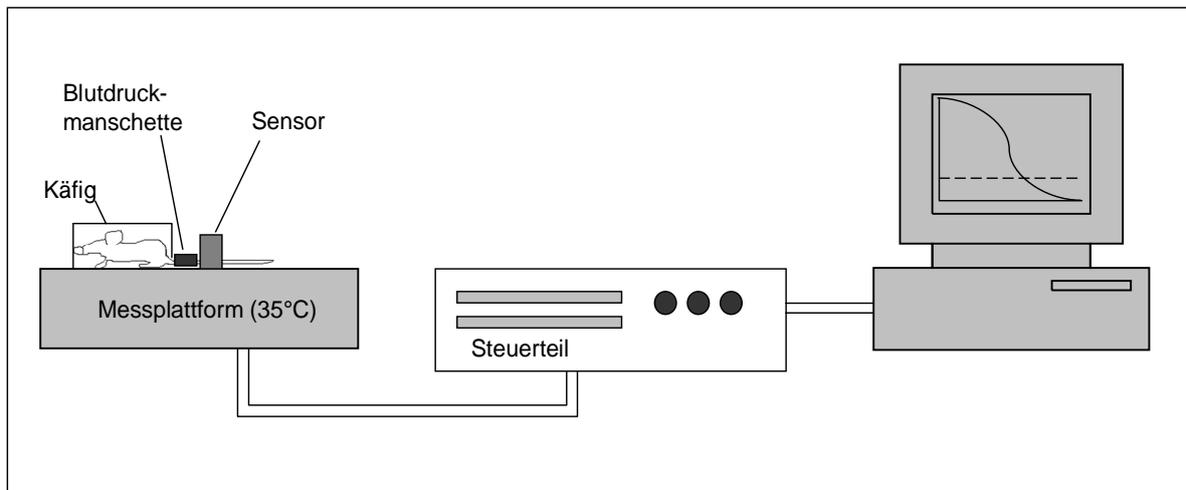


Abb. 3.2 Schematische Darstellung der Anlage zur Blutdruckmessung bei der Maus. Das zu untersuchende Tier befindet sich in einem Käfig auf einer speziellen Messplattform, die auf eine Temperatur von 35°C erwärmt wird. Um den Schwanz wird an dessen Ansatz eine Blutdruckmanschette gelegt und der restliche Schwanz über einen Sensor gelegt und fixiert. Ein Druckgenerator im Steuerteil pumpt die Blutdruckmanschette auf. Der Druck-Wert, ab dem der Sensor keine Pulsation der Schwanzarterie mehr registriert ist der systolische Blutdruck des Tieres. Die Daten werden an den Computer übermittelt und dort graphisch dargestellt.

### 3.4 Real-time PCR am icycler®

#### 3.4.1 RNA-Isolierung aus Mäuseherzen

##### 3.4.1.1 Präparation der Mäuseherzen

Um eine Aussage darüber zu treffen, ob und inwiefern ein vorhandenes Gen der Transkription unterliegt, muss die in den Zellen vorkommende RNA untersucht werden.

Für die RNA-Isolierung wurden die unter 2.5 beschriebenen Tiere im Alter von 6 Monaten verwendet. Die Tiere werden mit Diethylether betäubt und mittels Genickbruch getötet. Der Thorax wird eröffnet, das Herz entnommen und an einer Langendorff-Perfusionsanlage blutfrei perfundiert. Im Anschluß werden die Vorhöfe

und der rechte Ventrikel vom linken Ventrikel abpräpariert; das Septum wird am linken Ventrikel belassen. Die Vorhöfe und die Ventrikel werden getrennt erst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Zusätzlich zu den Herzen werden auch die Lunge und die Nieren für spätere Weiterbehandlung weggefroren.

#### 3.4.1.2 Gewinnung von RNA aus Mäuseherzen

Die gefrorenen Ventrikel und Vorhöfe werden in je 1 ml TriFast<sup>®</sup> Reagenz gegeben und am Ultra-Turrax<sup>®</sup> homogenisiert. Die so gewonnene Zellsuspension wird je in ein Eppendorf-Gefäß überführt, mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform überschichtet und für mehrere Sekunden am Vortexer vermischt, bis eine milchige Trübung eintritt. Bei der anschließenden Zentrifugation (12.500 rpm; 15 Min.; bei  $4^{\circ}\text{C}$ ) trennt sich das Gemisch in 3 Phasen auf, wobei die obere klare Phase die RNA enthält. Sie wird abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben, wo sie im Verhältnis 1:1 mit Isopropanol vermischt wird. Die verbleibenden 2 Phasen enthalten Proteine (mittlere) und DNA (untere); sie werden verworfen. Das Isopropanol-RNA-Gemisch wird über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Hierbei fällt die RNA aus und kann am nächsten Tag in einer erneuten Zentrifugation (12.500 rpm; 15 Min.; bei  $4^{\circ}\text{C}$ ) als Pellet gewonnen werden. Der Überstand wird dekantiert und das im Eppendorf-Gefäß verbleibende Pellet wird mit 1 ml 70% Ethanol zentrifugiert (12.000 rpm; 15 Min.; bei  $4^{\circ}\text{C}$ ) und somit gewaschen. Nach denkantieren des Ethanols wird das Pellet luftgetrocknet und abschließend in 20  $\mu\text{l}$  aqua bidest. gelöst.

#### 3.4.2 **Bestimmung der RNA-Konzentration**

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wird das Gerät Nano Drop<sup>®</sup> ND-1000 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein UV/Vis-Spektralphotometer, mit dem RNA-, DNA- und Protein-Konzentrationen schnell und sehr genau ermittelt werden können. Der Messbereich für RNA liegt zwischen 1,5 – 3.000 ng/ $\mu\text{l}$ . Das RNA-Pellet muß sich hierfür vollständig in aqua bidest. gelöst haben. Aus der Probenlösung werden 2  $\mu\text{l}$  auf den Sensor des Nano-Drop pipettiert und die Messung unverzüglich gestartet. Die Werte werden in ng/ $\mu\text{l}$  angegeben und sollten für die Weiterbearbeitung optimalerweise zwischen 200 und 1000 ng/ $\mu\text{l}$  liegen. Ist ein Wert

>1000, so wird der Probe nach und nach soviel aqua bidest. zugegeben bis der Wert im Optimalbereich liegt.

### 3.4.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

In dieser Studie wurde die Transkription bestimmter Gene untersucht, weswegen RNA aus den Zellen isoliert wurde. Da es jedoch für die Polymerase-Kettenreaktion keine spezifischen RNA-Polymerasen gibt, musste die isolierte RNA zunächst wieder in DNA (sog. copy-DNA) umgeschrieben werden.

Dazu wird von jeder Probe eine Menge von 1 µg RNA/µl benötigt. Da i.d.R. alle Proben unterschiedliche Konzentrationen an RNA enthalten, wird mit folgender Formel die Menge an Probenlösung errechnet, die entnommen werden muß um auf die oben genannte Konzentration zu kommen:

$$1000 / \text{Wert aus Nano Drop in ng/}\mu\text{l} = \text{Menge an zu entnehmender RNA-Lösung}$$

Die entsprechende Menge RNA wird entnommen und auf 5 µl mit aqua bidest. aufgefüllt. Die Proben werden in den Thermocycler verbracht und dort für 15 Minuten bei 60°C erhitzt. Dieser Schritt dient dem Denaturieren der RNA, damit die im cDNA-Mix enthaltene Reverse Transkriptase sich optimal an die RNA anlagern kann.

<i>cDNA-Mix</i>	5x RT-Puffer	2,0 µl
<i>(Angaben</i>	Oligo-dt	1,0 µl (0,1 mg/ml)
<i>für 1 Probe)</i>	dNTP's	1,0 µl (10 mmol/l je Nukleotid)
	DTT	0,5 µl (0,1 mol/l)
	RNAsin	0,2 µl (25 U/µl)
	M-MLV-RT	0,3 µl (200 U/µl)

Die Proben werden mit je 5 µl cDNA-Mix versetzt und erneut in den Thermocycler verbracht. Die reverse Transkription erfolgt bei 37°C in 1 Stunde. Abschließend werden die Proben für 5 Minuten bei 95°C erhitzt um die entstandene cDNA zu denaturieren und die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die Proben können direkt weiterverwendet oder für spätere Verwendung bei -20°C tiefgefroren werden.

### 3.4.4 Real-time Polymerase Kettenreaktion (Real-time PCR)

Für die Real-time PCR werden die cDNA-Proben im Verhältnis 1:10 mit aqua bidest. verdünnt. Von dieser Verdünnung werden 3 µl in spezielle PCR-tubes pipettiert und mit 17 µl eines PCR-Reaktionsansatzes versetzt. Für jede Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Laufkontrolle dient eine Doppelbestimmung mit reinem PCR-Reaktionsmix.

<i>PCR-Reaktions-</i>	SYBR® Green Supermix	10,0 µl
<i>Ansatz</i>	aqua bidest.	6,4 µl
	Primer fw+rev (1:10)	0,6 µl

Der SYBR® Green Supermix enthält bereits alle wichtigen Ingredienzien in den benötigten Konzentrationen. Somit wird eventuellen Pipettierfehlern bei kleinsten Mengen und Kontaminationen vorgebeugt. Zudem enthält er einen Farbstoff, der eine Fluoreszenz emittiert sobald er an doppelsträngige DNA bindet. Hierdurch kann nach jedem Zyklus die Menge an vorhandener DNA anhand der Stärke der Emission bestimmt werden. Die Primer werden nach Herstellerangaben getrennt für forward und reverse in aqua bidest. gelöst, im Verhältnis 1:1 gemischt und auf 1:10 mit aqua bidest. verdünnt.

Die mit Reaktionsansatz versetzten Proben werden in den iCycler verbracht und die PCR wird mit dem jeweils primer-spezifischen Protokoll gestartet.

Zyklus 1 ( 1x)	Step 1	95°C für 15 Minuten
Zyklus 2 ( 45x)	Step 1 (Denaturierung)	95°C für 30 Sekunden
	Step 2 (Annealing)	X°C für 30 Sekunden
	Step 3 (Amplifikation)	72°C für 30 Sekunden
Zyklus 3 ( 100x)	Step 1	50°C für 10 Sekunden
	(Temperatursteigerung in 0,5°C-Schritten bis 100°C)	

Für jeden Primer wird in diesem Basisprotokoll die für ihn optimale Annealing-Temperatur eingestellt.

Im 1. Zyklus wird das Proben-Reaktionsansatz-Gemisch auf 95°C erhitzt um die im Supermix enthaltene „Hot-Start“-Polymerase zu aktivieren. Zudem denaturiert bei dieser Temperatur die DNA, so dass die beiden DNA-Stränge getrennt voneinander vorliegen. Während des Annealing binden die Primer an den jeweils komplementären Strang der DNA. Bei 72°C erfolgt nun die Neusynthese des zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnitts durch die im Supermix enthaltene DNA-Polymerase mit den ebenfalls enthaltenen Desoxyribonukleotiden. Demnach verdoppelt sich in jedem PCR-Zyklus die Menge der spezifisch gesuchten DNA wodurch die Gesamtmenge der DNA exponentiell zunimmt.

### **3.4.5 Auswertung**

Die hier beschriebene Real-time PCR erlaubt eine semiquantitative Aussage über die Expression der untersuchten Gene in den Herzmuskelzellen der Versuchstiere. Eine Aussage über die absolute RNA-Menge in den Zellen kann hierbei nicht getroffen werden. Die ermittelten Ct-Werte der einzelnen Gene werden im Verhältnis zu einem Referenz-Gen, hier dem Aktin, betrachtet. Das Referenz-Gen unterliegt dabei keiner Regulierung im Hinblick auf die Versuchsbedingungen.

### 3.5 Western Blot

#### 3.5.1 Präparation der Mäuseherzen

Vor der Präparation der Herzen wird die Langendorff-Perfusionsanlage mit aqua bidest gespült und anschließend luftblasenfrei mit Powell-Medium befüllt. Das Medium wird für die Dauer des Versuches auf 37°C temperiert und mit Carbogen<sup>®</sup> begast, um einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu halten.

<i>Powell-Medium:</i>	NaCl	110	mmol/l
	NaHCO <sub>3</sub>	25	mmol/l
	Glucose	11	mmol/l
	KCl	2,6	mmol/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	mmol/l
	Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1,2	mmol/l

Die Tiere werden durch eine Diethylether-Narkose in tiefe Bewusstlosigkeit versetzt und mittels Genickbruch getötet. Nach Eröffnen des Thorax werden Herz und Lunge im gesamten entnommen und in ca. 4°C kalte Kochsalz-Lösung überführt. Das Herz wird freipräpariert und über die Aorta ascendens mittels einer Perfusionskanüle an die Langendorff-Apparatur angeschlossen. Durch eine erste Spülung mit Powell-Medium wird das Restblut aus dem Herzen entfernt.

#### 3.5.2 Proteingewinnung aus Mäuse-Kardiomyozyten

Im Anschluß werden die Vorhöfe und der rechte Ventrikel vom linken Ventrikel abpräpariert; das Septum wird am linken Ventrikel belassen. Die Proteinexpression von rechtem und linkem Ventrikel, sowie vom Vorhof wird in separaten Versuchsreihen ermittelt. Ebenso wird mit Lunge und Niere verfahren.

Zur Proteingewinnung wird das jeweilige Organ mit einem Lysat-Puffer versetzt und am Ultra-Turrax<sup>®</sup> homogenisiert.

<i>Lysat-Puffer</i>	Cacodylsäure	10 mM
	NaCl	150 mM
	CaCl <sub>2</sub>	20 mM
	NaN <sub>3</sub>	1,5 mM
	ZnCl <sub>2</sub>	1 µM
	Triton x 100	0,01 %
	pH 5,0	

Anschließend wird die Zellsuspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 4°C und 1.200 rcf für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und in einem Verhältnis von pro 100 µl Überstand mit je 20 µl Lämmli-Puffer versetzt.

<i>Lämmli-Puffer</i>	SDS	0,2 g
	Dithiotreitol	0,154 g
	Glycerin (100%)	2 ml
	BPB	0,2 ml
	Tris	0,5 M
	Aqua bidest.	1,8 ml
	pH 6,8	

Die Proben werden nun bei 95°C für 5 Minuten erhitzt.

Auf die gleiche Weise wurden Proteine aus Lungen- und Nieren-Proben gewonnen.

### 3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Sie dient dazu, Proteine anhand ihrer Größe im elektrischen Feld aufzutrennen.

Das hierfür benötigte Polyacrylamid-Trenngel wird zwischen zwei durch Spacer getrennte Glasplatten, welche aufrecht in einen Ständer gespannt werden, gegossen und mit Aqua bidest. überschichtet. Durch den so entstehenden Luftausschluß polymerisiert das Gel innerhalb einer Stunde aus. Nach entfernen des Aqua bidest. wird das Trenngel mit einem Polyacrylamid-Sammegel überschichtet, in welches

Profilformer eingesetzt werden. Diese werden nach ca. 20 Minuten entfernt und die Proben werden in die entstandenen Taschen gefüllt.

Je nach Größe der gesuchten Proteine wird ein Trenngel in 7,5- oder 12,5 %iger Konzentration gegossen. Die folgenden Angaben beziehen sich jeweils auf die Menge für ein Gel.

		<u>7,5%</u>	<u>12,5%</u>	<u>15%</u>	
<i>Trenngel</i>	AA/BA (30:1)	5,25	8,75	15	ml
	Trenngelpuffer	4,75	4,75	7,5	ml
	Aqua bidest	9,55	6,0	7,5	ml
	APS 10 % (wt/vol)	200	200	300	µl
	TEMED	15	15	25	µl
	SDS 10 % (wt/vol)	200	200	200	µl
<i>Trenngelpuffer</i>	Tris/HCl	1,5 mol/l			
	pH 8,6				
<i>Sammelgel</i>	AA/BA (30:1)	1,2 ml			
	Sammelgelpuffer	2,5 ml			
	Aqua bidest	6,4 ml			
	APS 10 % (wt/vol)	100 µl			
	TEMED	12 µl			
	SDS 10 % (wt/vol)	50 µl			
<i>Sammelgelpuffer</i>	Tris/HCl	0,5 mol/l			
	pH 6,8				

Um das Molekulargewicht der Proben bestimmen zu können wird ein Molekulargewichtsmarker (von 10 kDa bis 250 kDa) in eine der Taschen pipettiert. Die mit Proben und Marker beladenen Platten werden in eine Elektrophoresekammer eingehängt, welche mit Laufpuffer befüllt ist. Bei einer Spannung von 200 V findet in 2 bis 5 Stunden (je nach Proteingröße) die Gelelektrophorese statt.

<i>Laufpuffer</i>	Glycin	1,44 % (wt/vol)
	Tris/HCl	0,3 % (wt/vol)
	SDS	0,1 % (wt/vol)

### 3.5.4 Western Blot Verfahren

Im Anschluß an die SDS-PAGE werden die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamid-Gel mittels des „Semi Dry Blotting-Verfahrens“ (nach Khyse-Andersen, 1984) auf eine Polyvinyliden-Difluorid Membran (PVDF) übertragen. Hierfür werden je drei Filterpapiere, getränkt mit konzentriertem Anodenpuffer (C) und mit Anodenpuffer (B) luftblasenfrei in eine Blotkammer geschichtet. Darauf werden die in 100%igem Methanol getränkte PVDF-Membran und das Polyacrylamid-Gel gelegt und abschließend mit drei Filterpapieren mit Kathodenpuffer (A) belegt. Der Boden der Blotkammer dient als Anode, der Deckel als Kathode. Bei einer konstanten Spannung von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  werden in 2-4 Stunden (je nach Größe) die Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf die PVDF-Membran transferiert.

<i>Konzentrierter</i>	Tris/HCl	300 mmol/l
<i>Anodenpuffer</i> (C)	Methanol	20 % (vol/vol)
	pH 10,4	
<i>Anodenpuffer</i> (B)	Tris/HCl	30 mmol/l
	Methanol	20 % (vol/vol)
	pH 10,4	
<i>Kathodenpuffer</i> (A)	Tris/HCl	25 mmol/l
	6-Aminohexansäure	40 mmol/l
	Methanol	20 % (vol/vol)
	pH 9,4	

### 3.5.5 Immunologischer Proteinnachweis

Im Anschluß an den elektrophoretischen Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran, werden die gesuchten Proteine mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht. Zuerst werden hierbei die noch verbleibenden freien Bindungsstellen auf der PVDF-Membran durch Zugabe von 1xTBS, mit 3% BSA versetzt, abgesättigt. Die später zugegebenen Antikörper erkennen das BSA nicht als Protein und gehen keine Bindung mit ihm ein. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für 1 Stunde auf dem Schüttler.

10x TBS-Puffer	Tris/HCl	10 mmol/l
	NaCl	150 mmol/l
	pH 7,4	

Danach wird die Membran 2x für je 5 Minuten in 1xTBS gewaschen und anschließend mit dem 1. Antikörper inkubiert. Dieser 1. Antikörper reagiert spezifisch mit dem zu ihm gehörenden Antigen auf der Membran und geht mit diesem einen Antigen-Antikörper-Komplex ein. Nach 2-stündiger Inkubation wird der 1. Antikörper entfernt und die Membran mit 1x TBS, versetzt mit 0,1 % (vol/vol) Triton X-100, für 5 Minuten gewaschen um restliche ungebundene Antikörper zu entfernen. Es folgt eine 1-stündige Inkubation mit dem 2. Antikörper. Dieser 2. Antikörper ist mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt; er erkennt den 1. Antikörper und bindet an ihn.

<i>Antikörperlösung</i>	Tris/HCl	50 mmol/l
	NaCl	150 mmol/l
	Tween 20	0,05 % (vol/vol)
	BSA	2 % (wt/vol)
	pH 7,4	

Auch im Anschluß an diese Inkubation wird mit 1x TBS, versetzt mit 0,5 % (vol/vol) Triton X-100, gewaschen um Reste ungebundenen Antikörpers zu entfernen. Hierauf wird die Membran für 10 Minuten in AP- Puffer verbracht um sie zu äquilibrieren.

---

<i>AP-Puffer</i>	Tris/HCl	100 mmol/l
	MgCl <sub>2</sub>	5 mmol/l
	NaCl	10 mmol/l
	pH 9,5	

Letztendlich werden die gesuchten Proteinbanden auf der Membran durch Zugabe einer Entwicklerlösung sichtbar gemacht. Die an den 2. Antikörper gebundene Alkalische Phosphatase dephosphoryliert das in der Entwicklerlösung enthaltene 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) und reduziert gleichzeitig das ebenfalls enthaltene Nitro Blue Tetrazolium (NBT). Hierdurch entsteht ein schwer lösliches blau-violettes Präzipitat, welches den Antigen-Antikörper-Komplex, und somit die gesuchte Proteinbande, sichtbar macht.

<i>Entwicklerlösung</i>	AP-Puffer	50 ml
	NBT	15 mg
	BCIP	7 mg

Der Entwicklungsprozess findet unter Lichtausschluss statt und wird bei eindeutigem Sichtbarwerden der Banden durch Abspülen der Membran mit aqua bidest. unterbrochen.

### 3.5.6 Auswertung

Die vollständig getrockneten Membranen werden eingescannt, die Signalstärke der einzelnen Proteinbanden densitometrisch erfasst und im Programm Image Quant<sup>®</sup> quantitativ ausgewertet. Als Referenzprotein wurde das in der jeweiligen Probe enthaltene Aktin verwendet.

### 3.6 Bestimmung der Creatinin-Konzentration aus Mäuseplasma

Creatinin entsteht endogen im Muskelstoffwechsel aus Creatin und Creatinphosphat. Es wird bei normaler Nierenfunktion durch glomeruläre Filtration ausgeschieden. Creatininbestimmungen werden zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Nierenerkrankungen durchgeführt.

#### Methode

In dieser Studie wurde ein enzymatischer Fertig-Test (Firma: Labor + Technik) verwendet, um den Creatinin-Gehalt im Plasma der Versuchstiere zu bestimmen. In diesem Test reagiert Creatinin in mehreren Schritten unter Zugabe von Creatininase, Creatinase und Sarcosinoxidase zu Wasserstoffperoxid. Dieses bildet im letzten Reaktionsschritt mit 4-Aminoantipyrin und ADPS (N-Ethyl-N-(3-sulphopropyl)-3-methoxyanilin) einen roten Chinonimin-Farbstoff. Dieser kann dann photometrisch mittels eines ELISA-Readers bestimmt werden.

#### Durchführung

Das Blut wurde von den in 3.4.1 und 3.5.1 beschriebenen Tieren gewonnen und durch Zugabe von Heparin ungerinnbar gemacht. Anschließend wurde es bei 14.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert und der klare Überstand in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

Die Reagenzlösungen 1 und 2 werden anhand der Anleitung des Fertig-Tests hergestellt. Die Standardlösung enthält 2,00 mg/dl (177 µmol/l) Creatinin.

<i>Lösung 1:</i>	Phosphatpuffer	100 mmol/l (pH 8,0)
	ADPS	1 mmol/l
	Creatinase	20 kU/l
	Sarcosinoxidase	10 kU/l
	Peroxidase	20 kU/l
	Ascorbatoxidase	5 kU/l
	Kaliumhexacyanoferrat	10 µmol/l

<i>Lösung 2:</i>	Phosphatpuffer	100 mmol/l (pH 8,0)
	ADPS	1 mmol/l
	4-Aminoantipyrin	0,2 mmol/l
	Creatininase	60 kU/l

Reagenzlösungen und Proben werden bei Raumtemperatur wie im Folgenden beschrieben in die Messküvetten pipettiert:

1. Position	Leerwert	200 µl Lösung 1
2. Position	Standard	200 µl Lösung 1 + 10 µl Standardlösung
Restl. Positionen	Analyse	200 µl Lösung 1 + 10 µl Plasma-Probe

Die Lösungen und Proben werden durch schütteln gut gemischt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wird in jede Küvette 40 µl der Lösung 2 pipettiert, gemischt und weiter bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubiert. Nach diesen 2 Minuten wird die Extinktion  $E_1$  abgelesen und exakt nach weiteren 2 Minuten die Extinktion  $E_2$ .

### Berechnung

$$\Delta E = E_2 - E_1$$

$$\text{Serum-Creatinin} = \text{Standardkonzentration} \times (\Delta E) \text{ Analyse} / (\Delta E) \text{ Standard}$$

### Berechnung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)

*Formel:*

$$\text{GFR} = 186 \times [\text{Creatinin}_{\text{Serum}}]^{-1,154} \times [\text{Alter}_{\text{in Jahren}}]^{-0,203} / \text{Gewicht}_{\text{in Gramm}}$$

(für weibliche Tiere zusätzlich noch  $\times 0,742$ )

(Modifiziert nach MDRD [= Modification of Diet in Renal Disease] nach Levey et al., 2003)

### **3.7 Computerprogramme und Statistik**

PCR: Bio-Rad iQ5™ Optical System Software Version 2.0

Western Blot: MD Image Quant Software Version 3.3

Creatinin Konzentration: Tecan Magellan6 Version 6.5 und Tecan i-Control 1.4

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung vom Mittelwert (SD) aus n verschiedenen Tiergruppen dargestellt (siehe 4.1.3). Die Daten wurden durch eine ANOVA (One-Way Analysis of Variance) mit nachfolgendem Student-T-Test analysiert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle Datenanalysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Darstellung der Zuchtergebnisse

Von den oben beschriebenen Tiere wurden insgesamt 5 Zuchtpaare gebildet; die männlichen Tiere wiesen alle eine Y-chromosomal gebundene Überexpression von hepatozytärem TGF- $\beta_1$  auf, von den weiblichen Tieren hatten 2 ein inkomplettes eNOS-Defizit (+/-) (Ansatz A) und 3 ein vollständiges eNOS-Defizit (-/-) (Ansatz B) (siehe 1.5). Insgesamt wurden 84 Tiere geboren und lebend von den Muttertieren abgesetzt. Von diesen 84 Tieren starben jedoch 10 kurz nach dem absetzen (siehe Grafik). Die übrigen 74 Tiere dienten der Erhebung aller nachfolgenden Daten.

#### 4.1.1 Nachkommen der Zuchtansätze A und B

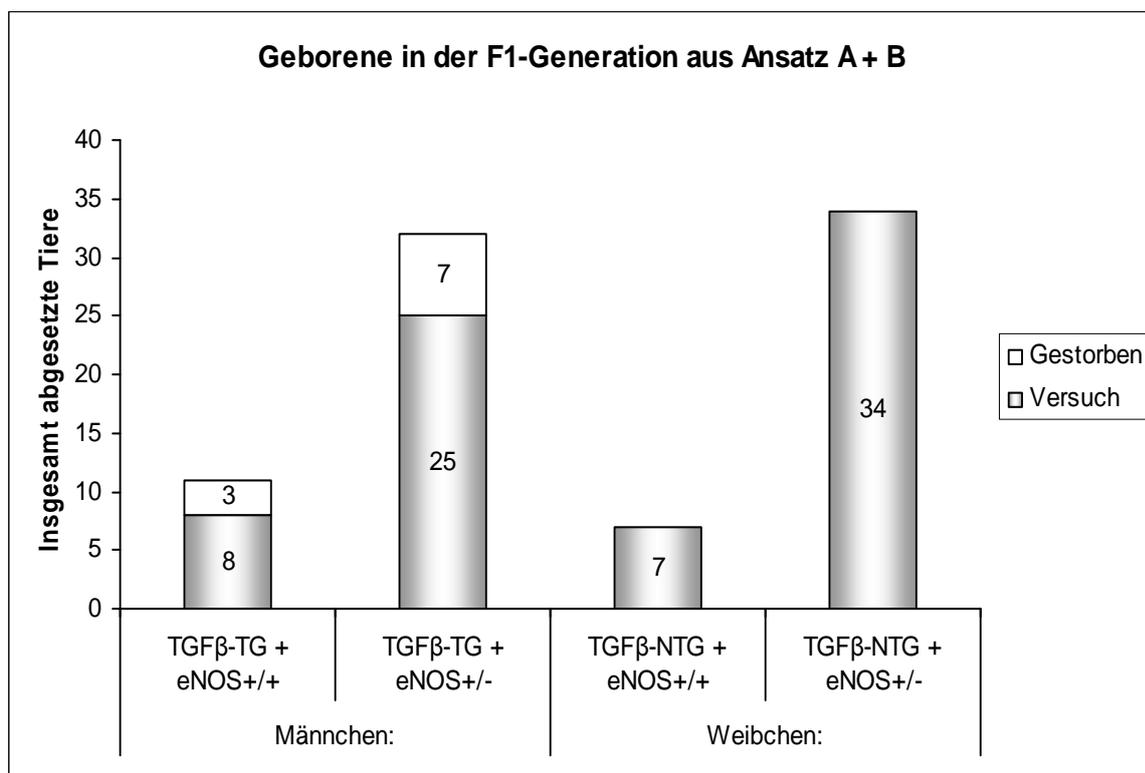


Abb. 4.1 In der F<sub>1</sub>-Generation aus den Zuchtansätzen A und B wurden insgesamt 84 Tiere geboren. Die Grafik zeigt die Verteilung der Genotypen der abgesetzten Tiere. Bei den männlichen Tieren starben nach dem Absetzen insgesamt 10 Tiere (□ Gestorben). Die restlichen Männchen, sowie alle abgesetzten Weibchen dienten zur Erhebung der im Folgenden dargestellten Daten.

#### 4.1.2 Überlebensraten der Nachkommen über 6 Monate

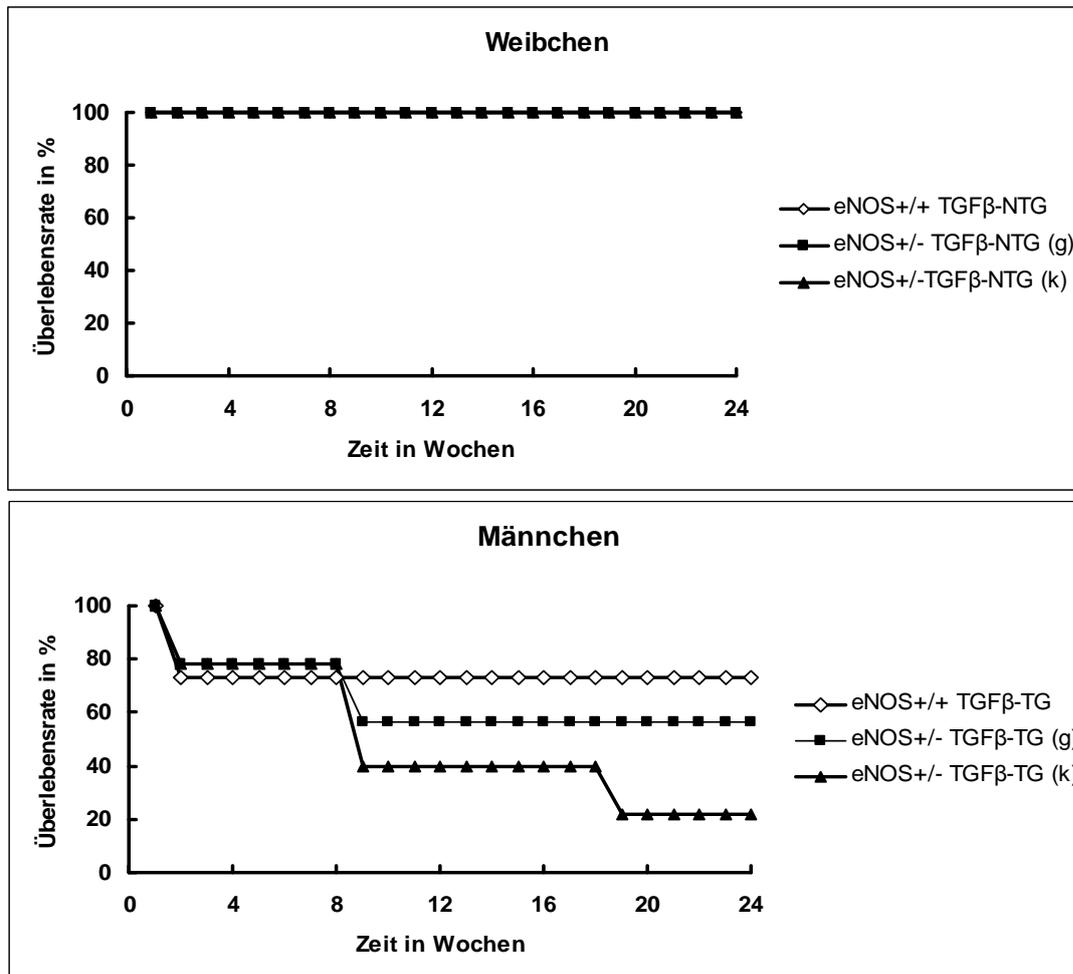


Abb. 4.2 Dargestellt sind die Überlebensraten der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation. Die Überlebensrate der Weibchen lag für alle Genotypen bei 100%. Bei den Männchen zeigten die eNOS<sup>+/+</sup> + TGF-β<sub>1</sub> TG Tiere (◇) eine Überlebensrate von 73%. Bei den eNOS<sup>+/-</sup> + TGF-β<sub>1</sub> TG Tieren lag die Überlebensrate bei knapp 78%, jedoch entwickelten einige Tiere mit zunehmender Zeit Krankheitssymptome, daher wurde hier zusätzlich zwischen gesunden (g) (56,3%) und kranken (k) (21,9%) unterschieden. Sobald die Tiere einen Distress Score von > 5 hatten (▲) wurden sie getötet, dies war bei einigen Tieren nach ca. 9 Wochen der Fall, bei anderen erst nach ca. 18 Wochen (der Schweregrad der Symptome unterschied sich dabei nicht).

Aus den oben stehenden Grafiken wird ersichtlich, dass sich die Überlebensraten für die weiblichen und die männlichen Tiere sehr unterschiedlich darstellen. Während bei den Weibchen alle abgesetzten Tiere überlebten, starben bei den Männchen kurz nach dem Absetzen einige Tiere. So wurden von 11 abgesetzten eNOS<sup>+/+</sup> + TGF-β<sub>1</sub> TG Tieren nur 8 (73%) für die Versuchsreihe verwendet, da die übrigen drei innerhalb der ersten zwei Wochen nach dem Absetzen plötzlich verstarben.

Bei den eNOS<sup>+/-</sup> + TGF-β<sub>1</sub> TG Tieren lag die Überlebensrate bei 25 Tieren (78%) von insgesamt 32 abgesetzten Tieren. Von diesen 25 Tieren, mit denen die Versuchsreihe fortgeführt wurde, entwickelten insgesamt 7 Tiere (21,9%) mit der Zeit deutliche Krankheitssymptome (k). Dies führte dazu, dass einige bereits nach 9 Wochen, der restliche Teil nach 18 Wochen getötet werden musste, um den Tieren weitere Leiden zu ersparen. Die restlichen 18 Tiere (56,3%) zeigten während der gesamten Versuchsdauer von 6 Monaten keine Anzeichen einer Erkrankung; sie werden im Folgenden als gesund (g) bezeichnet.

Auch bei den Weibchen entwickelten einige Tiere deutliche Krankheitsanzeichen. Dies waren 7 Tiere von den insgesamt 34 eNOS<sup>+/-</sup> + TGF-β<sub>1</sub> NTG Tieren. Da diese jedoch erst zum Ende der Versuchsreihe, also kurz vor Ablauf der 6 Monate auftraten, musste hier kein Tier vorzeitig getötet werden.

#### 4.1.3 Beurteilung des Gesundheitszustandes (nach Distress Score-Schema)

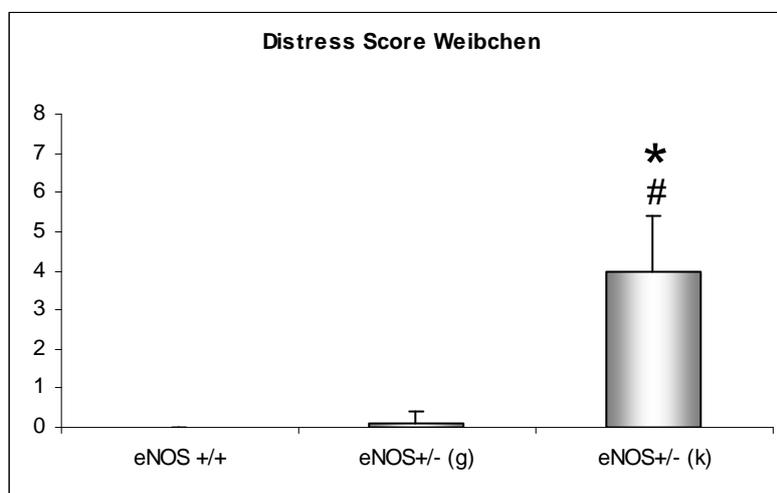


Abb. 4.3 Vergleich der Distress scores der weiblichen Tiere. Da alle dargestellten Weibchen keiner TGF-β<sub>1</sub>-Überexpression unterliegen wurde der Übersicht halber nur der eNOS-Status unterschieden. eNOS<sup>+/+</sup> stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/+</sup> ; # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

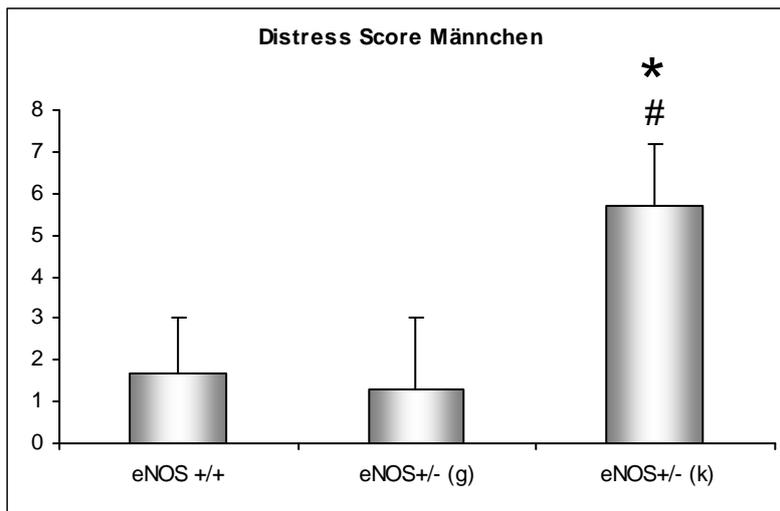


Abb. 4.4 Vergleich der Distress scores der männlichen Tiere. Bei allen dargestellten Gruppen handelt es sich um männliche Tiere, die das Gen für eine hepatozytäre TGF- $\beta_1$ -Überexpression tragen; der Übersicht halber wurde in der Grafik deswegen nur der eNOS-Status unterschieden. eNOS<sup>+/+</sup> stellt die Kontrollgruppe dar. \* =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/+</sup> ; # =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

Abbildung 4.3 und 4.4 zeigen die Ergebnisse der Untersuchung anhand des Distress-Score Schemas (siehe 3.1). Diese Einstufung wurde für alle 74 überlebenden Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Ansatz A und B einzeln durchgeführt. Ab einem Score von 5 zeigten die Tiere i.d.R. deutlich sichtbare Krankheitsanzeichen und wurden getötet um ihnen weitere Leiden zu ersparen. Wie aus den oben stehenden Grafiken hervorgeht zeigten einige der Weibchen mittlere Anzeichen einer Erkrankung (Score 4,0 +/- 1,4). Bei den Männchen waren die Krankheitssymptome ausgeprägter, was sich in erhöhten Score-Werten von 5,7 +/- 1,5 zeigte.

Bei den Weibchen ergeben sich folgende Tierzahlen:

- eNOS<sup>+/+</sup> + TGF- $\beta_1$  NTG      n = 7
- eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta_1$  NTG (g)      n = 27
- eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta_1$  NTG (k)      n = 7

Für die Männchen ergibt sich:

- eNOS<sup>+/+</sup> + TGF- $\beta_1$  TG      n = 8
- eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta_1$  TG (g)      n = 18
- eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta_1$  TG (k)      n = 7

## 4.2 Ergebnisse der Blutdruckmessung

Von den vier verschiedenen Genotypen der F<sub>1</sub>-Generation wurde bei je fünf Tieren der Blutdruck ermittelt. Zum Vergleich sind hier als fünfte Gruppe eNOS<sup>-/-</sup> Tiere dargestellt.

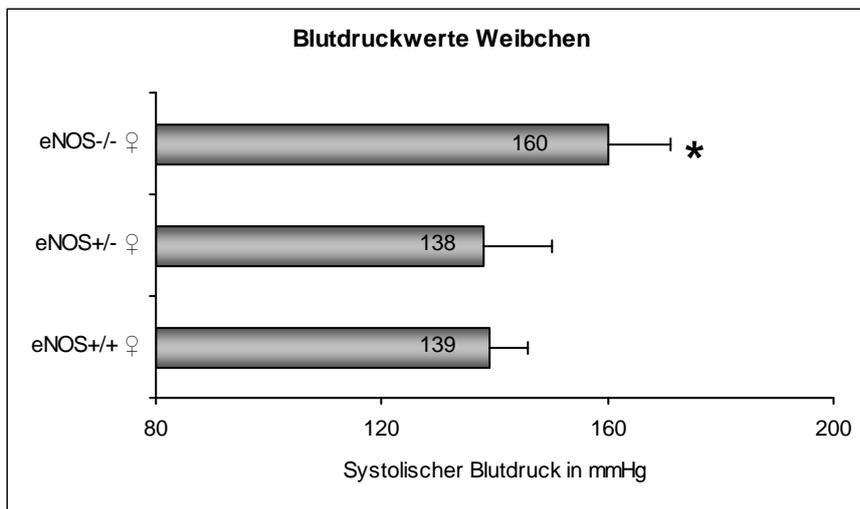


Abb. 4.5 Systolischer Blutdruck bei je fünf weiblichen Tieren mit unterschiedlichem eNOS-Status. Die Tiere mit eNOS<sup>+/-</sup>- und eNOS<sup>+/+</sup>-Status entstammen der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B. Die eNOS knock-out Weibchen (eNOS<sup>-/-</sup>) entstammen der F<sub>2</sub>-Generation (Zuchtansatz C), da es in der F<sub>1</sub>-Generation keine homozygoten knock-out Tiere gab.

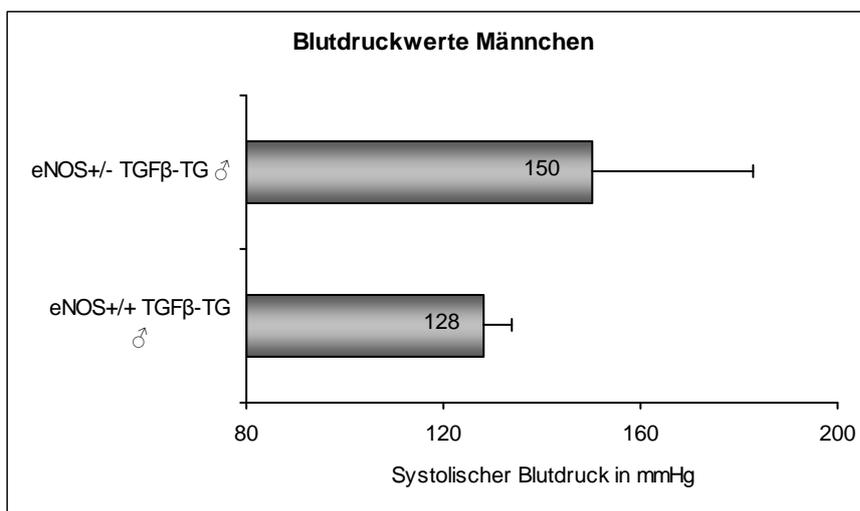


Abb. 4.6 Systolischer Blutdruck bei je fünf männlichen Tieren der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B.

Der Blutdruck war, im Vergleich zur Kontrollgruppe der eNOS<sup>+/+</sup> Weibchen bei allen untersuchten heterozygoten Tieren nicht signifikant erhöht. Starke Abweichungen zeigten nur die eNOS<sup>-/-</sup> + TGF-β<sub>1</sub> NTG Weibchen der F<sub>2</sub>-Generation, gefolgt von den eNOS<sup>+/-</sup> + TGF-β<sub>1</sub> TG Männchen der F<sub>1</sub>-Generation, welche jedoch stark streuten.

### 4.3 Organuntersuchung

#### 4.3.1 Untersuchung von Herz, Lunge und Niere

Von den unter 3.4.1 und 3.5.1 beschriebenen Tieren wurden Herz, Lunge und Nieren entnommen. Das Gewicht der jeweiligen Organe wurde ermittelt und ins Verhältnis zum Körpergewicht der Tiere gesetzt. Bei den Nieren handelt es sich dabei um das Gesamtgewicht beider Nieren.

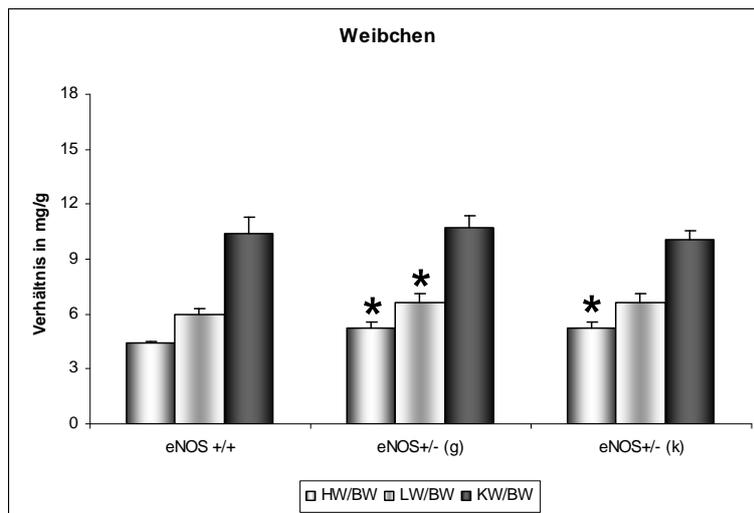


Abb. 4.7 Darstellung von Herzgewicht (HW), Lungengewicht (LW) und Nierengewicht (KW) im Verhältnis zum Körpergewicht (BW) der Tiere aus Zuchtansatz A und B. Da alle dargestellten Weibchen keiner TGF- $\beta_1$ -Überexpression unterliegen wurde der Übersicht halber nur der eNOS-Status unterschieden. \* =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/+</sup>.

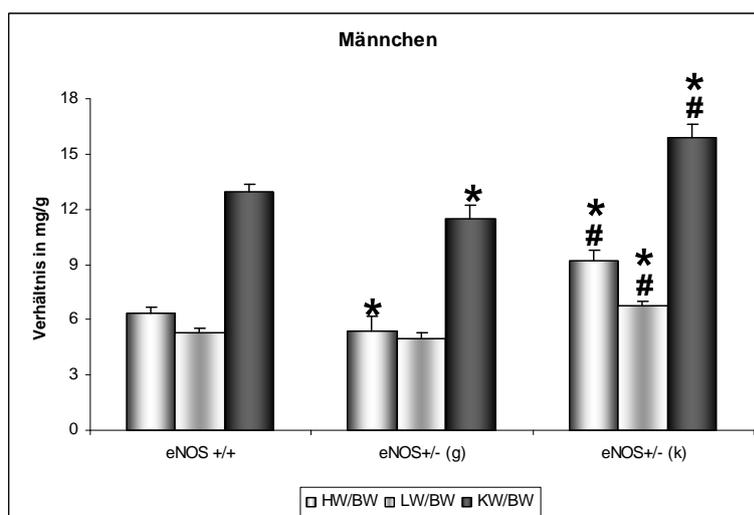


Abb. 4.8 Darstellung von Herzgewicht (HW), Lungengewicht (LW) und Nierengewicht (KW) im Verhältnis zum Körpergewicht (BW) der Tiere aus Zuchtansatz A und B. Da alle dargestellten Männchen einer TGF- $\beta_1$ -Überexpression unterliegen wurde der Übersicht halber nur der eNOS-Status unterschieden. \* =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/+</sup>; # =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

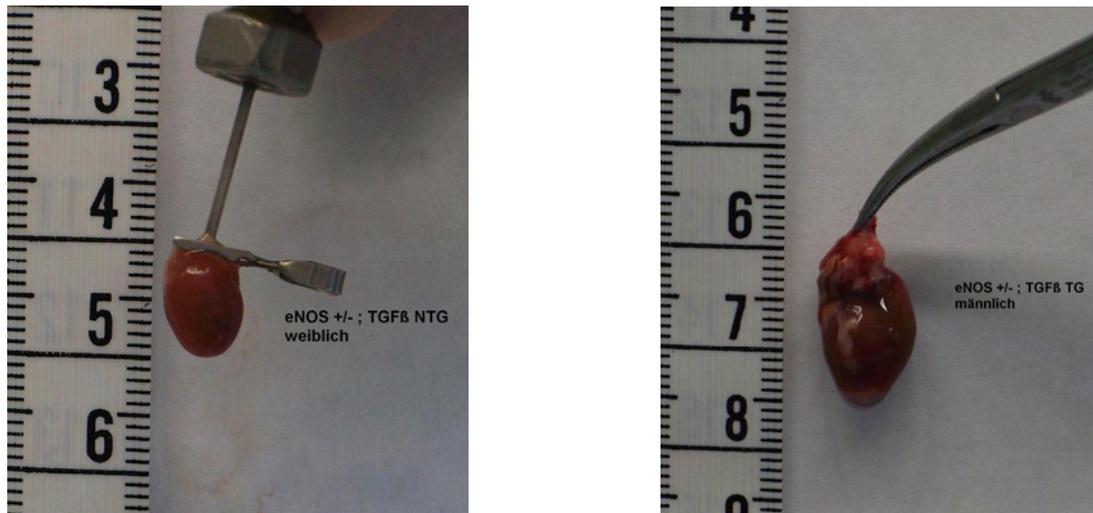


Abb. 4.9 Gezeigt sind zwei Herzen von Tieren der F<sub>1</sub>-Generation mit heterozygotem eNOS-Status. Das linke Herz stammt von einem weiblichen Tier, das rechte von einem Männchen. Gut sichtbar ist der deutliche Größenunterschied dieses Organs zwischen den beiden Geschlechtern.

Die Untersuchung verschiedener Organgewicht-Körpergewicht-Verhältnisse ergab in allen Gruppen der heterozygoten Tiere signifikante Veränderungen im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Bei den weiblichen Tieren zeigt sich in beiden heterozygoten Gruppen eine Erhöhung des HW/BW-Verhältnisses und ein Trend hin zu einem erhöhten LW/BW-Verhältniss (nur bei den gesunden Tieren signifikant). Das Nierengewicht blieb in allen Gruppen relativ unbeeinflusst von Genotyp und Gesundheitszustand.

Bei den männlichen Tieren zeigte sich ein interessanter Verlauf. Während die Verhältnisse von HW/BW und KW/BW in der gesunden Gruppe der eNOS<sup>+/-</sup> Tiere tendenziell sanken, stiegen sie in der kranken Gruppe extrem an. Hinzu kam eine starke Erhöhung des LW/BW-Verhältnisses bei den Kranken. Insgesamt zeigten sich also in der Gruppe der kranken eNOS<sup>+/-</sup> Männchen die meisten und die am stärksten ausgeprägten Veränderungen der Vitalorgane Herz, Lunge und Niere.

### 4.3.2 Ergebnisse der Creatinin-Untersuchung aus Plasmaproben

Aus dem Blut der oben genannten Tiere wurde wie unter 3.6 beschrieben die Creatinin-Konzentration ermittelt und die glomeruläre Filtrationsrate berechnet.

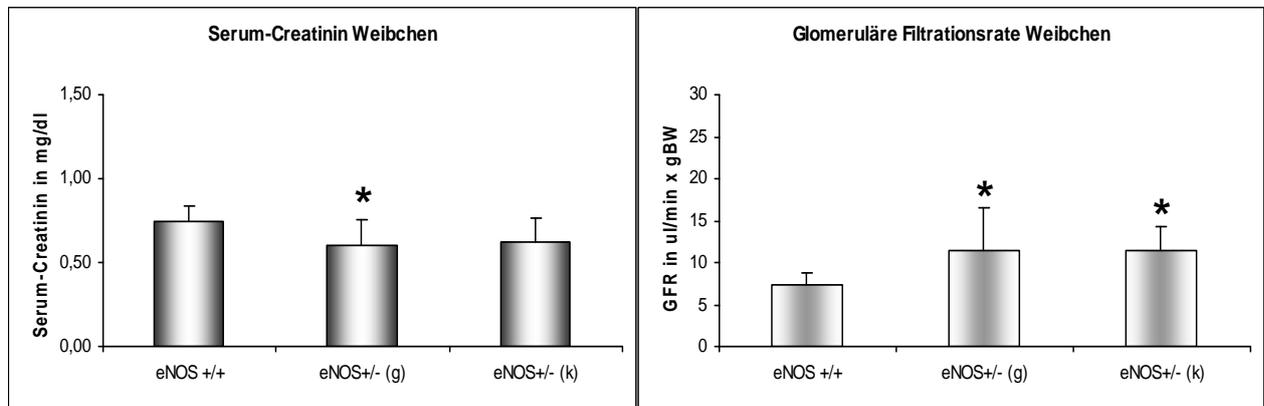


Abb. 4.10 Dargestellt sind die Serum-Creatinin-Werte der weiblichen Tiere der  $F_1$ -Generation aus Zuchtansatz A und B. Anhand dieser Werte wurde die glomeruläre Filtrationsrate der Tiere (in  $\mu\text{l}/\text{min} \times \text{g}$  Körpergewicht) bestimmt. \* =  $p < 0,05$  vs.  $e\text{NOS}^{+/+}$ .

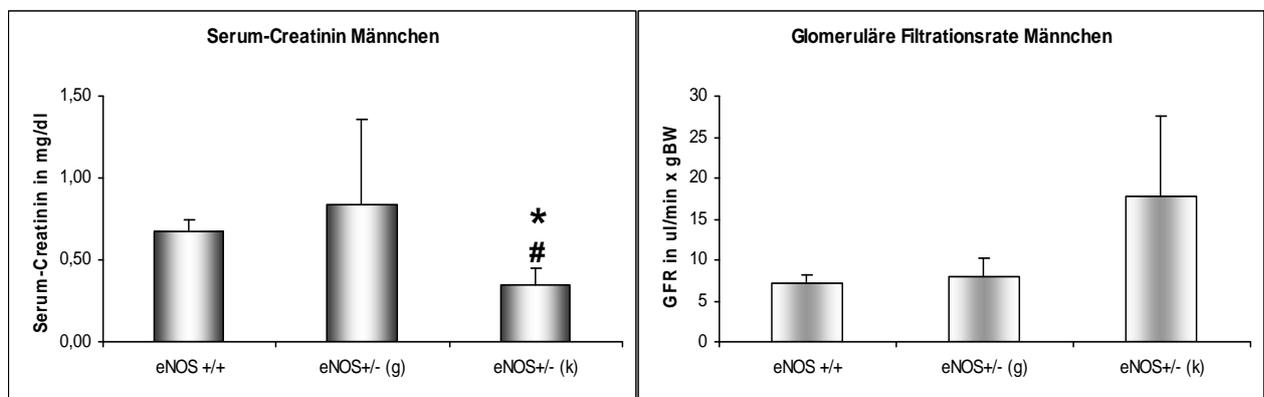


Abb. 4.11 Dargestellt sind die Serum-Creatinin-Werte der weiblichen Tiere der  $F_1$ -Generation aus Zuchtansatz A und B. Anhand dieser Werte wurde die glomeruläre Filtrationsrate der Tiere (in  $\mu\text{l}/\text{min} \times \text{g}$  Körpergewicht) bestimmt. \* =  $p < 0,05$  vs.  $e\text{NOS}^{+/+}$  ; # =  $p < 0,05$  vs.  $e\text{NOS}^{+/-}$  (g).

Die Untersuchung der Serum-Creatinin-Konzentration ergab für die weiblichen Tiere insgesamt erniedrigte Werte verglichen mit der Kontrollgruppe. Die daraus rechnerisch abgeschätzte glomeruläre Filtrationsrate war dementsprechend erhöht. Diese Ergebnisse stellten sich für die beiden heterozygoten Gruppen unabhängig vom Gesundheitszustand dar.

Bei den männlichen Tieren zeigten sich in der gesunden heterozygoten Gruppe keine signifikanten Veränderungen bezogen auf die Kontrollgruppe. In der kranken Gruppe jedoch fanden sich starke Abweichungen der Serum-Creatinin-Konzentration. Dieser Wert war sowohl gegenüber der Kontrollgruppe, als auch gegenüber den gesunden Tieren stark erniedrigt. Die glomeruläre Filtrationsrate war bei diesen Tieren tendenziell erhöht.

#### **4.4 PCR Untersuchung von Herz, Lunge und Niere**

Im Folgenden sind die Ergebnisse für die real-time RT-PCR Untersuchung dargestellt. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf Fibrosemarker (Elastin, Collagen-1, Laminin, Fibronectin), Fibrosemediatoren (TGF- $\beta_1$ ), Hypertrophiemarker (ODC, ANP, BNP), Apoptosemarker (Bcl-2, Bax), Calcium-Handling-Proteine (Serca-2A, NCX, PLB), die Matrix-Metalloproteinase 12 (MMP-12) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gelegt.

Untersucht wurde das Herz mit seinen separierten Funktionseinheiten Vorhöfe, rechter Ventrikel und linker Ventrikel, sowie die Lunge und die Niere.

#### 4.4.1 Genexpression der Matrixproteine in eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> NTG Tieren

In den nachstehenden Grafiken sind die Ergebnisse der PCR-Untersuchung für die weiblichen Nachkommen aus Zuchtansatz A und B dargestellt. Alle dargestellten Tiere waren TGF- $\beta$ <sub>1</sub> NTG. Für eine bessere Übersicht wurde auch hier nur der eNOS-Status dargestellt und zwischen krank (k) und gesund (g) unterschieden.

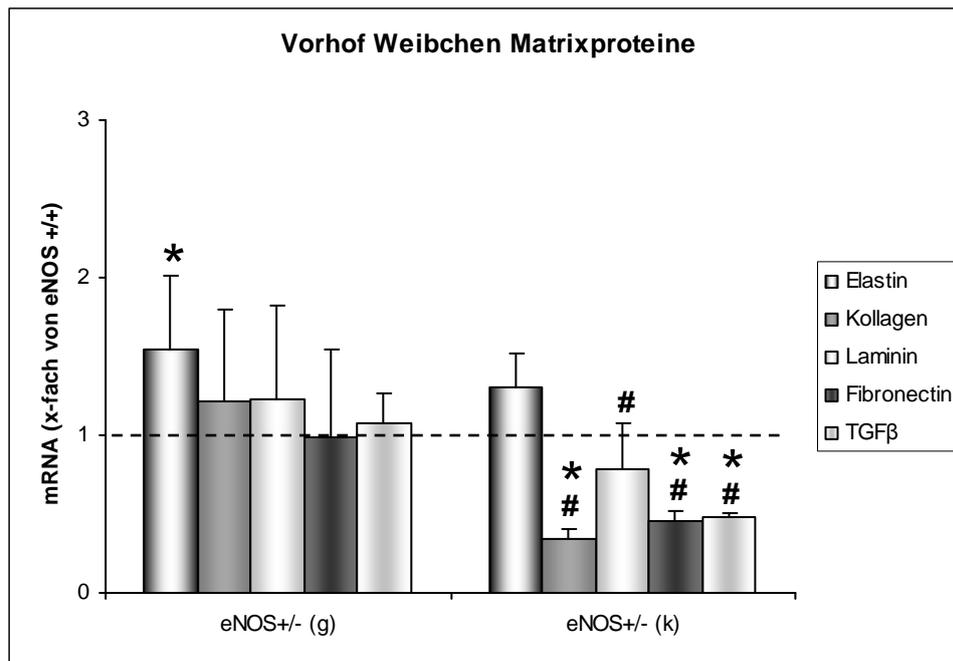


Abb. 4.12 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die Matrixproteine Elastin, Kollagen, Laminin und Fibronectin und für TGF- $\beta$ <sub>1</sub>. Die Daten wurden mittels PCR an Proben der Vorhöfe der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/-</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/+</sup>; # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

Die Expression der Matrixproteine im Vorhof der gesunden Tiere unterscheidet sich, bis auf die deutliche Erhöhung von Elastin, nicht sonderlich von der Kontrollgruppe. Dahingegen zeigen die kranken Tiere für Kollagen, Laminin, Fibronectin und TGF- $\beta$ <sub>1</sub> deutlich erniedrigte Werte.

Für den rechten Ventrikel (Abb. 4.13) zeigen sich ebenfalls wieder stärkere Veränderungen bei der Gruppe der kranken Tiere als bei den gesunden Tieren. Die Elastin-Expression ist jedoch in beiden Tiergruppen signifikant erhöht. In der kranken Gruppe sind des Weiteren die Kollagen-Expression erhöht, sowie die Laminin- und TGF- $\beta$ <sub>1</sub>-Expression erniedrigt.

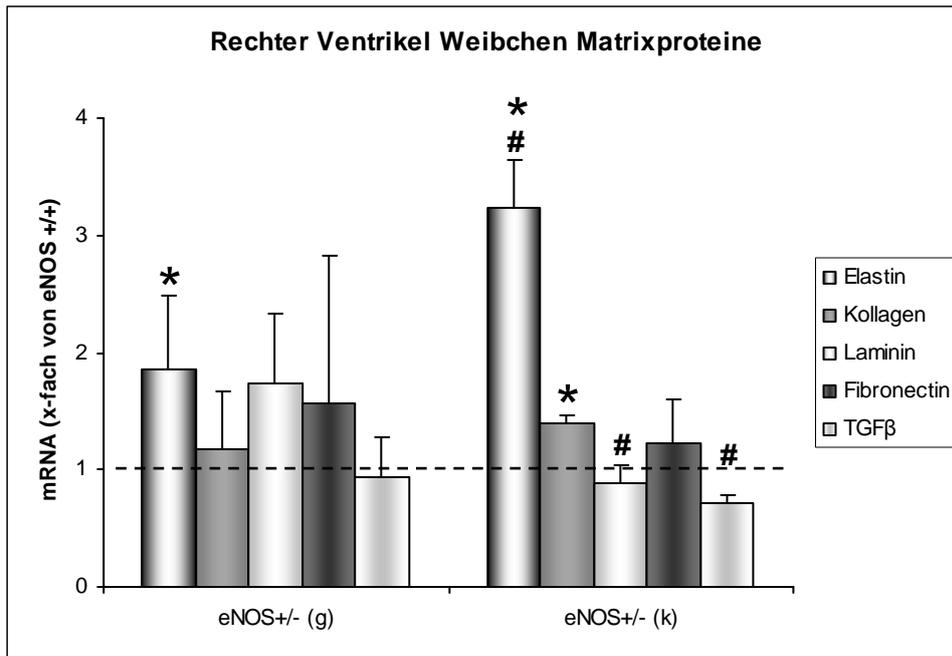


Abb. 4.13 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die Matrixproteine Elastin, Kollagen, Laminin und Fibronectin und für TGF- $\beta_1$ . Die Daten wurden mittels PCR an Proben der rechten Ventrikel der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/+</sup>; # =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

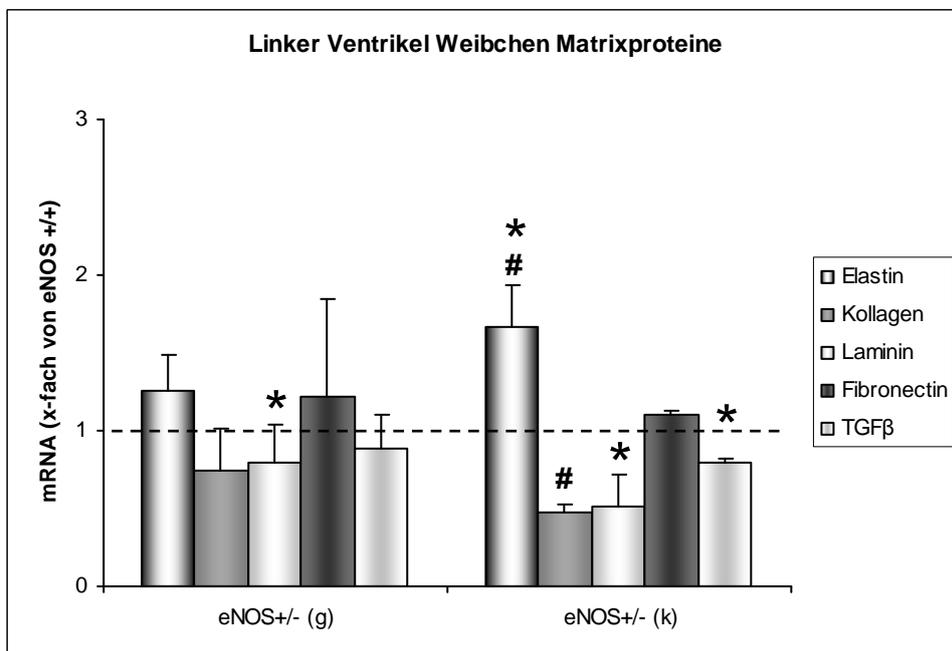


Abb. 4.14 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die Matrixproteine Elastin, Kollagen, Laminin und Fibronectin und für TGF- $\beta_1$ . Die Daten wurden mittels PCR an Proben der linken Ventrikel der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/+</sup>; # =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

Auch im linken Ventrikel (Abb. 4.14) sind die Werte für Laminin und TGF- $\beta_1$  bei der kranken Gruppe signifikant erniedrigt. Ebenso zeigt sich bei diesen Tiere eine deutlich erhöhte Elastin-Expression. Im Gegensatz dazu zeigt sich jedoch, dass die Kollagen-Expression der kranken Tiere, anders als im rechten Ventrikel, hier signifikant erniedrigt ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für die weibliche Gruppe die Veränderungen sowohl im Vorhof, als auch in den beiden Ventrikeln bei den kranken heterozygoten Tieren deutlich überwiegen.

Diese Veränderungen der Matrix-Struktur zeigen sich ebenfalls in den PCR-Untersuchungen der Lungen-Proben der kranken heterozygoten Weibchen. Die Elastin-Expression ist hier stark erhöht, wohingegen Fibronectin, TGF- $\beta_1$  und ganz besonders Kollagen signifikant erniedrigt sind.

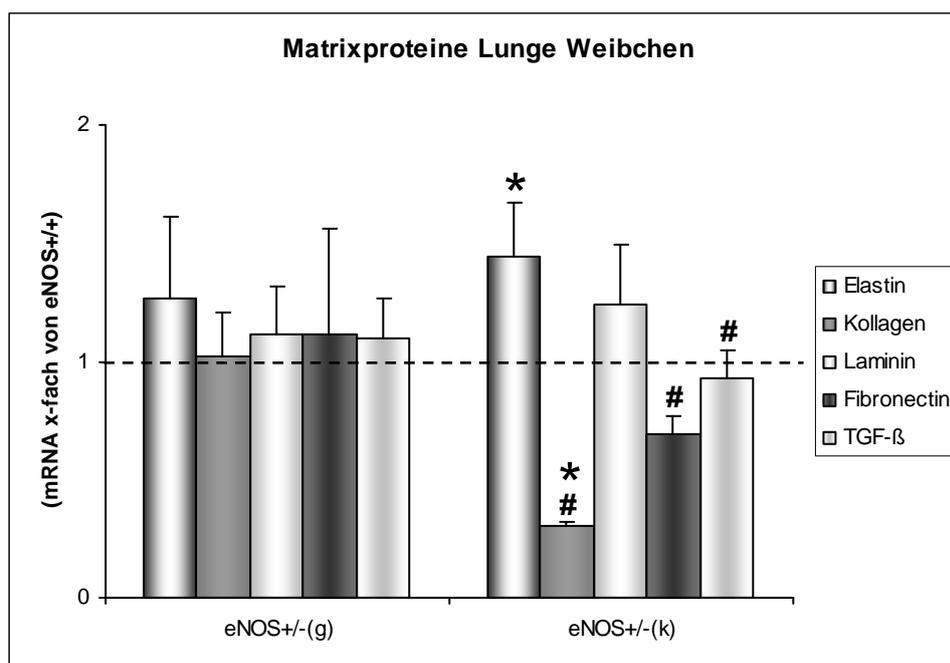


Abb. 4.15 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die Matrixproteine Elastin, Kollagen, Laminin und Fibronectin und für TGF- $\beta_1$ . Die Daten wurden mittels PCR an Proben der Lungen der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/+</sup> ; # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

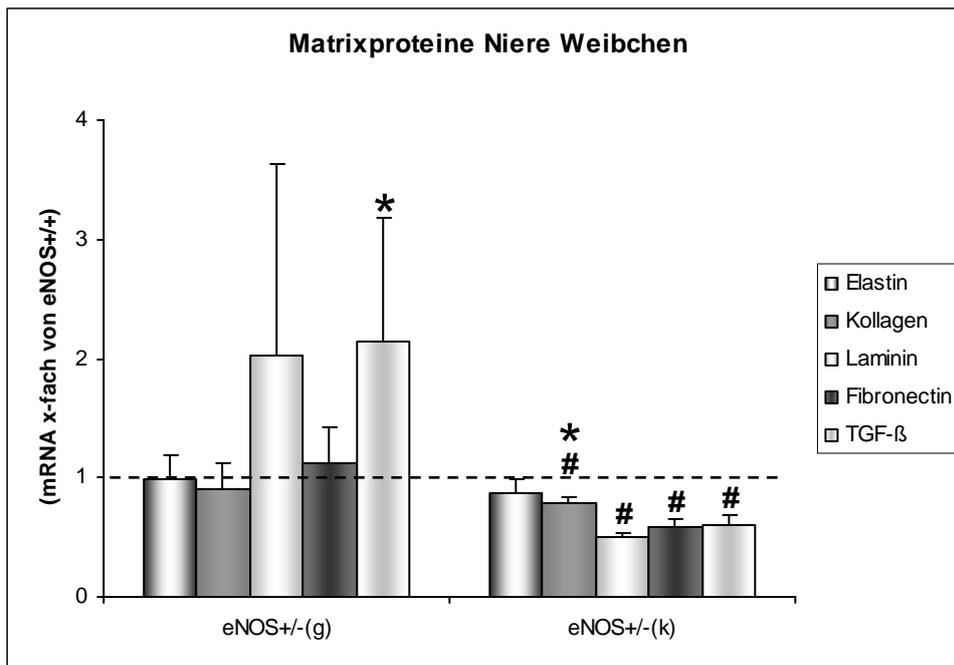


Abb. 4.16 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die Matrixproteine Elastin, Kollagen, Laminin und Fibronectin und für TGF- $\beta_1$ . Die Daten wurden mittels PCR an Proben der Nieren der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/+</sup>; # =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

Abschließend wurde auch das Nierengewebe der Weibchen mittels PCR auf die Expression der Matrixproteine untersucht. Es zeigten sich einige Veränderungen der Matrix-Struktur im Vergleich von kranker und gesunder Gruppe. Interessanterweise zeigen die als gesund eingestuft Tiere eine deutliche Erhöhung an TGF- $\beta_1$ , während die kranken Tiere insgesamt erniedrigte Werte in allen untersuchten Matrixproteinen und auch für TGF- $\beta_1$  aufwiesen.

#### 4.4.2 Genexpression der Matrixproteine in eNOS<sup>+/-</sup> + TGF-β<sub>1</sub> TG Tieren

Die folgenden Grafiken zeigen die Ergebnisse der PCR-Untersuchung der männlichen Tiere der F<sub>1</sub>-Generation. Der Übersicht halber, und weil alle dargestellten Tiere Männchen waren und einer TGF-β<sub>1</sub>-Überexpression unterlagen, wurde in den Darstellungen nur der eNOS-Status genannt und zwischen gesund (g) und krank (k) unterschieden.

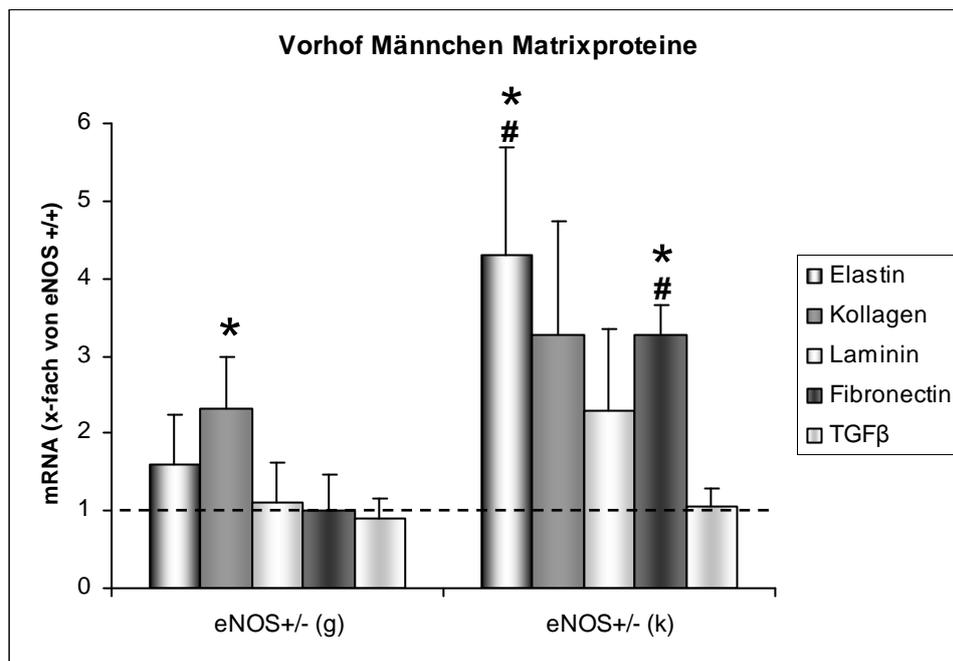


Abb. 4.17 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die Matrixproteine Elastin, Kollagen, Laminin und Fibronectin und für TGF-β<sub>1</sub>. Die Daten wurden mittels PCR an Vorhofproben der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/+</sup>; # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

Aus der Grafik geht hervor, dass die Kollagen-Expression im Vorhof bei gesunden eNOS<sup>+/-</sup> Männchen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ist. Bei den kranken eNOS<sup>+/-</sup> Männchen zeigt sich eine Erhöhung der Expression aller Matrixproteine, wobei Elastin und Fibronectin signifikant erhöht sind, und zwar sowohl im Bezug auf die Kontrollgruppe, als auch auf die gesunden eNOS<sup>+/-</sup> Männchen.

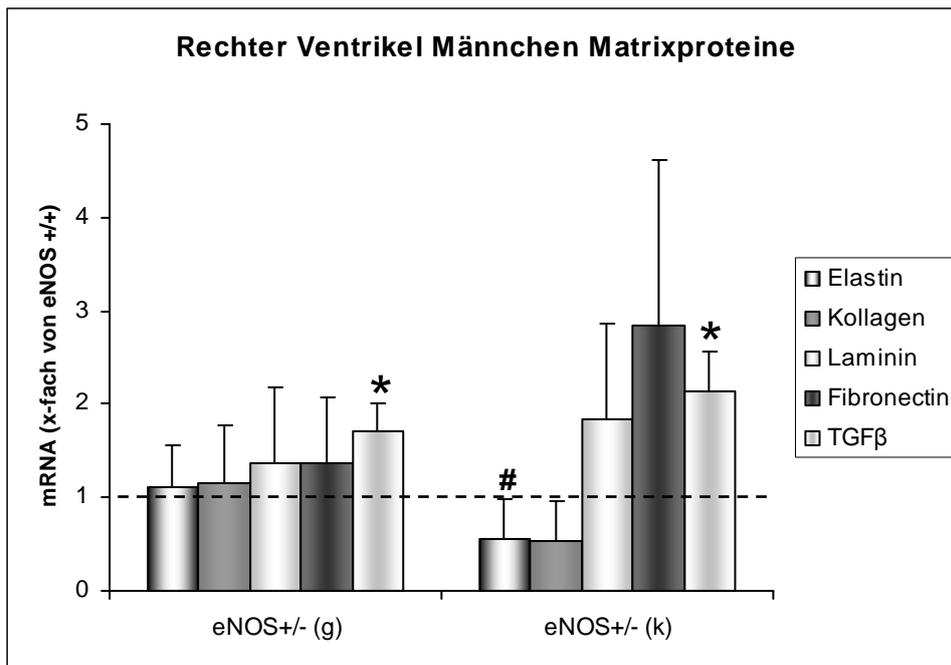


Abb. 4.18 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die Matrixproteine Elastin, Kollagen, Laminin und Fibronectin und für TGF- $\beta_1$ . Die Daten wurden mittels PCR an Proben der rechten Ventrikel der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/+</sup>; # =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

Für den rechten Ventrikel zeigen sich bei den gesunden Tieren nur signifikante Veränderungen in der TGF- $\beta_1$ -Expression, welche im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht ist. Die Expression der Matrixproteine unterscheidet sich hier nicht wesentlich von den Daten der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse der kranken Gruppe zeigen ein deutlich anderes Bild. Die Expression von Elastin und Kollagen ist insgesamt erniedrigt, diejenige von Elastin sogar signifikant im Vergleich zur gesunden Gruppe. Dahingegen sind die Werte für Laminin und Fibronectin erhöht, ebenso wie die TGF- $\beta_1$ -Werte (signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe).

Im linken Ventrikel (Abb. 4.19) ist, wie im rechten Ventrikel, TGF- $\beta_1$  signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Bei den gesunden Tieren zeigt sich außerdem eine ausgeprägte Expression von Laminin, wohingegen bei den kranken Tieren die Elastin-Expression gesteigert ist.

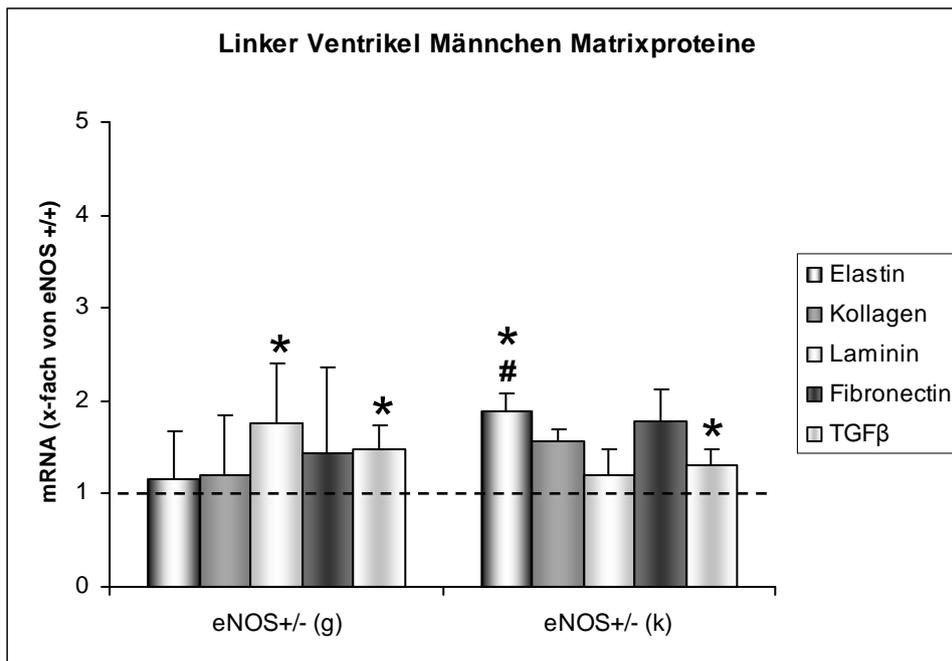


Abb. 4.19 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die Matrixproteine Elastin, Kollagen, Laminin und Fibronectin und für TGF- $\beta_1$ . Die Daten wurden mittels PCR an Proben der linken Ventrikel der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/+</sup>; # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

Insgesamt zeigen sich bei der männlichen Gruppe einige erhebliche Veränderungen der Expression der Matrixproteine im Herzen gegenüber der Kontrollgruppe. Diese Veränderungen überwiegen dabei bei den Tieren, die nach Distress-Score Schema als krank eingestuft wurden.

Die Veränderungen in der kranken Gruppe spiegeln sich auch in den Daten zur PCR-Untersuchung der Lunge wieder (Abb. 4.20). Hier zeigt sich ein starker Anstieg der Elastin-Expression, während Kollagen und Fibronectin signifikant erniedrigt sind. Identische Untersuchungen wurden mit Proben der Niere durchgeführt. Da sich hier in der männlichen Gruppe jedoch keine nennenswerten Unterschiede zu den Daten der Kontrollgruppe ergaben, wurde auf eine grafische Darstellung der Ergebnisse verzichtet.

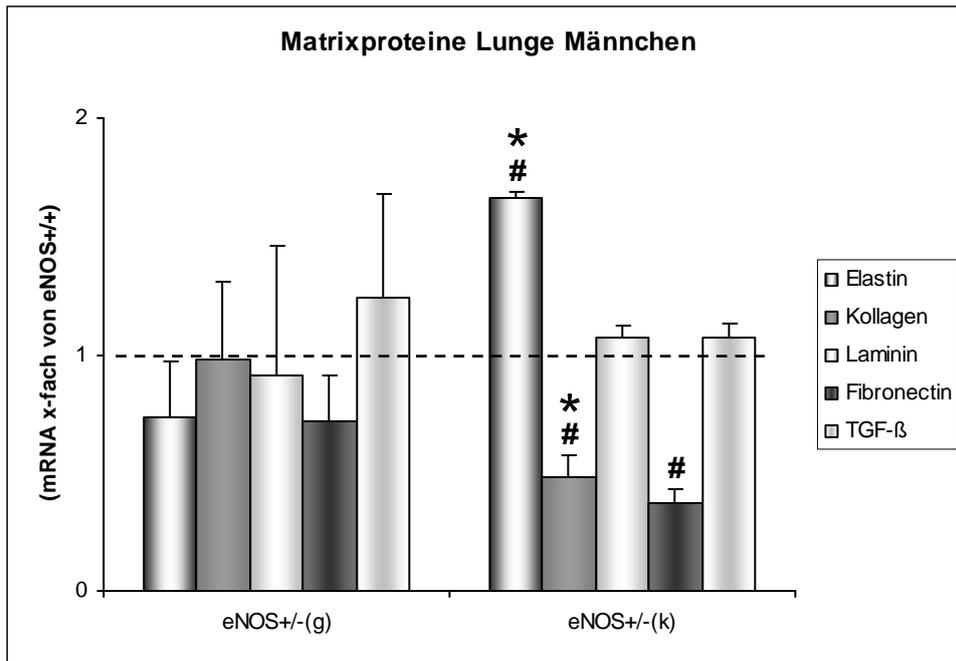


Abb. 4.20 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die Matrixproteine Elastin, Kollagen, Laminin und Fibronectin und für TGF-β<sub>1</sub>. Die Daten wurden mittels PCR an Proben der Lungen der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/-</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> ; # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

**Übersicht über die signifikanten Veränderungen der Genexpression der Matrixproteine für Weibchen und Männchen:**

	Weibchen										Männchen									
	gesund					krank					gesund					krank				
	VH	RV	LV	Lu	Ni	VH	RV	LV	Lu	Ni	VH	RV	LV	Lu	Ni	VH	RV	LV	Lu	Ni
Elastin	▲	▲					▲	▲	▲							▲	▼	▲	▲	
Kollagen						▼	▲	▼	▼	▼	▲									▼
Laminin			▼			▼	▼	▼		▼			▲							
Fibronectin						▼			▼	▼						▲				▼
TGF-β					▲	▼	▼	▼	▼	▼		▲	▲				▲	▲		

#### 4.4.3 Genexpression von MMP-12 bei Männchen und Weibchen im Vergleich

Bei der MMP-12 handelt es sich um die Matrix-Metalloproteinase 12, ein Matrix-abbauendes Enzym aus der Familie der Matrix-Metalloproteinasen. Die MMP-12 wird auch als Makrophagen Metalloelastase bezeichnet, da ihr bevorzugtes Substrat das Elastin ist.

Die MMP-12 wird in der weiblichen Gruppe insgesamt niedrig exprimiert. Bei den Männchen liegen die Expressionswerte höher. Vergleicht man die Daten der männlichen Tiere mit denen der weiblichen (nicht dargestellt), so ergeben sich für die männlichen Tiere insgesamt signifikant höhere Werte als für die weiblichen (eNOS<sup>+/-</sup> TGF-β<sub>1</sub> NTG 0,40 ± 0,15 vs. eNOS<sup>+/-</sup> TGF-β<sub>1</sub> TG 0,73 ± 0,33; p < 0,05).

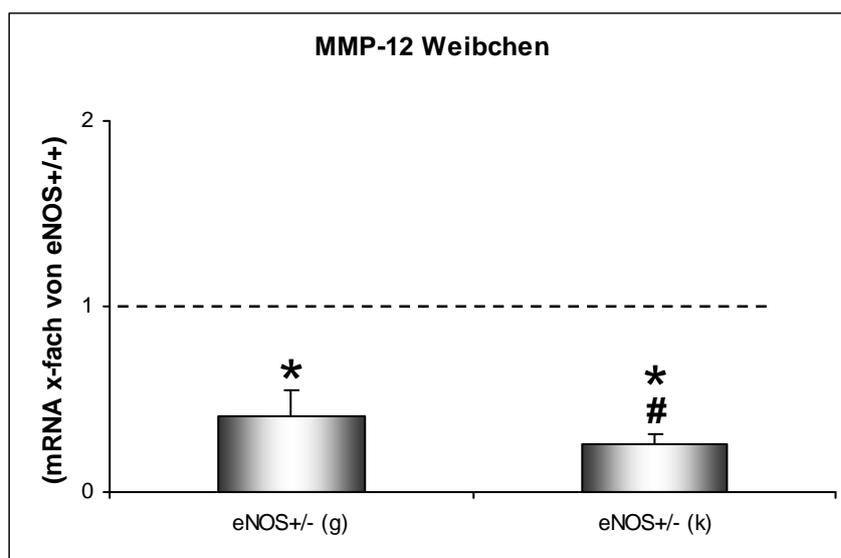


Abb. 4.21 Darstellung der mRNA-Expression für die Matrix-Metalloproteinase 12 (MMP-12) im Herzen bei den weiblichen Tieren der F<sub>1</sub>-Generation aus Ansatz A und B. Die Daten wurden mittels PCR an Proben vom linken Ventrikel erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/+</sup> ; # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

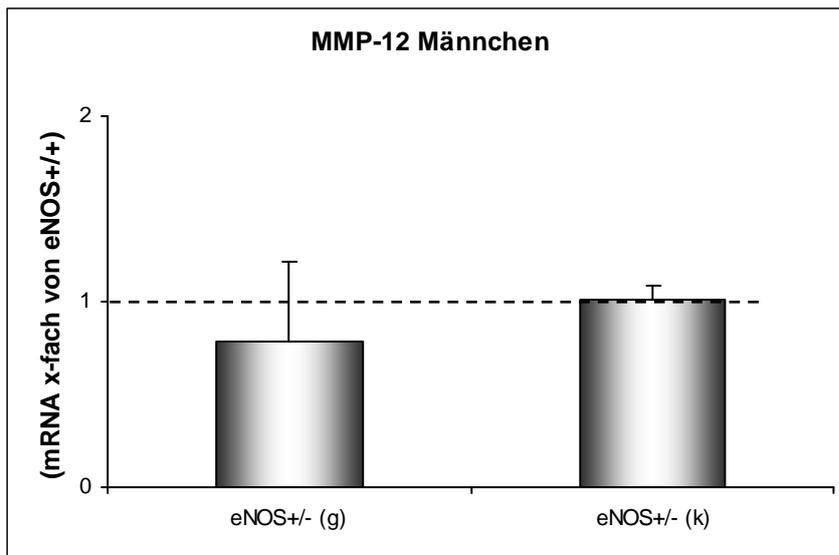


Abb. 4.22 Darstellung der mRNA-Expression für die Matrix-Metalloproteinase 12 (MMP-12) im Herzen bei den männlichen Tieren der F<sub>1</sub>-Generation aus Ansatz A und B. Die Daten wurden mittels PCR an Proben vom linken Ventrikel erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar.

#### 4.4.4 Genexpression von ANP und BNP bei Männchen und Weibchen im Vergleich

Neben den Matrixproteinen interessierte auch die Expression der natriuretischen Peptide ANP und BNP in den Herzproben der Tiere aus Zuchtansatz A und B. Bei ANP (Atriales natriuretisches Peptid) handelt es sich um ein Peptidhormon, dass von Muskelzellen des Vorhofs bei Überdehnung ausgeschüttet wird. ANP hat vasodilatatorische Wirkung und wirkt somit einem erhöhten Blutdruck entgegen.

Die Konzentration von BNP (Brain natriuretisches Peptid) wird in der Medizin als diagnostisches Mittel für Herzinsuffizienz verwendet. Es wird in beiden Ventrikeln ausgeschüttet und wirkt vornehmlich auf die Regulation der Vor- und Nachlast, indem es diese senkt.

In den folgenden Grafiken sind diese Daten jeweils für die beiden Gruppen „krank“ und „gesund“ bei Weibchen und Männchen dargestellt. Es zeigt sich, dass auch hier die größten Veränderungen in der kranken Gruppe zu finden sind.

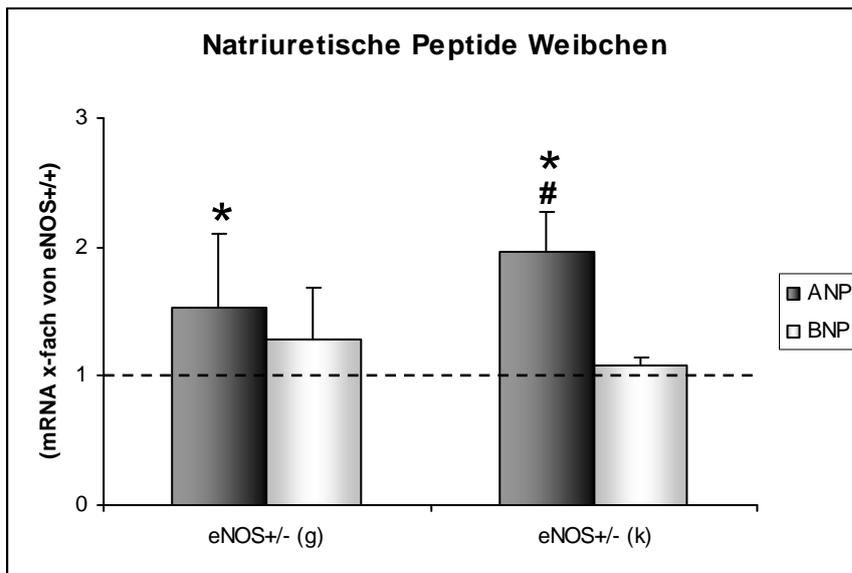


Abb. 4.23 Darstellung der mRNA-Expression für die natriuretischen Peptide ANP und BNP im Herzen bei den weiblichen Tieren der F<sub>1</sub>-Generation aus Ansatz A und B. Die Daten wurden mittels PCR an Proben vom linken Ventrikel erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/+</sup>; # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

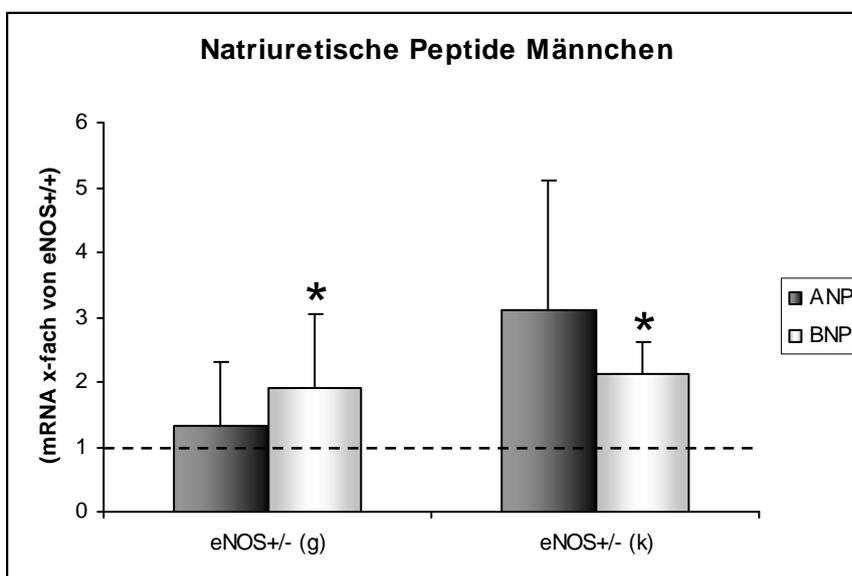


Abb. 4.24 Darstellung der mRNA-Expression für die natriuretischen Peptide ANP und BNP im Herzen bei den männlichen Tieren der F<sub>1</sub>-Generation aus Ansatz A und B. Die Daten wurden mittels PCR an Proben vom linken Ventrikel erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/+</sup>.

#### 4.4.5 Genexpression von eNOS und ODC bei Weibchen und Männchen

Die folgenden Daten zeigen die Genexpression für die endotheliale NO-Synthase und den Hypertrophiemarker Ornithin-Decarboxylase (ODC). Es fällt auf, dass wiederum die kranken Tiere die größten Veränderungen aufweisen, wobei diese Veränderungen bei den Männchen insgesamt stärker ausgeprägt sind als bei den Weibchen.

Die Ornithin-Decarboxylase ist in allen heterozygoten Tieren, bezogen auf die Kontrollgruppe signifikant erhöht. Auffällig ist hierbei, dass in beiden Geschlechtern die kranken Tiere sowohl gegen die Kontrollgruppe, als auch gegen die gesunden Tiere stark erhöhte Expressionswerte zeigen.

Daneben sehen wir in beiden kranken Gruppen eine signifikante Veränderung des eNOS-ODC-Verhältnisses.

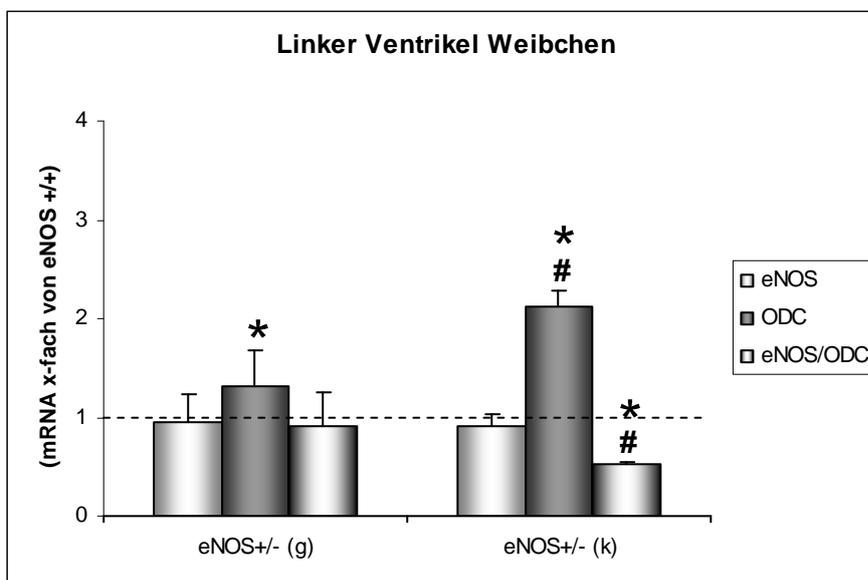


Abb. 4.25 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die Ornithin-Decarboxylase (ODC), sowie für das eNOS-ODC-Verhältnis. Die Daten wurden mittels PCR an Proben der linken Ventrikel der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/+</sup>; # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

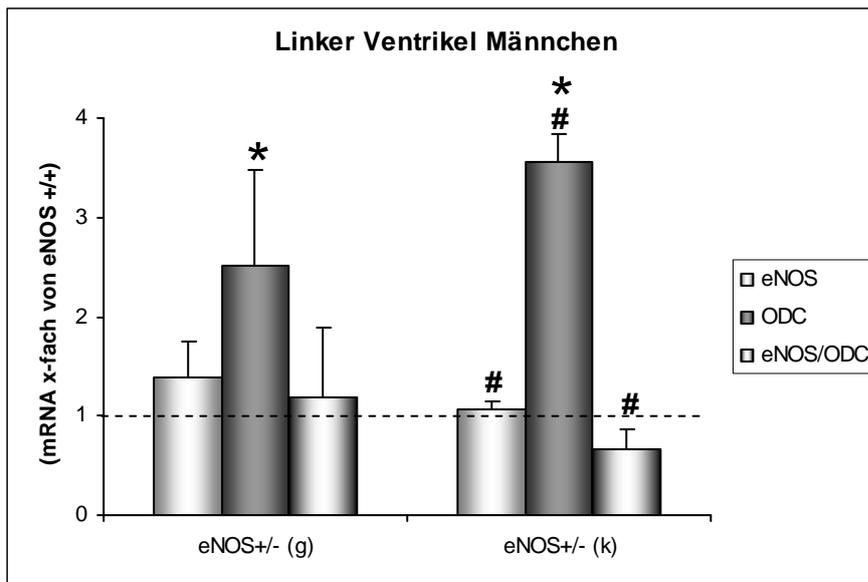


Abb. 4.26 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die Ornithin-Decarboxylase (ODC), sowie für das eNOS-ODC-Verhältnis. Die Daten wurden mittels PCR an Proben der linken Ventrikel der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/-</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup>; # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

#### 4.4.6 Genexpression von Bcl-2 und Bax bei Weibchen und Männchen

Des Weiteren waren die Apoptosemarker Bcl-2 und Bax von Interesse. Bcl-2 (B-cell Lymphoma -2) ist Namensgeber der Bcl-2 Familie und der Prototyp dieser Proteine, die bei der Regulation des programmierten Zelltodes (Apoptose) eine Rolle spielen. Bcl-2 wirkt hierbei anti-apoptotisch, während Bax (Bcl-2 associated X Protein), welches ebenfalls zur Bcl-2 Familie gehört, pro-apoptotisch wirkt.

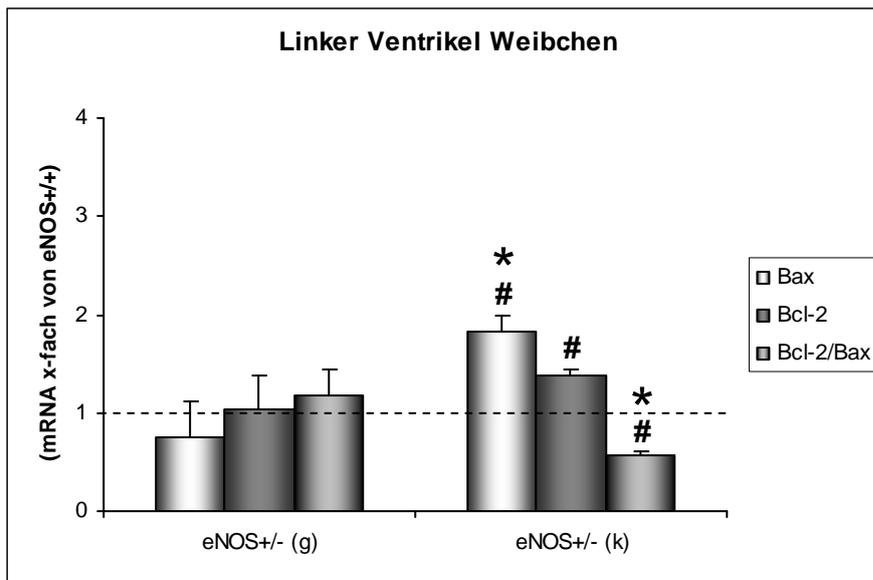


Abb. 4.27 Dargestellt ist die mRNA-Expression für das Protein B-cell Lymphoma-2 (Bcl-2) und das Bcl-2 associated X Protein (Bax), sowie für das Bcl-2-Bax-Verhältnis. Die Daten wurden mittels PCR an Proben der linken Ventrikel der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/-</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup>; # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

Wie in der oben stehenden Grafik zu erkennen ist, zeigen sich in der gesunden Gruppe keine nennenswerten Veränderungen verglichen mit den Kontrolltieren. Bei den kranken Tieren sieht man einen signifikanten Anstieg von Bax und ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung der Bcl-2 Expression. Das Bcl-2/Bax-Verhältnis, welches in den gesunden Tieren noch zugunsten des Bcl-2 ausgebildet war, kippt zugunsten des Bax (signifikant vermindertes Bcl-2/Bax-Verhältnis).

Hier wurden nur die Daten für den linken Ventrikel gezeigt. Der rechte Ventrikel und die Vorhöfe wurden ebenfalls untersucht und zeigten ein gleiches Bild der Verhältnisse, weshalb auf die grafische Darstellung verzichtet wurde.

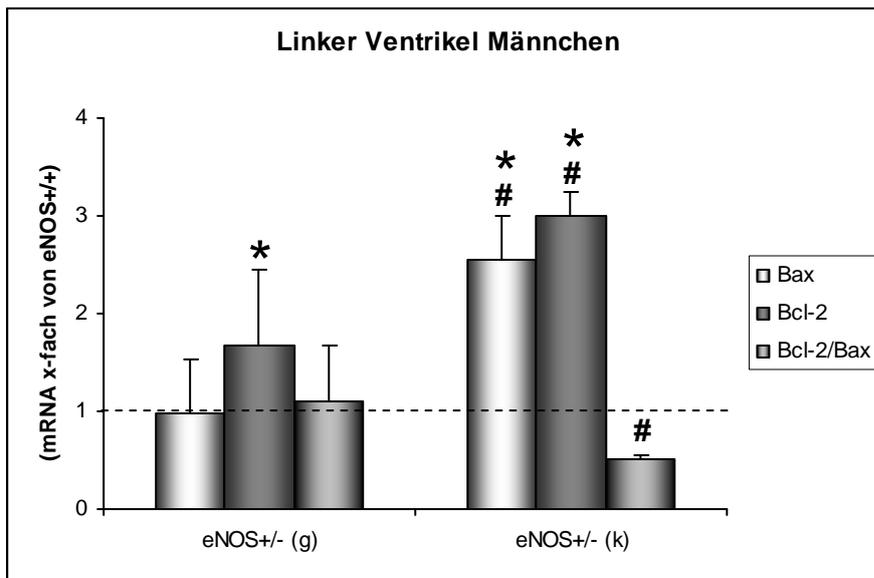


Abb. 4.28 Dargestellt ist die mRNA-Expression für das Protein B-cell Lymphoma-2 (Bcl-2) und das Bcl-2 associated X Protein (Bax), sowie für das Bcl-2-Bax-Verhältnis. Die Daten wurden mittels PCR an Proben der linken Ventrikel der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/-</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup>; # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

In der männlichen Gruppe zeigt sich für die gesunden Tiere eine erhöhte Expression von Bcl-2, die in den kranken Tieren noch verstärkt ist. In der kranken Gruppe ist zusätzlich ein Anstieg von Bax zu sehen, der den Bcl-2-Anstieg übersteigt, so dass das Bcl-2/Bax-Verhältnis erniedrigt ist.

#### 4.4.7 Genexpression von Serca 2A und NCX bei Weibchen und Männchen

Um Rückschlüsse auf die Calciumverfügbarkeit des Herzens ziehen zu können wurde die Genexpression für die Sarkoplasmatische Retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Serca 2A) und den Natrium-Calcium<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX) untersucht.

Bei Serca 2A handelt es sich um eine intrazelluläre Calciumpumpe mit Sitz in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums. Sie wird hauptsächlich in kardialem Gewebe und langsam kontrahierenden Skelettmuskeln exprimiert. Ihre Aufgabe ist der Rücktransport der zytosolischen Calcium<sup>2+</sup>-Ionen in das sarkoplasmatische Retikulum, die im Rahmen des Ca<sup>2+</sup>-induzierten Releases freigesetzt wurden.

Der Natrium-Calcium<sup>2+</sup>-Austauscher ist eine Calcium-Auswärts-Pumpe die in der Zellmembran der Herzmuskelzelle lokalisiert ist.

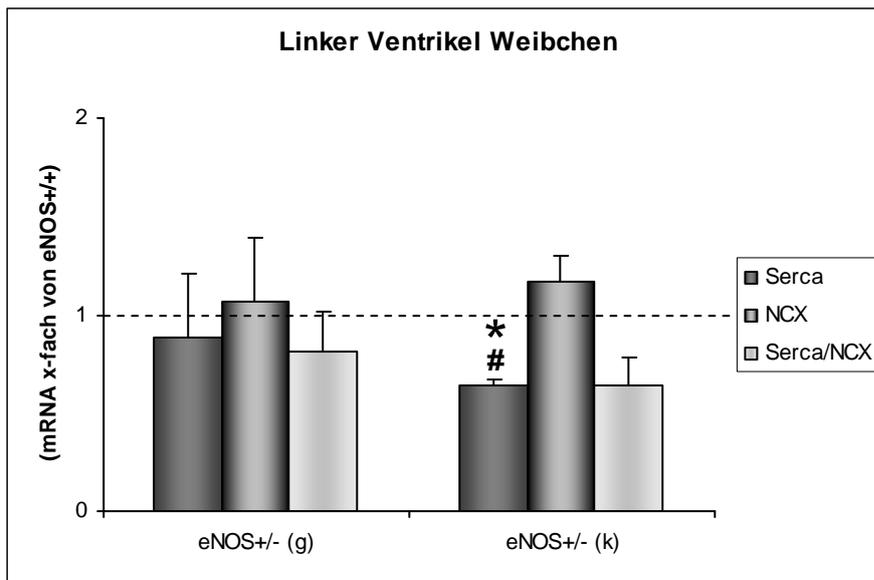


Abb. 4.29 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die sarkoplasmatische Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Serca 2A) und für den Natrium-Calcium<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX), sowie für das Serca 2A-NCX-Verhältnis. Die Daten wurden mittels PCR an Proben der linken Ventrikel der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. # = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/+</sup>; \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup> (g).

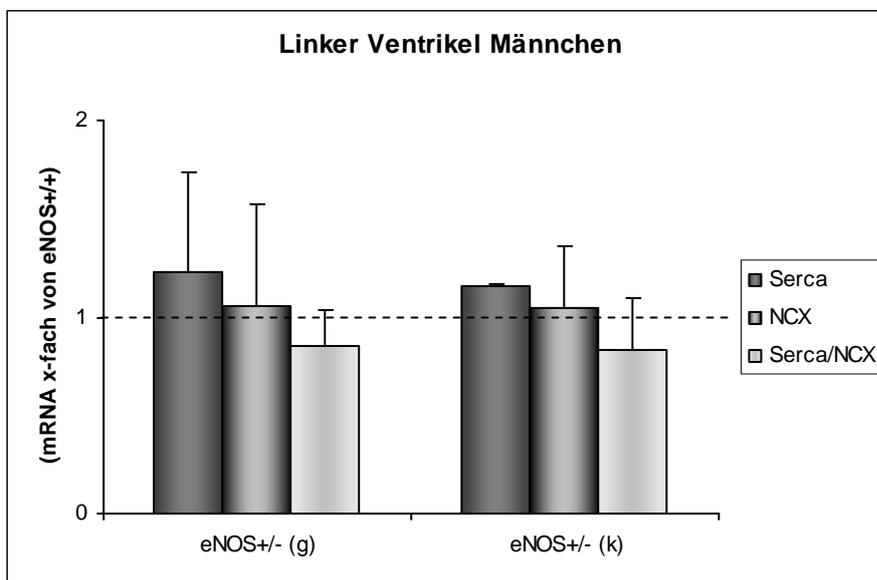


Abb. 4.30 Dargestellt ist die mRNA-Expression für die sarkoplasmatische Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Serca 2A) und für den Natrium-Calcium<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX), sowie für das Serca 2A-NCX-Verhältnis. Die Daten wurden mittels PCR an Proben der linken Ventrikel der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar.

Für die Serca 2A zeigen sich, wie oben dargestellt, nur in der kranken Gruppe der weiblichen Tiere nennenswerte Veränderungen. Hier ist die Expression sowohl im Vergleich mit der Kontrollgruppe, als auch mit den gesunden Tieren signifikant erniedrigt.

Bei den männlichen Tieren finden sich weder in der gesunden, noch in der kranken Gruppe signifikante Veränderungen für die untersuchten Calcium-Handling-Proteine.

#### 4.4.8 Genexpression von Phospholamban bei Weibchen und Männchen

Beim Phospholamban (PLB) handelt es sich um ein integrales Membranprotein des sarkoplasmatischen Retikulums. Im nicht-phosphorylierten Zustand bindet es an die Serca 2A und wirkt auf diese inhibitorisch. Phosphorylierung des PLB hebt diese Inhibition wieder auf.

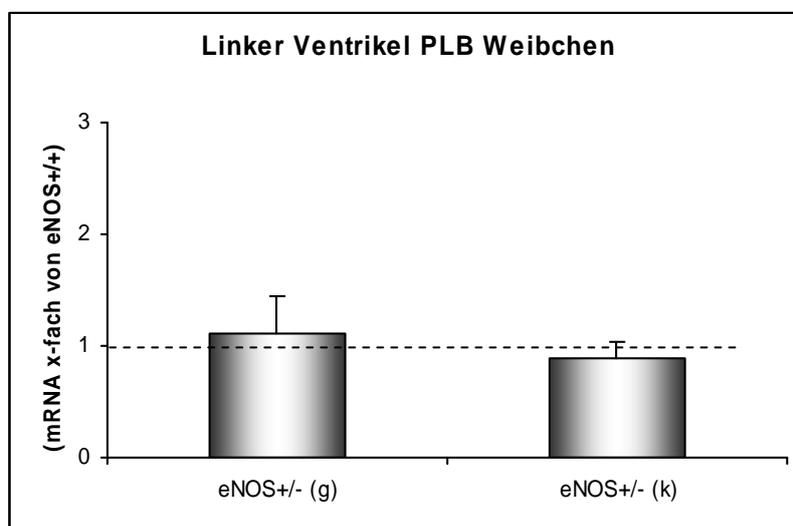


Abb. 4.31 Dargestellt ist die mRNA-Expression für Phospholamban (PLB). Die Daten wurden mittels PCR an Proben der linken Ventrikel der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar.

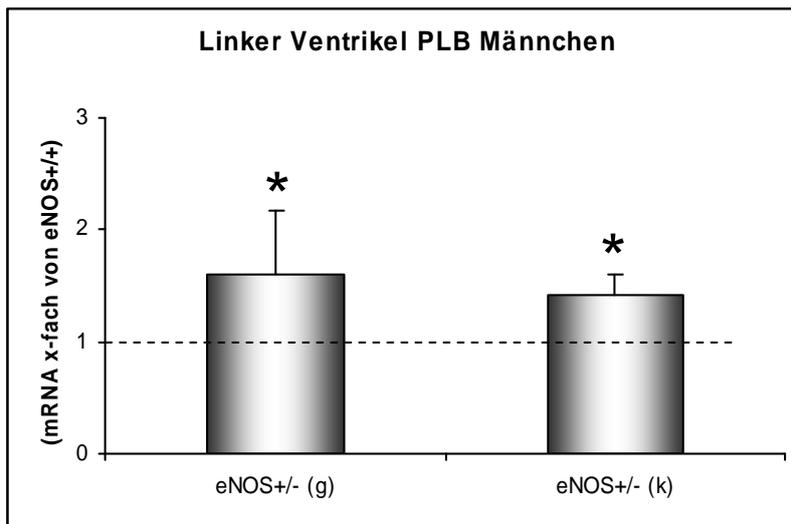


Abb. 4.32 Dargestellt ist die mRNA-Expression für Phospholamban (PLB). Die Daten wurden mittels PCR an Proben der linken Ventrikel der Tiere der F<sub>1</sub>-Generation aus Zuchtansatz A und B erhoben. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/+</sup>.

Für die mRNA Expression von Phospholamban zeigen sich in den weiblichen Tieren keine signifikanten Veränderungen.

Bei den Männchen sind jedoch in beiden Gruppen, gesund und krank, die Expressionswerte erhöht.

#### 4.5 Ergebnisse der Western Blot-Untersuchung

Zur Überprüfung der PCR Ergebnisse wurden Western Blot-Untersuchungen durchgeführt, um die Proteinexpression der oben genannten Marker auf zellulärer Ebene darzustellen. Hierfür wurde ein zweiter Zuchtansatz, identisch zur ersten Zucht mit Ansatz A und B gewählt. Limitierender Faktor war hierbei jedoch eine geringe Zahl an Nachkommen und insgesamt eine geringe zur Verfügung stehende Probenmenge für das Verfahren der Western Blot-Analyse. Daher konnten nicht alle oben genannten Marker hier untersucht werden. Die Untersuchung beschränkte sich somit auf die Expression der Matrixproteine Elastin und Kollagen-1, sowie auf die Apoptosemarker Bax und Bcl-2 und das Calcium-handling Protein Serca 2A. Als Bezugsgröße für die Expression diente auch hier das in der jeweiligen Probe enthaltene Aktin. Die Tiere wurden anhand ihrer Herzmorphologie in hypertroph (H) und nicht hypertroph (NH) eingeteilt, was der Distress-Score Einteilung in krank und gesund entspricht.

##### 4.5.1 **Proteinexpression von Elastin und Kollagen-1 in eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> NTG Tieren**

Für die weiblichen Tiere zeigt sich im linken Ventrikel in der nicht hypertrophen Gruppe eine signifikant erhöhte Kollagen-1 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Elastin/Kollagen-1-Verhältnis ist tendenziell erniedrigt.

Die Gruppe der Tiere mit Hypertrophie weist im Vergleich mit der nicht hypertrophen Gruppe eine signifikant erniedrigte Expression für Elastin auf. Auch hier ist das Elastin/Kollagen-1-Verhältnis zugunsten des Kollagen-1 verschoben.

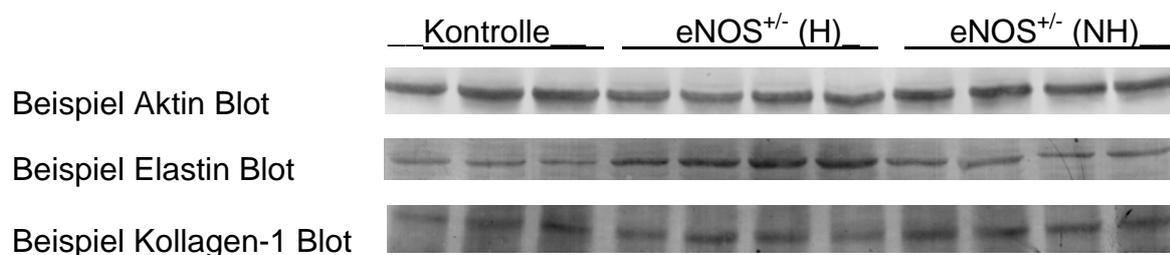


Abb. 4.33a Exemplarische Darstellung von Western Blot Banden für Aktin, Elastin und Kollagen-1 aus dem linken Ventrikel von eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> NTG Weibchen.

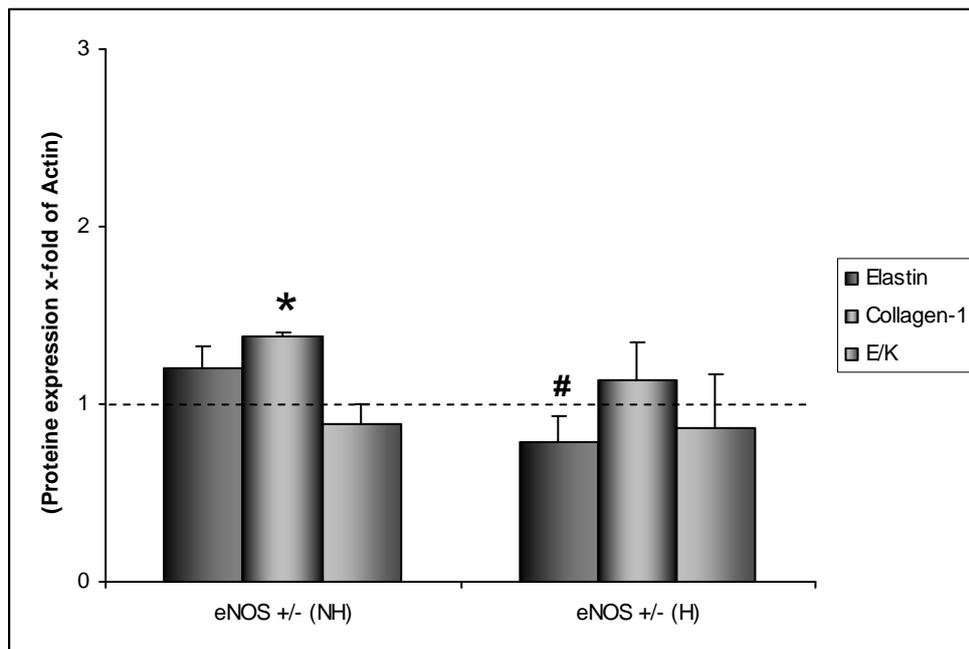


Abb. 4.33b Dargestellt ist die Proteinexpression für Elastin und Kollagen-1 im Bezug auf das in der Probe enthaltene Aktin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben des linken Ventrikels von  $eNOS^{+/+}$  + TGF- $\beta_1$  NTG und  $eNOS^{+/-}$  + TGF- $\beta_1$  NTG Tieren aus Zuchtansatz A und B erhoben. NH = nicht hypertroph; H = hypertroph.  $eNOS^{+/+}$  (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* =  $p < 0,05$  vs.  $eNOS^{+/+}$ ; # =  $p < 0,05$  vs.  $eNOS^{+/-}$  (NH).

#### 4.5.2 Proteinexpression von Elastin und Kollagen-1 in eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> TG Tieren

In den männlichen Tieren zeigen sich keine signifikanten Veränderungen in der Elastin und Kollagen-1 Expression im linken Ventrikel. Es lässt sich jedoch, wie bei den weiblichen Tieren, ein Trend zu vermindertem Elastin-Gehalt und erhöhten Kollagen-1 Werten feststellen.

Das Elastin/Kollagen-1 Verhältnis ist auch hier in beiden Gruppen zugunsten des Kollagen-1 verschoben.

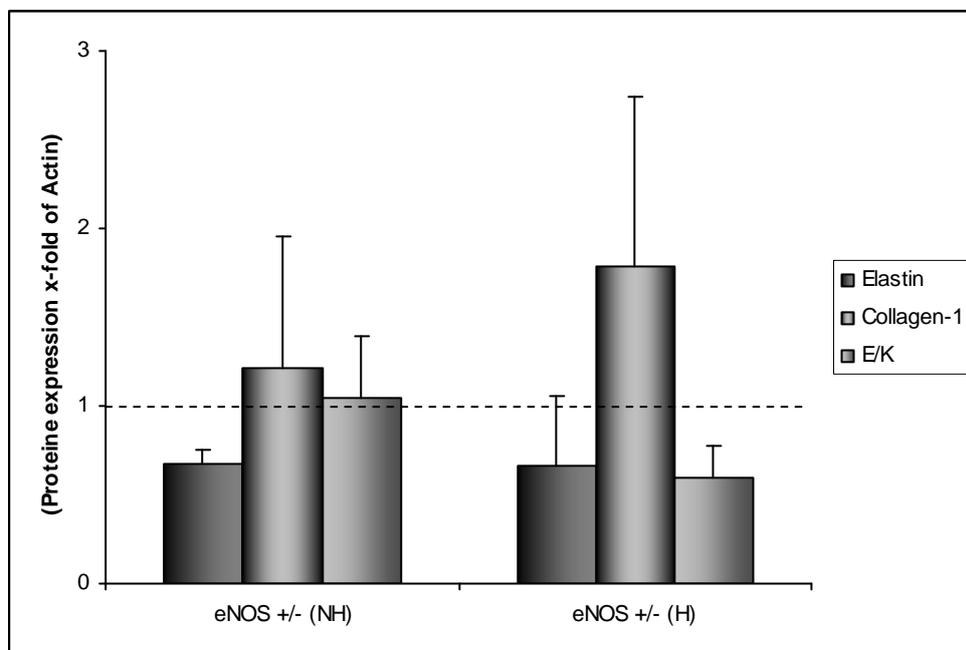


Abb. 4.34 Dargestellt ist die Proteinexpression für Elastin und Kollagen-1 im Bezug auf das in der Probe enthaltene Aktin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben des linken Ventrikels von eNOS<sup>+/+</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> TG und eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> TG Tieren aus Zuchtansatz A und B erhoben. NH = nicht hypertroph; H = hypertroph. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar.

### 4.5.3 Proteinexpression von Bcl-2 und Bax in eNOS<sup>+/-</sup> + TGF-β<sub>1</sub> NTG Tieren

Betrachtet man die Proteinexpression des pro-apoptotisch wirkenden Bax, so zeigen sich für die Gruppe der Tiere ohne Hypertrophie keinen nennenswerten Veränderungen, während die Gruppe mit Hypertrophie signifikant erniedrigte Werte aufweist.

Auch für das anti-apoptotisch wirkende Bcl-2 sind nur die Werte in der Gruppe mit Hypertrophie signifikant verändert, hier erhöht.

Für das Bcl-2/Bax Verhältnis zeigt sich dann in beiden Gruppen eine signifikante Erhöhung im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

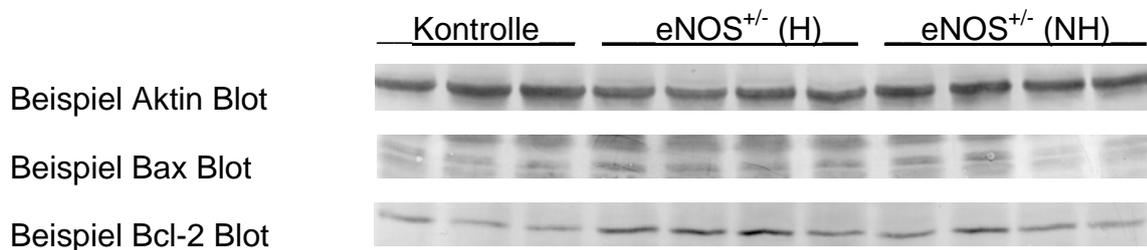


Abb. 4.36a Exemplarische Darstellung von Western Blot Banden für Aktin, Bax und Bcl-2 aus dem linken Ventrikel von eNOS<sup>+/-</sup> + TGF-β<sub>1</sub> NTG Weibchen.

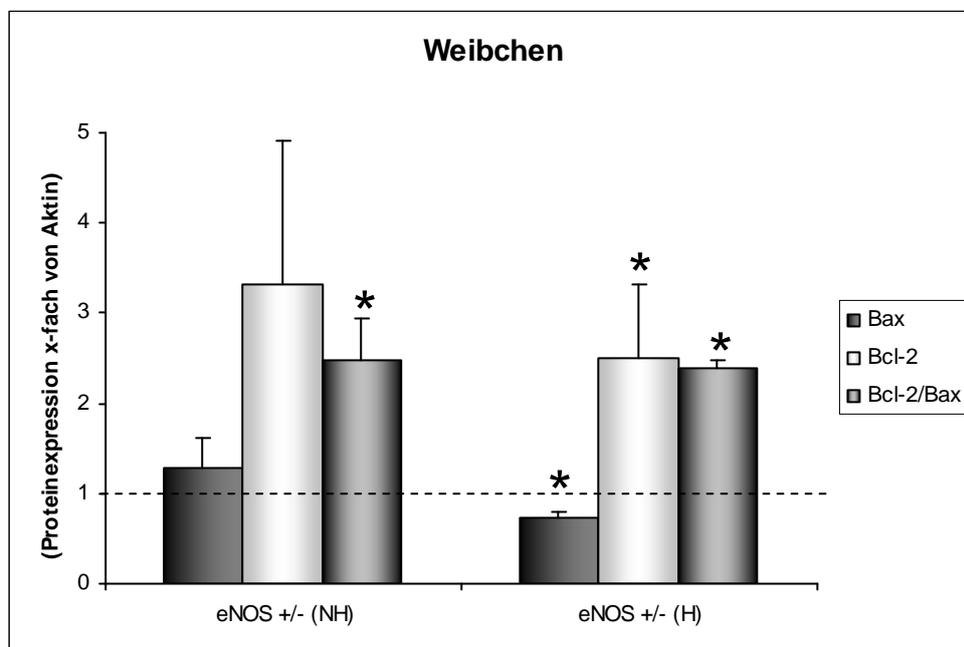


Abb. 4.36b Dargestellt ist die Proteinexpression für Bax und Bcl-2 im Bezug auf das in der Probe enthaltene Aktin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben des linken Ventrikels von eNOS<sup>+/-</sup> + TGF-β<sub>1</sub> NTG und eNOS<sup>+/-</sup> + TGF-β<sub>1</sub> NTG Tieren aus Zuchtansatz A und B erhoben. NH = nicht hypertroph; H = hypertroph. eNOS<sup>+/-</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* = p < 0,05 vs. eNOS<sup>+/-</sup>.

#### 4.5.4 Proteinexpression von Bcl-2 und Bax in eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> TG Tieren

In den männlichen TGF- $\beta$ <sub>1</sub> TG Tieren zeigen sich insgesamt keine signifikanten Veränderungen. Es ist jedoch auch hier ein Trend festzustellen, der in beiden Gruppen erhöhte Werte für die Bcl-2 Expression anzeigt. Das Bcl-2/Bax Verhältnis ist somit auch sowohl in der Gruppe ohne Hypertrophie, als auch in der Gruppe mit Hypertrophie tendenziell zum Bcl-2 hin verschoben.

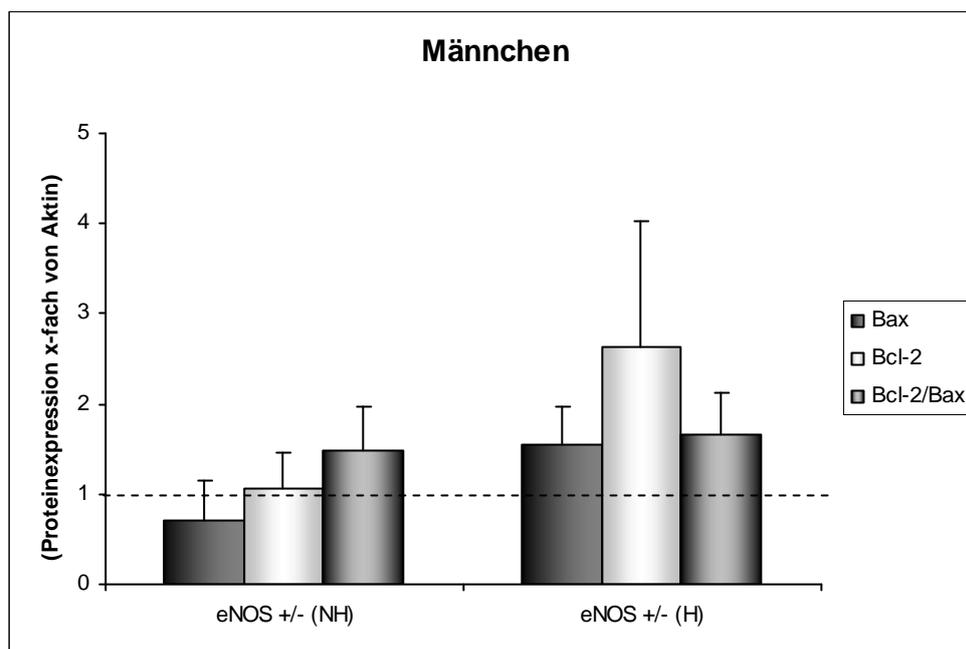


Abb. 4.37 Dargestellt ist die Proteinexpression für Bax und Bcl-2 im Bezug auf das in der Probe enthaltene Aktin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben des linken Ventrikels von eNOS<sup>+/+</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> TG und eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> TG Tieren aus Zuchtansatz A und B erhoben. NH = nicht hypertroph; H = hypertroph. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar.

#### 4.5.5 Proteinexpression von Serca 2A in eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> NTG Tieren

In den weiblichen Tieren zeigt sich im linken Ventrikel in beiden dargestellten Gruppen ein Anstieg in der Expression der Serca 2A auf Proteinebene. Dieser Anstieg ist in der Gruppe der Tiere mit Hypertrophie signifikant verglichen mit der Kontrollgruppe.

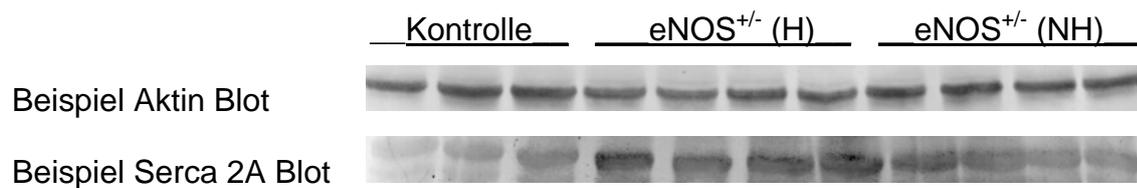


Abb. 4.38a Exemplarische Darstellung von Western Blot Banden für Aktin und Serca 2A aus dem linken Ventrikel von eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> NTG Weibchen.

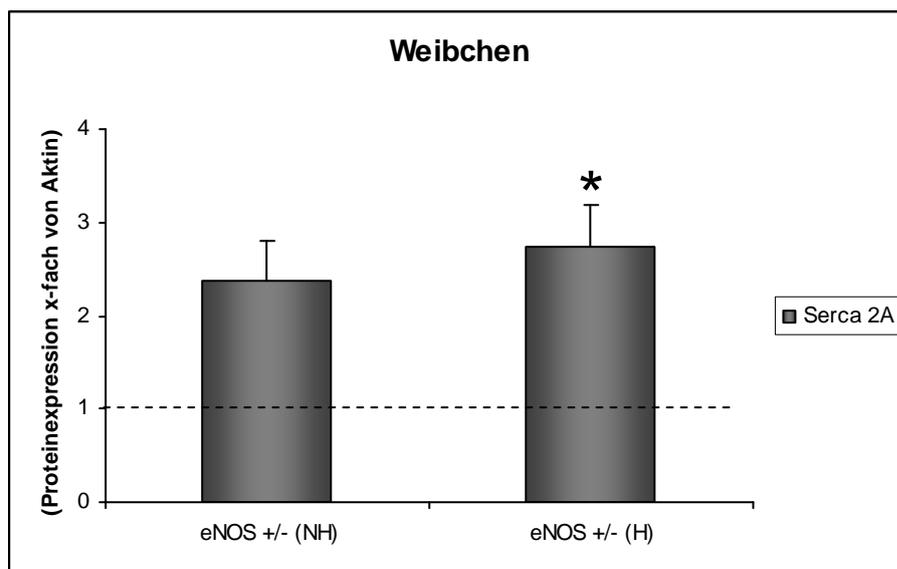


Abb. 4.38b Dargestellt ist die Proteinexpression für Serca 2A im Bezug auf das in der Probe enthaltene Aktin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben des linken Ventrikels von eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> TG und eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> NTG Tieren aus Zuchtansatz A und B erhoben. NH = nicht hypertroph; H = hypertroph. eNOS<sup>+/-</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/-</sup>.

#### 4.5.6 Proteinexpression von Serca 2A in eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> TG Tieren

Für die männlichen Tiere zeigt sich in der Gruppe mit Hypertrophie ein deutlicher Anstieg in der Serca 2A Expression im linken Ventrikel.

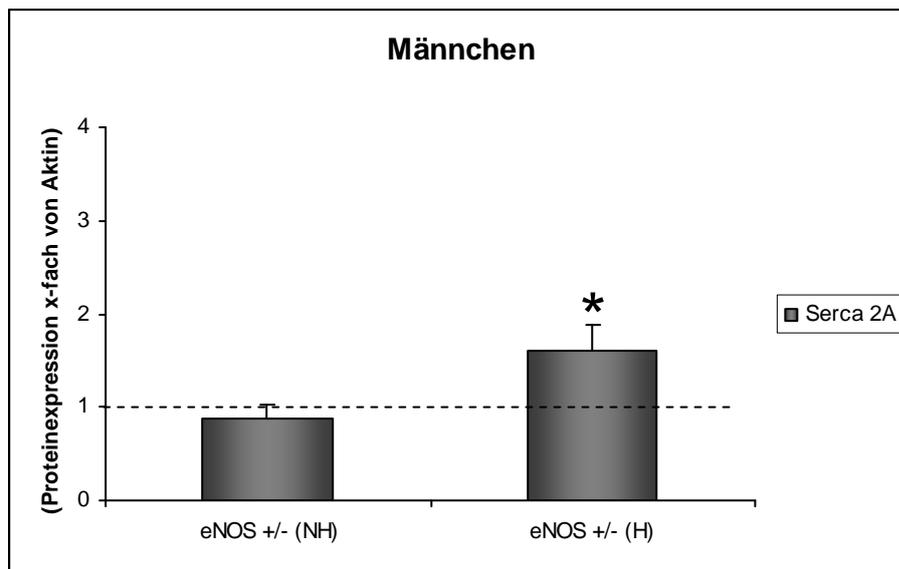


Abb. 4.39 Dargestellt ist die Proteinexpression für Serca 2A im Bezug auf das in der Probe enthaltene Aktin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben des linken Ventrikels von eNOS<sup>+/+</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> TG und eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> TG Tieren aus Zuchtansatz A und B erhoben. NH = nicht hypertroph; H = hypertroph. eNOS<sup>+/+</sup> (dargestellt durch die gestrichelte Linie) stellt die Kontrollgruppe dar. \* =  $p < 0,05$  vs. eNOS<sup>+/+</sup>.

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde anhand eines transgenen Mausmodells gezeigt, dass der Verlust eines eNOS-Allels in vivo ausreicht um bei nahezu 21% der Tiere phänotypisch sichtbare Anzeichen einer Herzinsuffizienz hervorzurufen. Die zusätzliche Überexpression von aktivem hepatozytärem TGF- $\beta_1$  verstärkt die Ausprägung dieser Symptome dabei noch bei 28% der Tiere.

### 5.1 Beurteilung der Zuchtergebnisse und des Gesundheitszustandes

Bei der Betrachtung der Überlebensraten der beiden Zuchtansätze A und B fällt auf, dass in beiden männlichen Gruppen (eNOS<sup>+/+</sup> und eNOS<sup>+/-</sup>) über 20% der Tiere kurz nach dem Absetzen verstarben. In der weiblichen Gruppe kommen nach dem Absetzen keine solchen Verluste vor.

Bei beiden Geschlechtern zeigen sich im Verlauf des Versuches bei einigen Tieren Krankheitssymptome, welche sich bei den Männchen jedoch insgesamt ausgeprägter darstellen (mehr erkrankte Tiere im Verhältnis zu Gesunden und stärker sichtbare Symptome einer Erkrankung). Die Symptome äußerten sich dabei in einer Veränderung der Fellbeschaffenheit (struppig und glanzlos), einem deutlich geringeren Körpergewicht und teilweise in Verhaltensauffälligkeiten (verzögerte Reaktionsbereitschaft).

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung aufkommen, dass der Verlust eines eNOS-Allels ausreichend ist, um bei einigen Tieren den Gesundheitszustand sichtbar zu beeinflussen. Die zusätzliche Überexpression von aktivem TGF- $\beta_1$  verstärkt die Ausprägung der Krankheitssymptome dabei noch erheblich.

Gestützt wird diese Beobachtung von der Untersuchung der Vitalorgane Herz, Lunge und Niere. Hier zeigte sich in der weiblichen Gruppe eine Hypertrophie des Herzens. In frühere Untersuchungen von Huang et al. (1995) zeigten homozygote eNOS knock out Mäuse bereits eine mittlere kardiale Hypertrophie. Diese ging jedoch mit einem erhöhten Blutdruck einher, womit unklar blieb ob die Hypertrophie als Folge des NO-Mangels oder als Folge des erhöhten Blutdruckes anzusehen war. In späteren Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten konnten Wenzel et al.

(2007) jedoch nachweisen, dass ein NO-Mangel durch Blockade der eNOS mit L-NNA zu Hypertrophie unabhängig vom Blutdruckgeschehen führt. Bei den in dieser Studie vorgestellten heterozygoten eNOS Mäusen konnte keine signifikante Erhöhung des Blutdruckes festgestellt werden. Es ist also davon auszugehen, dass die kardiale Hypertrophie bei allen weiblichen eNOS<sup>+/-</sup> Tieren durch die reduzierte NO-Verfügbarkeit als Folge des Fehlens eines eNOS Allels zustande kommt. Der Verlust dieses Allels scheint somit Auswirkungen auf die Morphologie des Herzens zu haben, und zwar unabhängig vom Gesundheitszustand der Tiere.

Bei weiterer Betrachtung der übrigen Organe fällt besonders das erhöhte Lungenfeuchtgewicht ins Auge, welches auf ein Lungenödem und somit auf ein Rückwärtsversagen des Herzens hindeutet. Demnach wäre also nicht nur die Morphologie sondern auch die Funktion des Herzens vom Verlust dieses Allels beeinträchtigt.

Die Nieren der weiblichen heterozygoten Tiere unterschieden sich morphologisch nicht von denen der Wildtyp-Weibchen. Bei der Untersuchung der Serum Creatinin-Spiegel fällt jedoch auf, dass die Gruppe der heterozygoten Tiere insgesamt niedrigere Werte aufweist als die Wildtyp-Tiere. Die glomeruläre Filtrationsrate ist bei allen heterozygoten Tieren signifikant erhöht, was auf eine Hyperfiltration der Niere hindeutet.

Bei den männlichen gesunden Tieren mit eNOS-Defizit (eNOS<sup>+/-</sup> TGF- $\beta_1$  TG) zeigen sich nicht immer Veränderungen, die auf eine Herzinsuffizienz hindeuten. In kranken Tieren kommt es dann aber zu einer massiven Hypertrophie, begleitet von einem erhöhten Lungenfeuchtgewicht und einer Zunahme des Nierengewichtes. Diese Zunahme des Nierengewichtes in der kranken Gruppe geht mit signifikant erniedrigten Serum-Creatinin Werten und einer tendenziell erhöhten glomerulären Filtrationsrate einher. Somit haben wir auch in diesen Tieren Hinweise auf eine renale Hyperfiltration.

Alles in allem bestätigen diese Organbefunde somit die Annahme, die bereits durch die Auswertung des Distress-Scores aufkommt, nämlich dass bei den kranken männlichen Tieren der Krankheitsverlauf insgesamt schwerer erfolgt als in kranken weiblichen Tieren. Somit scheint TGF- $\beta_1$  die Anfälligkeit für die Genese einer Herzinsuffizienz in vivo noch zu erhöhen. Unterstrichen wird diese Hypothese noch wenn man die hohen Verluste nach dem Absetzen in der heterozygoten männlichen Gruppe beachtet.

Durch die Untersuchung der Blutdruckwerte konnte auch in der männlichen Gruppe ausgeschlossen werden, dass die oben genannten Organveränderungen auf einer Hypertonie beruhen.

Der anfangs erwähnte 2. Zuchtansatz (Ansatz C) erbrachte, trotz wiederholter Versuche (3 x 5 Zuchtpaare) und somit hoher Zahl an Elterntieren, insgesamt nur 2 lebend abgesetzte männliche eNOS<sup>-/-</sup> + TGF- $\beta_1$  TG Tiere. Diese mussten zudem vor Ablauf des angestrebten Alters von 6 Monaten aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet werden, da sie massive Krankheitssymptome entwickelten. Anhand dieser geringen Tierzahl können keine genauen Aussagen über die Auswirkungen eines eNOS knock out, kombiniert mit einer TGF- $\beta_1$  Überexpression in vivo getroffen werden.

## **5.2 Beurteilung der PCR und Western Blot Untersuchungen**

### **5.2.1 Fibrosemarker**

Betrachtet man die Ergebnisse der PCR Untersuchung für die weiblichen Tiere, so fällt auf, dass es im Herzen in allen drei Bereichen (Vorhöfe, rechter + linker Ventrikel) zu einer Verschiebung des Elastin/Kollagen-1 Verhältnisses hin zum Elastin kommt. In den kranken Tieren ist dieser Trend noch stärker ausgeprägt als in den Gesunden. Im leichten Widerspruch hierzu stehen die Ergebnisse der Western Blot Untersuchung. Anhand des hohen mRNA Gehaltes würde man auch auf Proteinebene eine verstärkte Elastin Expression erwarten, doch das Gegenteil ist der Fall. Die Werte für Elastin sind in den kranken Tieren eher erniedrigt und das Elastin/Kollagen-1 Verhältnis ist zugunsten des Kollagen-1 verschoben.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es entweder zu Abbauvorgängen an der Matrix kommt, die speziell das Elastin betreffen, oder dass der Syntheseschritt zwischen mRNA und Endprodukt gestört ist. Anscheinend reagiert der Organismus kompensatorisch auf das Fehlen dieses Matrixproteins mit der oben beschriebenen gesteigerten mRNA-Expression.

Eine mögliche Antwort auf diese erniedrigten Elastin-Werte auf Proteinebene könnte die Expression der Matrix-Metalloproteinase 12 geben. Diese wird zwar in den

weiblichen Tieren nicht annähernd so stark exprimiert, wie in den männlichen Tieren, dennoch könnte sie für den Verlust des Elastins verantwortlich sein (s.u).

Die Lungen dieser Tiere zeigen für das Elastin/Kollagen-1 Verhältnis auf mRNA-Ebene ein ähnliches Bild. Auch hier ist der Anteil des Elastins, verglichen mit Kollagen-1 stark erhöht, besonders bei den erkrankten Tieren. Dies lässt vermuten, dass die Lunge auf das beginnende Rückwärtsversagen des Herzens mit einer Erhöhung der Elastizität reagiert um den durch ein Rückwärtsversagen auftretenden pulmonalen Hochdruck zu kompensieren.

Die PCR-Untersuchung des Nierengewebes ergab insgesamt inhomogene Werte für die kranken und gesunden weiblichen Tiere. Die oben erwähnte Hyperfiltration lässt sich somit nicht mit einer Änderung der Matrixstruktur erklären. Es scheinen hier andere Ursachen vorzuliegen, die diese Hyperfiltration auslösen.

In den kranken eNOS heterozygoten TGF- $\beta_1$  überexprimierenden Tieren zeigt sich auf mRNA-Ebene ebenfalls eine Verschiebung des Elastin/Kollagen-1 Verhältnisses hin zum Elastin, sowohl im Herzen, als auch in der Lunge. Doch auch hier konnte, genau wie bei den weiblichen Tieren, auf Proteinebene kein erhöhter Gehalt an Elastin im Herzen nachgewiesen werden. Es scheint in diesen Tieren zu dem gleichen oben genannten Verlust an Elastin zu kommen. Bei allen heterozygoten männlichen Tieren ist im direkten Vergleich zu den weiblichen Tieren auf mRNA-Ebene die Expression der MMP-12 erhöht. Die MMP-12 (auch HME, Human Macrophage Elastase) wird von Macrophagen sezerniert und gehört genetisch zur Familie der Metalloproteinasen. Sie zeigt vornehmlich elastolytische Aktivität, hat jedoch eine breite Substratspezifität (Belaouaj et al., 1995). Dies könnte eine mögliche Erklärung für den Verlust an Elastin auf Proteinebene sein.

Auch die übrigen extrazellulären Matrixproteine zeigen leichte Veränderungen, besonders in der kranken Gruppe. Es lässt sich jedoch bei keinem der untersuchten Proteine ein so einheitlicher Trend wie für das Elastin und das Kollagen-1 erkennen.

### 5.2.2 Hypertrophiemarker

Aus den Daten für die ODC-Expression geht hervor, dass diese in allen Tieren vermehrt exprimiert wird. Interessanterweise zeigt sich in beiden Geschlechtern ein massiver Anstieg in den kranken Tieren.

Die Ornithin-Decarboxylase ist das limitierende Enzym im Polyamin-Stoffwechsel. Frühere Untersuchungen konnten eine Induktion der ODC bei  $\beta$ -adrenerg vermittelter Herzinsuffizienz in vivo nachweisen (Bartolome et al., 1980).

Betrachtet man nun den Argininstoffwechsel, so zeigt sich, dass Arginin sowohl für die endotheliale NO-Synthase, als auch für die ODC (hier indirekt über Ornithin) als Substrat dient. Ausgehend von dieser Betrachtung stellt sich die Frage, ob und inwieweit diese beiden Enzyme um das Arginin konkurrieren und ob die Entwicklung einer Herzinsuffizienz Auswirkungen auf die Verhältnisse hat.

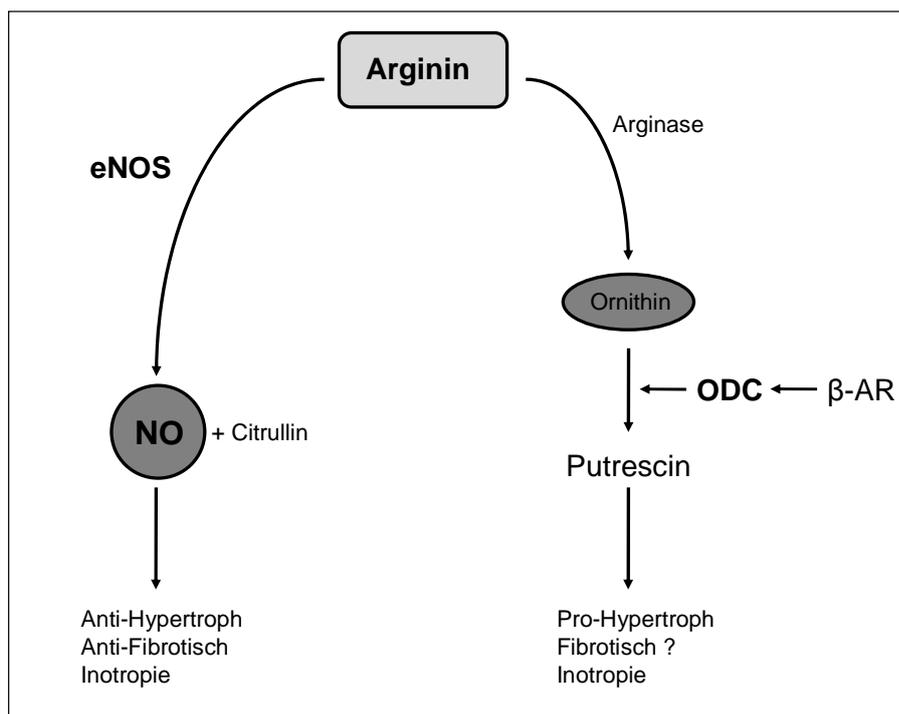


Abb. 5.1 Darstellung des Argininstoffwechsels im Bezug auf die beiden Enzyme endotheliale NO-Synthase (eNOS) und Ornithin-Decarboxylase (ODC).

Bei Betrachtung der weiblichen  $eNOS^{+/-}$  Tiere zeigen die gesunden Tiere bereits erhöhte Werte für die ODC-Expression. Diese Ergebnisse decken sich mit den Organbefunden, wo schon in den gesunden Tieren eine Hypertrophie sichtbar war. Das  $eNOS/ODC$ -Verhältnis dieser Tiere unterschied sich nicht signifikant von dem

der Kontrollgruppe. Da diese Weibchen jedoch ein eNOS-Allel weniger besitzen als die Tiere der Kontrollgruppe lässt sich daraus folgern, dass es in diesen Tieren zu einer verstärkten Expression der eNOS kommen muss um den Verlust dieses Allels auszugleichen. Hieraus ergibt sich folgende Hypothese: Im gesunden Herzen zeigt die endotheliale NO-Synthase eine normale Basalaktivität, während die Aktivität der Ornithindecaboxylase heruntergefahren ist. Entwickelt sich nun eine Herzinsuffizienz kommt es über  $\beta$ -adrenerge Stimulation zur Induktion der ODC. Gleichzeitig wird die Expression der eNOS erhöht um der Konkurrenz um das Substrat (Arginin) entgegenzuwirken.

In den kranken weiblichen Tieren kippt das eNOS/ODC-Verhältnisse zugunsten der ODC. Der Organismus scheint hier nicht mehr in der Lage zu sein der gesteigerten ODC-Expression entgegenzuwirken.

eNOS ↑	Normal	ODC ↓
eNOS ↑↑	Kompensiert	ODC ↑
eNOS ↑	Dekompensiert	ODC ↑

Abb. 5.2 Mögliche Wechselbeziehung zwischen eNOS-Aktivität und Aktivität der Ornithin-Decarboxylase im normalen Herzen und bei kompensierter und dekompenzierter Herzinsuffizienz.

Beachtet man, dass die gesunden Tiere normale TGF- $\beta_1$ -Expression zeigten, diese aber in den kranken Tieren erniedrigt war, decken sich die genannten Ergebnisse mit früheren Untersuchungen, wonach TGF- $\beta_1$  die eNOS-Expression erhöht. Inoue et al. (1995) wiesen an bovinen Endothelzellen eine Hochregulation der eNOS-Expression nach Stimulation mit TGF- $\beta_1$  nach. Spätere Untersuchungen von Schwartz et al. (2005) zeigten, dass TGF- $\beta_1$  an humanen Endothelzellen der Nabelschnur nicht nur die eNOS-Expression, sondern auch die eNOS-Aktivität steigerte.

Durch die Einkreuzung einer TGF- $\beta_1$ -Überexpression in den männlichen Tieren, zeigt sich erwartungsgemäß ein Anstieg der ODC. In Versuchen an isolierten Herzmuskelzellen konnte in der Vergangenheit nachgewiesen werden, dass TGF- $\beta_1$

zu einer Induktion der ODC führt (Schlüter et al., 2000). Diese Ergebnisse decken sich zunächst nicht mit den Ergebnissen der Organuntersuchung der gesunden eNOS<sup>+/-</sup> Männchen, die tendenziell ein eher erniedrigtes Herzgewicht im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigten. Es scheint hier also einen Mechanismus zu geben, der einer Hypertrophie durch erhöhte ODC-Expression entgegenwirkt. Eine Antwort könnte in der vermehrten eNOS-Expression durch TGF- $\beta_1$  liegen. Vergleicht man die eNOS-Expressionsdaten der gesunden Männchen mit denen der weiblichen Kontrolltiere, so ist die Expression bei den Männchen signifikant erhöht. Es scheint hier also im Stadium der kompensierten Herzinsuffizienz ein protektiver Effekt von TGF- $\beta_1$  über eine Induktion der eNOS vorzuliegen. Diese Annahme deckt sich mit früheren Überlegungen von Schwartz et al. (2005), die eine Beeinflussung der eNOS-Aktivität durch TGF- $\beta_1$  als einen potentiell physiologisch wichtigen Regulationsmechanismus diskutierten.

Beim Übergang zur dekompenzierten Herzinsuffizienz kippen jedoch auch bei diesen Tiere die Verhältnisse. Dies äußert sich in einer Hyperinduktion der ODC und signifikant verminderter eNOS-Expression verglichen mit den gesunden Tieren. TGF- $\beta_1$  scheint also beim Übergang zur dekompenzierten Herzinsuffizienz verstärkt hypertroph zu wirken.

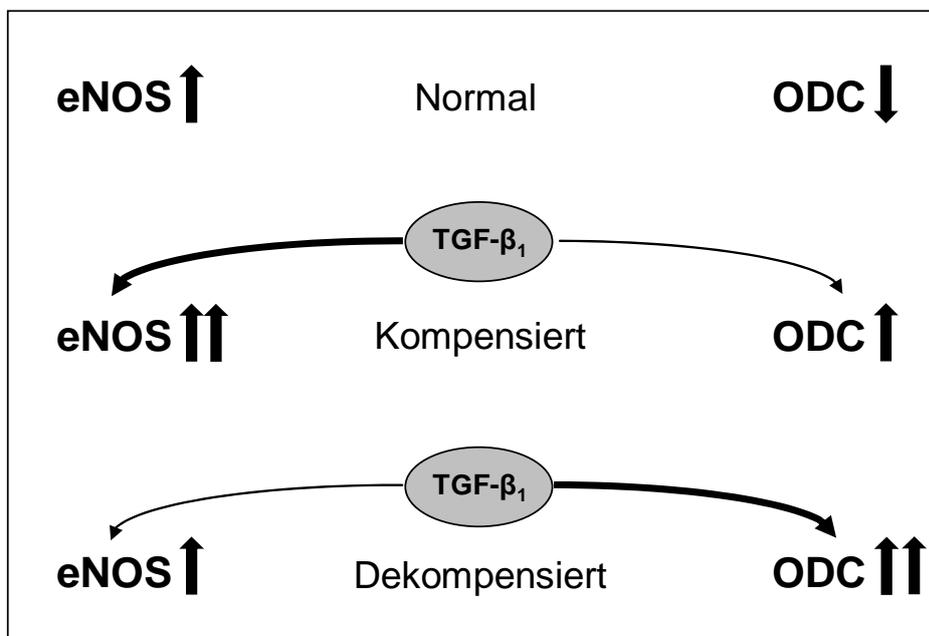


Abb. 5.3 Mögliche Wechselbeziehung zwischen eNOS-Aktivität und Aktivität der Ornithin-Decarboxylase im normalen Herzen und bei kompensierter und dekompenzierter Herzinsuffizienz unter dem zusätzlichen Einfluss von TGF- $\beta_1$

Neben der ODC-Expression interessierte auch die Expression weiterer Hypertrophieparameter, in diesem Fall von ANP (Atriales Natriuretisches Peptid) und BNP (Brain Natriuretic Peptide). Hier zeigte sich für die weiblichen Tiere insgesamt eine Erhöhung des ANP im linken Ventrikel in beiden Gruppen, während bei den männlichen Tieren in beiden Gruppen das BNP erhöht war. Der interessantere Parameter, der auch in der Diagnostik zu Einsatz kommt ist hier das BNP.

BNP wird in der Klinik zur Diagnose der Herzinsuffizienz eingesetzt, wobei die Höhe des BNP im Plasma mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz korreliert (Conference Report, Asian Pacific Congress of Heart Failure, 2008). Da es sich bei den untersuchten Proben um Herzgewebe aus dem linken Ventrikel der Tiere handelt, können keine eindeutigen Aussagen über den Gehalt an BNP im Plasma gemacht werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass die gesteigerte mRNA Expression im Ventrikel zu erhöhten Plasma-Werten führt. Somit würde sich hier bereits in den gesunden Tieren ein Hinweis auf das Beginnen einer Herzinsuffizienz zeigen, die jedoch durch die oben genannten Vorgänge möglicherweise noch kompensiert werden kann.

### 5.2.3 Apoptosemarker

Die Untersuchung der Apoptosemarker Bax und Bcl-2 ergab für die heterozygoten weiblichen Tiere auf mRNA-Ebene eine Verschiebung des Bcl-2/Bax-Verhältnisses hin zum pro-apoptotisch wirkenden Bax in den kranken Tieren.

Für die männlichen Tiere ergibt sich in der PCR-Untersuchung auch hier ein anderes, zunächst unerwartetes Bild. Anhand vorangegangener *in vitro* Untersuchungen, die eine pro-apoptotische Wirkung von TGF- $\beta_1$  in Kardiomyozyten zeigten (Schneiders et al., 2005) würde man eine verstärkte Expression des pro-apoptotischen Bax erwarten. Es zeigt sich jedoch in beiden heterozygoten Gruppen (gesund und krank) eine verstärkte Expression des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2. Unter Berücksichtigung der oben genannten Untersuchungen könnte eine mögliche Antwort auch hier in einer verstärkten Expression und Aktivität der eNOS durch TGF- $\beta_1$  liegen. In verschiedenen Studien wird NO als bifunktionaler Regulator der Apoptose diskutiert (Kim et al., 1999). Einige Arbeitsgruppen wiesen anti-apoptotische Effekte an vaskulären Endothelzellen (Dimmeler et al., 1997), Hepatozyten (Kim et al.,

1997), eosinophilen Granulozyten (Hebestreit et al., 1998) und Zellen der Milz (Genaro et al., 1995) nach. Andere Gruppen wiederum zeigten, dass NO Apoptose an glatten Gefäßmuskelzellen (Lincoln et al., 1996), Makrophagen (Albina et al., 1993) und Neuronen (Heneka et al., 1998) induzieren kann. Über die regulatorische Rolle von NO im Bezug auf die Apoptose von Kardiomyozyten finden sich in der Literatur nur Hinweise darauf, dass hohe Konzentrationen von NO in Kardiomyozyten Apoptose induzieren können (Taimor et al., 2001; Ing et al., 1999). Da es sich hierbei jedoch um in vitro Daten handelt, lassen sich diese Ergebnisse nicht zwangsläufig auf das vorliegende in vivo-Model übertragen. Hinzu kommt die Tatsache, dass selbst durch eine Induktion der eNOS über TGF- $\beta_1$  das Allel-Defizit in diesen Tieren nicht in solchem Maße ausgeglichen werden kann, um die in-vitro Konzentrationen der genannten Versuche annähernd zu erreichen. Man kann hier also nur die Vermutung aufwerfen, dass NO in Kardiomyozyten ähnlich wie in vaskulären Endothelzellen in niedrigen Konzentrationen eher anti-apoptotische Effekte hat.

Der anti-apoptotische Trend setzt sich in den TGF- $\beta_1$  TG kranken Tieren fort. Es scheint hier also Kompensationsmechanismen zu geben, die der Apoptose entgegenwirken. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Induktion der eNOS über TGF- $\beta_1$  hier selbst in den kranken Tieren noch ausreichend ist um einer verstärkten Apoptose entgegenzuwirken. Um eine genaue Aussage treffen zu können wären hier jedoch weitere Untersuchungen nötig.

#### 5.2.4 Calcium-Handling Proteine

Bei den weiblichen Tieren zeigt sich auf mRNA-Ebene besonders in der kranken Gruppe eine signifikant verminderte Expression der Sarcoplasmatischen Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Serca 2A). Dem gegenüber steht eine vermehrte Expression des Natrium-Calcium-Austauschers (NCX). Sowohl die Serca 2A, als auch der NCX sind für den Calciumtransport aus dem Zytosol am Ende der Kontraktionsphase verantwortlich. Die Serca 2A pumpt dabei den mengenmäßig größeren Anteil des zuvor in der Kontraktion freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  in das sarkoplasmatische Retikulum, wo es dann für den nächsten Kontraktionszyklus zur Verfügung steht. Speziesabhängig werden dabei 70 – 92% des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  von der Serca 2A transportiert (Bers et al., 1996).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass es bei Herzinsuffizienz zu einer verminderten Expression der Serca 2A in Herzmuskelzellen kommt (De la Bastie et al., 1990; Mercadier et al., 1990). Kompensatorisch wird die Expression des Natrium-Calcium-Austauschers erhöht um das  $\text{Ca}^{2+}$  am Ende der Kontraktion aus der Zelle zu schleusen und die Relaxation zu ermöglichen.

In den TGF- $\beta_1$  TG Männchen zeigen sich zunächst keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Expression für die Serca 2A und den NCX. Der Trend geht hier jedoch zu einer Erhöhung der Expression der Serca 2A und einem leicht erhöhten Serca 2A/NCX-Verhältnis.

Auf Proteinebene zeigt sich, sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren, ein Anstieg der Serca 2A Expression besonders in den Gruppen mit Hypertrophie.

Zu beachten ist hierbei jedoch, dass auch die mRNA Expression von Phospholamban erhöht ist. Da Phospholamban im nicht-phosphorylierten Zustand inhibitorisch auf die Serca 2A wirkt, wäre es hier durchaus möglich, dass die männlichen Tiere trotz verstärkter Serca 2A-Expression keine erhöhte Serca 2A-Aktivität zeigen. Hierzu müsste auf Proteinebene abgeklärt werden ob das Phospholamban im phosphorylierten oder im nicht-phosphorylierten Zustand vorliegt.

### 5.2.5 Gewebespezifische Veränderungen

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Kombination von eNOS-Defizit und TGF- $\beta_1$  Überexpression in allen untersuchten Geweben zu mehr oder weniger starken Veränderungen führt. Da im vorangegangenen Teil hauptsächlich der linke Ventrikel im Fokus der Diskussion stand, soll hier noch einmal auf die Veränderungen in den restlichen, ebenfalls untersuchten Geweben eingegangen werden.

Für die Niere zeigten sich bei der Untersuchung der Serum-Creatinin Werte Hinweise auf eine renale Hyperfiltration. Dies warf die Vermutung einer Veränderung der Matrix-Struktur im Nierengewebe auf, die zu einer solchen Hyperfiltration führen könnte. In der PCR-Untersuchung ergeben sich jedoch keine eindeutigen Hinweise auf das tatsächliche Vorliegen einer Veränderung der Matrix-Struktur. Jedoch sind die natriuretischen Peptide ANP und BNP erhöht, die sich insgesamt auf den

Flüssigkeitshaushalt des Körpers auswirken und die Flüssigkeitsausscheidung über die Nieren erhöhen. Dies könnte also eine mögliche Antwort für die Hyperfiltration darstellen. Hier wären jedoch weitere Untersuchungen nötig um die Ursache der Hyperfiltration eindeutig zu identifizieren.

Bei der Lunge deutete schon die Organuntersuchung auf ein Lungenödem und somit auf ein Rückwärtsversagen des Herzens hin, besonders in den kranken Tieren beider Geschlechter. Diese Annahme bestätigt sich in der PCR-Untersuchung; hier zeigt sich, besonders für die kranken Tiere eine signifikante Erhöhung der Elastin Expression. Dies deutet auf kompensatorische Prozesse in der Lunge hin, wahrscheinlich um den durch das Rückwärtsversagen entstehenden pulmonalen Hochdruck zu kompensieren.

Die Untersuchung der Vorhöfe zeigt in beiden Geschlechtern die meisten Veränderungen in den kranken Tieren. Interessanterweise ist die Expression der Matrixproteine in den kranken eNOS<sup>+/-</sup> TGF- $\beta_1$  NTG Weibchen insgesamt eher erniedrigt, wohingegen sie in den kranken eNOS<sup>+/-</sup> TGF- $\beta_1$  TG Männchen eher erhöht ist. Es scheint hier in beiden Gruppen zu Remodeling-Prozessen zu kommen, die jedoch in unterschiedliche Richtungen laufen. Ob, und inwieweit diese Veränderungen sich auf die atriale Erregungsübertragung auswirken und somit evtl. zu Funktionsstörungen wie Arrhythmiebildung beitragen wäre hier in weiteren Untersuchungen abzuklären.

Auch für den rechten Ventrikel zeigen sich in beiden Geschlechtern Veränderungen der Matrixstruktur, die sich jedoch insgesamt sehr inhomogen darstellen. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Veränderungen mit kompensatorischen Remodeling-Prozessen in Verbindung stehen, für eine genaue Aussage müssten jedoch auch hier weitere Untersuchungen stattfinden.

## 6. Zusammenfassung

Verschiedene wissenschaftliche Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass es beim Übergang von kompensierter zu dekomensierter Herzinsuffizienz zu einem Anstieg von TGF- $\beta_1$  in Herzmuskelzellen kommt. Ebenso sinkt die NO Verfügbarkeit. In der vorliegenden Studie wurde anhand eines transgenen Maus-Modells die Theorie untersucht, ob die Kombination von eNOS-Defizit und TGF- $\beta_1$  Überexpression in vivo zur Induktion einer Herzinsuffizienz führt und inwieweit die Struktur der extrazellulären Matrix hiervon betroffen ist.

Hierzu wurden weibliche eNOS-knock out Mäuse mit männlichen Mäusen, die einer hepatozytären Überexpression von aktivem TGF- $\beta_1$  unterliegen, gekreuzt. In der 1. Nachkommengeneration entstanden so weibliche eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta_1$  NTG und männliche eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta_1$  TG Tiere. Diese wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten beobachtet, wobei mittels eines speziellen Distress Score Schemas der Gesundheitszustand ständig überprüft wurde. Blutdruckdaten und Serum-Creatinin-Werte wurden bestimmt und anschließend wurden die Vitalorgane Herz, Lunge und Niere mittels PCR und Western Blot Verfahren auf Fibrosemarker, Hypertrophieparameter, Apoptosemarker und Calcium-Handling Proteine untersucht. Insgesamt zeigten sowohl in der weiblichen, als auch in der männlichen Gruppe, einige Tiere phänotypisch sichtbare Anzeichen einer Erkrankung, wobei die männlichen Tiere insgesamt stärker erkrankten als die weiblichen Tiere, die keiner TGF- $\beta_1$  Überexpression unterlagen. Auch die Untersuchung der Organe Herz und Lunge zeigte in beiden Gruppen der erkrankten Tiere, besonders aber bei den erkrankten männlichen eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta_1$  TG Tieren, deutliche Hinweise auf das Vorhandensein einer Herzinsuffizienz. Die PCR und Western Blot Untersuchung ergab schließlich Hinweise darauf, dass besonders in den kranken Tieren die Matrixstruktur Veränderungen aufwies, die auf Remodeling-Prozesse sowohl im Herzen, als auch in der Lunge hindeuten. Des Weiteren zeigte sich, dass besonders die kranken Tiere insgesamt einer deutlichen Herzhypertrophie unterlagen. Interessanterweise zeigten jedoch die gesunden Männchen, im Gegensatz zu den gesunden Weibchen, kaum Hinweise die auf eine beginnende Herzinsuffizienz hindeuten, was die Vermutung nahe legt, dass TGF- $\beta_1$  bei einem eingeschränkten eNOS-Status durchaus positive Effekte auf den Vitalzustand der Tiere haben kann.

Auch die Untersuchung der Apoptosemarker zeigte in den eNOS<sup>+/-</sup> + TGF-β<sub>1</sub> TG Tieren eher Tendenzen zu anti-apoptotischen Effekten. Über die Calciumverfügbarkeit konnten keine genauen Aussagen getroffen werden, hier sind weitere Untersuchungen nötig. Allerdings findet sich der erwartete Trend von verminderter Serca 2A und gesteigerter NCX Expression.

Schlussfolgerung: Die eingeschränkte Verfügbarkeit von NO aufgrund eines heterozygoten eNOS-Genotyps war ausreichend, um in vivo bei ca. 1/5 der Tiere phänotypisch sichtbare Anzeichen einer Erkrankung auszulösen, die sich in weiteren Untersuchungen bestätigten. Die zusätzliche Überexpression von aktivem TGF-β<sub>1</sub> führte bei über einem Viertel der Tiere zu schweren Krankheitserscheinungen. Da die restlichen eNOS<sup>+/-</sup> + TGF-β<sub>1</sub> TG Tiere phänotypisch gesund waren, scheint TGF-β<sub>1</sub> in gewissem Maße und für einen gewissen Zeitraum das eNOS-Defizit kompensieren zu können.

## 7. Summary

In recent years, several studies have shown that at the transition from compensated to decompensated heart failure TGF- $\beta_1$  is increased in cardiomyocytes. In the same way the NO availability is reduced. In the study at hand we used a transgene mouse model to investigate the theory, whether the combination of eNOS deficiency and TGF- $\beta_1$  overexpression causes heart failure in vivo, and in how far the structure of extracellular matrix proteins is involved in this process.

Therefore we crossed female eNOS knock out mice with male mice that had a constitutive release of active TGF- $\beta_1$  from hepatocytes. This resulted in female eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta_1$  NTG and male eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta_1$  TG mice in the first generation. These mice were monitored over a period of 6 month, in which we regularly checked vitality and clinical signs with a special distress score scheme. Furthermore blood pressure and serum creatinin level were taken. In the end we examined the internal organs heart, lung and kidneys with real time PCR and Western Blot analysis, with look on fibrotic markers, hypertrophic markers, markers for apoptosis and calcium handling proteins.

All in all in both groups, female and male, some animals developed clinical signs of illness, whereas the male mice showed more severe illness than the female mice without TGF- $\beta_1$  overexpression. The examination of the internal organs heart and lung gave high evidence, especially in the male eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta_1$  TG group, for the existence of a manifest heart failure. PCR and Western Blot analysis gave hints for remodelling processes in the matrix structure, especially in the heart and lungs of the sick animals. Furthermore the sick animals showed strong hypertrophy. Interestingly the healthy male mice, in contrast to the healthy female mice, barely showed signs of beginning heart failure. This brought up the assumption that TGF- $\beta_1$  in combination with a restricted eNOS status might have quite positive effects on the vitality of these animals. The investigation of markers for apoptosis showed rather anti-apoptotic effects in the male eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta_1$  TG mice, too. About the calcium availability we can not make a safe statement, here further analysis is required. However, the expected decrease in Serca 2A and increase in NCX expression was found.

Conclusion: Reduced availability of NO, because of a heterozygous eNOS genotype, is sufficient to induce phenotypic clinical signs of heart failure in nearly 20% of the

animals. The signs were confirmed in further examinations. The overexpression of active TGF- $\beta_1$ , on top of eNOS heterozygous gene status, led to severe illness in more than 25% of the animals. Because of the phenomenon that the rest of the eNOS<sup>+/-</sup> + TGF- $\beta_1$  TG mice were phenotypic healthy, we assumed that TGF- $\beta_1$  might be able to compensate an eNOS deficit in some degree and for some time.

## 8. Literaturverzeichnis

Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 1993; 150: 5080-5085.

Awolesi MA, Sessa WC, Sumpio BE. Cyclic Strain Upregulates Nitric Oxide Synthase in Cultured Bovine Aortic Endothelial Cells. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 1449-1454.

Bartolome J, Guguenard J, Slotkin TA. Role of ornithine decarboxylase in cardiac growth and hypertrophy. *Scienc*e, 1980; 210: 793-794.

Belaouaj A, Shipley JM, Kobayashi DK, Zimonjic DB, Popescu N, Silverman GA, Shapiro SD. Human Macrophage Metalloelastase- Genomic Organization, Chromosomal Location, Gene Linkage, and Tissue-Specific Expression. *J. Biol. Chemi.* 1995; Vol. 270, No. 24: 14568-14575.

Bers DM, Bassani JW, Bassani RA. Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1996; 779: 430-442.

Border WA, Noble NA. Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331: 1286-1292.

Boulanger CM, Vanhoutte PM. G proteins and endothelium-dependent relaxation. *J. Vasc. Res.* 1997; 34: 175-185.

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N. Engl. J. Med.*, 1982; 307: 205-211.

Brum PC, Rolim NPL, Bacurau AVN, Medeiros A. Neurohumoral activation in heart failure: The role of adrenergic receptors. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2006; 78(3): 485-503.

Cheng J, Grande J.P. Transforming growth factor- $\beta$  signal transduction and progressive renal disease. *Exp. Biol. Med.* 2002; 227: 943-956.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodelling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodelling. Behalf on an international forum on cardiac remodelling. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2000; 35: 569-582.

Conference Report from the symposium held during the 4<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Heart Failure. Expanding role of biomarkers in the management of heart failure and cardiorenal syndrome. Published by Elsevier Australia, 2008; pp 3-6.

De la Bastie D, Levitsky D, Rappaport L, Mercadier JJ, Marotte F, Wisnewsky C, Brovkovich V, Schwartz K, Lompre AM. Function of the Sarcoplasmic Reticulum and Expression of Its  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Gene in Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy in the Rat. *Circ. Res.* 1990; 66: 554-564.

Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1-beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 601-607.

ESC Guidelines 2008. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos GS, McMurray JJV, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2008; 10: 933-989.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. *Nature.* 1980; 288: 373-376.

Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martinez C, Bosca L. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 1884-1890.

Grande J.P. Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair. *Exp. Biol. Med.* 1997; 214: 27-40.

Hebestreit H, Dibbert B, Balatti I, et al. Disruption of fas receptor signalling by nitric oxide in eosinophils. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 415-425.

Heneka MT, Loschmann PA, Gleichmann M, et al. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *J. Neurochem.* 1998; 71: 88-94.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature.* 1995; 377: 239-242.

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.* 1987; 61: 866-879.

Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, Webster KA, Bishopric NH. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. *Circ. Res.* 1999; 84: 21-33.

Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, Ohara Y, Murphy TJ, Harrison DG. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15: 1255-1261.

Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper H, Noack E, Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1988; 154: 236-244.

Khyse-Anderson J. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1984; 10(3-4): 203-209.

Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 1402-1411.

Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ. Res.* 1999; 84: 253-256.

Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer CE, Ihrig-Biedert I, Li H, Förstermann U. Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension.* 1998; 31: 582-588.

Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schlüter KD, Piper HM, Noack E. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 1996; 78: 91-101.

Koyanagi M, Egashira K, Kubo-Inoue M, Usui M, Kitamoto S, Tomita H. Role of transforming growth factor- $\beta_1$  in cardiovascular inflammatory changes induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Hypertension.* 2000; 35: 86-90.

Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K. Transforming growth factor- $\beta$  function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation.* 2002; 106: 130-135.

Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G. National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Ann. Intern. Med.* 2003; 139: 137-147.

Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G; National Kidney Foundation. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann. Intern. Med.* 2003 Jul 15; 139 (2): 137-147.

Lim H, Zhu YZ. Role of transforming growth factor- $\beta$  in the progression of heart failure. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006; 63: 2584-2596.

Lincoln TM, Cornwell TL, Komalavilas P, Boerth N. Cyclic GMP-dependent protein kinase in nitric oxide signalling. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 149-166.

Lloyd MH, Wolfensohn SE. Practical use of distress scoring systems in the application of humane endpoints. *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research*, Royal Society of Medicine Press. 1999; pp 48-53.

Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of  $\beta$ -adrenergic signaling in heart failure? *Circ. Res.* 2003; 93: 896-906.

Machida H, Ogawa K, Funaba M, Mizutani T, Tsujimoto M. mRNA expression of type I and type II receptors for activin, transforming growth factor- $\beta$ , and bone morphogenetic protein in the murine erythroleukemic cell line, F5-5.fl. *Eur. J. Endocrinol.* 2000; 143: 705-710.

Manning RD Jr, Reckelhoff JF. Role of endothelium-derived nitric oxide in control of renal microvasculature in aging male rats. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: 1126-1131.

Massague J, Cheifetz S, Boyd FT, Andres JL. TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990; 593: 59-72.

Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K. Altered Sarcoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase Gene Expression in the Human Ventricle during End-Stage Heart Failure. *J. Clin. Invest.* 1990; 85: 305-309.

Michel T, Feron O. Perspective Series : Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases. Nitric Oxide Synthases : Which, Where, How, and Why ? *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 2146-2152.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327: 524-526.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323(1):22-27.

Pschyrembel; Klinisches Wörterbuch. 259. Auflage; 2002; Walter de Gruyter, Berlin, New York.

Rosenkranz S. TGF- $\beta_1$  and angiotensin networking in cardiac remodelling. *Cardiovasc. Res.* 2004; 63: 423-432.

Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, Schlüter KD, Böhm M. Alterations of  $\beta$ -adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF- $\beta_1$ . *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 283(3): H1253-H1262.

Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor. *Circ. Res.* 1993; 73: 413-423.

Saura M, Zaragoza C, Cao W, Bao C, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D, Lowenstein CJ. *Circ. Res.* 2002; 91: 806-813.

Schlüter KD, Frischkopf K, Flesch M, Rosenkranz S, Taimor G, Piper HM. Central role for ornithine decarboxylase in  $\beta$ -adrenoceptor mediated hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 2000; 45: 410-417.

Schneiders D, Heger J, Best P, Piper HM, Taimor G. SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 2005; 67: 87-96.

Schultz JEJ, Witt SA, Glascock BJ, et al. TGF- $\beta_1$  mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J. Clin. Invest.* 2002; 109: 787-796.

Schwartz EA, Reaven E, Topper JN, Tsao PS. Transforming growth factor- $\beta$  receptors localize to caveolae and regulate endothelial nitric oxide synthase in normal human endothelial cells. *Biochem. J.* 2005; 390: 199-206.

Smithies O, Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Med. Sci.* 1996; 93: 13176-13181.

Statistisches Bundesamt Deutschland – Todesursachen 2006. <http://www.destatis.de>

Sudgen PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J. Mol. Med.* 1998; 76: 725-746.

Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc. Res.* 2000; 46: 250-256.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodelling. *Physiol. Rev.* 1999; 79: 215-262.

Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after stimulated ischemia. *Cardiovasc. Res.* 2000; 45(3): 588-594.

Taimor G, Rakow A, Piper HM. Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. *FASEB J.* 2001; 15(12): 2291-3.

Tomita H, Egashira K, Ohara Y, et al. Early induction of transforming growth factor-beta via angiotensin II type 1 receptors contributes to cardiac fibrosis induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension*, 1998; 32: 273-279.

Wada H, Zile MR, Ivester CT, Cooper IV G, McDermott PJ. Comparative effects of contraction and angiotensin II on growth of adult feline cardiomyocytes in primary culture. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: H29-37.

Wells, R.G. Fibrogenesis, V. TGF- $\beta$  signaling pathways. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000; 279: G845-G850.

Wenzel S, Taimor G, Piper HM, Schlüter KD. Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF- $\beta$  expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB J.* 2001; 15: 2291-2293.

Wenzel S, Rohde C, Wingerning S, Roth J, Kojda G, Schlüter KD. Lack of Endothelial NO Synthase-Derived NO Formation Favours Hypertrophy in Adult Ventricular Cardiomyocytes. *Hypertension*, 2007; 49: 193-200.

Wenzel S, Henning K, Habbig A, Kasseckert S, Schreckenber R, Maxeiner H, Piper HM, Schlüter KD. Matrix Deposition by Adult Ventricular Cardiomyocytes: Notable Role for TGFbeta. 2009, Submitted.

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

## **Danksagung**

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Roth und Herrn Prof. Schlüter für die gute Betreuung während der Zeit der Dissertationsanfertigung! Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kollegen, ganz besonders denen aus meiner Arbeitsgruppe für die Unterstützung und den motivierenden Zuspruch bedanken!



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5491-1



Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

© Emilia Stasiak - Fotolia.com