
Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Zum Einfluss von DYRK1A
auf den aktivierten Calcineurin/NFAT-Signalweg und
die Hypertrophie in Kardiomyozyten

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Simon Philipp Grau
aus Stuttgart

Göttingen 2011

Dekan:

Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. G. Hasenfuß

II. Berichterstatter:

Prof. Dr. Wienands

III. Berichterstatter:

Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung:

Mittwoch, den 11. Januar 2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Herzinsuffizienz.....	1
1.2 Die Herzhypertrophie.....	2
1.3 Molekulare Wege der Herzhypertrophie- und Herzinsuffizienzentwicklung	4
1.4 Der Calcineurin/NFAT-Signalweg	5
1.5 <i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinases (DYRKs)</i>	7
1.6 Die Isoform DYRK1A.....	9
1.7 Substrate von DYRK1A	11
1.8 Einfluss von DYRK1A auf NFAT	12
1.9 Zielsetzung dieser Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.2 Enzyme	19
2.1.3 Gebrauchswaren	19
2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	20
2.1.5 Geräte.....	20

2.1.6	Sterilisationsverfahren	21
2.1.7	Medien und Puffer	21
2.1.7.1	Stammlösungen/Puffer	21
2.1.7.2	Lösungen für die Zellisolation	22
2.1.7.3	Lösungen für die Zellkultur	23
2.1.7.4	Lösungen für den Western Blot	23
2.1.7.5	Antikörper	25
2.1.8	Adenoviren und Organismen	26
2.1.8.1	Adenoviren	26
2.1.8.2	Tiere	26
2.1.9	Datenbanken und Analysesoftware	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Zellbiologische Arbeitsmethoden	28
2.2.1.1	Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus adulten Ratten	28
2.2.1.2	Kultivierung von Kardiomyozyten adulter Ratten	29
2.2.1.3	Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten neonataler Ratten	29
2.2.1.4	Kultivierung von Kardiomyozyten neonataler Ratten	31
2.2.1.5	Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Mäuse	31
2.2.2	Isolierung von RNA und cDNA-Synthese	32
2.2.2.1	RNA-Isolierung aus murinen Kardiomyozyten	32
2.2.2.2	cDNA-Synthese	32
2.2.2.3	Quantitative <i>Real-time</i> RT-PCR	32
2.2.3	Adenoviral vermittelte Genexpression	35
2.2.3.1	Adenovirale Transduktion isolierter Rattenkardiomyozyten	35
2.2.3.2	Ernten der infizierten Kardiomyozyten	36
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	36
2.2.4.1	Herstellung von Protein-Lysaten aus eukaryotischen Zellen	36
2.2.4.2	Herstellung von Protein-Lysaten aus murinen Herzen	37

2.2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Protein-Lysaten.....	37
2.2.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.2.4.5	Western Blot	38
2.2.5	Diagnostik der subzellulären Lokalisation von Fusionsproteinen.....	39
2.2.6	Planimetrie von Kardiomyozyten neonataler Ratten	40
2.2.6.1	Immunzytochemische α -Aktinin-Färbung neonataler Rattenkardiomyozyten ...	41
2.2.7	Histologische Techniken.....	41
2.2.7.1	Gewebefixierung und -einbettung.....	41
2.2.7.2	Herstellung von Paraffinschnitten	42
2.2.7.3	Entparaffinierung	43
2.2.7.4	WGA-Färbung (<i>Wheat-Germ-Agglutinin</i>).....	43
2.2.7.4.1	Auswertung der WGA-Schnitte.....	44
2.2.8	<i>In-vivo-Molecular-Imaging</i> - Biolumineszenz.....	45
2.2.8.1	Transgenes Mausmodell	45
2.2.8.2	Durchführung einer Messung	46
2.2.9	Transgene Mäuse	47
2.2.9.1	DYRK1A/tTA-transgene Maus	47
2.2.9.2	Genotypisierung der transgenen Mäuse	49
2.2.9.3	Phänotypisierung der transgenen Mäuse mit Hilfe der Echokardiographie.....	49
2.2.9.4	Stimulation transgener Mäuse durch mikro-osmotische Pumpen	49
2.3	Ethik.....	50
2.4	Statistische Auswertung.....	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Analyse der Expressionsstärke der bislang bekannten <i>Dyrk</i> -Isoformen in murinen Kardiomyozyten	51
3.2	Untersuchung der adenoviral vermittelten DYRK1A-Expression im Western Blot.....	53
3.3	Untersuchung der DYRK1A-Regulation.....	54
3.4	Planimetrische Hypertrophieanalyse von Kardiomyozyten neonataler Ratten	55

3.4.1	Die Phenylephrin-induzierte Hypertrophieinduktion	55
3.4.2	Dosis-Wirkungs-Kurve unterschiedlicher Phenylephrin-Konzentrationen	56
3.4.3	Hemmung der Phenylephrin-induzierten Hypertrophie durch DYRK1A.....	57
3.5	Untersuchung der NFATc3-Lokalisation.....	58
3.5.1	Untersuchung der prozentualen NFAT-Kernlokalisierung mit steigenden Calcineurin-Konzentrationen.....	59
3.5.2	Einfluss auf die subzelluläre NFATc3-Lokalisation nach Hemmung von endogenem DYRK1A durch Harmin.....	60
3.5.3	Einfluss einer Hemmung von DYRK1A mittels <i>Dyrk1a</i> -siRNA-Adenovirus auf die subzelluläre NFAT-Lokalisation	62
3.6	Analyse von induzierbaren DYRK1A-transgen überexprimierenden Mäusen	64
3.6.1	Untersuchung der DYRK1A-Expression in DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen.....	65
3.6.2	Untersuchung der kardiomyozytenspezifischen Überexpression von DYRK1A in DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen	67
3.6.3	Untersuchung der intrazellulären DYRK1A-Lokalisation und -Überexpression in Kardiomyozyten durch immunhistochemische Färbung	68
3.6.4	Untersuchung der DYRK1A/tTA-transgenen Mäuse nach transaortaler Konstriktion (TAC).....	69
3.6.4.1	Untersuchung der Herzfunktion mittels Echokardiographie	70
3.6.4.2	Untersuchung der Herzmorphologie transgener Mäuse nach TAC-Operation mittels histologischer Färbung und Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht.....	71
3.6.4.3	Untersuchung der Hypertrophiemarker <i>Bnp</i> und <i>Myh6/Myh7</i>	73
3.7	Einfluss von DYRK1A auf die Calcineurin-induzierte Hypertrophie	75
3.7.1	Untersuchung der Herzfunktion mittels Echokardiographie	75
3.7.2	Untersuchung der Herzmorphologie mittels histologischer Färbung und Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht.....	77
3.7.3	Untersuchung der Hypertrophiemarker <i>Bnp</i> und <i>Myh6/Myh7</i>	79
3.8	Einfluss von DYRK1A auf den Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg in Kardiomyozyten	80
3.8.1	Einfluss der DYRK1A-Überexpression auf die Aktivierung und Gesamtmenge von MEK1/2.....	80

3.9	Messung der NFAT-Aktivität <i>in vivo</i>	82
3.9.1	Messung der NFAT-Aktivität mittels der Expression von <i>Rcan1-4</i> in den TAC- und Calcineurin-induzierten Hypertrophie-Modellen.....	82
3.9.2	Messung der NFAT-Aktivität in der NFAT-abhängigen Luciferase-exprimierenden transgenen Maus	84
3.9.2.1	Test des Biolumineszenzsignals in NFAT-Luciferase-transgenen Mäusen und Wildtyp-Mäusen.....	85
3.9.2.2	Untersuchung der Kinetik des Biolumineszenzsignals nach Luciferin-Injektion..	86
3.9.3	Untersuchung des Biolumineszenzsignals in NFAT-Luc/tTA- und NFAT-Luc/DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen	87
4	Diskussion	90
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	90
4.2	Einfluss von DYRK1A auf den aktivierten Calcineurin/NFAT-Signalweg <i>in vitro</i>	93
4.3	Einfluss von DYRK1A auf die MAPK-Signalkaskade <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	95
4.4	Analyse der DYRK1A-Expression durch eine gesteigerte Calcineurin-Aktivität	96
4.5	Existieren neben NFAT weitere Substrate von Calcineurin, die eine Hypertrophie induzieren?.....	97
4.6	Einfluss von DYRK1A auf den aktivierten Calcineurin/NFAT-Signalweg <i>in vivo</i>	98
4.7	Abschließende Bemerkungen	100
5	Zusammenfassung	102
6	Literaturverzeichnis.....	104

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bpm	beats per minute (Schläge pro Minute)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumionen
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu ²⁺	Kupferionen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
kb	Kilobasenpaare
KG	Körpergewicht
l	Liter
m	milli, 10 ⁻³
m	Meter
M	Molar
μ	mikro, 10 ⁻⁶
min	Minute
Mio.	Million, 10 ⁶
Mrd.	Milliarde, 10 ⁹
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)

n	nano, 10^{-9}
p	piko, 10^{-12}
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
Tet	Tetracyclin
U	Unit, definierte Enzymeinheit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
vs.	gegenüber
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung	Seite
Abb. 1.1	3
Abb. 1.2	5
Abb. 1.3	8
Abb. 1.4	9
Abb. 1.5	10
Abb. 1.6	14
Abb. 1.7	15
Abb. 2.1	35
Abb. 2.2	44
Abb. 2.3	45
Abb. 2.4	48
Abb. 3.1	52
Abb. 3.2	53
Abb. 3.3	55
Abb. 3.4	56
Abb. 3.5	58
Abb. 3.6	60
Abb. 3.7	61
Abb. 3.8	62
Abb. 3.9	63
Abb. 3.10	65
Abb. 3.11	66
Abb. 3.12	67
Abb. 3.13	69
Abb. 3.14	71
Abb. 3.15	72
Abb. 3.16	74

Abb. 3.17	76
Abb. 3.18	78
Abb. 3.19	79
Abb. 3.20	81
Abb. 3.21	83
Abb. 3.22	85
Abb. 3.23	86
Abb. 3.24	88

Tabelle	Seite
Tab. 3.1	68
Tab. 3.2	77

1 Einleitung

1.1 Die Herzinsuffizienz

In den westlichen Industriestaaten sind die Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache. Die Herzinsuffizienz liegt dabei an dritter Stelle nach der chronischen ischämischen Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt (Statistisches Bundesamt 2009a). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert die Herzinsuffizienz als verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung (WHO 1995). Das Herz verliert seine Fähigkeit, ausreichend Blut durch die Körperperipherie zu pumpen, um die Durchblutung aller Organe zu decken und ihren metabolischen Bedarf zu gewährleisten. Die Folge ist eine Kaskade von Veränderungen die unter Belastung aber auch in Ruhe zu rascher Ermüdbarkeit, Dyspnoe, Ödemen und zum Tod führen kann (Mudd und Kass 2008). Die Herzinsuffizienz war im Jahr 2006 in Deutschland der häufigste Grund für eine vollstationäre Behandlung. Auch bei den Krankheitskosten rangierten die Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit 35 Mrd. Euro an erster Stelle, mit steigender Tendenz (Statistisches Bundesamt 2009b).

Die akute Herzinsuffizienz entwickelt sich kurzfristig. Sie ist unter anderem Folge eines akuten Koronarsyndroms, Papillarmuskelabrisses mit folgender Mitralinsuffizienz, einer Perikardtamponade oder einer Dekompensation einer bestehenden chronischen Herzinsuffizienz (Nieminen *et al.* 2005). Die chronische Herzinsuffizienz hingegen entsteht im Verlauf von Monaten bis Jahren und ist immer mit einer systolischen und diastolischen Ventrikelfunktionsstörung assoziiert. Die systolische Ventrikelfunktionsstörung ist durch eine verminderte Kontraktilität des Myokards gekennzeichnet. Sie entsteht in den meisten Fällen aus einer koronaren Herzkrankheit oder einer Kardiomyopathie. Bei der diastolischen Ventrikelfunktionsstörung ist die systolische Pumpfunktion erhalten, allerdings ist hierbei die Einschränkung des Schlagvolumens durch eine verschlechterte diastolische Füllung des Ventrikels bedingt. Ätiologisch liegt der diastolischen Ventrikelfunktionsstörung meistens eine arterielle Hypertonie zugrunde, die eine myokardiale Hypertrophie nach sich zieht (Swedberg *et al.* 2005; Lips *et al.* 2003). Laut der Framingham-Offspring-Studie sind die arterielle Hypertonie mit assoziierter Myokardhypertrophie und der Myokardinfarkt in 75 % der Fälle die häufigsten Ursachen einer Herzinsuffizienz (Lloyd-Jones *et al.* 2002). Aus klinischer Sicht ist die Herzinsuffizienz ein Syndrom einer gemeinsamen Endstrecke vielfältigster Krankheitsprozesse,

welche die kardiale Funktion beeinträchtigen (Cowie *et al.* 1997; Remme *et al.* 2001; Levy *et al.* 1990).

Der Organismus ist in der Lage, die eingeschränkte Pumpleistung des Herzens primär durch physiologische Anpassungsmechanismen zu kompensieren. Zum einen vermehrt er das intravasale Volumen. Durch die gesteigerte Vordehnung des Myokards (erhöhte Vorlast) wird dessen Kontraktionskraft gesteigert (Frank-Starling-Mechanismus). Des Weiteren schüttet der Körper sowohl auf neuronalem als auch auf humoralem Wege vermehrt Katecholamine aus, was unter anderem auch die Kontraktilität des Myokards erhöht. Außerdem führt dies, vor allem durch Noradrenalin, zu einer peripheren Vasokonstriktion und somit zu einer Nachlaststeigerung. Eine langdauernde Stimulation ist jedoch schädlich für das Herz und verschlechtert die Prognose (Cohn *et al.* 1984). Ein weiterer bedeutender Kompensationsmechanismus ist die myokardiale Hypertrophieentwicklung, durch die die ventrikuläre Wandspannung trotz erhöhter Belastung konstant gehalten werden kann (Laplace-Gesetz). Bei Fortbestehen der Grunderkrankung ist das Herz nicht dauerhaft in der Lage, die eingeschränkte Pumpleistung zu kompensieren. In der Folge kommt es zu einer Dekompensation mit den typischen Symptomen einer Herzinsuffizienz (Mudd und Kass 2008).

1.2 Die Herzhypertrophie

Das insuffiziente Herz weist ein erhöhtes Gewicht aufgrund einer gesteigerten Muskelmasse auf. Die Herzhypertrophie ist definiert durch Zunahme des Volumens der Myofibrillen, ohne dass sich die Anzahl der Myozyten ändert (Wilkins und Molkentin 2002). Kardiomyozyten sind terminal differenzierte Zellen und somit nicht mehr fähig, sich zu teilen. Die Herzhypertrophie kann in drei Arten klassifiziert werden: die „entwicklungsbedingte“, die mit dem normalen Herzwachstum von der Geburt bis zum Erwachsenenalter im Zusammenhang steht, die „physiologische“, welche mit Training oder Schwangerschaft assoziiert ist und die „pathologische“, die mit krankhaften Stimuli verbunden wird (Abb. 1.1). Die Hypertrophie durch sportliche Betätigung unter aeroben Bedingungen oder in der Schwangerschaft ist nicht schädlich. Hier entwickelt sich eine adaptive physiologische exzentrische Hypertrophie (Dickhuth *et al.* 2004; Dorn und Force 2005; Maron und Pelliccia 2006). Dabei nimmt die Wanddicke der Ventrikel und des Septums in gleichem Maße wie der Innendurchmesser der Ventrikel zu (Heineke und Molkentin 2006). Bei der pathologischen Herzhypertrophie kommt es zum ventrikulären Remodelling, das sich negativ auf die Herzfunktion und den Energieverbrauch auswirkt (Deschamps und Spinale 2006). Hierbei kommt es letztendlich

zu Veränderungen der extrazellulären Matrix mit erhöhter Steifigkeit des Myokards und vermehrtem Zelltod durch Apoptose und Nekrose (Kang und Izumo 2003; Wencker *et al.* 2003). Die pathologische Hypertrophie ist anfangs oftmals eine konzentrische Hypertrophie, bei der die Septum- und Ventrikelwand deutlich an Dicke zunehmen, jedoch der Innendurchmesser der Kammern abnimmt. Erfolgt in diesem kompensatorischen Stadium keine adäquate Therapie, kann sich daraus eine exzentrische Hypertrophie mit Dilatation der Kammern entwickeln. Nach dem Laplace-Gesetz nimmt hier die Wandspannung deutlich zu, was sich ungünstig auf den myokardialen Sauerstoffverbrauch und die Kontraktilität auswirkt (Heineke und Molckentin 2006).

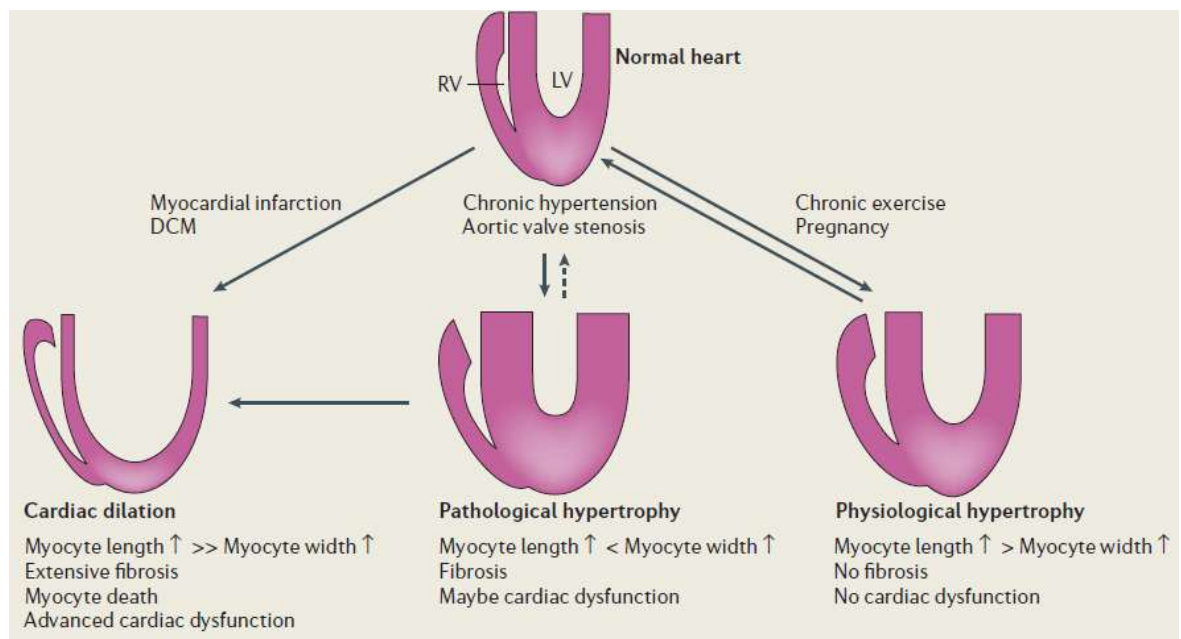


Abb. 1.1: Die verschiedenen Typen der kardialen Hypertrophie. Drei verschiedene Typen der Herzhypertrophie gilt es zu unterscheiden: die „entwicklungsbedingte“, die „physiologische“ und die „pathologische“ Hypertrophie. Unter der „entwicklungsbedingten“ Herzhypertrophie versteht man das normale Herzwachstum von der Geburt bis zum Erwachsenenalter. Die „physiologische“ Hypertrophie, durch regelmäßige sportliche Betätigung oder Schwangerschaft, ist anatomisch stets eine exzentrische Hypertrophie. Hier zeigen das Wachstum der Septum- und Ventrikelwand und die Vergrößerung der Herzkammern ein gleichmäßiges Profil. Die Länge der einzelnen Myozyten nimmt dabei stärker zu als die Breite. Die Entwicklung vom gesunden Herzen zur „physiologischen“ Hypertrophie ist reversibel. Die „pathologische“ Hypertrophie, beispielsweise durch chronische Hypertonie oder Aortenklappenstenose, ist anatomisch anfangs oftmals eine konzentrische Hypertrophie, bei der sich die Septum- und Ventrikelwand verdicken, wohingegen sich die Herzkammern netto verkleinern. Die Breite der einzelnen Myozyten nimmt stärker zu, als die Länge. Durch einen Myokardinfarkt, eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) und eine „pathologische“ Hypertrophie kann eine Dilatation des Herzens entstehen. Die Myozyten werden bei dieser Form im Verhältnis zu ihrer Breite deutlich länger. Je nach Veränderung kann es zur Fibrose und Nekrose, sowie zur kardialen Dysfunktion kommen (Heineke und Molckentin 2006, S. 590).

1.3 Molekulare Wege der Herzhypertrophie- und Herzinsuffizienzentwicklung

Intrazellulär ist bei der Hypertrophieinduktion eine Vielzahl von Signalwegen aktiv, die teilweise ineinander greifen. Ein Ligand oder mechanischer Stimulus führt über Rezeptoren der Zelloberfläche zur Aktivierung von Proteinkinasen und Phosphatasen. Nach derzeitiger Auffassung nehmen die zyklische AMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), die Proteinkinase C (PKC), die Proteinkinase D (PKD), die Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAPKs), die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und Calcineurin eine zentrale Rolle ein (Abb. 1.2) (Heineke und Molkentin 2006). Die chronische Aktivierung dieser Signalwege führt zu einer Veränderung der Zellstruktur und -funktion, die allgemein als Remodelling bezeichnet wird. Unter anderem erhöhen diese aktivierten Signalwege die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, der eine entscheidende Relevanz bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie zugesprochen wird (Frey *et al.* 2000). Unterschiedliche Transkriptionsfaktoren werden stimuliert, worauf sich eine gesteigerte Expression pro-hypertropher Gene, wie zum Beispiel *β -myosin heavy chain (Myh7)* und *α -skeletal actin*, anschließt (Mudd und Kass 2008). Die MAPK-Transduktionswege bestehen aus kaskadenartig aktivierten Kinasen. Sie werden durch mechanischen Stress, Zytokine und neuroendokrine Stimuli aktiviert. Der Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg ist Teil dieses Netzwerkes und bewirkt nach kontinuierlicher Stimulation eine kardiale Hypertrophie (Bueno *et al.* 2000).

Eine gesteigerte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist unter anderem die Antwort auf eine vermehrte Last oder Dehnung der Myozyten (Marban und Kusuoka 1987; Bustamante *et al.* 1991; Hongo *et al.* 1995), was eine erhöhte Auswurfleistung als physiologische Regulation zur Folge hat. Zudem können einige Faktoren, wie Angiotensin II (AngII), Phenylephrin (PE) und Endothelin-1 (ET-1), die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration der Myozyten erhöhen und damit auf molekularer Ebene eine Hypertrophie induzieren (Karlner *et al.* 1990; Sadoshima und Izumo 1993; Leite *et al.* 1994). Hier kommt der calciumabhängigen Phosphatase Calcineurin bei der Signaltransduktion sowohl der pathologischen Herzhypertrophie als auch der Herzinsuffizienz eine zentrale Bedeutung zu (Molkentin *et al.* 1998).

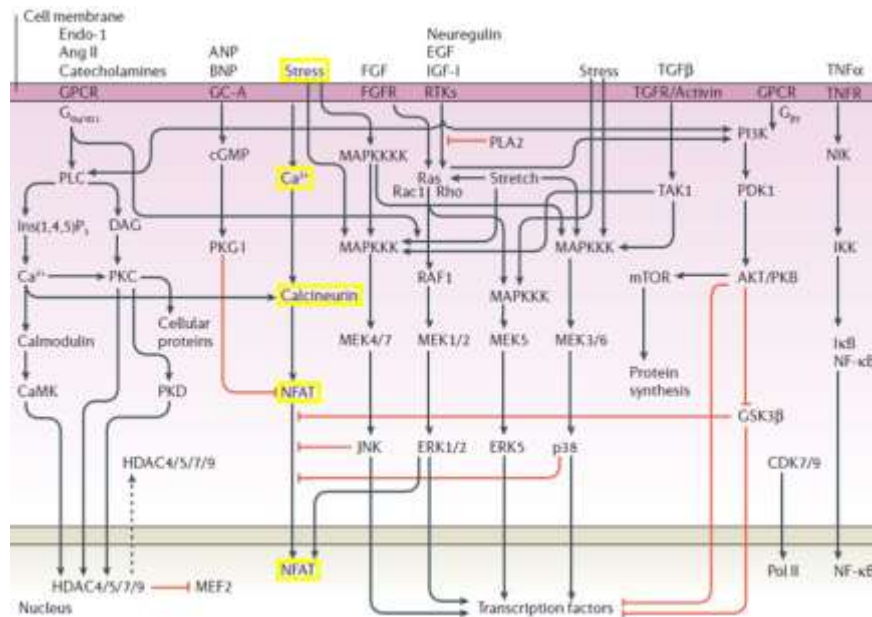


Abb. 1.2: Schematische Darstellung wichtiger Signaltransduktionswege im Herzen, die eine Rolle bei der kardialen Hypertrophieentwicklung spielen. An Rezeptoren der Zellmembran binden die verschiedenen aktivierenden Faktoren, die die Weiterleitung der Signale durch Kinasen und Phosphatasen bewirken. Der bedeutende Calcineurin/NFAT-Signalweg ist gelb umrandet dargestellt. Stress oder verschiedene Substanzen, wie zum Beispiel Phenylephrin, bewirken einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die durch Ca^{2+} /Calmodulin aktivierte Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT). Dies führt zu einer nukleären Translokation von NFAT. NFAT ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Reihe pro-hypertrophen Gene in Kardiomyozyten bewirken kann (modifiziert von Heineke und Molckentin 2006, S. 591).

1.4 Der Calcineurin/NFAT-Signalweg

Calcineurin ist eine calciumabhängige Serin/Threonin-Phosphatase, die den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) dephosphoryliert und somit aktiviert. Als ein dimeres Protein besteht es aus einer katalytischen Untereinheit CnA (57-61 kDa) und einer regulatorischen Untereinheit CnB (19 kDa). Calcineurin wird durch die direkte Bindung des Proteins Calmodulin, welches Ca^{2+} gebunden hat, aktiviert (Wilkins und Molckentin 2004). Die Interaktion von Calmodulin und Calcineurin führt zur Dephosphorylierung und Aktivierung von NFAT, der im phosphorylierten Zustand im Zytoplasma lokalisiert ist und durch Dephosphorylierung in den Zellkern transloziert. Dort bindet NFAT als Transkriptionsfaktor an Promotoren pro-hypertropher Gene. Zu den Proteinen, die dadurch vermehrt exprimiert werden, gehören unter anderem β -myosin heavy chain (β -MHC), α -skeletal actin, der atriale natriuretische Faktor (ANF) und das *brain natriuretic Peptid* (BNP) (Komuro und Yazaki 1993). BNP und das *N-terminale pro brain natriuretic peptide* (NT-pro-BNP) sind gute Parameter zur Diagnosesicherung einer

Herzinsuffizienz, da mit zunehmender Herzinsuffizienz der BNP-Spiegel im Serum ansteigt (Mueller *et al.* 2004). Kardiales Myosin bewirkt den Querbrückenschlag und ist damit für die Verkürzung der Herzmuskelzelle entscheidend. Im gesunden menschlichen Herzen macht α -myosin heavy chain (α -MHC - das Gen wird als *Myh6* bezeichnet) etwa 10 % der gesamten kardialen Myosin-Expression aus. Die restlichen 90 % fallen auf die Isoform β -MHC (das Gen wird als *Myh7* bezeichnet) (Locher *et al.* 2009). Die schnelle Isoform α -MHC wird postembryonal vermehrt exprimiert und hat eine hohe ATPase-Aktivität, wohingegen die langsamere Isoform β -MHC eine niedrigere Aktivität aufweist (Braunwald und Bristow 2000). In der Herzinsuffizienz kommt es zu einer erheblichen Verschiebung des Expressionsmusters. Die α -MHC-Expression fällt im insuffizienten Herzventrikel auf ein nicht nachweisbares Niveau zurück (Lowe *et al.* 1997; Miyata *et al.* 2000; McKinsey und Olson 2005), wohingegen β -MHC vermehrt exprimiert wird (Herron und McDonald 2002). Des Weiteren wird das Protein *regulator of calcineurin protein 1* (RCAN1) NFAT-abhängig exprimiert. RCANs sind eine Familie von kleinen, strukturell verwandten Proteinen, die als Calcineurin-Inhibitoren identifiziert werden konnten. RCANs inhibieren die Calcineurin-Aktivität durch eine direkte Interaktion mit der katalytischen Untereinheit A. Die Expressionsstärke der Exon-4-Isoform (RCAN1-4 - früher MCIP1 oder DSCR1) ist ein guter Indikator für die transkriptionelle NFAT-Aktivität. Dies liegt an 15 NFAT-Bindungsstellen in seiner Promotorregion. Die vermehrte Translokation von NFAT in den Zellkern führt neben der Transkription pro-hypertropher Gene folglich auch zur Transkription des Calcineurin-Inhibitors RCAN1-4. Dies entspricht einem negativen Feedback-Mechanismus (Yang J *et al.* 2000; van Rooij *et al.* 2004).

Der Calcineurin/NFAT-Signalweg ist notwendig und hinreichend (Molkentin *et al.* 1998), um eine kardiale Hypertrophie zu induzieren, und ist in Tiermodellen als eine entscheidende Kaskade für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz und des Remodellings identifiziert worden. Transgene Mäuse, die herzspezifisch aktiviertes Calcineurin überexprimieren, entwickeln eine konzentrische kardiale Hypertrophie, die in der Herzinsuffizienz endet. Dies zeigt sich im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in einer extremen Größenzunahme des Herzens, was sich in einer 2-3fachen Steigerung des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht widerspiegelt. Auch NFAT-transgene Mäuse, die herzspezifisch vermehrt aktiviertes NFAT bilden, entwickeln eine Hypertrophie, die sich im Verlauf zu einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) mit interstitieller Fibrose, Stauungsinsuffizienz und der Gefahr des plötzlichen Herztods entwickelt (Molkentin *et al.* 1998). Bei einem weiteren Mausmodell wurde das Calcineurin-Gen inaktiviert, um die Wichtigkeit dieses Transduktionswegs weiter zu beurteilen. Calcineurin-*knockout* Mäuse waren bis ins Erwachsenenalter lebensfähig. Nach operativ hervorgerufener transaortaler Konstriktion oder Katecholamininfusion war die

Hypertrophieantwort geringer (Bueno *et al.* 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Calcineurin/NFAT-Signalweg in der Regulation der kardialen Hypertrophie eine wichtige Rolle spielt. Aufgrund der dargestellten Bedeutung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs wurden einige Versuche unternommen, diesen Weg gezielt zu inhibieren und so einer Hypertrophie entgegen zu wirken. Zwei Substanzen, Cyclosporin A und FK506 (Tacrolimus) inhibieren die Aktivität von Calcineurin (Bueno *et al.* 2002). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* waren Versuche erfolgreich, durch Inhibierung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs eine Hypertrophie zu vermeiden (Molkentin *et al.* 1998; Sussman *et al.* 1998; Shimoyama *et al.* 2000). Jedoch ließen sich diese Inhibitoren aufgrund der schon in geringen Dosen immunsuppressiven, neuro- und nephrotoxischen Wirkung in der medikamentösen Behandlung der Herzhypertrophie nicht einsetzen (Wilkins und Molkentin 2002). Aus diesem Grund liegt in der derzeitigen Forschung ein großes Augenmerk auf der gezielten herzspezifischen Hemmung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs. Hierdurch ließen sich die Nebenwirkungen auf andere Organsysteme vermeiden und die Chancen steigen, dass auf Calcineurin-Inhibition ausgerichtete Strategien ein zukünftiges therapeutisches Konzept zur Behandlung der pathologischen Herzhypertrophie darstellen.

1.5 Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinases (DYRKs)

Arron *et al.* und Gwack *et al.* fanden unabhängig voneinander heraus, dass das Protein *dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1A* (DYRK1A) eine Kinase darstellt, die NFAT in HeLa- und Jurkat-T-Zellen phosphoryliert und so den Export aus dem Zellkern ermöglicht und beschleunigt (Arron *et al.* 2006; Gwack *et al.* 2006). DYRK1A konnte somit als ein Antagonist des Calcineurin/NFAT-Signalwegs identifiziert werden.

In bisher allen eukaryotischen Lebewesen konnten Homologe der DYRK-Kinasen nachgewiesen werden. Aus phylogenetischer Sichtweise betrachtet, kann die DYRK-Familie in zwei Subtypen klassifiziert werden: eine Gruppe von zytosolischen DYRK-Proteinen, zu denen Pom1p, MBK-2, DYRK2, DYRK3 und DYRK4 gehören. Zudem ein Subtyp, der vornehmlich nukleär vorliegt, und zu dem Yak1p, YakA, MBK-1, MNB (minibrain), DYRK1B und DYRK1A zählen (Becker *et al.* 1998; Bähler und Pringle 1998; Raich *et al.* 2003; Lochhead *et al.* 2003; Leder *et al.* 1999) (Abb. 1.3). Die Isoform DYRK6 ist phylogenetisch weiter von den übrigen DYRK-Isoformen entfernt und nimmt daher eine Sonderstellung ein. Sie kann sowohl nukleär als auch zytosolisch lokalisiert vorliegen (Rochat-Steiner *et al.* 2000). Die Mitglieder der DYRK-Kinase-Familie, die in niederen Eukaryoten, wie zum Beispiel Yak1p in *Saccharomyces cerevisiae* (Garrett *et al.* 1991), Pom1p in

Schizosaccharomyces pombe (Bähler und Pringle 1998) und YakA in *Dictyostelium discoideum* (Souza *et al.* 1998), vorkommen, werden mit Funktionen der Wachstumskontrolle und Entwicklung verbunden. Das zu DYRK1A homologe Protein in *Drosophila melanogaster*, minibrain (MNB), ist in der postembryonalen Neurogenese involviert (Tejedor *et al.* 1995).

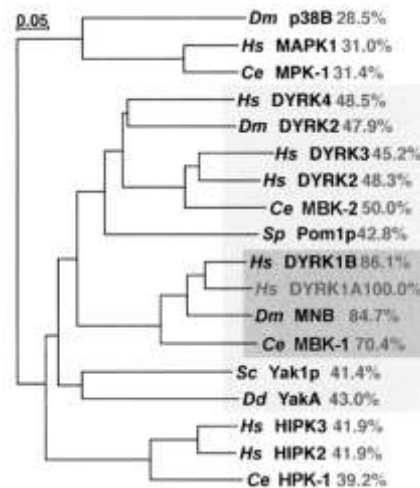


Abb. 1.3: Darstellung der phylogenetischen Konservierung der DYRK-Kinasen. *Dm*, Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*; *Hs*, Mensch; *Ce*, Nematode *C. elegans*; *Sp*, Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*; *Sc*, Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*; *Dd*, Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf den Grad der Konservierung der Gensequenz in Bezug auf humanes DYRK1A-Gen (Raich *et al.* 2003, Seite 574).

Die DYRK-Familie gehört in die Gruppe der CMGC-Proteinkinasen, deren Name sich aus den Proteinkinasen CDK, MAPK, GSK und CLK zusammensetzt (Hunter und Plowman 1997). DYRKs werden als dual-specificity-Kinasen bezeichnet, da sie zur Autophosphorylierung an Tyrosin- (Tyr-) und Serin-/Threonin-Resten befähigt sind. Jedoch können DYRKs an exogenen Substraten lediglich Serin-/Threonin-Reste phosphorylieren, die in einer Konsensus-Phosphorylierungssequenz liegen müssen. Diese Sequenz lautet RPX(S/T)P. Hierbei besteht eine Präferenz für Prolin an der Position +1 (Himpel *et al.* 2000). Die DYRK-Familienmitglieder haben eine konservierte Kinasedomäne und eine angrenzende kleine N-terminale Erweiterung der Kinasedomäne (DYRK Homology Box, DH) gemeinsam. Sie weisen jedoch Unterschiede in ihren N- und C-terminalen Regionen auf. Außerdem haben sie als charakteristisches Merkmal ein konserviertes Tyr-X-Tyr-Motiv (Tyr-319 und Tyr-321) zwischen den Subdomänen VII und VIII in ihrer Aktivierungsschleife der katalytischen Domäne (Becker und Joost 1999, Kentrup *et al.* 1996). Dieses Motiv entspricht exakt dem der Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK). Die Aktivität von DYRK hängt von der Phosphorylierung eines oder beider dieser Tyrosin-Reste ab. Dabei ist die Phosphorylierung des zweiten Tyrosin-Restes (Tyr-321) für die Kinaseaktivität aller Mitglieder essentiell (Himpel *et al.* 2001; Li *et al.*

2002; Lochhead *et al.* 2003). Des Weiteren gleichen sich die DYRK-Kinasen in der Subdomäne II. Hier befindet sich ein essentieller Lysin-Rest, der für die ATP-Bindung von Bedeutung ist (Hanks *et al.* 1988; Ullrich und Schlessinger 1990) (Abb. 1.4).

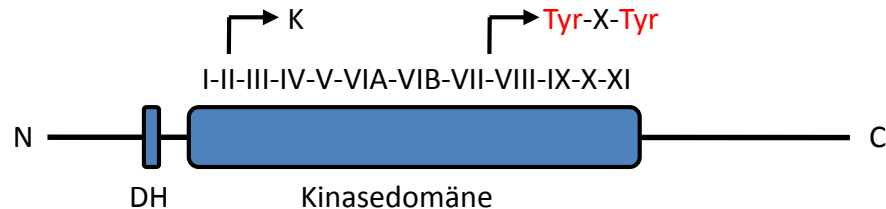


Abb. 1.4: Gemeinsamer Aufbau von DYRK-Kinasen in schematischer Darstellung. Die Kinasedomäne besteht aus zwölf Subeinheiten (Hanks *et al.* 1988) und einer kleinen N-terminalen Erweiterung der Kinasedomäne (DYRK Homology Box, DH). Des Weiteren ist ihnen ein konserviertes Tyr-X-Tyr-Motiv (Tyr-319 und Tyr-321) zwischen den Subdomänen VII und VIII in der Aktivierungsschleife der katalytischen Domäne gemeinsam. In der Subdomäne II befindet sich ein Lysin-Rest (K). Dieser ist für die ATP-Bindung essentiell.

DYRK wird nicht von einer vorgeschalteten Kinase, sondern durch Autophosphorylierung aktiviert (Himpel *et al.* 2001). Die Autophosphorylierung in der Aktivierungsschleife ist ein intramolekulares Ereignis, vermittelt durch eine zwischenzeitliche Übergangsform während der Translation. Sobald das Protein vollständig translatiert ist, verliert die Tyr-Kinase ihre Aktivität und das reife Protein kann lediglich Serin-/Threonin-Reste phosphorylieren (Lochhead *et al.* 2005).

1.6 Die Isoform DYRK1A

DYRK1A zeigt abgesehen von den unter 1.5 genannten Eigenschaften weitere charakteristische Merkmale auf. Im Gegensatz zu den zytosolisch lokalisierten Isoformen hat DYRK1A zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS). Ein klassisches zweiteiliges NLS liegt in dem N-terminalen Bereich (Kentrup *et al.* 1996) und ein weiteres komplexes NLS in der Kinasedomäne (Alvarez *et al.* 2003). Existieren in einem Protein mehrere NLS, so wird es nach der Biosynthese schneller in den Zellkern aufgenommen (Boulikas 1993). Des Weiteren befinden sich am C-terminalen Ende des DYRK1A-Proteins eine Histidin- und eine Serin-/Threonin-Domäne (Abb. 1.5). Die Serin-/Threonin-reiche Region erfüllt die Bedingungen einer PEST-Region (Kentrup *et al.* 1996). Dieses Motiv ist außerdem reich an Prolin und Glutamin und ist wahrscheinlich für die Proteindegradierung verantwortlich (Rogers *et al.* 1986). Die Histidin-reiche Domäne, mit 13 Histidin-Wiederholungen,

scheint dafür verantwortlich, dass DYRK1A im Nukleus mit Splicing-Faktoren interagiert und so eine Rolle in der RNA-Synthese oder in der RNA-Prozessierung spielt (Alvarez *et al.* 2003).

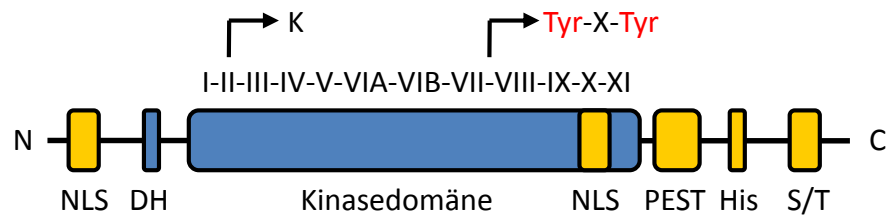


Abb. 1.5: Die DYRK1A-Kinase in schematischer Darstellung. DH (DYRK Homology Box), K (Lysin-Rest), die zwölf Subeinheiten der Kinasedomäne (Hanks *et al.* 1988) und das Tyr-X-Tyr-Motiv entsprechen dem homologen Bereich der DYRK-Kinase-Familie. DYRK1A besitzt zwei nukleäre Lokalisierungssignale: NLS1 am N-terminalen Ende und NLS2 in der Kinasedomäne. PEST, PEST-Domäne; HIS, Histidin-reiche Domäne; S/T, Serin-/Threonin-reiche Domäne.

Das menschliche *Dyrk1a*-Gen liegt auf dem Chromosom 21 (Region 21q22.2) in der *Down Syndrome Critical Region* (DSCR). Es wird sowohl in fetalem als auch in adultem Gewebe in wahrscheinlich jeder Zelle exprimiert. In *Drosophila melanogaster* lautet das homologe Gen *minibrain* (*mnb*) und wurde bereits 1979 das erste Mal beschrieben (Heisenberg und Böhl 1979). In humanem Gewebe liegt ein sehr hohes Expressionsniveau vor allem im Gehirn, in der Herz- und Skelettmuskulatur und in der Plazenta vor (Guimera *et al.* 1996; Wang *et al.* 1998; Guimera *et al.* 1999; Okui *et al.* 1999). Es wird angenommen, dass DYRK1A aufgrund des besonderen Expressionsmusters im zentralen Nervensystem während der Neurogenese von großer Bedeutung ist (Hämmerle *et al.* 2002; Marti *et al.* 2003; Wegiel *et al.* 2004). DYRK1A spielt eine bedeutende Rolle bei der geistigen Fehlentwicklung der Trisomie 21 (Down-Syndrom). Hierbei ist durch ein zusätzliches Allel die DYRK1A-Expression gesteigert. In einem komplexen Zusammenspiel, verursacht durch Expressionssteigerung weiterer Gene der DSCR, kommt es zu einer Dysregulation der Calcineurin/NFAT-Aktivität in zahlreichen Geweben. In Neuronen führt diese Dysregulation bei den Betroffenen letztendlich zu Fehlentwicklungen und geistiger Retardierung mit unterschiedlicher Ausprägung. Auch Patienten mit einer seltenen partiellen Trisomie der DSCR und Patienten mit dem Down-Syndrom weisen eine nahezu gleiche geistige Retardierung auf (Song *et al.* 1996; Smith DJ *et al.* 1997). Umgekehrt werden auch in heterozygoten DYRK1A-*knockout*-Mäusen (DYRK1A^{+/-}) Wachstumsstörungen, Mikrozephalie, Verhaltensstörungen und motorische Auffälligkeiten beobachtet, wohingegen homozygote DYRK1A-*knockout*-Mäuse (DYRK1A^{-/-}) bereits *in utero* sterben (Fotaki *et al.* 2002; Fotaki *et al.* 2004). Transgene Mäuse, die DYRK1A ubiquitär überexprimieren, haben analog zu den Veränderungen beim Down-Syndrom Lernstörungen und Gedächtnisprobleme (Smith DJ *et al.* 1997; Altafaj *et al.* 2001). Sie weisen

überdies Herzklappenfehler und Schäden an den Gefäßen auf, wobei das endokardial exprimierte NFATc1 hyperphosphoryliert und im Zytoplasma lokalisiert vorliegt (Arron *et al.* 2006, Ahn *et al.* 2006). Ab dem Embryonaltag 13.5 wird aufgrund des höheren Expressionsniveaus von DYRK1A die Entwicklung der Herzklappen, vergleichbar mit dem Phänotyp der NFATc1-*knockout*-Embryos (NFATc1^{-/-}), gestört (Arron *et al.* 2006).

1.7 Substrate von DYRK1A

DYRK1A ist wahrscheinlich eine recht pleiotrope Kinase (Aranda *et al.* 2010). Es konnte eine Vielzahl von Zielsubstraten identifiziert werden, die völlig unterschiedliche Funktionen in einer Zelle wahrnehmen. Hierzu gehören unter anderem der Einfluss auf den Stoffwechsel, das Wachstum, den Zellzyklus und die Differenzierung von Zellen, sowie auf die Endozytose und die Verarbeitung synaptischer Vesikel. Der größte Teil der Substrate wird durch deren Phosphorylierung reguliert. Der Einfluss von DYRK1A auf die Proteine Ras, B-Raf und Mek1 in COS-7-Zellen findet kinase-unabhängig statt. Über die Bildung eines Ras/B-Raf/Mek1-Multiproteinkomplexes wird die Aktivität des Proteins Erk gesteigert (Kelly und Rahmani 2005). Zu den Substraten, die DYRK1A phosphoryliert, zählen die ϵ -Untereinheit des eukaryotischen Translationsfaktors 2B (eIF2B ϵ) und im Gehirn das mikrotubuli-assoziierte Protein tau. Bei beiden Substraten konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von DYRK1A an Serin-539 (eIF2B ϵ) und Threonin-212 (tau) die weitere Phosphorylierung der *Glycogen-Synthase-Kinase 3* (GSK3) erleichtert (Woods *et al.* 2001a). Des Weiteren phosphoryliert DYRK1A im Gehirngewebe von Ratten die Endozytose vermittelnden Proteine Dynamin und Amphiphysin 1 (Chen-Hwang *et al.* 2002; Murakami *et al.* 2006) und scheint somit in dem Exozytose-Endozytose-Zyklus von synaptischen Vesikeln eine Bedeutung zu haben (Bauerfeind *et al.* 1997). Überdies konnte in COS-7-Zellen die Glykogen-Synthase, ein bedeutendes Enzym in der Regulation der Glykogensynthese durch Insulin, als DYRK1A-Substrat identifiziert werden (Skurat und Dietrich 2004). DYRK1A spielt auch beim Splicing-Prozess eine Rolle, indem das in der Prozessierung von prä-mRNA bekannte Cyclin L2 (de Graaf *et al.* 2004) und der Splicing Faktor SF3b/SAP155 (de Graaf *et al.* 2006) in COS-7-Zellen phosphoryliert werden. Unter kardialen Gesichtspunkten ist von Interesse, dass Cyclin L2 im Gewebe des ventrikulären Herzseptums bei Patienten mit einem Ventrikelseptumdefekt, im Vergleich zu der Kontrollgruppe, vermehrt exprimiert wird (Zhuo *et al.* 2009). Jedoch ist nicht bekannt, ob DYRK1A Cyclin L2 im Herzen beeinflusst. Des Weiteren reguliert DYRK1A wahrscheinlich durch Phosphorylierung die Transkriptionsfaktoren *Forkhead in Rhabdomyosarcoma* (FKHR), *Glioma-associated oncogene 1* (Gli1), *cAMP response element-*

binding protein (CREB), *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) und NFAT (Woods *et al.* 2001b; Mao *et al.* 2002; Matsuo *et al.* 2000; Arron *et al.* 2006; Gwack *et al.* 2006). Die Phosphorylierung und damit Inaktivierung von FKHR an Serin-329 durch DYRK1A wurde in HEK-293-Zellen nachgewiesen und die Funktion liegt in der Regulation der Apoptose (Woods *et al.* 2001b). In C3H10T1/2-Zellen wurde gezeigt, dass DYRK1A den Transkriptionsfaktor Gli1 phosphoryliert und somit die Lokalisation und Aktivität dieses Proteins steuert, dessen Funktion in der Entwicklung des zentralen Nervensystems und in der Tumorgenese liegt (Mao *et al.* 2002; Zhu und Lo 2010). Der Transkriptionsfaktor CREB wird an Serin-133 durch DYRK1A phosphoryliert (Yang EJ *et al.* 2001). Das insuffiziente Herz ist mit einer verminderten Aktivität von CREB assoziiert. Die herzspezifische Expression einer phosphorylierungsdefizienten CREB-Mutante in transgenen Mäusen spiegelt den kontraktile Phänotyp der Herzinsuffizienz wider und führt zu einer dilatativen Kardiomyopathie (Fentzke *et al.* 2001; Fentzke *et al.* 1998). Außerdem konnten Matsuo *et al.* in COS-7-Zellen die Phosphorylierung von STAT3 an Serin-727 nachweisen (Matsuo *et al.* 2000). Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT3 in Kardiomyozyten konnte in einigen *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien gezeigt werden. So waren herzspezifische STAT3-*knockout*-Mäuse sensitiver gegenüber Inflammation, kardialer Fibrose und der Herzinsuffizienz (Jacoby *et al.* 2003). In Kardiomyozyten wurde *in vitro* ein Effekt auf die Regulation der Angiogenese sowie der Apoptose nachgewiesen (Hilfiker-Kleiner *et al.* 2005).

1.8 Einfluss von DYRK1A auf NFAT

Die präzise Regulation der Transkriptionsfamilie NFAT ist in der Entwicklung von Wirbeltieren von großer Bedeutung. In ruhenden Zellen liegt NFAT hoch phosphoryliert und im Zytoplasma lokalisiert vor. In stimulierten Zellen, in denen die Ca^{2+} -Konzentration erhöht ist, wird NFAT durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert. Dies führt zur Translokation in den Zellkern (Hogan *et al.* 2003). Die Phosphorylierung von NFAT geschieht durch verschiedene Kinasen, zu denen die *Casein-Kinase 1* (CK1) und *Glycogen-Synthase-Kinase 3* (GSK3) gehören (Okamura *et al.* 2000).

Gwack *et al.* und Arron *et al.* beschrieben 2006 unabhängig voneinander die Wirkung der Kinase DYRK1A auf den Calcineurin/NFAT-Signalweg. Gwack *et al.* führten einen RNA-interference-Screen (RNAi-Screen) im Genom der *Drosophila melanogaster* durch und identifizierten DYRKs als neue NFAT-Regulatoren. DYRK1A und DYRK2 reagieren auf die Calcineurin bedingte Dephosphorylierung von NFAT durch direkte Phosphorylierung des konservierten SP-3-Motivs

(*serine-proline repeat 3*) in der regulatorischen Domäne von NFAT. Die Phosphorylierung dieser Domäne bereitet die weitere Phosphorylierung des SP-2- und des SRR-1-Motivs durch die Kinasen GSK3 und CK1 vor (Gwack *et al.* 2006) (Abb. 1.6).

Arron *et al.* wurden auf andere Weise auf DYRK1A aufmerksam. Sie stellten fest, dass NFAT-*knockout*-Mäuse den transgenen Mäusen mit einer Trisomie 21 phänotypisch sehr ähnlich sind. Hierzu zählen neurologische, skeletale, kardiovaskuläre und immunologische Defekte. Die Genmenge ist in der *Down Syndrom Critical Region* (DSCR) bei transgenen Mäusen mit Trisomie 21 um den Faktor 1,5 erhöht. Deshalb untersuchten sie die 25 bis 30 Gene, die innerhalb der DSCR kodiert sind, nach möglichen NFAT-Inhibitoren und identifizierten DYRK1A (Arron *et al.* 2006).

Die regulatorische Domäne von NFAT beinhaltet mehr als 14 phosphorylierbare Serin-Reste. Hiervon können 13 durch Calcineurin dephosphoryliert werden (Okamura *et al.* 2000). Fünf der 13 Serin-Reste sind in dem SRR-1-Motiv lokalisiert, das die Freilegung der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) kontrolliert und ein Ziel der CK1 ist (Okamura *et al.* 2000; Okamura *et al.* 2004). Drei Serin-Reste liegen in dem SP-2-Motiv, die durch die GSK-3 phosphoryliert werden können. Hierfür ist eine vorangehende Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) erforderlich (Beals *et al.* 1997; Okamura *et al.* 2004). Weitere vier Serin-Reste sind in dem SP-3-Motiv lokalisiert. Für diese konnten Gwack *et al.* DYRKs als Kinasen identifizieren (Abb. 1.6) (Gwack *et al.* 2006). Die SP-2- und die SP-3-Motive regulieren nicht direkt die subzelluläre Lokalisation von NFAT. Allerdings erhöht dessen Dephosphorylierung die Wahrscheinlichkeit der NLS-Präsentation und die Affinität von NFAT an der DNA (Okamura *et al.* 2000; Okamura *et al.* 2004). Weiter konnten Gwack *et al.* zeigen, dass die verminderte Expression von endogenem DYRK1A durch spezifische *short interfering RNAs* (siRNA) in HeLa-Zellen die vermehrte Dephosphorylierung von NFAT nach sich zieht. Die Folge war der gesteigerte Import von NFAT in den Zellkern. Sowohl die Rephosphorylierung und der Export aus dem Zellkern waren verlangsamt (Gwack *et al.* 2006). DYRK1A und DYRK2 phosphorylieren Peptide *in vitro*, die zu dem SP-3-Motiv der regulatorischen Domäne von NFAT gehören, jedoch keine Peptide des SRR-1-Motivs und des SP-2-Motivs. Zwei Serin-Reste des NFAT-SP-3-Motivs (SPQRSRSSPSPQSPHVAPQDD) entsprechen der bekannten Sequenz (R(x)xx(S/T)(P/V)), die von DYRKs bevorzugt phosphoryliert wird. Wenn die zu phosphorylierenden Serin-Reste in dem SP-3-Motiv durch Alanin ersetzt werden, findet keine NFAT-Phosphorylierung statt (Himpel *et al.* 2000; Campbell und Proud 2002; Woods *et al.* 2001a). Insbesondere die Arbeiten von Gwack *et al.* und Arron *et al.* zeigten, dass DYRK eine Schlüsselkinase darstellt, die die NFAT-Phosphorylierung entscheidend reguliert. DYRK phosphoryliert das SP-3-Motiv und ermöglicht so erst die weiteren Phosphorylierungen der SRR-1-

und SP-2-Motive durch die CK1 und GSK3. Daher wird DYRK auch als Priming-Kinase bezeichnet. Die im Zytoplasma lokalisierten Isoformen DYRK2-4 werden dagegen als Maintenance-Kinasen bezeichnet, da sie den Phosphorylierungsstatus von NFAT der ruhenden Zelle aufrecht erhalten. Dagegen sind DYRK1A und DYRK2 im Zellkern vorhanden und exklusiv für die Rephosphorylierung und den Zellkernexport von aktiviertem NFAT verantwortlich (Gwack *et al.* 2006; Arron *et al.* 2006).

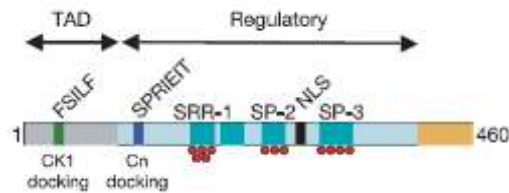


Abb. 1.6: Der Transkriptionsfaktor NFAT in schematischer Darstellung. NLS, Nukleäres Lokalisationssignal; TAD, Transaktivierungsdomäne; rote Punkte, phosphorylierte Serin-Reste im SRR-1-, SP-2- und SP-3-Motiv (Gwack *et al.* 2006, S. 646).

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

In den letzten Jahren wurden viele Kenntnisse über die Entstehung der Herzinsuffizienz gewonnen. Auf molekularer Ebene wurde das Verständnis von physiologischen und pathophysiologischen Transduktionswegen verbessert. Die Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz werden in den kommenden Jahren und Jahrzehnten deutlich zunehmen, da die Lebenserwartung der westlichen Gesellschaft stetig steigt. Um die Herzinsuffizienz in Zukunft besser behandeln zu können, ist es notwendig, neue therapeutische Ziele zu erforschen. Wie im Abschnitt 1.4 dargestellt, ist der Calcineurin/NFAT-Transduktionsweg ein wichtiger Signalweg in der Entstehung einer pathologischen Herzhypertrophie und -insuffizienz. In der vorliegenden Dissertation sollte *in vitro* und *in vivo* untersucht werden, ob DYRK1A in Kardiomyozyten als NFAT-Kinase wirkt und so, durch Hemmung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs, die Entwicklung einer pathologischen Herzhypertrophie verhindert werden kann. Wird die Phosphatase Calcineurin durch Ca^{2+} /Calmodulin aktiviert, dephosphoryliert sie NFAT und veranlasst die Translokation von NFAT in den Zellkern. Wir hypothesierten, dass die NFAT-Kinase DYRK1A aufgrund der zwei nukleären Lokalisationssignale im Zellkern von Kardiomyozyten vorliegt und durch direkte Phosphorylierung von NFAT dessen Export in das Zytoplasma bewirkt und so die Transkription pro-hypertropher Gene verhindert (Abb. 1.7).

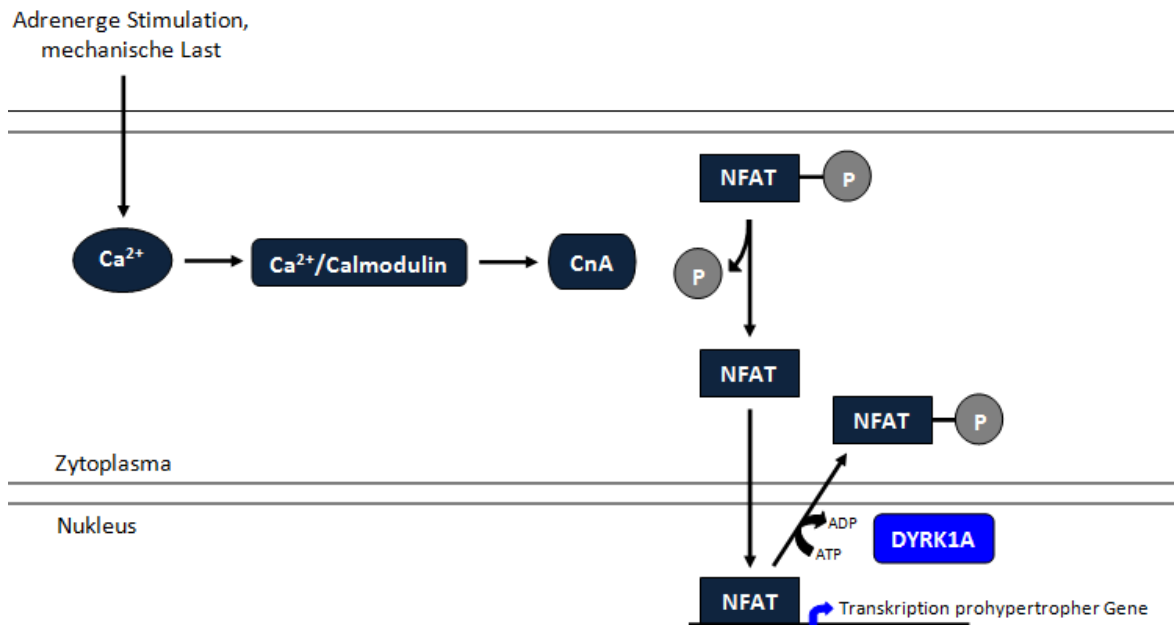


Abb. 1.7: Einfluss der Phosphatase Calcineurin und der Kinase DYRK1A auf die Lokalisation von NFAT in schematischer Darstellung. Die intrazelluläre Calciumkonzentration ist in der Herzhypertrophie und -insuffizienz aufgrund von neurohumoraler Stimulation und mechanischer Last erhöht. Der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex aktiviert die Phosphatase Calcineurin, was eine Dephosphorylierung und Translokation von NFAT in den Nucleus bewirkt. Dort wirkt NFAT als Transkriptionsfaktor positiv auf die vermehrte Expression pro-hypertropher Gene. Wahrscheinlich veranlasst die nukleäre Kinase DYRK1A die Re-Phosphorylierung von NFAT und somit den Export aus dem Zellkern. Bei gesteigerter DYRK1A-Aktivität würden die Promotoren hypertrophie-relevanter Gene nicht aktiviert werden. Dies könnte die Entstehung einer Herzhypertrophie bzw. -insuffizienz verhindern.

Die folgenden zentralen Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Welche DYRK-Isoform spielt in Kardiomyozyten eine bedeutende Rolle?

In diesem Zusammenhang sollte geprüft werden, welche Isoform der DYRK-Kinase-Familie in adulten Mauscardiomyozyten auf mRNA-Ebene am stärksten exprimiert wird.

2. Wird die DYRK1A-Expression durch NFAT reguliert?

Die Expression eines Proteins wird durch viele Einflüsse reguliert. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Frage bearbeitet, ob eine gesteigerte NFAT-Aktivität die Expression von DYRK1A beeinflusst. Der Transkriptionsfaktor NFAT sollte mit Calcineurin aktiviert und im folgenden Western Blot die Expression von DYRK1A analysiert werden.

3. Welchen Einfluss hat DYRK1A auf den aktivierten Calcineurin/NFAT-Signalweg *in vitro*?

Dafür sollte im Vorfeld mit Hilfe einer Dosis-Wirkungs-Kurve geprüft werden, ab welcher Konzentration das Sympathomimetikum Phenylephrin in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten eine Hypertrophie auslöst. In der folgenden planimetrischen Analyse sollte durch adenovirale DYRK1A-Überexpression geklärt werden, ob DYRK1A diese induzierte zelluläre Hypertrophie beeinflussen kann. Außerdem wurde untersucht, ob die endogene Hemmung bzw. Herunterregulation von DYRK1A Einfluss auf die intrazelluläre NFAT-Lokalisation hat. Für diese Fragestellung sollte zum einen endogenes DYRK1A spezifisch mit Harmin gehemmt werden. Zum anderen sollte die DYRK1A-Expression mittels eines angefertigten Adenovirus herunterreguliert werden. Die Frage war hierbei, ob diese Veränderungen die Lokalisation des NFAT-GFP-Fusionsproteins beeinflussen.

4. Hat eine DYRK1A-Überexpression in transgenen Mäusen, bei denen eine Hypertrophie induziert wurde, einen protektiven Effekt?

Um die Wirkung von DYRK1A *in vivo* zu untersuchen, sollten zwei Mausmodelle detailliert analysiert werden. Bei beiden Modellen sollte eine Hypertrophie induziert werden, bei dem einen Modell durch eine transaortale Konstriktion der Aorta (TAC), bei dem anderen durch eine herzspezifische Calcineurin-Überexpression. Die Frage war, ob die transgenen Mäuse aufgrund einer DYRK1A-Überexpression eine geringere Hypertrophie aufwiesen. Dies sollte mittels Echokardiographie, *Real-time* RT-PCR und Immunhistologie geprüft werden.

5. Beeinflusst DYRK1A die transkriptionelle NFAT-Aktivität *in vivo*?

Mit Hilfe der molekularen Bildgebung sollte in NFAT-Luciferase-transgenen Mäusen geprüft werden, ob eine DYRK1A-Überexpression die Transkriptions-Aktivität von NFAT beeinflusst.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
Aceton	Sigma-Aldrich, München
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Aprotinin	Roche, Mannheim
basal Iscove-Medium	Biochrom, Berlin
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
Creatin	Sigma-Aldrich, München
Cytosin-β-D-arabinofuranosid-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
dNTPs (100mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM-Medium)	Sigma-Aldrich, München
DMEM:F12 (1:1)	Invitrogen, Karlsruhe
Entwicklerlösung	Kodak, Darmstadt
Ethanol	Baker, Deventer (NL)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, München
Fixierlösung	Kodak, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Formalin	Merck, Darmstadt
Glukose (Dextrose)	AppliChem, Darmstadt
Glutaminsäure, D-, L-	Sigma-Aldrich, München

Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, München
Glycerolphosphat, β -	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Harmin	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm
HEPES	Sigma-Aldrich, München
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, München
Isofluran	EurimPharm Arzneimittel GmbH, Piding
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Kollagenase CLS 2	Biochrom, Berlin
Laminin	Sigma-Aldrich, München
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Luciferin, D-	Biosynth, Staad (Schweiz)
M199-Medium	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol, β -	Sigma-Aldrich, München
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, München
Natriumpyrophosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$)	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
PBS	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Sigma-Aldrich, München
Pepstatin	Biomol, Hamburg
Phenol	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylephrin	Sigma-Aldrich, München
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	Bio-Rad Laboratories, München

Ponceau-Lösung	Sigma-Aldrich, München
Röntgen Superfix	Tetenal, Norderstedt
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Taurin	Sigma-Aldrich, München
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Trishydroxymethyl-aminoethan (Tris-Base)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Biochrom, Berlin
Vectashield-Mounting-Medium (ohne DAPI)	VectorLab, Burlingame (USA)
WGA (Wheat-Germ-Agglutinin)	Sigma-Aldrich, München
Xylol	Sigma-Aldrich, München

2.1.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Collagenase Typ II	Worthington, Lakewood NJ (USA)
iScript™ Reverse Transcriptase	Bio-Rad Laboratories, München
RNase-free DNase	Qiagen, Hilden
Mango Taq DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Proteinkinase K	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Gebrauchswaren

Gebrauchsware	Bezugsquelle
96-Well <i>Real-time</i> RT-PCR Platten	Bio-Rad Laboratories, München
Blottingpapier GB 003	Schleicher & Schüll, Dassel
Falcon Culture-slides	Becton Dickinson, Heidelberg
Filterpapier	Whatman, Dassel
Mikro-osmotische Pumpe (Model 1002)	Alzet, Cupertino (USA)
Nitrocellulose Membran	Whatman, Dassel

Objektträger, superfrost	Nunc, Wiesbaden
Omnican 40 (40 G Einmal-Insulinkanüle)	Braun, Melsungen
Pipettenspitzen	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Fuji Medical X-Ray Films	Fujifilm GmbH, Düsseldorf
Sterilfilter	Milipore, Bad Schwalbach
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Kit	Bezugsquelle
BCA TM Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford (USA)
DirectPCR-tail-Reagent	PEQLAB, Erlangen
iQ TM SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München
iScript TM cDNA-Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, München
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford (USA)

2.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Echokardiographie-Gerät Vevo 660	VisualSonics, Toronto (Kanada)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Hamburg
Geldokumentationssystem (Multimage TM Light Cabinet)	Alpha Innotech, San Leandro (USA)
Gelelektrophoresekammer (für SDS-PAGE) und Blotting-Apparatur	Bio-Rad Laboratories, München

Homogenisator (Micra)	ART Labortechnik, Müllheim
IVIS Lumina II	Caliper LifeSciences, Hopkinton (USA)
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Hamburg
Mikrotom (JUNG RM 2035)	Leica Deutschland, Wetzlar
<i>Real-time</i> RT-PCR-Gerät iQ TM 5	Bio-Rad Laboratories, München
Multicolor Detection System Pipetten	Eppendorf, Hamburg
µQuant Universal	Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA
Microplate-Spektralphotometer	

2.1.6 Sterilisationsverfahren

Die Gebrauchswaren, Lösungen und Kulturmedien wurden bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert oder über Nacht bei 220°C hitzesterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden steril filtriert. Wässrige Lösungen für RNA-Präparationen und RNA-Analysen wurden mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, für 12 bis 24 h bei RT inkubiert und im Anschluss zwei Mal autoklaviert.

2.1.7 Medien und Puffer

2.1.7.1 Stammlösungen/Puffer

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
Diethylpyrocarbonat-(DEPC-) H ₂ O	0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat Inkubation für 24h unter Rühren, danach Dampfdrucksterilisation
Ladepuffer für PCR-Produkte	40 % Sucrose 1 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylenyanol FF

5x TBE-Puffer	445 mM Tris/HCl pH 8,0
	445 mM Borsäure
	10 mM EDTA

2.1.7.2 Lösungen für die Zellisolation

Lösung	Zusammensetzung
10x Thyrodepuffer	137 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,2 mM MgSO ₄ 1,2 mM Na ₂ HPO ₄ 20 mM HEPES
1x Thyrodepuffer ohne Calcium	10 % 10x Thyrodepuffer 2,7 g/l Glukose 1 % 100x Penicillin/Streptomycin
1x Thyrodepuffer mit Calcium	1 M CaCl ₂ in Thyrodepuffer ohne Ca ²⁺
Kollagenasepuffer	60 mM Taurin 8 mM D,L-Glutaminsäure 2 mM D,L-Carnitinsäure 1,3 mg/ml Collagenase II 26 µg/ml Protease XIV 0,025 mM CaCl ₂ in 1x Thyrodepuffer ohne Ca ²⁺ pH 7,54
Stopplösung	1 M CaCl ₂ 2 % (w/v) Albuminfraktion V BDM (607µg) in 1x Thyrodepuffer ohne Ca ²⁺

2.1.7.3 Lösungen für die Zellkultur

Lösungen	Zusammensetzung
Medium für adulte Kardiomyozyten	M199, Sigma-Aldrich (M7528) 5 mM Taurin 5 mM D, L-Carnitin 5 mM Creatin 1 % 100x Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin
Medium für neonatale Kardiomyozyten	4 Teile DMEM, Sigma-Aldrich (D1152) 1 Teil M199, Sigma-Aldrich 1 % 100x Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin

2.1.7.4 Lösungen für den Western Blot

Lösung	Zusammensetzung
10x TBS	0,2 M Tris 2 M NaCl pH 7,5
1x Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 150 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 8,3
4x Tris/SDS, pH 6,8	0,5 M Tris 0,4 % SDS auf pH 6,8 einstellen

4x Tris/SDS, pH 8,8	1,5 M Tris 0,4 % SDS auf pH 8,8 einstellen
5x Milchpuffer	5 % Magermilchpulver gelöst in TBS-Tween-Waschpuffer
5x SDS-PAGE-Laufpuffer	125 mM Tris Base 96 mM Glycin 0,5 % (w/v) SDS auf pH 8,3 einstellen
Lämmli-Ladepuffer	312,5 mM Tris/HCL pH 6,8 50 % Glycerol 10 % SDS 150 mM DTT 5 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau
Lysepuffer für Zellen/Gewebe	1 % (v/v) NP 40 10 % (v/v) Glycerol 137 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,4 10 mM EDTA pH 8,0 1 mM EGTA pH 7,0 20 mM NaF 1 mM Natrium-Orthovanadat 1 mM Natrium-Pyrophosphat 50 mM β -Glycerophosphat 4 μ g/ml Aprotinin 4 μ g/ml Leupeptin 4 μ g/ml Pepstatin A 1 mM PMSF

TBS-Tween-Waschpuffer	10x TBS Lösung 1 % Tween 20
-----------------------	--------------------------------

2.1.7.5 Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung Inkubationszeit	Bezugsquelle
anti- α -Actinin, Maus	1:200, 1h	Sigma-Aldrich, München
anti-DYRK1A monoclonal, Kaninchen	1:200, 1h	Santa Cruz (USA)
anti-flag M2 monoclonal, Maus	1:10000, 2h	Sigma-Aldrich, München
anti-GAPDH monoclonal, Maus	1:40000, 1h	Biotrend Chemikalien, Köln
anti-phospho-Mek1/2, Kaninchen	1:3000, über Nacht	New England Biolabs, Bad Schwalbach
anti-total Mek1/2, Kaninchen	1:3000, über Nacht	New England Biolabs, Bad Schwalbach

Sekundärantikörper	Verdünnung Inkubationszeit	Bezugsquelle
anti-mouse IgG, <i>Horseradish peroxidase</i> -linked whole Antibody (from sheep)	1:10000, 1h	GE Healthcare UK, Buckinghamshire (UK)
anti-mouse IgG Cy3-gekoppelt	1:10000, 1h	Dianova, Hamburg
anti-rabbit IgG, <i>Horseradish peroxidase</i> -linked whole Antibody (from donkey)	1:10000, 1h	GE Healthcare UK, Buckinghamshire (UK)

2.1.8 Adenoviren und Organismen

2.1.8.1 Adenoviren

Adenovirus	Präparationsdatum	biologische Aktivität
Ad-Balt-CMV-βgal (LacZ)	30.04.2002	$5,4 \times 10^{10}$
Ad-Calcineurin	24.07.2007	$1,31 \times 10^{11}$
Ad-DYRK1A	17.07.2007	$4,23 \times 10^9$
Ad-Dyrk1a-siRNA	23.04.2010	$8,77 \times 10^{10}$
Ad-Kontroll-siRNA	07.05.2010	$1,76 \times 10^{11}$
Ad-NFATc3-GFP	13.07.2007	$1,24 \times 10^{11}$

2.1.8.2 Tiere

Tier	Bezugsquelle
Calcineurin-transgene Mauslinie	Arbeitsgruppe J. Molzentin
DYRK1A-transgene Mauslinie	Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen
NFAT-Luciferase-transgene Mauslinie	Tierzucht, Universitätsmedizin Göttingen
Wistar Ratten	Tierzucht, Universitätsmedizin Göttingen

Die Haltungsbedingungen bestanden aus einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei 22°C und 55 ± 5 % relativer Luftfeuchtigkeit mit uneingeschränktem Zugang zu Trinkwasser und Nahrung. Tierfutter wurde von der Firma ssniff-Spezialdiäten (Soest) bezogen.

2.1.9 Datenbanken und Analysesoftware

Zur Bearbeitung und Auswertung von Daten wurden folgende Programme verwendet:

Programm	Verwendung
Alpha Ease FC Version 4.1.0 (Alpha Innotech, San Leandro (USA))	Densitometrische Auswertung
Axio-Vision 4.0 (Zeiss, München)	Fluoreszenzmikroskop
GraphPad Prism 5 (San Diego (USA))	Statistische Auswertung
ImageJ 1.42 (http://rsb.info.nih.gov/ij/)	Vermessung von Zelloberflächen
IQ5 (Bio-Rad Laboratories, München)	Auswertung von <i>Real-time</i> RT-PCR-Daten
Living Image 3.1 (Caliper LifeSciences, Hopkinton (USA))	Auswertung der Biolumineszenzdaten

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

2.2.1.1 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus adulten Ratten

Die „Tötung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ nach § 4 TierSchG erforderte die Mitteilung an die Landesbehörde, die durch den Tierschutzbeauftragten der Universitätsmedizin Göttingen erfolgte. Die Tiere wurden bei einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus bei einer Raumtemperatur von 22°C mit uneingeschränktem Zugang zu Wasser und Futter gehalten.

An einer modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage wurden die adulten Rattenkardiomyozyten isoliert. Die Wistar-Ratten wiesen ein Körpergewicht zwischen 200 und 250 g auf und stammten aus der Tierzucht der Universitätsmedizin Göttingen. Die Anästhesie der Ratten erfolgte mit Isofluraninhalation (20 µl/g KG). Nach dem Eintritt tiefer Anästhesie wurden die Tiere mittels Genickbruch getötet, woraufhin schnellstmöglich der Thorax der Tiere eröffnet wurde, das Herz freipräpariert und Heparin (625 Internationale Einheiten (I.E.)) in das linke Atrium injiziert wurde. Das Herz wurde mit seinem langen Aortenstumpf entnommen und, um das im Herz verbliebene Blut zu entfernen, in einem Becherglas mit eisgekühlter Tyrodelösung (inklusive 1,25 mM Calciumchlorid) achtsam gespült. In den Aortenstumpf wurde eine Kanüle eingeführt und daran das Herz an der Langendorff-Apparatur zur Perfusion aufgehängt. Mit einer Flussrate von 8-10 ml/min wurde das Herz retrograd perfundiert (Langendorff-Perfusion) (Marsh 1979). Alle Lösungen, die für die Perfusion zum Einsatz kamen, wurden während des Isolationsprozesses mit 100 % Sauerstoff begast und auf 37°C vorgewärmt. Im Jahr 1895 beschrieb Oscar Langendorff erstmalig eine solche Apparatur, die auf dem Prinzip der Aufrechterhaltung der Herzfunktion durch die Zufuhr einer oxygenierten, alle notwendigen Nährstoffe enthaltenden Flüssigkeit über die Aorta ascendens beruht. Durch die retrograde Applikation der Nährlösung schloss die Aortenklappe, was eine konsekutive Perfusion der Koronargefäße bewirkte (Langendorff 1895). Zunächst wurde das Herz mit einer Calciumchloridhaltigen Tyrodelösung perfundiert, bis es kräftig und regelmäßig schlug. Um anschließend die Herzfunktion zum Sistieren zu bringen, schloss sich eine circa fünfminütige Perfusion mit 400 ml einer calciumfreien Tyrodelösung an. Im darauffolgenden Schritt wurde das Herz 15-20 min mit einer kollagenasehaltigen Enzymlösung perfundiert, woraufhin das Organ eine weiche Konsistenz bekam. In einem Erlenmeyerkolben konnten die zuvor abgetrennten Ventrikel in der aufgefangenen Kollagenaselösung behutsam zerteilt werden. Der Gewebeaufschluss wurde während der nun folgenden 20minütigen bei 200

U/min und 37°C schüttelnden Inkubation fortgesetzt. Das verbliebene Gewebe wurde vorsichtig auf- und abpipettiert, um möglichst viele Zellen aus dem Zellverband zu lösen. Die Zellsuspension wurde zunächst durch ein Nylonnetz gefiltert und anschließend in einer 1:1-Verdünnung mit Tyrodelösung mit 0,125 mM Calcium verdünnt. Nach Sedimentation der Zellen wurde die Kollagenaselösung abgenommen und die Zellen mit Tyrodelösungen mit ansteigenden Calciumkonzentrationen (0,125 mM, 0,24 mM, 0,5 mM und 1 mM) mehrfach gewaschen. Nach dem letzten Sedimentationsschritt wurden die Zellen in ein 50-ml-Röhrchen, in dem sich M199-Medium mit Zusatz von 6 % Albumin befand, überführt. Für die Zellzählung wurden 40 µl Zellsuspension mit 40 µl Tryptan-Blau-Lösung vermischt. So konnten nicht-vitale Zellen kenntlich gemacht werden und die Zellmorphologie beurteilt werden. Die Gesamtzahl an vitalen Zellen betrug durchschnittlich circa vier Millionen. Das Verhältnis von intakten Zellen zu der Gesamtzahl der mittels eines Mikroskops sichtbaren Zellen betrug etwa 70 %.

2.2.1.2 Kultivierung von Kardiomyozyten adulter Ratten

Um eine ideale Anheftung der Rattenkardiomyozyten auf den Kulturschalen zu gewährleisten, wurden die Schalen mit Laminin beschichtet. Hierfür wurde Laminin 1:100 in M199-Medium verdünnt und die Platten nach Beschichtung mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abnehmen der Laminin-Medium-Lösung wurden bei einer Kulturschale mit einem Durchmesser von 6 cm in 2,5 ml M199-Medium 250.000 Zellen suspendiert und ausplattiert. Direkt im Anschluss erfolgte die adenovirale Transduktion der Zellen (2.2.3.1). Das M199-Medium wurde nach vierstündiger Inkubationszeit gewechselt, um einerseits die nicht adhärenen Zellen zu entfernen sowie andererseits die Virustransduktion zu terminieren. Die Kardiomyozyten wurden in dem frischen M199-Medium über 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.1.3 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten neonataler Ratten

Die Zellgewinnung erforderte die „Tötung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ nach § 4 TierSchG. Der Tierschutzbeauftragte der Universitätsmedizin Göttingen entrichtete die gesetzlich geforderte Mitteilung unter dem Aktenzeichen T 13.07 an die Landesbehörde.

Die maximal zwei Tage alten Wistar-Ratten eines Wurfes aus der Tierzucht der Universitätsmedizin Göttingen wurden durch Dekapitation getötet, auf einer Styroporunterlage fixiert und mit Ethanol desinfiziert. Bei meist zehn bis 14 Tieren wurde der Thorax schnellstmöglich eröffnet und das Herz freipräpariert. Die abgetrennten Ventrikel wurden in ein mit 1x PBS-Lösung gefülltes Becherglas überführt. Um eine Kontamination der Zellen zu vermeiden wurden alle weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden die Ventrikel in eine 10-cm-Zellkulturschale mit 3 ml einer Enzymlösung, bestehend aus 0,2 % Trypsin und 0,1 % Kollagenase in 1x PBS, gelegt. In dieser Lösung erfolgte die mechanische Zerkleinerung der Ventrikel mit einer Schere und die anschließende Überführung der Gewebesuspension in einen 50-ml-Erlenmeyerkolben. Es schlossen sich vier Verdauzyklen an. Hierbei wurde das in der Enzymlösung befindliche Herzgewebe jeweils 14 min lang auf einer magnetischen Heizplatte bei 37°C inkubiert und währenddessen mittels eines Rührmagneten mit einer Geschwindigkeit von 180 rpm gerührt. In dieser Phase wurden durch die Enzymaktivität die Zellen aus dem Zellverband gelöst. Nach jedem abgeschlossenen Inkubationsschritt wurden die im Überstand befindlichen herausgelösten Zellen vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Dieser Überstand wurde in ein vorbereitetes 50-ml-Falcon-Röhrchen, in dem sich bereits 35 ml 37°C warmes DMEM:F12-Medium befanden, pipettiert und im Zellkulturinkubator (37°C und 5 % CO₂) gelagert. Um im Erlenmeyerkolben ungefähr die gleiche Menge Enzymlösung zu haben, wurden vor jedem Inkubationszyklus 10 ml vorgewärmte Enzymlösung der Suspension beigefügt. Es schloss sich eine Zentrifugation der vier Falcon-Röhrchen mit der Zellsuspension in DMEM:F12-Medium bei 400 x g für 10 min bei Raumtemperatur an. Der Überstand wurde abgesaugt, die in den Röhrchen verbliebenen Zellpellets wurden in insgesamt 20 ml 37°C warmen DMEM:F12-Medium resuspendiert und in einem Röhrchen gesammelt. Im Anschluss wurden die Kardiomyozyten von anderen im Herzgewebe befindlichen Zellen (vor allem Fibroblasten) separiert. Hierfür wurde die Zellsuspension für 45 min bei 37°C in zwei 10-cm-Zellkulturschalen inkubiert. In dieser Zeit hefteten sich die Fibroblasten, im Gegensatz zu den Kardiomyozyten, an den unbeschichteten Zellkulturschalen an. So standen zur weiteren Verwendung vor allem die Kardiomyozyten zur Verfügung. Die im Medium-Überstand enthaltenen Kardiomyozyten wurden von den Platten abgenommen und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Dem Kulturmedium DMEM:F12 (1:1) wurden zusätzlich 1 % Pen/Strep, 10 % FCS, sowie ein Fibroblasten-Wachstumsinhibitor, Cytosin-β-D-arabinofuranosid (AraC), zugefügt. Um in jede Zellkulturschale die gleiche Anzahl an Zellen zu überführen wurden diese mit einer Neubauer-Improved-Zählkammer gezählt und anschließend auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen für die endgültige Kultivierung ausplattiert.

2.2.1.4 Kultivierung von Kardiomyozyten neonataler Ratten

Die Zellkulturschalen wurden zunächst mit einer 2 %igen Gelatinelösung, bestehend aus 50 ml HCl und 1 g Gelatine, beschichtet. Das DMEM:F12-Medium (1:1) mit 1 % Pen/Strep und 10 % FCS wurde mit den darin enthaltenen frisch isolierten Rattenkardiomyozyten ausplattiert. Je nach Versuch wurden in 3-cm-Schalen 100.000 Zellen in 2 ml Medium und in 6-cm-Schalen 1.000.000 Zellen in 4 ml Medium ausplattiert. Die Zellen wurden für 18 h in einem Inkubationsschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend die toten Zellen durch mehrmaliges Waschen mit DMEM-Medium entfernt. Die adhärenenten Zellen wurden mit frischem DMEM/M199-Medium im Verhältnis 4:1 versorgt. Es erfolgte die adenovirale Transduktion der Zellen (2.2.3.1). Die Zellen wurden je nach Versuch für 48-72 h in einem Inkubationsschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.1.5 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Mäuse

Die Isolation muriner Kardiomyozyten erforderte die „Tötung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ gemäß § 4 TierSchG. Es erfolgte eine Mitteilung an die Landesbehörde durch den Tierschutzbeauftragten der Universitätsmedizin Göttingen. Die Isolation der Herzmuskelzellen aus Mäuseherzen erfolgte an einer Langendorff-Perfusionsanlage. Diese wurde vor Versuchsbeginn zweimal mit einer Isolationslösung gespült und anschließend auf 37°C erwärmt, um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen.

Die Mäuse wurden mit Isofluraninhalation (20 µl/g KG) anästhesiert und mittels Genickbruch getötet. Nach Eröffnung des Thorax und Gewinnung des Herzens wurde dieses retrograd über die Aorta mit PBS perfundiert, um das in den Koronarien und Herzkammern befindliche Blut zu entfernen. Anschließend wurde das Herz an die Langendorff-Perfusionsanlage angeschlossen und mit einer herzwichtadaptierten Menge Kollagenase-Lösung erneut retrograd perfundiert. Nach erfolgreicher Auflösung des Bindegewebes wurde das Herz weich und bekam einen glasigen Charakter. Nach 7-10 min nahm die Perfusionsgeschwindigkeit zu und das Herz wurde von der Perfusionsanlage genommen. In einem Glasbehältnis mit Verdauungslösung wurde das Herz zerschnitten und 5 min darin belassen. Das so entstandene Zellgemisch wurde mittels eines Nylonfilters mit einem Porendurchmesser von 200 µm in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Nach Sedimentation der Mausmyozyten wurde der das Verdauenzym enthaltende Überstand abgesaugt und anschließend ein Calciumaufbau durchgeführt. Die Calciumkonzentration der Zelllösung wurde so in vier Schritten mit Lösungen steigender Konzentrationen von 0,125 mM

über 0,25 mM und 0,5 mM auf 1 mM intrazellulärem Calcium erhöht. Anschließend konnten die Zellen zur weiteren Verarbeitung verwendet werden. In dieser Arbeit schloss sich die RNA-Isolierung an (2.2.2)

2.2.2 Isolierung von RNA und cDNA-Synthese

2.2.2.1 RNA-Isolierung aus murinen Kardiomyozyten

Mit dem RNeasy® Mini-Kit der Firma Qiagen (Hilden) wurde aus kultivierten Mausmyozyten die RNA isoliert. Die Extraktion wurde durch eine Kombination aus Guanidinsalzen, Phenol und 1-Bromo-3-chloropropan vorgenommen. Die kultivierten adhärennten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst. Es folgte bei 4°C und 500 x g für 5 min ein Zentrifugationsschritt, so dass die pelletierten Zellen mittels QiaShredder®-Säulen homogenisiert werden konnten. Die RNA-Isolation geschah mit einer Säulenaufreinigung durch eine Silica-Membran. Um eine RNase-freie Isolation zu gewährleisten, wurden RNase-freie Kunststoff-Einweggefäße und -Filterspitzen verwendet.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde nach der Methode von Loh *et al.* (1989) durchgeführt. Das Enzym *Reverse Transkriptase* synthetisiert eine der mRNA komplementäre cDNA. Hierfür kam das iScript™ cDNA-Synthese-Kit von der Firma Bio-Rad Laboratories (München) zum Einsatz und das Protokoll wurde nach den Angaben des Herstellers bearbeitet.

2.2.2.3 Quantitative *Real-time* RT-PCR

Die quantitative *Real-time* RT-PCR ist eine Variante der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.* 1985), bei der während der Messung die Menge an entstandenen Produkten gemessen werden kann. Durch die PCR können *in vitro* kleinste Mengen von Nukleinsäuren amplifiziert werden. Ein Zyklus der DNA-Amplifikation sieht folgendermaßen aus: Denaturierung der DNA,

Anlagerung der Primer an die komplementäre Sequenz des jeweiligen Einzelstrangs (Annealing) und die Synthese der DNA durch die Polymerase in 5'-3'-Richtung (Elongation). So kommt es durch Wiederholung dieses Zyklus zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA-Sequenz. Durch den Einsatz der hitzestabilen Taq-Polymerase des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus* (Chien *et al.* 1976) wurde die Automatisierung der PCR in programmierbaren Thermocyclern ermöglicht. Bei der quantitativen *Real-time* RT-PCR bindet ein Fluoreszenzfarbstoff an doppelsträngige DNA, wodurch produktabhängig ein Fluoreszenzsignal generiert wird. Anhand dessen kann die Produktzunahme quantifiziert werden. Als Farbstoff wurde der Cyaninfarbstoff SYBR-Green I (Singer *et al.* 1994) verwendet, der als iQTM SYBR-Green-Supermix (Bio-Rad Laboratories, München) bezogen wurde. Die Affinität dieses Farbstoffs ist in etwa 100 Mal höher als die von Ethidiumbromid und bindet sequenzunspezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA. Eine weitere positive Eigenschaft des Cyaninfarbstoffs SYBR-Green I ist, dass er nach Bindung und Anregung circa 1000 Mal stärker fluoresziert als freier Farbstoff (Morrison TB *et al.* 1998). So kann die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte sehr gut sichtbar gemacht werden. Blaulicht, von einer Wellenlänge von 480 nm, regt das SYBR-Green in Gegenwart von Doppelstrang-DNA an und weist ein maximales Emissionsspektrum bei 520 nm auf.

Mit dem iQ5TM Multicolor *Real-time* RT-PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, München) wurde die *Real-time* RT-PCR im 96-Well-Maßstab durchgeführt. Ein CCD (Charge-coupled Device)-Detektor erfasst bei der Messung ein simultanes Bild aller 96 Wells. Das System arbeitet mit einem PCR-Temperaturcyclus, gekoppelt an eine Halogenlampe und den Filtern zur Anregung des SYBR-Green-I-Farbstoffs. Jeder Reaktionsansatz enthielt 0,5 µM Oligonukleotide und 10 µl 2x iQTM SYBR-Green-Supermix, in dem sich die iTaq-DNA-Polymerase (50 U/ml) in einem optimierten Puffer, der dNTP-Mix (0,4 mM pro dNTP) und der SYBR-Green-I-Fluoreszenzfarbstoff befinden. Die cDNA wurde 1:1 verdünnt und jedem Ansatz 2,5 µl zugefügt. Um eine Standardkurve erstellen zu können, wurde das für die PCR spezifische Produkt über ein Agarosegel aufgereinigt, die DNA Konzentration photometrisch bestimmt und eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen zwischen 1 ng/µl und 0,5 fg/µl angesetzt. Zur Erhöhung der Stabilität wurde die DNA in mit yeast-RNA versetztem sterilem Wasser (für Injektionszwecke) gelöst. In Abhängigkeit seiner Expression musste eine Anpassung des Bereichs der Standardkurve für jedes Gen vorgenommen werden. Das Auftreten von unspezifischen Produkten wurde ausgeschlossen, indem nach vollendeter Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wurde. Dabei wird kontinuierlich die Fluoreszenz (F) bei steigender Temperatur (T) gemessen und daraus die 1. Ableitung (Steigung dF/dT) errechnet. Diese Ableitung wurde gegen die Temperatur aufgetragen, so dass die Maxima

bei den Primer-spezifischen Schmelztemperaturen dargestellt werden konnten. Unspezifische Produkte, z.B. Primer-Dimere, wurden durch zusätzliche Maxima ermittelt.

Im Folgenden sind die Schritte tabellarisch zusammengefasst:

95°C	1 min		Vordenaturierung
95°C	30 sec	} 45 Zyklen	Denaturierung
x°C	10 sec		Annealing
72°C	20 sec		Elongation
95°C	15 sec		
60°C	10 sec		
60-95°C	2°C/min		Schmelzkurve.

Die *Real-time* RT-PCR ermöglicht die absolute Quantifizierung der Expression. Hierbei wird das Verhältnis zwischen der initialen Menge des zu untersuchenden Zielamplikons und der eines Referenzamplikons ermittelt. Dieses Referenzamplikon wird unter identischen Bedingungen amplifiziert. In dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck das nicht entscheidend regulierte „Housekeeping-Gen“ Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Auf GAPDH lässt sich im Anschluss die ursprünglich eingesetzte Menge an cDNA normalisieren. Bei der Auswertung wird ein Signal-Schwellenwert definiert, bei dem sich jede Einzelreaktion in der exponentiellen Phase befinden sollte. Der Schwellenwertzyklus oder CT-Wert (*threshold cycle*) bezeichnet den Zeitpunkt (in Zyklen), an dem das Signal den Schwellenwert erreicht hat, und korreliert mit der Template-Menge, die für die Reaktion eingesetzt wurden. Der signifikant frühere oder spätere Anstieg der Fluoreszenz-Emission resultiert aus einer höheren bzw. niedrigeren Ausgangsstrang-Menge.

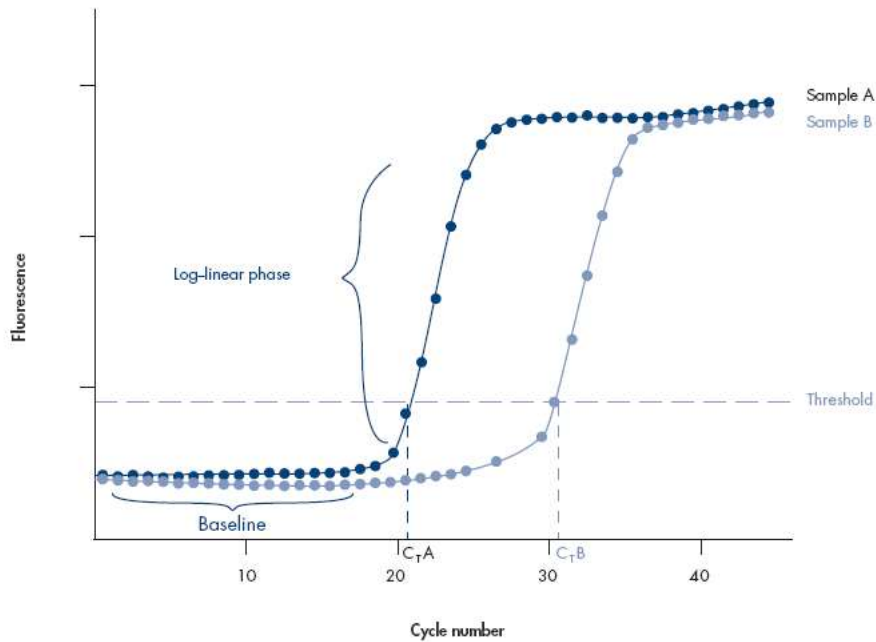


Abb. 2.1: Zunahme der Fluoreszenz zweier Proben (A und B) in Abhängigkeit der PCR-Zyklus-Anzahl. Probe A enthält eine größere Menge an Template als Probe B und überschreitet den Schwellenwert daher bei einem früheren Zyklus. CT: Schwellenwertzyklus. Quelle: QuantiTect SYBR-Green PCR Handbook, Qiagen (2003).

Das Programm iQ™5 Optical System Software Version 2.0 interpoliert aus den Daten der Standardkurven für jedes Amplikon die theoretisch eingesetzte cDNA-Menge. Dies geschieht sowohl für das Referenzamplikon als auch für das Testamplikon jeder Probe. Die Ergebnisse wurden in Excel (Microsoft Office 2007) exportiert und damit ausgewertet.

2.2.3 Adenoviral vermittelte Genexpression

2.2.3.1 Adenovirale Transduktion isolierter Rattenkardiomyozyten

Der adenovirale Gentransfer ist eine Methode der transienten Transduktion. Hierbei wird die DNA nicht in das Wirtsgenom integriert. Die *multiplicity of infection* (MOI) gibt die Virusmenge für die Transduktion einer Zelle an. Sie ist definiert als die Anzahl aktiver Viruspartikel pro Zelle. Die biologische Aktivität eines hergestellten Virus basiert auf der im Plaque-Assay ermittelten Viruskonzentration und wird in pfu/ml gemessen. Um eine bestimmte genetische Überexpression zu erhalten, wurden je nach Virus verschiedene MOI verwendet. Abhängig von der zu transduzierenden Zellzahl und der biologischen Virusaktivität wurde die benötigte Virusmenge für

die gewünschte MOI mit folgender Formel berechnet und anschließend dem Kulturmedium der ausplattierten Zellen zugesetzt:

$$V_{Stock} = \frac{MOI \times \alpha_{ct}}{c_{Stock}}$$

α_{ct} = Gesamtmenge an virustransduzierten Zellen

c_{Stock} = Viruskonzentration (pfu/ml)

V_{Stock} = Volumen an hinzuzufügendem Virusstock

Da sich adulte Rattenkardiomyozyten nicht mehr teilen, wurde die Virusinfektion nach vierstündiger Inkubation durch einen Mediumwechsel abgebrochen und die Zellen für 24 h inkubiert. Im Gegensatz dazu wurde das Virus bei teilungsfähigen neonatalen Rattenkardiomyozyten einen Tag nach Isolation für 48-72 h, je nach Versuch, auf den Zellen belassen.

2.2.3.2 Ernten der infizierten Kardiomyozyten

Um die abgestorbenen Kardiomyozyten zu entfernen wurden 4 ml 1x PBS auf die Kulturschalen gegeben und sofort wieder abgesaugt. Auf die verbliebenen vitalen Kardiomyozyten wurde 1 ml 1x PBS pipettiert und die Zellen auf dem Boden der Kulturschale mit einem Zellschaber gründlich gelöst. Die in ein 2-ml-Reaktionsgefäß pipettierte Zellsuspension wurde anschließend bei 200 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets bei -80°C eingefroren.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Protein-Lysaten aus eukaryotischen Zellen

Das unter 2.2.3.2 entstandene Pellet wurde in 150 µl Lysepuffer resuspendiert und mit Hilfe einer 40G-Kanüle mechanisch lysiert. Es folgte eine 15 minütige Inkubationszeit der Reaktionsgefäße auf Eis, wonach sich eine Zentrifugation bei 16.000 x g für 5 min anschloss, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Da die Zellproteine im Überstand gelöst sind, wurde dieser in ein

neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration (2.2.4.3) bestimmt. Das Lysat wurde bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Herstellung von Protein-Lysaten aus murinen Herzen

Die Maus wurde getötet und unmittelbar danach das Herz entnommen. Dieses wurde in kaltem PBS gewaschen und perfundiert, um das restliche Blut aus den Ventrikeln und Gefäßen zu entfernen. Anschließend wurden die Ventrikel in ein Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Um die Proteine aus 100-200 mg gefrorenem Gewebe zu isolieren, wurde 300-500 μl frisch angesetzter Lysepuffer auf das Gewebe gegeben und mittels eines Rotor-Stator Homogenisators der Firma ART Labortechnik (Mühlheim) auf höchster Stufe homogenisiert. Die Lysate wurden bei $8000 \times g$ für 10 min bei 4°C zentrifugiert und die im Überstand befindlichen Proteine in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lysaten

Die Proteinkonzentration einer Protein-Lösung wurde nach der BCA-Methode (Smith PK *et al.* 1985) mit Hilfe des BCATM Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford (USA)) bestimmt. Bei dieser Methode läuft die Biuret-Reaktion ab, bei der Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung an Proteine binden. Werden die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen reduziert, bilden diese mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm besitzt. Es wurden 200 μl einer 50:1-Mischung zweier vom Hersteller bereitgestellten Lösungen A und B zu 25 μl einer 1:10- oder 1:20-Verdünnung der zu messenden Protein-Lösung gegeben. Die Lösungen in einer Mikrotiterplatte wurden für 30 min bei 37°C in einen Inkubationsschrank gestellt, worauf sich die Messung der Extinktion der Proben anschloss. Dies geschah mit Hilfe eines μQuant Universal Microplate-Spektralphotometers (Bio-Tek Instruments, Winooski (USA)) bei einer Wellenlänge von 562 nm.

2.2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ziel der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli ist die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970). Es wurde eine Protean™ II Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad Laboratories, München) verwendet. Um das Trenn- bzw. Sammelgel zu gießen wurden folgenden Komponenten gemischt und nach Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) und TMED (Tetramethylethylendiamin) wurde die Suspension rasch zwischen zwei Glasplatten gefüllt:

	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
Acrylamid-Biscrylamid	5 ml	0,67 ml
4x Tris/SDS, pH8,8	3,75 ml	----
4x Tris/SDS, pH6,8	----	1,25 ml
H ₂ O	6,25 ml	3,08 ml
APS	50 µl	30 µl
TMED	10 µl	10 µl

Die Proteinproben wurden mit Lysepuffer und 5x Laemmli-Puffer auf eine definierte Proteinkonzentration eingestellt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1x PAGE-Laufpuffer bei 100 mA. Die Dauer betrug etwa 1 h und variierte je nach Größe des Zielproteins. Um die Größe der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurde direkt neben den Proteinproben ein vorgefärbter Proteinstandard (Bio-Rad Laboratories, München) aufgetragen.

2.2.4.5 Western Blot

Um die Proteine immunologisch nachweisen zu können, erfolgte zunächst ein elektrophoretischer Transfer, nach dem Tank-Blot-System der Firma Bio-Rad Laboratories, auf eine Nitrozellulosemembran. Für den Aufbau wurde das *sandwich*-Modell verwendet. Alle verwendeten Materialien wurden in Transferpuffer getränkt. Auf einen Schwamm wurden zwei Filterpapiere, die Membran und das PAGE-Gel luftblasenfrei gestapelt. Zwei weitere Filterpapiere und ein Schwamm wurden auf das Gel gelegt und der gesamte Stapel in eine Kassette geschlossen. Diese wurde in den mit Transferpuffer gefüllten Tank eingehängt. Es wurde darauf geachtet, dass vor allem die Membran und das Gel ständig feucht gehalten wurden. Die Proteine transferierten bei 500 mA für 2 h in Richtung Anode aus dem Gel auf die Membran. Während des

Transfers wurde die Kassette direkt durch einen Eisakku und der gesamte Tank in einem Eisbad gekühlt. Nach dem Transfer wurde die Membran reversibel mit einer Ponceau-Rot-Lösung gefärbt, um die gleichmäßige Übertragung zu überprüfen und zu dokumentieren. Zusätzlich diente die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure zur Fixierung der Proteine auf der Membran. Es schloss sich die Inkubation von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern an. Hierzu mussten zuerst die unspezifischen Bindungsstellen geblockt werden, um im weiteren Verlauf ein eindeutiges Ergebnis zu erhalten. Die Membran wurde nach dem Proteintransfer in 1x TBS-Tween (TBST) mit 5 % Magermilchpulver für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht gelegt. Nach kurzem Waschen in 1x TBST erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei einer für den jeweiligen Antikörper entsprechenden Verdünnung (2.1.7.5) in 1x TBST/0,5 % Magermilchpulver bei 4°C über Nacht oder für 2 h bei Raumtemperatur. Um mehrere Proteine auf einer Membran detektieren zu können, wurde die Membran auf entsprechender Höhe geteilt und mit unterschiedlichen Primärantikörpern getrennt inkubiert. Anschließend wurden die Membranteile 3x 5 min in TBST gewaschen und mit einem zum Primärantikörper passenden HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in 1x TBST/0,5 % Magermilchpulver für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden erneut 3x 5 min in 1x TBST gewaschen. Zwischenzeitlich wurde eine 1:1-Mischung von Luminol/Enhancer-Lösung und stabiler Peroxid-Lösung angesetzt (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce (USA)). Diese Mischung wurde auf die Membranen pipettiert, so dass diese für 5 min dauerhaft bedeckt waren. Nach der Inkubationszeit lies man die Membranen abtropfen und legte sie in eine Röntgenkassette. Die Oxidation von Luminol löst eine Chemilumineszenz-Reaktion aus, die durch die Peroxidase katalysiert wird. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm (Super RX, Fujifilm, Düsseldorf) aufgelegt und nach 1 min entwickelt. Durch die Veränderung Belichtungszeit konnte die Intensität der Banden verstärkt oder vermindert werden.

2.2.5 Diagnostik der subzellulären Lokalisation von Fusionsproteinen

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von NFATc3 wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit einem Adenovirus transduziert, das für ein Fusionsprotein aus NFATc3 und *green fluorescent protein* (GFP) kodiert. Nach der Isolation wurden 100.000 Zellen pro 3-cm-Schale ausplattiert, am darauf folgenden Tag mit DMEM-Medium gewaschen und alle Schalen mit dem NFATc3-GFP-Virus transduziert. Weiter wurden die Schalen nach den Untersuchungsgruppen mit Harmin (1µM), einem spezifischen DYRK1A-Inhibitor (Seifert *et al.* 2008; Bain *et al.* 2007; Sitz

et al. 2008; Kuhn *et al.* 2009), mit einem konstitutiv aktivem Calcineurin-Adenovirus und mit dem Adenovirus *Dyrk1a*-siRNA versorgt. Die Kontrollgruppen wurden mit den Adenoviren Balt-CMV- β gal (Ad-LacZ) und einer *Kontroll*-siRNA transduziert. Da Harmin in Ethanol gelöst vorlag, wurde den Nicht-Harmin-Gruppen die gleiche Menge Ethanol (Vehikel-Kontrolle) zugeführt (max. 0,02 % Ethanol pro Schale). Nach 48 h Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Hamburg) bei 400facher Vergrößerung fotografiert. Die Lokalisation des NFATc3-GFP konnte durch Verwendung eines GFP-Filters und UV-Licht mit Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm und einer Emission bei 509 nm sichtbar gemacht werden. Um die verschiedenen Transduktionsbedingungen auswerten zu können wurden ausreichend viele Aufnahmen, hinsichtlich der Gruppenzuordnung verblindet, angefertigt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Axio-Vision 4.0 (Zeiss, Hamburg). Hierbei wurden die Zellen mit mehrheitlich nukleärer, mehrheitlich zytoplasmatischer oder ubiquitärer NFATc3-GFP-Lokalisation gezählt und die Zellen mit mehrheitlich nukleärem NFATc3 ins Verhältnis zu allen transduzierten Zellen gesetzt.

2.2.6 Planimetrie von Kardiomyozyten neonataler Ratten

Nach der Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten wurden 100.000 Zellen auf einer 3-cm-Kulturschale so ausplattiert, dass für die Analyse der zellulären Hypertrophie möglichst kein Kontakt zwischen den Zellen bestand. 24 h nach der Zellisolation wurden die Schalen mehrfach gewaschen und anschließend adenoviral transduziert. Hypertrophes Wachstum wurde durch Phenylephrin (5 μ M) induziert. Die Stimulation der Zellen erfolgte 24 h nach Virustransduktion, um den Zellen genug Zeit zur induzierten Proteinbiosynthese zu gewährleisten. 48 h nach Phenylephrin-Gabe wurden die Zellen mit DMEM/M199-Medium (im Verhältnis 4:1) gewaschen und mit einer 400fachen Vergrößerung hinsichtlich der Gruppenzuordnung verblindet fotografiert. Die planimetrische Messung bezüglich einer zellulären Hypertrophie erfolgte mit dem Programm ImageJ Version 1.42. Es wurden 150 Zellen pro Experiment und Transduktionsgruppe vermessen. Der Versuch wurde stets in Doppelbestimmung durchgeführt.

2.2.6.1 Immunzytochemische α -Aktinin-Färbung neonataler Rattenkardiomyozyten

Zur besseren Darstellung des Ergebnisses wurde für jede Gruppe eine repräsentative immunzytochemische Färbung der neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen 48 h nach Phenylephrin-Stimulation mit DMEM/M199-Medium (im Verhältnis 4:1) gewaschen und mit einer eiskalten Methanol/Aceton-Mischung im Verhältnis 7:3 bei -20°C fixiert. Die nach der Fixierung dreimal mit DPBS gewaschenen Zellen wurden in 1 % BSA in DPBS bei 4°C für mindestens 40 min geblockt. Nach dem Blocken wurde erneut in 1 % BSA in DPBS gewaschen und die Kerne mit 0,1 % Triton X-100 in 1 % BSA in DPBS 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Darauf erfolgte erneut ein Blockschritt in 1 % BSA in DPBS für 30-40 min bei Raumtemperatur. Der primäre Antikörper Anti- α -Aktinin (Sigma-Aldrich) ist spezifisch für kardiales α -Aktinin und wird in einer 1:200 Verdünnung in 1 % BSA in DPBS eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37°C . Nach drei erneuten Waschschritten wurde der Cy3-gekoppelte sekundäre Antikörper Anti-mouse IgG ebenfalls für 1 h bei 37°C inkubiert. Ab jetzt erfolgten alle weiteren Inkubationsschritte im Dunkeln. Nach einem weiteren Waschschriff wurde DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) zur Anfärbung der Zellkerne in einer 1:5000 Verdünnung zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe in DPBS und ein Waschschriff in H_2O . Anschließend wurden zwei Tropfen Vectashield-Mounting-Medium für Immunfluoreszenz (VectorLab, Burlingame (USA)) zugegeben, Deckgläschen aufgesetzt und versiegelt. Repräsentative Zellen der jeweiligen Versuchsgruppe wurden unter dem Mikroskop fotografiert.

2.2.7 Histologische Techniken

2.2.7.1 Gewebefixierung und -einbettung

Die Mäuse wurden mittels Genickbruch unter Isoflurannarkose getötet und die Herzen mit dem langen Aortenstumpf entnommen. Durch Einführen einer Kanüle in den Stumpf wurde das restliche Blut sowohl aus den Gefäßen als auch aus den Ventrikeln gespült. Die Herzen wurden direkt in 4 % Paraformaldehyd (PFA) gegeben und darin bei 4°C über Nacht belassen. Am nächsten Tag erfolgte zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe wurde das Gewebe entwässert. Folgendes Programm wurde in dem Einbettautomat der Firma Leica gewählt:

H ₂ O		2 h
70 % Ethanol		1 h 15 min
80 % Ethanol		1 h 15 min
96 % Ethanol		1 h 15 min
100 % Ethanol	2x	1 h 15 min
Chloroform	2x	1 h 30 min
Paraffin	3x	1 h 30 min.

Eine auf 65°C temperierte Einbettungsform wurde daraufhin zur Hälfte mit geschmolzenem Paraffin gefüllt, das Gewebe darin richtig positioniert und mit flüssigem Paraffin aufgefüllt. Bei 4°C wurde der Paraffinblock über Nacht ausgehärtet und dann in einem Stück aus der Form entnommen. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Lagerung bei 4°C.

2.2.7.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke mit dem fixierten Gewebe wurden in das Mikrotom (JUNG RM 2035, Leica) eingespannt und die Schnittdicke von 6 µm eingestellt. Die Schnitte wurden mit einem feinen Pinsel auf 37°C warmes Wasser gelegt und mit einem beschrifteten Objektträger aufgenommen. Um die Schnitte darauf zu trocknen und zu fixieren wurden sie bei 55°C für 1 h inkubiert. Zur Aufbewahrung und weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert. Die histologischen Analysen wurden stets in identischen Regionen der mittleren linksventrikulären Myokardwand durchgeführt.

2.2.7.3 Entparaffinierung

Zunächst wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert, um die anschließende Färbung in wässriger Lösung durchführen zu können. Dabei wurden die Präparate zunächst zweimalig in Xylol für 20 min inkubiert. Die weitere Entparaffinierung geschah in einer Alkoholreihe mit absteigenden Konzentrationen. Die Schritte sind im Folgenden zusammengefasst:

Xylol	2x	20 min
100 % Ethanol		5 min
90 % Ethanol		5 min
80 % Ethanol		5 min
65 % Ethanol		5 min
50 % Ethanol		5 min
25 % Ethanol		5 min
dH ₂ O		5 min.

2.2.7.4 WGA-Färbung (*Wheat-Germ-Agglutinin*)

Wheat-Germ-Agglutinin (WGA) ist ein Lektin, das die Eigenschaft hat, an N-Acetyl-*beta*-(1,4)-D-Glucosamin zu binden. Lektine sind zuckerbindende Proteine mit der Eigenschaft, Zellen zu agglutinieren oder Moleküle mit einem Kohlenhydratanteil (Polysaccharide, Glykoproteine, Glykolipide u.a.) zu präzipitieren. Durch Konjugation eines Fluoreszenzmarkers an das WGA ist es möglich, Bestandteile einer Zelle, die N-Acetyl-*beta*-(1,4)-D-Glucosamin bilden, mikroskopisch sichtbar zu machen. Da in der Zellmembran von Kardiomyozyten N-Acetyl-*beta*-(1,4)-D-Glucosamin exprimiert wird, wurde eine WGA-Färbung der Herzschnitte angefertigt. Anhand der Zellgrenzen konnte so eine Hypertrophie-Analyse der Kardiomyozyten transgener Mäuse durchgeführt werden. Um die Zellkerne zu identifizieren, wurde auch eine DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)-Färbung durchgeführt. DAPI bindet an Adenin/Thymin-reiche Verbindungen der doppelsträngigen DNA, hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 358 nm und ein Emissionsmaximum bei 461 nm.

Es wurde anhand folgenden Protokolls eine WGA-Färbung durchgeführt, um die Zellgrenzen sichtbar zu machen, und eine DAPI-Färbung, um die dazugehörigen Zellkerne zu identifizieren.

30 μ l einer WGA-Lösung (Sigma-Aldrich, München) mit der Konzentration 75 μ g/ml wurde auf die Schnitte pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 1x mit PBS gewaschen, bevor sich die DAPI-Färbung anschloss. DAPI wurde 1:500 mit 0,5 %igem BSA verdünnt und für 10 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit auf den Schnitten belassen. Nach 3x 5 minütigem Waschen in PBS wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit Vectashield-Mounting-Medium für Immunfluoreszenz (VectorLab, Burlingame (USA)) eingedeckt und bei 4°C in einer lichtdichten Kammer gelagert.

2.2.7.4.1 Auswertung der WGA-Schnitte

Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Hamburg) bei 400facher Vergrößerung fotografiert und anschließend mit dem Computerprogramm ImageJ 1.42 der kleinste Durchmesser einer Zelle gemessen. Da die Muskelfasern in den Herzen nicht exakt senkrecht organisiert sind, konnten die Zellen trotz senkrechter Positionierung der Herzen in dem Paraffin nicht genau orthogonal geschnitten werden. Der Querschnitt einer Zelle war folglich mehr oval als kreisrund. Daher wurde stets der kleinste Durchmesser einer Zelle gemessen. Dieser entspricht dann annähernd dem Durchmesser einer Zelle (Abb. 2.2). Die Daten der Durchmesser wurden in Excel übertragen und dort ausgewertet.

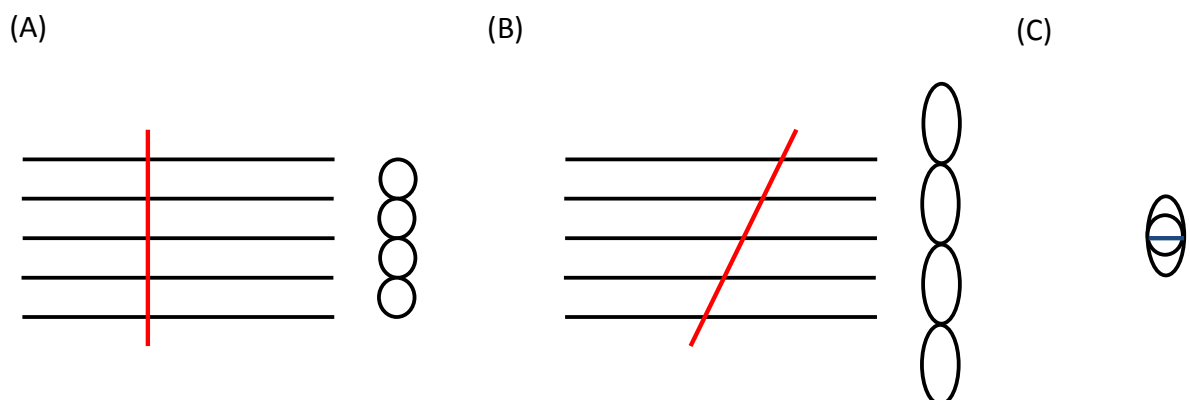


Abb. 2.2: Darstellung der Auswertung der WGA-Schnitte. (A) Schematische Darstellung von vier Muskelfasern in der Seit- (links) und Frontansicht (rechts). Der rote Strich stellt die Schnittebene des Mikrotoms durch das Gewebe dar. In der Frontansicht kommen die genau orthogonal geschnittenen Zellen nahezu kreisrund zur Darstellung. (B) Da das Gewebe, durch eine nicht exakt senkrechte Positionierung der Muskelfasern in den Herzen, nicht genau orthogonal geschnitten werden kann (roter Strich), sind die Querschnitte der Muskelfasern nicht kreisrund, sondern oval. (C) Wenn die Zellquerschnitte der orthogonalen und schrägen Schnittebenen übereinander gelegt werden, wird sichtbar, dass der kleinste Durchmesser beider Zellquerschnitte identisch ist (blauer Strich).

2.2.8 *In-vivo-Molecular-Imaging* - Biolumineszenz

Die Biolumineszenz wurde mit Hilfe des IVIS Lumina II (Caliper LifeSciences) *in vivo* gemessen. Dieses Gerät ermöglicht die quantitative Bestimmung eines Biolumineszenz-Signals in der Einheit Photonen/Zeit/Quadratcentimeter/Winkel (p/sec/cm²/sr). Eine CCD-Kamera, die thermoelektrisch auf -90°C gekühlt wird, nimmt das Signal an maximal drei Messplätzen mit einer Entfernung von 12,5 cm auf. Als Parameter für die Aufnahme eines Biolumineszenzsignals wurde ein Binning von vier gewählt. Das bedeutet, dass der CCD-Sensor stets vier benachbarte Bildpunkten (Pixel) zusammenfasste, wodurch eine höhere Lichtempfindlichkeit erreicht werden konnte. Eine integrierte Narkoseeinheit bewirkte, dass die Mäuse während der Detektion mit 3,5 % Isofluran und 1,4 l/min Sauerstoff tief anästhesiert waren.

2.2.8.1 Transgenes Mausmodell

Eine NFAT-Luciferase-Reporter-Maus diente als Modell für das *in-vivo-Molecular-Imaging*, mit dessen Hilfe die transkriptionelle NFAT-Aktivität gemessen werden sollte. Diese Maus besitzt ein herzspezifisches Transgen-Konstrukt, bestehend aus einem minimalisierten Promotor des α -myosin heavy chain (α -MHC) Gens. Dieser Promotor ist so modifiziert, dass er 5'wärts neun NFAT-Bindungsstellen des Interleukin-4 (IL-4) Promotors (5'-TGGAAAATT-3') aufweist und selbst 5'wärts einer Luciferase kodierenden DNA Sequenz liegt (Abb. 2.3). Die Expression des Enzyms Luciferase wird somit in Abhängigkeit der NFAT-Aktivität reguliert (Wilkins *et al.* 2004)

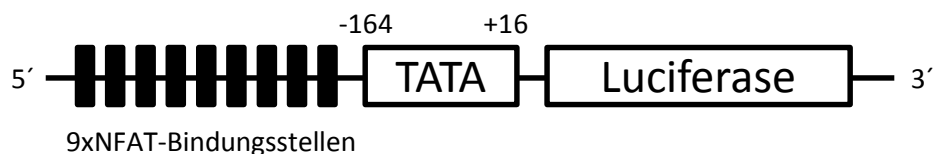
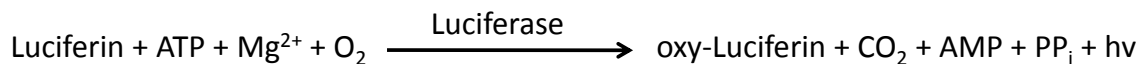


Abb. 2.3: Transgenes Konstrukt der NFAT-Luciferase-transgenen Maus. Dieses Konstrukt besteht aus einem herzspezifischen minimalisierten Promotor des α -myosin heavy chain (α -MHC) Gens (-164 bis +16), der 5'wärts mit neun NFAT-Bindungsstellen des Interleukin-4 (IL-4) Promotors (5'-TGGAAAATT-3') modifiziert ist. 3'wärts des minimalisierten Promotors liegt die Luciferase kodierende DNA Sequenz, deren Transkription durch diesen Promotor reguliert wird (Wilkins *et al.* 2004). Aktiviertes NFAT transloziert in den Zellkern der Kardiomyozyten, besetzt dort unter anderem die NFAT-Bindungsstellen und führt über die Aktivierung des minimalisierten Promotors zur Expression des Enzyms Luciferase. Die Expression des Enzyms Luciferase wird somit in Abhängigkeit der NFAT-Aktivität reguliert.

Der Leuchtkäfer *Photinus pyralis* exprimiert eine *firefly*-Luciferase. Dieses Enzym produziert in Anwesenheit von dem Substrat Luciferin, einem Benzothiazol, und Co-Substraten Licht. Das Enzym Luciferase katalysiert die Oxidation des Substrates Luciferin mit molekularem Sauerstoff und Co-Substraten zu oxy-Luciferin, was einen nicht stabilen, angeregten Übergangszustand bedingt. Dieser Übergangszustand geht unter Abgabe von Licht in einen stabilen Zustand über. Die Lichtproduktion ist hierbei proportional der Luciferasemenge, was dieses System in der molekularen Bildgebung anwenden lässt. In NFAT-Luciferase-transgenen Mäusen transloziert aktiviertes NFAT in den Zellkern der Kardiomyozyten, besetzt dort unter anderem die NFAT-Bindungsstellen und führt über die Aktivierung des minimalisierten α MHC-Promotors zur Expression des Enzyms Luciferase. In Anwesenheit des Substrates Luciferin entsteht durch eine chemische Reaktion Licht. Dieses Licht wurde in dem Bioluminometer IVIS Lumina II detektiert und ausgewertet.

Die Reaktionsgleichung lautet wie folgt:



2.2.8.2 Durchführung einer Messung

Die Durchführung einer Messung hatte folgenden Ablauf: die NFAT-Luciferase-transgene Mäuse wurden für eine Woche in ihrem Stall keinem Stress ausgesetzt, was eine Aktivierung des minimalisierten α MHC-Promotors mit folgender Expression der Luciferase verhindern sollte. Nacheinander wurden die Mäuse aus der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen in den Messraum gebracht, was circa 5 min in Anspruch nahm. Anschließend wurden die Mäuse mittels Isofluran anästhesiert und im Bereich des Thorax rasiert, um die Streustrahlung so gering wie möglich zu halten. Das Substrat Luciferin (Biosynth) wurde mit einer Dosis von 150 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert und die Maus auf den Messplatz in dem Bioluminometer vorsichtig unter die Kamera gelegt. Durch die Narkoseeinheit des Gerätes waren die Mäuse dauerhaft mit Isofluran anästhesiert. Nach 5 min Wartezeit wurde die erste Messung gestartet. In dieser Zeit sollte das Luciferin in den Blutkreislauf und das Herz gelangen. Die Belichtungszeit wurde von der Kamera automatisch je nach Signalstärke berechnet. Da dieses Gerät eine quantitative Bestimmung eines Biolumineszenz-Signals in der Einheit Photonen/Zeit/Quadratcentimeter/Winkel ($\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$) ermöglicht, war die eigentliche

Messung von den unterschiedlichen Belichtungszeiten unabhängig. Die Quantifizierung der Bilder erfolgte mit der Software Living Image R 3.1 (Caliper LifeSciences). Eine „*region of interest*“ (ROI) wurde mit einem Schwellenwert von 10 % in der Herzregion gewählt und der Hintergrund entsprechend der Fläche der ROI abgezogen. So wurden Daten von dem Biolumineszenzsignal ab einem Schwellenwert von 10 % und einer ROI abzüglich des Hintergrunds generiert. Die Signalstärke nahm bei jeder Maus in den ersten 25 min zu, erreichte dann ein Plateau, bevor sie nach etwa 30 min wieder abnahm. Diese Kinetik wurde bei jeder Maus und bei jeder Messung dargestellt, um für die Quantifizierung stets ein maximales Signal definieren zu können (3.9.2.2). Diese Daten wurden in Excel exportiert und in der Gesamtheit aller Bilder ausgewertet.

2.2.9 Transgene Mäuse

2.2.9.1 DYRK1A/tTA-transgene Maus

Die Generierung einer DYRK1A/tTA-transgenen Mauslinie erfolgte im Vorfeld dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe. Da eine 1,5fache Expression von DYRK1A im Gesamtorganismus bei transgenen Mäusen zu einer fehlerhaften Entwicklung der Herzklappen führt (Arron *et al.* 2006), wurde eine Maus konstruiert, die DYRK1A kardiomyozytenspezifisch und nur in adulten Tieren überexprimiert. Mit Hilfe des Tet-off-Systems wurde eine induzierbare DYRK1A-Überexpression in transgenen Mäusen erreicht. Hierfür mussten zwei Mauslinien miteinander verpaart werden. Zum einen die Tet-Regulator-Mauslinie (tTA), die das TetR-VP16-Fusionsprotein, kontrolliert von dem α MHC-Promotor, exprimiert. VP16 (*virion protein 16*) ist ein Protein des Herpes-simplex-Virus, das als Transaktivator die Transkription einer Promotorsequenz stimuliert (Gossen und Bujard 1992). Zum anderen kam die DYRK1A-überexprimierende Mauslinie bei der Verpaarung zum Einsatz. Die DYRK1A-Expression steht bei ihr unter Kontrolle eines modifizierten α MHC-Promotors, bei dem drei GATA-Bindestellen und zwei *thyroid-like responsive elements* deletiert waren, die sonst für die herzspezifische Expression erforderlich sind (Sanbe *et al.* 2003). Desweiteren enthält der Vektor 3'-wärts der TATA-Box sieben Kopien des Tet-Operators (TetO). Dieser modifizierte α MHC-Promotor kann nur durch Bindung des Tet-Regulators (TetR) an dem Tet-Operator (TetO) aktiviert werden.

Nach der Verpaarung entstanden so DYRK1A/tTA-doppelt-transgene Mäuse. Diese sollten nur in Abwesenheit von Doxycyclin in der Lage sein, vermehrt DYRK1A zu bilden. Dabei bindet der Tet-

Regulator an den Tet-Operator. Die Aktivierung des Promotors führt zu einer gesteigerten Expression von DYRK1A. Die Interaktion des TetR mit dem TetO wird in Anwesenheit von Doxycyclin blockiert und die DYRK1A-Überexpression somit unterbunden (Abb. 2.4). Dieses Tet-off-System regelt die Expression von DYRK1A in Abhängigkeit des Antibiotikums Doxycyclin. Dessen Konzentration betrug 0,2 g/l und wurde über das Trinkwasser den trächtigen Weibchen und anschließend allen Nachkommen bis zu einem Alter von vier Wochen verabreicht. Zusätzlich enthielt das Trinkwasser 1 % Sucrose.

Vier DYRK1A/tTA-doppelt-transgene Mauslinien wurden im Vorfeld dieser Arbeit generiert und sowohl auf die Supprimierbarkeit als auch auf die Induzierbarkeit der DYRK1A-Expression getestet. Es musste eine Mauslinie identifiziert werden, bei der die DYRK1A-Expression im nicht-induzierten Zustand unter Doxycyclin-Gabe supprimiert war, jedoch nach Absetzen des Doxycyclins ausreichend induziert werden konnte. Das ist notwendig, da die Expression des transgenen Proteins je nach Insertionsstelle bei jeder Mauslinie unterschiedlich ist. Abhängig davon, an welcher Stelle sich der Integrationsort befindet, liegt eine ausreichende Supprimierbarkeit bzw. Induzierbarkeit vor. Von den vier Founder-Linien erfüllte die Linie #45 diese Kriterien (Klingebiel 2009).

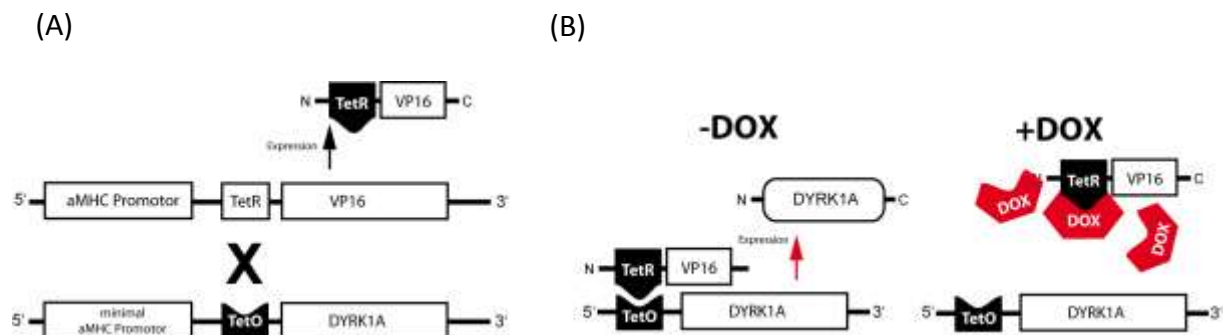


Abb. 2.4: Tet-off-System zur induzierbaren, herzspezifischen Überexpression von DYRK1A in transgenen Mäusen (Sanbe *et al.* 2003). (A) Zwei Mauslinien mussten für die induzierbare Überexpression miteinander verpaart werden: Die erste war die Tet-Regulator-Mauslinie (tTA), die das TetR-VP16-Fusionsprotein, kontrolliert von dem α MHC-Promotor, exprimiert. Die zweite war die DYRK1A-überexprimierende Mauslinie, die unter Kontrolle eines modifizierten α MHC-Promotors steht, der sonst für die herzspezifische Expression erforderlich ist. (B) Nach erfolgreicher Verpaarung entstanden so DYRK1A/tTA-doppelt-transgene Mäuse, die nur in Abwesenheit von Doxycyclin vermehrt DYRK1A bilden können. Hierbei kann der TetR an den TetO binden und der Aktivierung des Promotors folgt die gesteigerte DYRK1A-Expression. Allerdings wird die Interaktion des TetR mit dem TetO in Anwesenheit von Doxycyclin blockiert und die DYRK1A-Überexpression somit unterbunden. Die Doxycyclin-Konzentration betrug 0,2 g/l und wurde über das Trinkwasser den trächtigen Weibchen und anschließend allen Nachkommen bis zu einem Alter von vier Wochen verabreicht. Zusätzlich enthielt das Trinkwasser 1 % Sucrose (Abb. AG Hasenfuß/Seidler).

2.2.9.2 Genotypisierung der transgenen Mäuse

Im ersten Schritt wurde den transgenen Mäusen die Schwanzspitze abgeschnitten, um daraus die genomische DNA zu gewinnen. Hierfür wurde das DirectPCR-tail-Reagent (PEQLAB, Erlangen) verwendet. Zu den jeweiligen Schwanzspitzen in den Reaktionsgefäßen wurden 200 µl Lysepuffer mit Proteinkinase K gegeben und bei 55°C über Nacht inkubiert. Die Proteinkinase K wurde bei 85°C für 45 min hitzeinaktiviert und die Reaktionsgefäße im Anschluss für 3 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, woraufhin sich die Genotypisierung mittels PCR mit transgen-spezifischen Primern anschloss.

2.2.9.3 Phänotypisierung der transgenen Mäuse mit Hilfe der Echokardiographie

Um ein gutes Schallsignal zu erhalten, wurden die Mäuse vor der Untersuchung im Thoraxbereich rasiert. Dazu wurden die Tiere mit einem 1,5 % Isufluran-haltigem Gasmisch sediert. Auch während des Ultraschalls waren die Mäuse mit Isofluran über eine Maske narkotisiert. Die Echokardiographie erfolgte im M-Mode in der longitudinalen Achse. Als Parameter wurden die Septumdicke (SW), die Dicke der Hinterwand (PW), der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) und der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser (LVESD) gemessen. Ein Maß für die Pumpfunktion des linken Ventrikels stellt die relative Verkürzungsfraction (*fractional shortening* (FS)) dar. Diese wird mit folgender Formel ermittelt: $FS = ((LVEDD) - (LVESD)) / LVEDD * 100 \%$. Durchgeführt wurde die echokardiographische Untersuchung der transgenen Mäuse von Frau Spitalieri aus der Abteilung Molekulare Kardiologie der Universitätsmedizin Göttingen.

2.2.9.4 Stimulation transgener Mäuse durch mikro-osmotische Pumpen

Die NFAT-Luciferase/tTA/DYRK1A-transgenen Mäuse und die NFAT-Luciferase/tTA-transgenen Mäuse bekamen nach der ersten Biolumineszenzmessung mikro-osmotische Pumpen implantiert. Die erste Messung wurde als Ausgangswert durchgeführt, um nach Pumpenimplantation die Veränderung des Biolumineszenzsignals sichtbar zu machen. Die Pumpen wurden unter Isofluran-Anästhesie in das subkutane Bindegewebe eingesetzt. Sie gaben konstant mit einer Dosis von 0,1 mg/kgKG/Tag das Sympathomimetikum Phenylephrin ab. Zwölf Stunden und sieben Tage nach

der Implantation der Pumpen wurden erneut Messungen durchgeführt, um den Verlauf des Signals zu verfolgen.

2.3 Ethik

Die gesamten Untersuchungen und Analysen an lebenden Tieren wurden durch die örtliche Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen geprüft und bewilligt. Des Weiteren erfolgte die Prüfung und Genehmigung durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Das Aktenzeichen lautet: AZ 33.11.42502-04-078/07.

2.4 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5.0) statistisch ausgewertet. Für die Berechnung von statistischen Signifikanzen wurde beim Vergleich von zwei Gruppen der Student's t-Test angewandt. Sollten mehrere Gruppen hinsichtlich der Signifikanz getestet werden, wurde der One-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. Die Fehlerbalken in den Graphiken entsprechen, soweit im Abbildungstext nicht anders angegeben, dem Standardfehler (SEM).

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Expressionsstärke der bislang bekannten *Dyrk*-Isoformen in murinen Kardiomyozyten

In Vorarbeiten untersuchte Klingebiel (Molekulare Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) das Expressionsniveau verschiedener *Dyrk*-Isoformen in humanem Myokardgewebe. Sie konnte mittels *Real-time* RT-PCR zeigen, dass *Dyrk1a*, gefolgt von *Dyrk6*, die am stärksten exprimierte Isoform darstellt. Die Isoformen *Dyrk1b*, *Dyrk2*, *Dyrk3* und *Dyrk4* waren im Herzen in deutlich geringeren Mengen vorhanden (Klingebiel 2009). Jedoch schloss dieses Ergebnis die in humanem Myokardgewebe befindlichen Fibroblasten mit ein. Das adulte Mausherz enthält ungefähr 55 % Myozyten und 45 % Nicht-Myozyten, davon circa 27 % Fibroblasten. Im Gegensatz dazu weist das adulte Rattenherz lediglich 30 % Myozyten und 70 % Nicht-Myozyten auf, wovon alleine 67 % auf die Fibroblasten fallen (Banerjee *et al.* 2007). Eine vergleichbare Studie in humanem Herzgewebe liegt derzeit nicht vor. Jedoch zeigte diese Untersuchung deutlich, dass sich der Anteil der einzelnen kardialen Zellarten zwischen verschiedenen Spezies erheblich unterscheiden kann. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Isoform in isolierten Kardiomyozyten von Mäusen die am stärksten exprimierte Isoform ist.

Mittels quantitativer *Real-time* RT-PCR wurden die mRNA-Expressionsniveaus der bekannten Isoformen *Dyrk1a*, *-1b*, *-2*, *-3*, *-4* und *-6* in isolierten adulten Mauskardiomyozyten gemessen. Die Expression der einzelnen Isoformen wurde in das Verhältnis zu der Expression des nicht bedeutend regulierten „Housekeeping-Gens“ Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) gesetzt. Auf diese Weise konnte die mRNA-Menge der *Dyrk*-Isoformen auf *Gapdh* normalisiert und miteinander verglichen werden (Abb. 3.1).

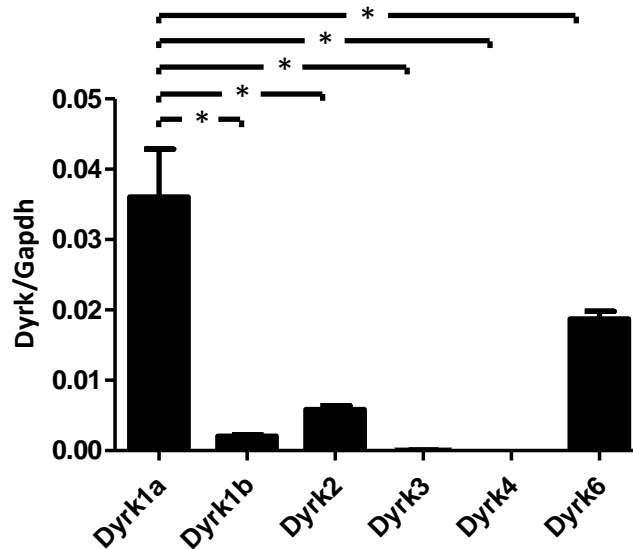


Abb. 3.1: Analyse der Expression der *Dyrk*-Isoformen in murinen Kardiomyozyten mittels quantitativer *Real-time* RT-PCR. *Dyrk1a* stellte in murinen Kardiomyozyten die am stärksten exprimierte Isoform dar. Das zweithöchste Niveau wies die Isoform *Dyrk6* auf. Auch sie wurde signifikant stärker exprimiert als die Isoformen *Dyrk1b*, -2, -3 und -4. Die RNA wurde aus drei verschiedenen Isolationen muriner Kardiomyozyten gewonnen. Zur Normalisierung wurden die Expressionsniveaus auf *Gapdh* bezogen. N=3; $p < 0,0001$.

Die Untersuchung der *Dyrk*-Isoformen in murinen Kardiomyozyten ergab, dass *Dyrk1a*, gefolgt von der Kinase *Dyrk6*, die am stärksten exprimierte Isoform war. Die weiteren Isoformen *Dyrk2* und *Dyrk1b* wiesen eine deutlich geringere Expression auf, wohingegen die Isoformen *Dyrk3* und *Dyrk4* am geringsten in Kardiomyozyten vorhanden waren (*Dyrk1a/Gapdh*: $3,61e-2 \pm 3,92e-3$; *Dyrk1b/Gapdh*: $2,08e-3 \pm 1,88e-4$; *Dyrk2/Gapdh*: $5,85e-3 \pm 5,67e-4$; *Dyrk3/Gapdh*: $6,01e-5 \pm 1,91e-5$; *Dyrk4/Gapdh*: $1,88e-5 \pm 9,47e-6$; *Dyrk6/Gapdh*: $1,87e-2 \pm 1,10e-3$). *Dyrk1a* wird verglichen mit sämtlichen bekannten Isoformen in murinen Kardiomyozyten signifikant stärker exprimiert. Auch die Isoform *Dyrk6* wird signifikant stärker exprimiert als die Isoformen *Dyrk1b*, *Dyrk2*, *Dyrk3* und *Dyrk4* ($p < 0,0001$).

3.2 Untersuchung der adenoviral vermittelten DYRK1A-Expression im Western Blot

Die Wahl der richtigen Konzentration eines Adenovirus ist essentiell für valide Ergebnisse eines Versuchs. Nur so kann der durch ein Adenovirus gesteigerte Einfluss eines Proteins im Kontext der Zellphysiologie korrekt beurteilt werden. Hierbei ist das Ziel eine moderate Überexpression zu erreichen und eine massive oder zu geringe Expression zu vermeiden. Um für Versuche mit ventrikulären Kardiomyozyten neonataler Ratten eine geeignete MOI (*multiplicity of infection*) zu finden, wurden diese mit unterschiedlichen Mengen des Adenovirus DYRK1A (Ad-DYRK1A) transduziert. Gewählt wurden die MOI 0, 1, 10 und 50. Die neonatalen Zellen wurden nach der Inkubationszeit von 48 h geerntet, lysiert und eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt. Im folgenden Western Blot wurde für jede Probe die gleiche Gesamtproteinmenge eingesetzt. Die Detektion des nicht bedeutend regulierten Proteins GAPDH bestätigte dies (Abb. 3.2). Bei der Herstellung des Ad-DYRK1A wurde an das aminoternale Ende eine Flag-tag-Sequenz fusioniert, um die Detektion von DYRK1A zu erleichtern. Um die DYRK1A-Proteinexpression sichtbar zu machen, wurde der Anti-Flag-Antikörper verwendet. Das theoretische Molekulargewicht von DYRK1A beträgt 87 kDa.

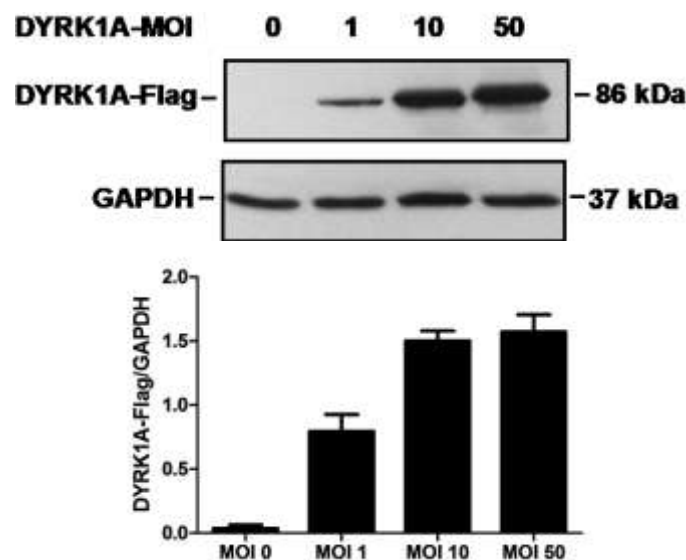


Abb. 3.2: Western Blot zur Überprüfung der MOI-abhängigen DYRK1A-Überexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Frisch isolierte neonatale Rattenkardiomyozyten wurden in aufsteigender MOI-Konzentration (MOI 0, 1, 10 und 50) adenoviral mit DYRK1A transduziert. Die Immunfärbung erfolgte mit Flag- und GAPDH-Antikörpern. Drei unabhängig voneinander durchgeführte Western Blots wurden quantitativ densitometrisch ausgewertet. Die ermittelte DYRK1A-Proteinmenge wurde auf die Proteinmenge von GAPDH normalisiert (DYRK1A-Flag/GAPDH). N=3; $p < 0,0001$.

Durch die adenovirale Transduktion neonataler Rattenkardiomyozyten mit aufsteigender MOI (MOI 0, 1, 10 und 50) konnte die DYRK1A-Proteinexpression gesteigert werden (DYRK1A-Flag/GAPDH: MOI 0: $0,04 \pm 0,03$; MOI 1: $0,79 \pm 0,13$; MOI 10: $1,5 \pm 0,08$; MOI 50: $1,57 \pm 0,14$). Der Anti-Flag-Antikörper detektierte überexprimiertes DYRK1A bei circa 86 kDa und wies eine singuläre Bande auf. Um eine moderate, aber ausreichend hohe, Überexpression zu erreichen, wurde für die folgenden Versuche eine MOI von 10 verwendet.

3.3 Untersuchung der DYRK1A-Regulation

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von aktiviertem NFAT auf die Proteinexpression von DYRK1A in Kardiomyozyten neonataler Ratten und in Calcineurin-transgenen Mäusen untersucht werden. Um dies zu untersuchen, wurden zum einen frisch isolierte neonatale Rattenkardiomyozyten mit einem konstitutiv aktiven Calcineurin-kodierenden Adenovirus (Ad-CnA) transduziert. Als Kontrollgruppe dienten Zellen aus der gleichen Isolation, die mit einem Balt-CMV- β gal-Adenovirus (LacZ) transduziert wurden. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und für die Durchführung eines Western Blots weiterverarbeitet (Abb. 3.3 (A)). Zum anderen wurden aus dem Myokard Calcineurin-transgener Mäuse (CnA-TG) und der Wildtyp-Kontrollgruppe (WT) Proteinlysate hergestellt (Abb. 3.3 (B)). Die Proteine DYRK1A und GAPDH wurden mit ihren spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Nach densitometrischer Auswertung der Banden wurde der Quotient aus DYRK1A und dem Referenz-Protein GAPDH gebildet. So konnte die Proteinexpression von DYRK1A auf die eingesetzte Proteinmenge normalisiert werden.

Die Auswertung der Western Blots ergab, dass sowohl in Ad-CnA stimulierten Kardiomyozyten neonataler Ratten (DYRK1A/GAPDH: Ad-LacZ: $0,85 \pm 0,07$; Ad-CnA: $1,32 \pm 0,08$; $n=13$; $p=0,0002$) als auch im Myokard Calcineurin-transgener Mäuse (DYRK1A/GAPDH: WT ($n=11$): $0,81 \pm 0,09$; CnA-TG ($n=9$): $1,16 \pm 0,06$; $p=0,0069$) eine signifikant gesteigerte DYRK1A-Expression vorlag. Somit konnte in den Western Blots im Zellkultur- und im Tiermodell eine vermehrte DYRK1A-Expression durch eine verstärkte NFAT-Aktivität festgestellt werden.

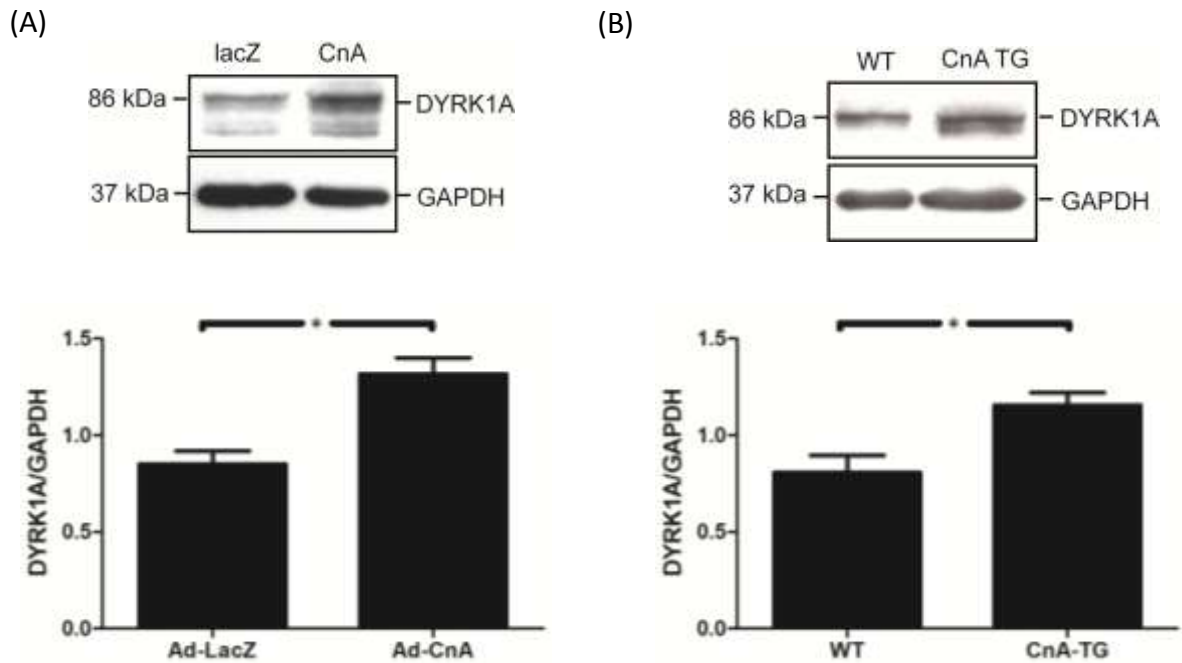


Abb. 3.3: Regulation der DYRK1A-Expression in Kardiomyozyten nach verstärkter Expression von Calcineurin. Mit Hilfe des Western Blots wurde die Proteinexpression von DYRK1A nach Stimulation der NFAT-Aktivität *in vitro* und *in vivo* untersucht. (A) In neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte nach adenoviral vermittelter Calcineurin- (Ad-CnA-) Expression eine signifikante Zunahme der DYRK1A/GAPDH Expression festgestellt werden ($p=0,0002$). Als Kontrollgruppe dienten Ad-LacZ transduzierte Zellen. (B) Auch die Calcineurin-transgenen Mäuse (CnA-TG) exprimierten signifikant mehr DYRK1A/GAPDH als Wildtyp (WT) Geschwistertiere ($p=0,0069$).

3.4 Planimetrische Hypertrophieanalyse von Kardiomyozyten neonataler Ratten

3.4.1 Die Phenylephrin-induzierte Hypertrophieinduktion

Nach ihrer Isolation wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten für drei Tage mit Phenylephrin (PE) adrenerg stimuliert und mittels planimetrischer Messung hinsichtlich einer zellulären Hypertrophie untersucht. Prasad *et al.* zeigten, dass isolierte neonatale Rattenkardiomyozyten nach PE-Stimulation in einer Dosis von 20 μM eine signifikante Hypertrophie aufwiesen (Prasad *et al.* 2007). PE ist ein Sympathomimetikum, das α_1 -adrenerge Rezeptoren der Kardiomyozyten aktiviert. Die Entwicklung eines hypertrophen Phänotyps ist ein langfristiger Effekt einer kardialen α_1 -adrenergen Stimulation (Meidell *et al.* 1986; Lee HR *et al.* 1988; Waspe *et al.* 1990). Es ist bekannt, dass PE im Herzen den Calcineurin/NFAT-Signalweg aktiviert (Taigen *et al.* 2000).

3.4.2 Dosis-Wirkungs-Kurve unterschiedlicher Phenylephrin-Konzentrationen

Um festzustellen, ab welcher Dosis PE eine signifikante Hypertrophie auslöst, wurde zunächst eine Dosis-Wirkungs-Kurve etabliert. Die PE-Dosis wurde von 5 μM auf maximal 40 μM Endkonzentration im Kulturmedium gesteigert (Abb. 3.4). Das Ziel war eine möglichst geringe PE-Konzentration zu finden, die in neonatalen Rattenkardiomyozyten eine signifikante Hypertrophie auslöst. Im darauf folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob sich die induzierte Hypertrophie durch adenoviral vermittelte DYRK1A-Überexpression antagonisieren lässt. Die isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden mit den unterschiedlichen PE-Konzentrationen versetzt und für 48 h inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellkulturschalen wurden mikroskopische Aufnahmen in einer 400fachen Vergrößerung angefertigt. Mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ wurde anschließend der Zellumfang gemessen und daraus die Fläche, relativ zum Mittelwert der Kontrollgruppe (0 μM), berechnet. Die Auswertung des Versuchs erfolgte hinsichtlich der Gruppenzuordnung verblindet.

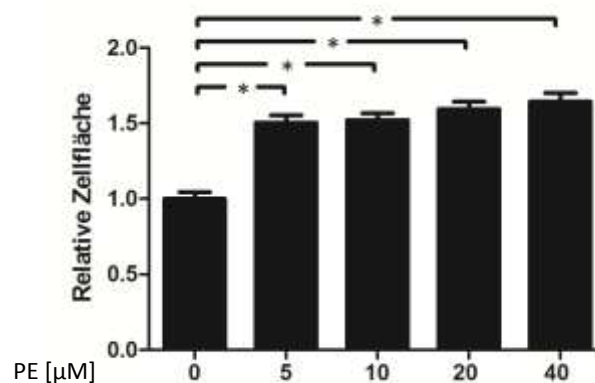


Abb. 3.4: Dosis-Wirkungs-Kurve neonataler Rattenkardiomyozyten nach Phenylephrinstimulation. Die Kardiomyozyten wurden für 48 h mit dem Sympathomimetikum PE stimuliert und anschließend die Zellflächen planimetrisch ermittelt. Die PE-Dosis wurde von 5 μM bis 40 μM gesteigert. Es wurden > 100 Zellen ausgemessen und die Zellfläche relativ zum Mittelwert der Kontrollgruppe (0 μM) berechnet. Bereits ab einer Dosis von 5 μM ließ sich eine signifikante Hypertrophieinduktion nachweisen. Diese Konzentration wurde daher für den folgenden Versuch verwendet ($p < 0,0001$).

Bereits eine PE-Dosis von 5 μM bewirkte eine signifikante Hypertrophie der Kardiomyozyten. Eine Steigerung auf bis zu 40 μM zeigte keine wesentliche Zunahme der relativen Zellfläche (relative Zellfläche: 0 μM PE: $1,00 \pm 0,04$; 5 μM PE: $1,50 \pm 0,05$; 10 μM PE: $1,52 \pm 0,05$; 20 μM PE: $1,60 \pm 0,05$; 40 μM PE: $1,64 \pm 0,06$). Im folgenden Versuch wurde daher eine PE-Dosis von 5 μM gewählt.

3.4.3 Hemmung der Phenylephrin-induzierten Hypertrophie durch DYRK1A

In dem Vorversuch 3.4.2 konnte festgestellt werden, dass neonatale Rattenkardiomyozyten 48 h nach Stimulation mit PE in einer Dosis von 5 μ M eine signifikante Hypertrophie aufweisen. Nun wurde geprüft, ob die induzierte Hypertrophie durch adenoviral vermittelte Expression von DYRK1A beeinflusst werden kann. Als Kontrollgruppe fungierten Zellen, die mit dem β gal-Adenovirus (Ad-LacZ) in der gleichen Konzentration transduziert wurden. Um den basalen Effekt einer gesteigerten DYRK1A-Konzentration zu untersuchen, wurden zusätzlich nicht-stimulierte neonatale Rattenkardiomyozyten mit dem Adenovirus DYRK1A (Ad-DYRK1A) transduziert. In den übrigen Gruppen erfolgte die PE-Stimulation 24 h nach Virustransduktion, um eine ausreichende Menge DYRK1A in den Zellen zu gewährleisten. Nach 48 h Stimulation mit PE wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen in einer 400fachen Vergrößerung angefertigt und deren Umfang mittels des Computerprogramms ImageJ gemessen. Bereits das Fotografieren der Zellen wurde hinsichtlich der Gruppenzuordnung verblindet durchgeführt. Die Fläche der Zellen wurde in willkürlicher Einheit durch das Programm ImageJ anhand des Umfangs berechnet. Jeder dieser Werte wurde in Relation zu dem Mittelwert der Zellfläche der Kontrollgruppe (Ad-LacZ) gesetzt (Abb. 3.5).

Das Ergebnis zeigte, dass PE (5 μ M) eine signifikante Hypertrophie auslöst. Die relative Zellfläche war im Vergleich zu den mit LacZ transduzierten Zellen ($1,00 \pm 0,02$) um den Faktor $1,52 \pm 0,03$ vergrößert. Wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten zusätzlich zur PE-Stimulation mit Ad-DYRK1A transduziert, so ließ sich die Hypertrophie signifikant reduzieren ($p < 0,0001$). Die relative Zellfläche betrug hierbei $1,29 \pm 0,02$. Wurden die Zellen alleine mit DYRK1A adenoviral transduziert, so resultierte eine geringe, aber signifikante, Hypertrophie. Die Zellen waren um den Faktor $1,19 \pm 0,02$ vergrößert.

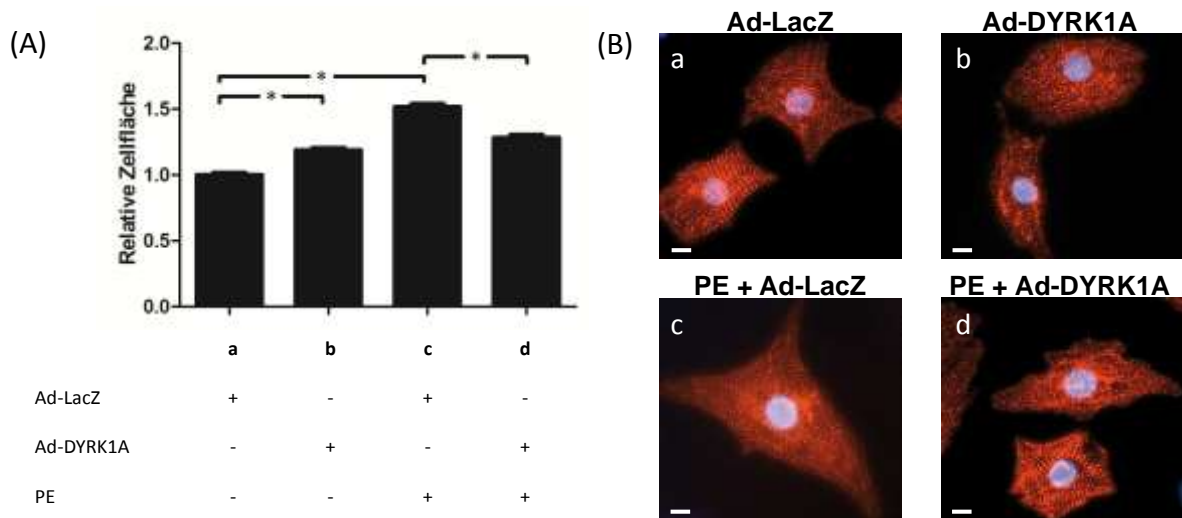


Abb. 3.5: Analyse des Einflusses einer DYRK1A-Überexpression auf die Phenylephrin-induzierte Hypertrophie neonataler Kardiomyozyten. Das Transduktionsschema ist unter (A) dargestellt. Nach der Stimulation wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt und ausgewertet. Pro Versuch wurden > 150 Zellen ausgemessen und die Zellfläche relativ zum Mittelwert der Kontrollgruppe (LacZ) berechnet. (A) Kumulative Daten: Ein geringer pro-hypertropher Effekt von DYRK1A unter basalen Bedingungen (ohne PE) konnte nachgewiesen werden (b). Die Stimulation von neonatalen Rattenkardiomyozyten mit 5 μ M PE führte zu einer 1,5fachen Vergrößerung der mittleren Zellfläche (c). Die DYRK1A-Überexpression verhinderte Phenylephrin-stimuliertes hypertrophes Wachstum in Kardiomyozyten signifikant (d). N=3; >150 Zellen pro Experiment und Transduktionsgruppe ausgewertet; $p < 0,0001$. (B) Repräsentative, fluoreszenzmikroskopische Bilder von Kardiomyozyten neonataler Ratten (Aktinin/DAPI-Färbung) der unterschiedlichen Gruppen a-d.

3.5 Untersuchung der NFATc3-Lokalisation

Die Phosphorylierung von NFAT wirkt sich auf dessen intrazelluläre Lokalisation aus. Liegt NFAT phosphoryliert vor, befindet sich das Protein im Zytoplasma. Dagegen transloziert es im dephosphorylierten Zustand in den Nukleus, um als Transkriptionsfaktor die Expression prohypertropher Gene zu veranlassen. In diesem Versuch sollte der Einfluss von DYRK1A auf die subzelluläre Lokalisation von NFATc3-GFP untersucht werden. Durch die Verwendung von GFP-Fusionsproteinen kann die Lokalisation von Proteinen innerhalb vitaler Zellen analysiert werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass bei neonatalen Rattenkardiomyozyten, die mit einem Calcineurin-Adenovirus transduziert wurden, die nukleäre NFAT-Lokalisation bei 76 % lag, wohingegen sie durch DYRK1A signifikant auf 3 % reduziert werden konnte. Die Phosphorylierung von aktiviertem, nukleären NFAT durch DYRK1A bewirkte eine Translokation von NFAT aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Klingebiel 2009).

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die Herunterregulation von DYRK1A die Kernlokalisierung von NFAT steigert. In verschiedenen Publikationen konnte dargestellt werden, dass das Alkaloid Harmin einen spezifischen DYRK1A-Inhibitor darstellt (Seifert *et al.* 2008; Bain *et al.* 2007; Sitz *et al.* 2008; Kuhn *et al.* 2009). Des Weiteren wurde ein Adenovirus zur Expression einer *Dyrk1a*-siRNA angefertigt (Ad-*Dyrk1a*-siRNA). Durch die RNA-Interferenz (RNAi) mit der Ziel-RNA *Dyrk1a* sollte es zu einer spezifischen Verringerung von DYRK1A kommen. Als Kontrollgruppe diente ein Adenovirus mit einer Kontroll-siRNA (Ad-Kontroll-siRNA), die gegen keine bekannte Ziel-RNA gerichtet ist.

3.5.1 Untersuchung der prozentualen NFAT-Kernlokalisierung mit steigenden Calcineurin-Konzentrationen

Der Transkriptionsfaktor NFAT liegt im inaktiven Zustand zytoplasmatisch lokalisiert vor, wohingegen sich DYRK1A im Zellkern befindet. Daher ist bei der Hemmung des basalen DYRK1A kein Effekt auf die subzelluläre NFAT-Lokalisation zu erwarten. Erst wenn die Translokation von NFAT in den Zellkern stimuliert wurde, sollte sich die Auswirkung einer DYRK1A-Hemmung bemerkbar machen. Daher war zu untersuchen, bei welcher Calcineurin-MOI eine circa 50 %ige Kernlokalisierung von NFAT vorliegt. Dieser Lokalisationsanteil sollte durch zusätzliche Verwendung des DYRK1A-Inhibitors Harmin oder durch Ad-*Dyrk1a*-siRNA vermittelte Herunterregulation von DYRK1A gesteigert werden.

Aus diesem Grund wurde zuerst eine MOI-Reihe mit steigenden Calcineurin-Konzentrationen angefertigt (Abb. 3.6). Es wurden folgende MOIs getestet: MOI 0, MOI 1, MOI 5, MOI 10, MOI 25 und MOI 50. 48 h nach Transduktion wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen in 400facher Vergrößerung angefertigt und hinsichtlich der Kontrollgruppen verblindet ausgewertet. Die Zuordnung der Zellen erfolgte visuell abhängig von ihrer NFATc3-GFP-Lokalisation in eine der folgenden drei Gruppen: vornehmlich nukleär lokalisiertes Fluoreszenz, ubiquitär in der Zelle lokalisiertes Fluoreszenz oder vornehmlich zytoplasmatisch lokalisiertes Fluoreszenz. Im Anschluss wurde der Prozentsatz der Zellen mit nukleärer NFAT-GFP-Fluoreszenz berechnet.

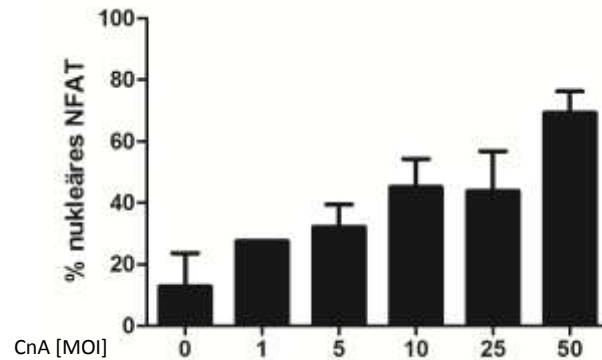


Abb. 3.6: Untersuchung der NFAT-GFP-Lokalisation nach Transduktion neonataler Rattenkardiomyozyten mit steigenden Calcineurin-Konzentrationen. Es wurde eine Calcineurin-MOI gesucht, bei der eine NFAT-Lokalisation vorliegt, die im folgenden Versuch durch eine DYRK1A-Herunterregulation gesteigert werden kann. Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit einem konstitutiv aktivem Calcineurin-Adenovirus (Ad-CnA) transduziert. Anschließend wurden sie bei einer 400fachen Vergrößerung fotografiert und der Anteil von nukleärem NFATc3 gezählt. Pro MOI wurden 200 Zellen ausgewertet. Sowohl bei der MOI 10 als auch bei der MOI 25 lag eine circa 50 %ige NFAT-Kernlokalisierung vor. In den folgenden Versuchen wurde bei der Calcineurin-Transduktion die geringere MOI von 10 gewählt.

Das Ergebnis der Transduktion mit ansteigender MOI für Ad-Calcineurin ergab, dass bei einer MOI von 10 eine 45 %ige und bei einer MOI von 25 eine 43 %ige Kernlokalisierung vorlag. In den folgenden Versuchen wurde bei der Transduktion von Kardiomyozyten die MOI 10 verwendet (MOI 0: 12,83 ± 10,83 %; MOI 1: 27,50 ± 0,00 %; MOI 5: 32,24 ± 7,24 %; MOI 10: 45,14 ± 9,14 %; MOI 25: 43,90 ± 12,86 %; MOI 50: 69,29 ± 6,96 %).

3.5.2 Einfluss auf die subzelluläre NFATc3-Lokalisation nach Hemmung von endogenem DYRK1A durch Harmin

Wie in 3.5 beschrieben wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit Ad-NFATc3-GFP kotransduziert, um die subzelluläre NFAT-Lokalisation sichtbar zu machen. Des Weiteren wurden die Zellen gegenüber konstitutiv aktivem Calcineurin-Adenovirus (Ad-CnA), mit dem DYRK1A-Inhibitor Harmin oder Vehikel-Kontrolle exponiert. Wie in dem Vorversuch 3.5.1 beschrieben, wurde bei dem konstitutiv aktivem Calcineurin-Adenovirus (Ad-CnA) eine MOI von 10 gewählt, um eine circa 50%ige Lokalisation von NFAT im Kern zu erreichen. Untersucht wurde, ob dieser prozentuale Anteil durch zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem DYRK1A-Hemmer Harmin gesteigert werden konnte (detailliertes Transduktionsschema siehe Abb. 3.7. (A)). Die entsprechenden Schalen wurden mit LacZ transduziert, um in den Gruppen die gleiche Menge

Virus zu gewährleisten. Die Inkubationszeit betrug 48 h und es wurden vier unabhängige Experimente jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. Pro Experiment wurden in jeder Transduktionsgruppe mindestens 100 Zellen gezählt.

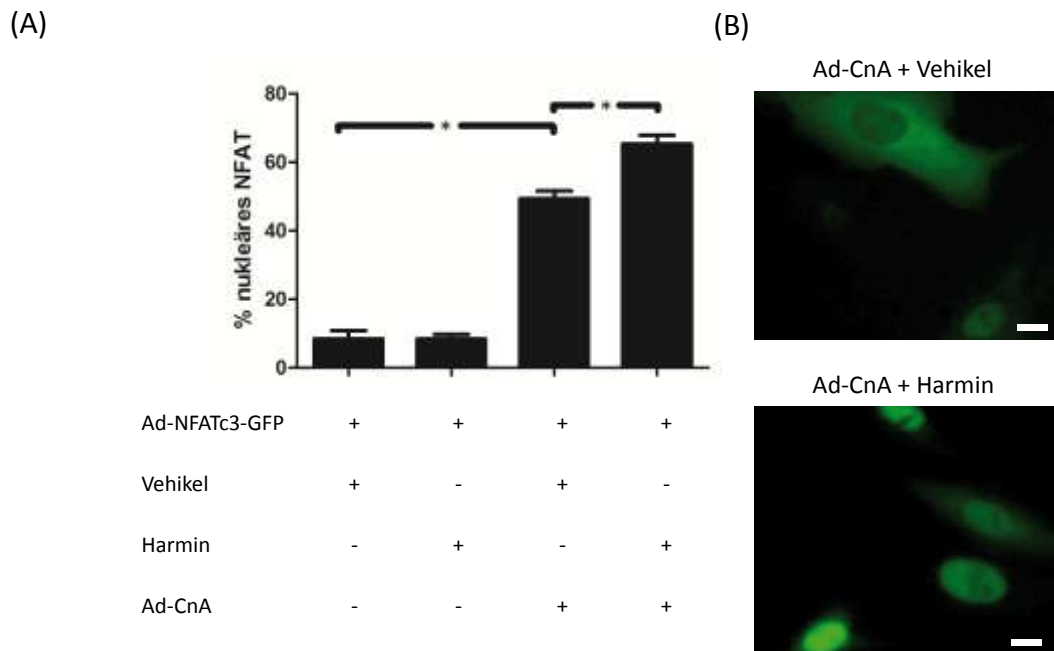


Abb. 3.7: Subzelluläre NFATc3-GFP-Lokalisation in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach endogener DYRK1A-Inhibierung durch Harmin. Untersucht wurde der Einfluss von Harmin, einem spezifischen DYRK1A-Inhibitor, auf den Anteil an nukleärem NFATc3. Das detaillierte Transduktionsschema ist unter (A) dargestellt. Bei der Gruppe, die mit dem Vehikel Ethanol (max. 0,02 % Ethanol pro Schale) versetzt wurde, lag eine circa 10 %ige NFAT-Kernlokalisation vor. Diese konnte durch Kotransduktion mit Ad-CnA signifikant auf 49 % gesteigert werden. Wurde zusätzlich der DYRK1A-Inhibitor Harmin zugefügt, konnte die nukleäre Lokalisation von NFATc3 signifikant auf 65 % erhöht werden. Ohne zusätzliche CnA-Überexpression bewirkte Harmin keinen Unterschied der NFAT-Lokalisation im Vergleich zu Vehikel. (A) Kumulative Daten, $n=4$, ≥ 100 Zellen pro Experiment und Transduktionsgruppe; $p < 0,0001$; detailliertes Transduktionsschema. (B) Repräsentative, fluoreszenzmikroskopische Bilder der Gruppen Ad-CnA + Vehikel und Ad-CnA + Harmin.

Aufgrund dieses Ergebnisses konnte festgestellt werden, dass die endogene Hemmung von DYRK1A durch Harmin eine signifikante Erhöhung des nukleären NFAT bewirkte. Die Zellen, die mit dem Calcineurin-Virus transduziert wurden, wiesen zu 49 % nukleäres NFAT auf. Dagegen zeigten 65 % aller Zellen, die zusätzlich mit Harmin inkubiert wurden, nukleäres NFAT. Die Inkubation mit Harmin bewirkte im Vergleich zu der Vehikel-Kontrollgruppe keinen nennenswerten Unterschied (Vehikel: $8,42 \pm 2,42$ %; Harmin: $8,39 \pm 1,41$ %; CnA+Vehikel: $49,33 \pm 2,21$ %; CnA+Harmin: $65,35 \pm 2,52$ %; $n=4$; $p < 0,0001$).

3.5.3 Einfluss einer Hemmung von DYRK1A mittels *Dyrk1a*-siRNA-Adenovirus auf die subzelluläre NFAT-Lokalisation

Der Adenovirus (Ad-) *Dyrk1a*-siRNA wurde angefertigt, um durch eine RNA-Interferenz mit *Dyrk1a* eine spezifischen Herunterregulation von DYRK1A zu erzielen. Bevor Ad-*Dyrk1a*-siRNA verwendet werden konnte, sollte geprüft werden, ob nach Transduktion von neonatalen Rattenkardiomyozyten die Proteinexpression von DYRK1A herunterreguliert werden konnte (Abb. 3.8). Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die mit dem Adenovirus Ad-Kontroll-siRNA, welches die Produktion einer siRNA bewirkt, die gegen keine bekannte Ziel-RNA gerichtet ist, transduziert wurden. Zur Überprüfung der Funktionalität wurden die neonatalen Kardiomyozyten mit den Adenoviren Ad-*Dyrk1a*-siRNA und Ad-Kontroll-siRNA mit einer MOI von 10 transduziert und für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und Lysate für die Durchführung eines Western Blots hergestellt. Der DYRK1A-Antikörper sollte die Proteinexpression von DYRK1A sichtbar machen. Zur Normalisierung wurde zusätzlich das nicht bedeutend regulierte Protein GAPDH mit seinem spezifischen Antikörper detektiert.

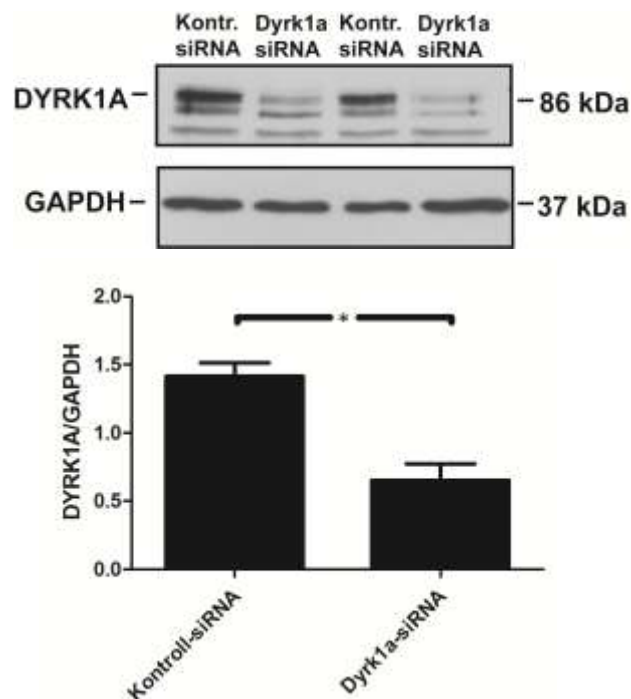


Abb. 3.8: Überprüfung der endogenen DYRK1A-Herunterregulation durch den Adenovirus Ad-*Dyrk1a*-siRNA. Es wurde ein Adenovirus generiert, um eine spezifische Herunterregulation von DYRK1A zu bewirken (Ad-*Dyrk1a*-siRNA). Zur Überprüfung der Funktionalität wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit dem Virus Ad-*Dyrk1a*-siRNA und dem Kontrollvirus Ad-Kontroll-siRNA transduziert (MOI 10). Die densitometrische Auswertung der Western Blots ergab, dass durch Ad-*Dyrk1a*-siRNA die Proteinexpression von DYRK1A signifikant herunterreguliert werden konnte. N=4; p=0,0029.

Nach der densitometrischen Auswertung der Western Blots konnte festgestellt werden, dass nach Virustransduktion (*Ad-Dyrk1a*-siRNA) von Kardiomyozyten neonataler Ratten mit einer MOI von 10 die Proteinexpression von DYRK1A signifikant um 54 % gesenkt werden konnte (*DYRK1A*/*GAPDH*: *Kontroll*-siRNA: $1,41 \pm 0,10$ %; *Dyrk1a*-siRNA: $0,65 \pm 0,12$ %).

Die Hypothese des folgenden Versuchs lautete: Die DYRK1A-Proteinexpression lässt sich durch die Transduktion des Adenovirus *Ad-Dyrk1a*-siRNA signifikant vermindern (3.5.3). Dadurch kann DYRK1A die Re-Phosphorylierung von aktiviertem NFAT im Zellkern nicht mehr adäquat vornehmen. Die Folge ist eine Persistenz von aktiviertem NFAT im Zellkern. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden isolierte neonatale Rattenkardiomyozyten mit den Adenoviren *Ad-NFATc3*-GFP, *Ad-Kontroll*-siRNA, *Ad-Dyrk1a*-siRNA sowie mit konstitutiv aktivem Calcineurin (*Ad-CnA*) kotransduziert. Bei der Transduktion von *Ad-CnA* wurde eine MOI von 10 gewählt, um eine circa 50 %ige Kernlokalisierung vorauszusetzen (3.5.1). In der Abbildung 3.9 ist das detaillierte Transduktionsschema dargestellt (Abb. 3.9. (A)).

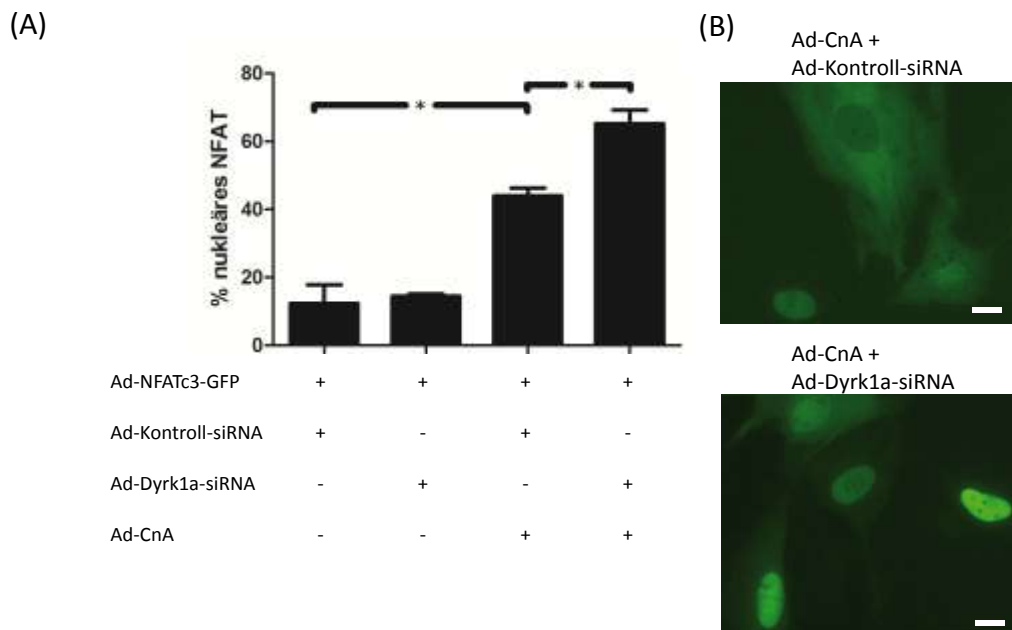


Abb. 3.9: Subzelluläre NFATc3-GFP-Lokalisation in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach *Dyrk1a*-"knock-down" durch das Adenovirus *Ad-Dyrk1a*-siRNA. In diesem Experiment wurde geprüft, wie sich die subzelluläre NFATc3-Lokalisation mit und ohne *Ad-Dyrk1a*-siRNA nach Stimulierung der Kardiomyozyten durch *Ad-CnA* ändert. Des Weiteren wurde der basale Effekt der *Ad-Kontroll*-siRNA und der *Ad-Dyrk1a*-siRNA untersucht. Die Zellen wurden, wie im Transduktionsschema unter (A) dargestellt, transduziert und nach der Inkubationszeit in 400facher Vergrößerung fotografiert. Die Transduktion der Zellen mit *Ad-CnA* bewirkte in 44 % der Zellen eine nukleäre NFAT-Lokalisation. Dieser Wert konnte durch die endogene *Dyrk1a*-Hemmung mit *Ad-Dyrk1a*-siRNA signifikant auf 65 % gesteigert werden. Die alleinige Transduktion von *Ad-Dyrk1a*-siRNA und *Ad-Kontroll*-siRNA bewirkte einen nukleären NFATc3-Anteil von 12 bzw. 14 %. (A) Kumulative Daten, $n=4$, ≥ 100 Zellen pro Experiment und Transduktionsgruppe; $p < 0,0001$. (B) Dargestellt sind repräsentative, fluoreszenzmikroskopische Bilder der Gruppen *Ad-CnA* + *Ad-Kontroll*-siRNA und *Ad-CnA* + *Ad-Dyrk1a*-siRNA.

Die mit Ad-CnA transduzierten neonatalen Rattenkardiomyozyten wiesen einen nukleären NFATc3-Anteil von $43,99 \pm 2,33$ % auf. Nach der *Dyrk1a*-Inhibierung durch den Adenovirus Ad-*Dyrk1a*-siRNA konnte der prozentuale Anteil auf $65,25 \pm 3,94$ % signifikant gesteigert werden ($n=4$, $p<0,0001$). Die alleinige Transduktion der Kardiomyozyten mit Ad-Kontroll-siRNA und Ad-*Dyrk1a*-siRNA bewirkte einen nukleären Anteil von $12,29 \pm 5,56$ % und $14,43 \pm 0,67$ %.

3.6 Analyse von induzierbaren DYRK1A-transgen überexprimierenden Mäusen

Arron *et al.* konnten im Jahr 2006 zeigen, dass eine 1,5fache Überexpression von DYRK1A im Gesamtorganismus in der Herzentwicklung von Mäusen zu Klappendefekten und Gefäßveränderungen führt (Arron *et al.* 2006). Entwicklungsbedingte Fehlbildungen des kardiovaskulären Systems können zu der Entwicklung einer Herzhypertrophie und -insuffizienz führen. Daher ist für die Analyse der Hypertrophieentstehung unabdingbar, diese entwicklungsbedingten Fehlbildungen zu verhindern. Aus diesem Grund sollte eine transgene Maus generiert werden, die herzspezifisch und erst nach abgeschlossener Entwicklung eine DYRK1A-Überexpression aufweist. Ermöglicht wurde dies durch das Tet-off-System, mit dem sich in der Phase der Herzentwicklung eine gesteigerte DYRK1A-Expression durch Doxycyclin im Trinkwasser verhindern lässt (2.2.9.1). Die Doxycyclin-Konzentration betrug 0,2 g/l und wurde den zu verpaarenden Weibchen und anschließend allen Nachkommen bis zu einem Alter von vier Wochen über das Trinkwasser verabreicht. Zusätzlich enthielt das Trinkwasser 1 % Sucrose. Doxycyclin inhibiert die Interaktion des Tet-Regulators (tTA) mit dem Tet-Operator und somit die Expression von DYRK1A. Daher exprimieren nur adulte DYRK1A/tTA-doppelt-transgene Mäuse, nach Absetzen des Doxycyclins, herzspezifisch das DYRK1A-Transgen. Verschiedene DYRK1A/tTA-doppelt-transgene Mauslinien wurden im Vorfeld dieser Arbeit generiert. Sie wurden sowohl hinsichtlich der Supprimierbarkeit als auch auf die Induzierbarkeit der DYRK1A-Expression untersucht. Es war eine Mauslinie zu finden, bei der die DYRK1A-Expression im nicht-induzierten Zustand, unter Doxycyclin-Gabe, supprimiert war, jedoch nach Absetzen des Doxycyclins ausreichend induziert werden konnte. Die Linie #45 erfüllte diese Kriterien und wurde daher für alle folgenden Versuche verwendet (Klingebiel 2009).

3.6.1 Untersuchung der DYRK1A-Expression in DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen

In dieser Arbeit sollte die Kinetik nach Induktion der DYRK1A-Expression in DYRK1A/tTA-doppelt-transgenen Mäusen im Vergleich zu tTA-einfach-transgenen Mäusen untersucht werden. Es wurden Mäuse im Alter von zwei bis zwölf Wochen getötet, das Herz entnommen und Western Blots aus den Proteinlysaten angefertigt. Zur Normalisierung der DYRK1A-Proteinexpression wurde zusätzlich das nicht bedeutend regulierte Protein GAPDH detektiert. Im Alter von vier Wochen wurde den Mäusen das Doxycyclin im Trinkwasser entzogen. Somit sollten sie ab diesem Zeitpunkt DYRK1A überexprimieren. Kurz nach dem Absetzen erfolgte die erste Messung der kardialen DYRK1A-Proteinexpression (in der Abb. 3.10 als – DOX, 4w bezeichnet). Die weiteren Messungen erfolgten im Alter von sechs, acht, zehn und zwölf Wochen.

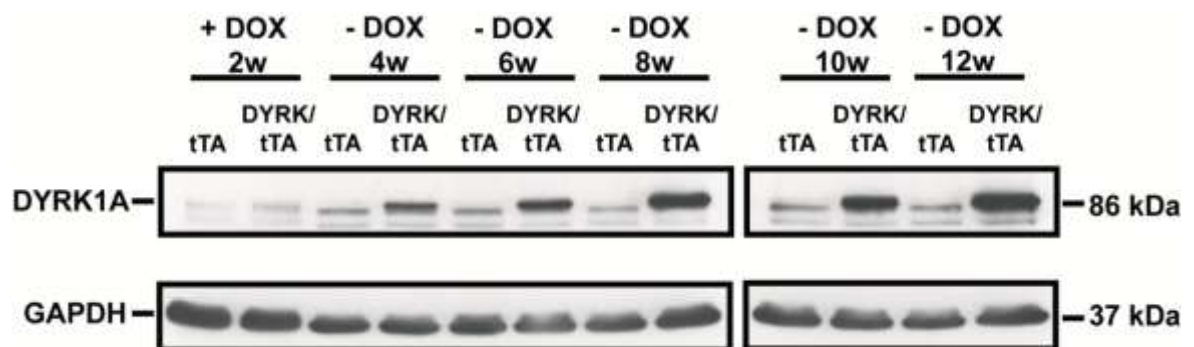


Abb. 3.10: Analyse der kardialen DYRK1A-Expression in DYRK1A/tTA-doppelt-transgenen Mäusen nach Induktion der Überexpression. Aus den Herzen von DYRK1A/tTA-doppelt-transgenen und tTA-einfach-transgenen Mäusen wurden im Alter von zwei bis zwölf Wochen Proteinlysate hergestellt. Anschließend wurde ein Western Blot mit einem DYRK1A-spezifischen Antikörper durchgeführt. Dieselben Proben wurden zusätzlich mit einem GAPDH-Antikörper zur Normalisierung gefärbt. Bis zu einem Alter von vier Wochen bekamen die Mäuse Doxycyclin ins Trinkwasser. Im Alter von zwei Wochen war in den DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen keine Steigerung der DYRK1A-Expression festzustellen (+ Dox, 2w). Durch Absetzen des Doxycyclins wurde die DYRK1A-Überexpression induziert. Kurz nach dem Absetzen erfolgte eine weitere Messung (-Dox, 4w). Hier konnte bereits eine Steigerung der DYRK1A-Proteinexpression bei den DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen im Vergleich zu den tTA-transgenen Mäusen festgestellt werden. Bis zu einem Alter von acht Wochen war eine deutliche Steigerung der DYRK1A-Proteinexpression nachzuweisen. Nach acht Wochen war die maximale DYRK1A-Expression erreicht.

Die DYRK1A/tTA-transgenen Mäuse wiesen im Alter von zwei Wochen unter Doxycyclin-Behandlung keine vermehrte DYRK1A-Expression im Vergleich zu den tTA-einfach-transgenen Mäusen auf (+Dox, 2w). Nach Absetzen des Doxycyclins konnte die DYRK1A-Expression kurz nach der vierten bis zur achten Lebenswoche kontinuierlich gesteigert werden (- Dox, 4w bis 8 w). Bei den tTA-transgenen Mäusen blieb das Expressionsniveau relativ konstant. Somit konnte die Funktionalität des Tet-off-Systems bestätigt werden.

Im Alter von acht Wochen wiesen die Mäuse ein deutlich gesteigertes DYRK1A-Expressionsniveau auf. Daher sollte in einer densitometrischen Auswertung der Proteinbanden geprüft werden, um welchen Faktor die Expression gesteigert war (Abb. 3.11). Es wurde aus den Proteinlysaten von zehn Tieren pro Genotyp ein Western Blot durchgeführt und die DYRK1A-Expression der DYRK1A/tTA-transgenen Tiere im Vergleich zu den tTA-transgenen Tieren ermittelt.

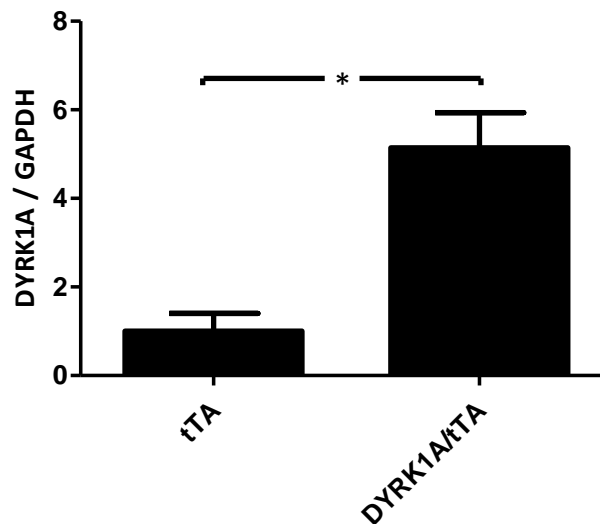


Abb. 3.11: Im Alter von acht Wochen (vier Wochen nach Absetzen des Doxycyclins) wurden die DYRK1A/tTA- vs. tTA-transgenen Tiere hinsichtlich der DYRK1A-Überexpression analysiert. Die Herzen von zehn Tieren pro Genotyp wurden homogenisiert und Proteinlysate gleicher Konzentration angefertigt. Im folgenden Western Blot wurden die Banden der Proteine DYRK1A und GAPDH mit ihren spezifischen Antikörpern angefärbt. Es folgte eine quantitative, densitometrische Auswertung der Western Blots. Die DYRK1A-Proteinmenge wurde relativ zur GAPDH-Proteinmenge dargestellt. Es konnte eine 5,1fache DYRK1A-Überexpression in den acht Wochen alten DYRK1A/tTA-doppelt-transgenen Mäusen im Vergleich zu den tTA-transgenen Mäusen identifiziert werden. N=10; p=0,0028.

Die induzierte Expression von DYRK1A in DYRK1A/tTA-doppelt-transgenen Mäusen ist im Vergleich zu der Kontrollgruppe tTA-einfach-transgene Mäuse in der achten Lebenswoche signifikant um den Faktor $5,14 \pm 0,80$ erhöht (n=10; p=0,0028). Während der Embryonalphase bis zum Alter von zwei Wochen supprimieren die DYRK1A/tTA-doppelt-transgenen Mäusen der Linie #45 in Anwesenheit von Doxycyclin die Überexpression von DYRK1A. In der vierten Lebenswoche wird das Doxycyclin abgesetzt und die Expression von DYRK1A steigt im weiteren Verlauf bis zur achten Woche stetig an. Von der achten bis zur zwölften Woche verändert sich das Expressionsniveau nicht wesentlich. Im Alter von acht Wochen ist die induzierte DYRK1A-Überexpression bei den DYRK1A/tTA- vs. tTA-transgenen Mäuse um den Faktor 5,14 gesteigert.

3.6.2 Untersuchung der kardiomyozytenspezifischen Überexpression von DYRK1A in DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen

Zur weiteren Analyse der DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen war zu prüfen, ob eine herzspezifische DYRK1A-Überexpression vorlag. Die herzspezifische Überexpression sollte durch Integration der DYRK1A-kodierenden DNA-Sequenz in den α MHC-tet-Vektor erreicht werden (Sanbe *et al.* 2003). Verschiedene Organe wurden homogenisiert, die RNA isoliert und im Folgenden die cDNA synthetisiert. Mit Hilfe der quantitativen *Real-time* RT-PCR wurde die organspezifische *Dyrk1a* mRNA-Expression ermittelt. In folgenden Organen der tTA- vs. DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen wurde das *Dyrk1a* und *Gapdh* mRNA-Expressionsniveau ermittelt: Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Gehirn, Skelettmuskulatur und Hoden. Die *Dyrk1a*-Expressionslevels wurden auf die jeweilige *Gapdh* mRNA normalisiert (Abb. 3.12).

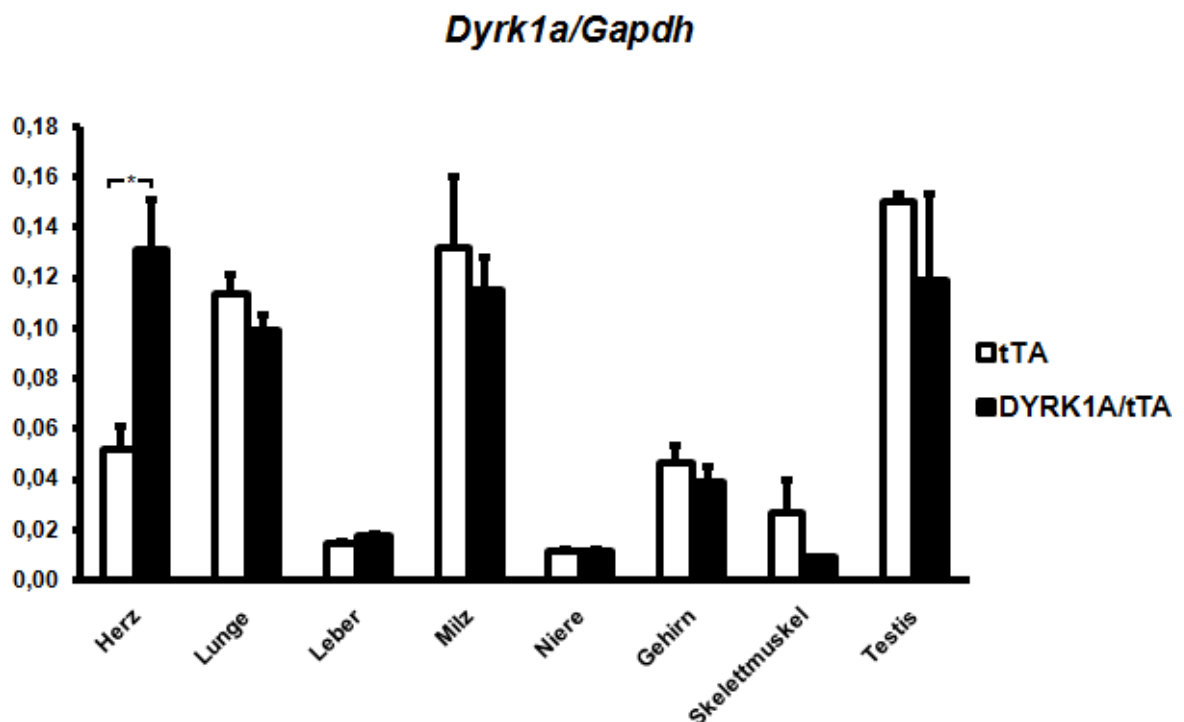


Abb. 3.12: Analyse der *Dyrk1a* mRNA-Expression unterschiedlicher Gewebe in tTA- vs. DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen. Es wurde geprüft, ob DYRK1A herzspezifisch in DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen überexprimiert wird. Die *Dyrk1a* und *Gapdh* mRNA-Expression wurden mittels der quantitativen *Real-time* RT-PCR ermittelt. Die *Dyrk1a* mRNA-Menge wurden auf die Menge *Gapdh* mRNA bezogen. Das Ergebnis zeigte, dass nur im Herzen ein signifikanter Unterschied der *Dyrk1a/Gapdh*-Expression zwischen den tTA- und DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen vorlag ($p=0,005$). Bei beiden Genotypen waren des Weiteren in Hoden, Milz und Lunge ein hohes *Dyrk1a/Gapdh*-Expressionsniveau nachzuweisen.

Die quantitative *Real-time* RT-PCR der *Dyrk1a* mRNA-Expression verschiedener Organe von DYRK1A/tTA- vs. tTA-transgenen Mäusen zeigte eine signifikante herzspezifische *Dyrk1a*-

Überexpression in DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen ($p=0,005$). Neben dem Herzen konnte in Lunge, Milz und Hoden ein hohes *Dyrk1a/Gapdh*-Expressionsniveau beobachtet werden. Allerdings zeigte sich hier in den DYRK1A/tTA-transgenen Tiere keine signifikante Veränderung. Somit konnte in den DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen von einer induzierbaren, herzspezifischen *Dyrk1a*-Überexpression ausgegangen werden (Tab. 3.1).

Tab. 3.1.: Werte der mRNA-Expression unterschiedlicher Gewebe (*mDyrk1a/mGapdh*) in tTA- gegenüber DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen.

Genotyp	mDyrk1a/mGapdh	mDyrk1a/mGapdh
	Mittelwert	Mittelwert
	tTA	DYRK1A/tTA
Herz	5,16e-2 ± 9,75e-3	1,31e-1 ± 1,94e-2
Lunge	1,14e-1 ± 7,63e-3	9,89e-2 ± 6,50e-3
Leber	1,47e-2 ± 6,85e-4	1,73e-2 ± 1,14e-3
Milz	1,32e-1 ± 2,81e-2	1,16e-1 ± 1,28e-2
Niere	1,17e-2 ± 6,82e-4	1,17e-2 ± 5,33e-4
Gehirn	4,64e-2 ± 6,65e-3	3,91e-2 ± 5,87e-3
Skelettmuskel	2,66e-2 ± 1,32e-2	9,22e-3 ± 1,65e-4
Testis	1,50e-1 ± 3,38e-3	1,19e-1 ± 3,43e-2

3.6.3 Untersuchung der intrazellulären DYRK1A-Lokalisation und -Überexpression in Kardiomyozyten durch immunhistochemische Färbung

Nachdem in dem Versuch 3.6.2 gezeigt werden konnte, dass in den DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen eine herzspezifische *Dyrk1a*-Überexpression vorliegt, sollte hier mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung die intrazelluläre Lokalisation von DYRK1A in murinen Kardiomyozyten untersucht werden. Wie unter 1.6 beschrieben, besitzt DYRK1A im Gegensatz zu den zytosolisch lokalisierten Isoformen zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS). Weiter war anzunehmen, dass aufgrund der DYRK1A-Überexpression in den DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen der DYRK1A-spezifische Antikörper bei diesen Mäusen deutlich stärker DYRK1A anfärben würde. Um die nukleäre Lokalisation und Überexpression von DYRK1A in murinen Kardiomyozyten nachzuweisen, wurden Paraffinschnitte aus den Ventrikeln transgener Mausherzen angefertigt. Untersucht wurden DYRK1A/tTA- gegenüber tTA-transgene Tiere nach der

immunhistochemischen Färbung mit einem DYRK1A-spezifischen Antikörper und einer Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Gegenfärbung (Abb. 3.13).

Wie erwartet, konnte in diesem Versuch die intranukleäre Lokalisation von DYRK1A bestätigt werden. Des Weiteren war in den Zellkernen der DYRK1A/tTA-transgenen Kardiomyozyten bedeutend mehr DYRK1A nachzuweisen.

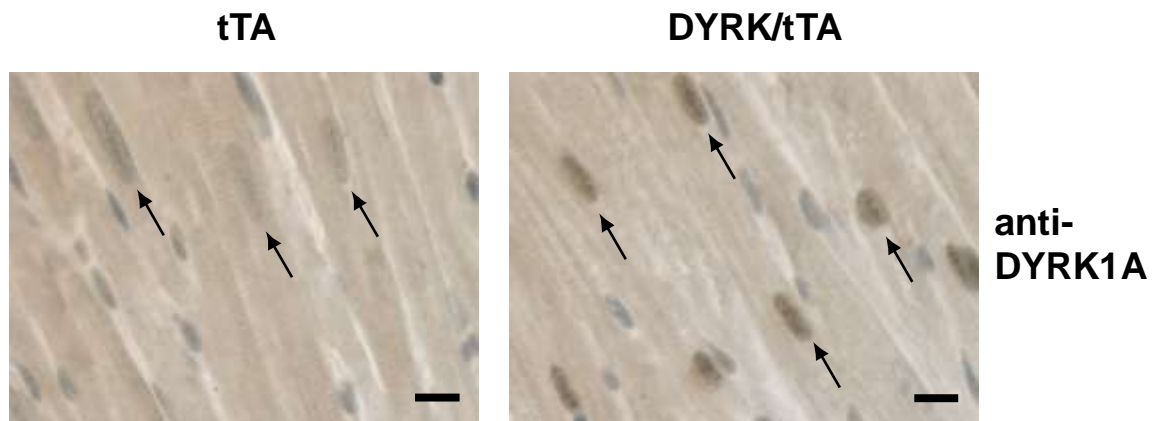


Abb. 3.13: Analyse der Lokalisation und Expression von DYRK1A in murinen Kardiomyozyten mit Hilfe einer immunhistochemischen DYRK1A-Färbung. Untersucht wurden tTA- vs. DYRK1A/tTA-transgene Mäuse. Um die intranukleäre Lokalisation und die DYRK1A-Überexpression in DYRK1A/tTA-transgenen Tieren nachzuweisen, wurden aus den Ventrikeln der transgenen Mäuser Herzen Paraffinschnitte angefertigt. Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung konnte DYRK1A mit seinem spezifischen Antikörper sichtbar gemacht werden. Überdies erfolgte eine Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Gegenfärbung. Sichtbar wurde die DYRK1A-Färbung der Kerne besonders bei den DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen. Die spezifische DYRK1A-Färbung fiel bei den tTA-transgenen Mäusen bedeutend schwächer aus (schwarze Pfeile: Zellkerne der murinen Kardiomyozyten; Eichbalken: 10 μ m).

3.6.4 Untersuchung der DYRK1A/tTA-transgenen Mäuse nach transaortaler Konstriktion (TAC)

Untersucht wurden weibliche DYRK1A/tTA- und tTA-transgene Mäuse vier Wochen nach einer minimal-invasiven transaortalen Konstriktion im Bereich der Aorta descendens (*transaortic constriction*, TAC). Aufgrund dieser Intervention kann in Mäusen eine Hypertrophie und konsekutiv eine Herzinsuffizienz erzeugt werden. Es ist bekannt, dass in diesem Mausmodell der Calcineurin/NFAT-Signalweg aktiviert ist. Die Kontrollgruppe waren schein-operierte Mäuse bei denen alle Schritte des operativen Eingriffs, jedoch keine Aortenkonstriktion, vorgenommen wurde (sham). Da die perioperative und postoperative Letalität bei männlichen Mäusen nach

TAC-Operation erfahrungsgemäß erheblich größer ist, wurden nur weibliche transgene Mäuse analysiert.

3.6.4.1 Untersuchung der Herzfunktion mittels Echokardiographie

Die Echokardiographie ist eine Methode durch die die Morphologie und Funktion des Herzens sehr gut beurteilt werden kann. Sie erlaubt eine nicht-invasive kardiale Untersuchung und ermöglicht nach unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten eine sehr gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Die echokardiographischen Untersuchungen der transgenen Mäuse erfolgten im M-Mode in der longitudinalen Achse mit dem Gerät Vevo 660 (Visualsonics) und wurden von der darin ausgebildeten Technischen Assistentin Frau Spitalieri durchgeführt.

Vier Wochen nach der TAC-sham-Operation konnte in der echokardiographischen Untersuchung sowohl der tTA- als auch der DYRK1A/tTA-transgenen Mäuse eine signifikante Hypertrophie festgestellt werden (Abb. 3.14). Sowohl die Septumdicke (SW) als auch die Hinterwand des linken Ventrikels (PW) waren signifikant hypertrophiert (SW: tTA-sham (n=9): $0,98 \pm 0,04$ mm; tTA-TAC (n=8): $1,33 \pm 0,03$ mm; DYRK1A/tTA-sham (n=5): $0,96 \pm 0,05$ mm; DYRK1A/tTA-TAC (n=9): $1,34 \pm 0,03$ mm; PW: tTA-sham: $0,89 \pm 0,04$ mm; tTA-TAC: $1,15 \pm 0,03$ mm; DYRK1A/tTA-sham: $0,90 \pm 0,02$ mm; DYRK1A/tTA-TAC: $1,12 \pm 0,04$ mm; $p < 0,0001$). Des Weiteren war die Funktionalität nach TAC-sham-Operation eingeschränkt. Dies zeigte sich in einer signifikanten Reduktion der Verkürzungsfraktion (FS) der murinen Herzen (FS: tTA-sham: $43,40 \pm 2,05$ %; tTA-TAC: $34,85 \pm 1,92$ %; DYRK1A/tTA-sham: $42,04 \pm 2,45$ %; DYRK1A/tTA-TAC: $31,02 \pm 1,23$ %; $p < 0,0001$). Hingegen wies der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) keine Veränderung auf und deutete somit nicht auf eine ventrikuläre Dilatation hin (LVEDD: tTA-sham: $3,61 \pm 0,14$ mm; tTA-TAC: $3,50 \pm 0,09$ mm; DYRK1A/tTA-sham: $3,44 \pm 0,13$ mm; DYRK1A/tTA-TAC: $3,67 \pm 0,08$ mm). Diese Veränderungen vier Wochen nach TAC-sham-Operation waren in den DYRK1A-exprimierenden DYRK1A/tTA-doppelt-transgenen Mäusen im Vergleich zu der tTA-exprimierenden Kontrollgruppe gleich. Die Mäuse profitierten nicht durch die zusätzliche DYRK1A-Expression.

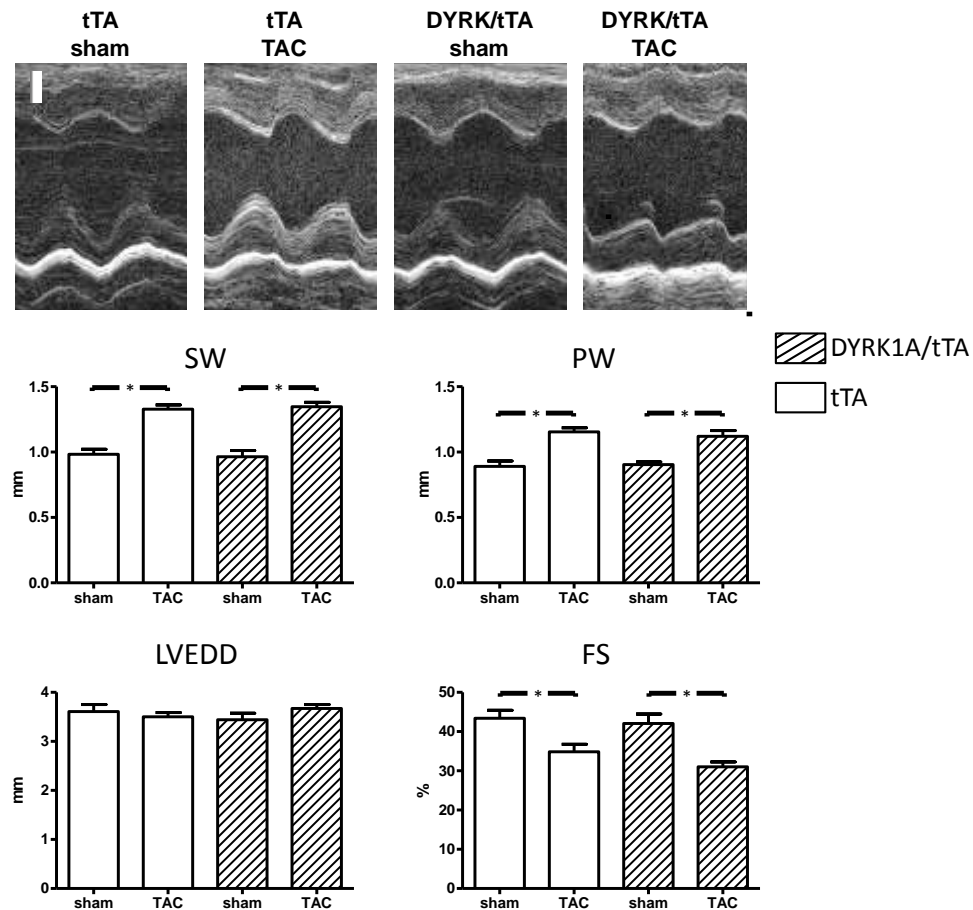


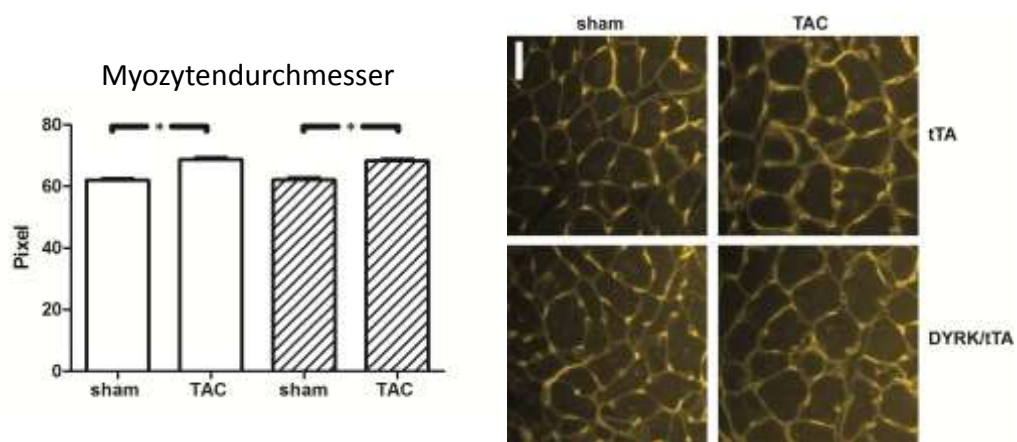
Abb. 3.14: Echokardiographische Untersuchung der DYRK1A/tTA- vs. tTA-transgenen Mäuse nach transaortaler Konstriktion (TAC). Die echokardiographische Analyse der DYRK1A/tTA- und tTA-transgenen Mäuse erfolgte vier Wochen nach TAC-sham-Operation im M-Mode in der longitudinalen Achse. Sowohl die DYRK1A/tTA- als auch die tTA-transgenen Mäuse zeigten nach der TAC-sham-Operation eine signifikante Hypertrophie des Septums (SW) und der Hinterwand des linken Ventrikels (PW). Es konnte keine Veränderung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVEDD) festgestellt werden. Der linke Ventrikel schien somit nicht dilatiert zu sein. Allerdings war die Verkürzungsfraktion (FS) in den TAC-operierten Mäusen in beiden Genotypen verringert. Die echokardiographische Untersuchung wurde von der darin ausgebildeten Technischen Assistentin Frau Spitalieri durchgeführt (n=9-12 pro Gruppe; p<0,0001; Eichbalken: 1 mm).

3.6.4.2 Untersuchung der Herzmorphologie transgener Mäuse nach TAC-Operation mittels histologischer Färbung und Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht

Vier Wochen nach der Intervention wurden die Mäuse gewogen und die Herzen entnommen. Auch die Herzen wurden gewogen und anschließend Paraffinschnitte der Ventrikel hergestellt. Als Kontrollgruppe dienten sham-operierte Mäuse gleichen Genotyps. Nach Entparaffinierung der Schnitte wurde eine histologische Färbung mit *Wheat-Germ-Agglutinin* (WGA) angefertigt. WGA ist ein Lektin, das spezifisch an N-Acetyl-beta-(1,4)-D-Glucosamin in der Zellmembran bindet.

Durch Konjugation eines Fluoreszenzmarkers an WGA ist es möglich die Zellmembran histologisch durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen (Abb. 3.15 (A)). Die Zellen wurden in einer 400fachen Vergrößerung fotografiert und anschließend mit dem Computerprogramm ImageJ der kleinste Durchmesser einer Zelle gemessen. Schon das Erstellen der Fotos wurde hinsichtlich der Genotypen und Operationsmethode verblindet durchgeführt. Da nicht alle Muskelfasern genau orthogonal geschnitten werden, der Querschnitt folglich mehr oval als kreisrund war, wurde stets der kleinste Durchmesser einer Zelle gemessen. Dieser entspricht dem eigentlichen Durchmesser einer Muskelfaser. Die histologischen Analysen wurden stets in identischen Regionen der mittleren linksventrikulären Myokardwand durchgeführt (vgl. 2.2.7.4.1).

(A)



(B)

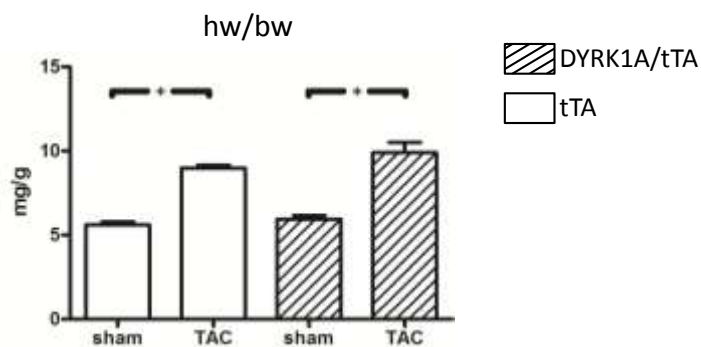


Abb. 3.15: Die Herzmorphologie DYRK1A/tTA-transgener Mäuse wurde vier Wochen nach TAC-Operation mittels Histologie und dem Quotient aus Herz- zu Körpergewicht untersucht. (A) Es wurde eine histologische *Wheat-Germ-Agglutinin*- (WGA-) Färbung der Paraffinschnitte vom Myokard der TAC-sham-operierten Mäuse angefertigt. Als Schnittebene wurde stets die mittlere linksventrikuläre Myokardwand gewählt. Die Schnitte wurden in 400facher Vergrößerung fotografiert und es wurde stets der kleinste Durchmesser einer Zelle gemessen (vgl. 2.2.7.4.1). Das Ergebnis zeigte bei beiden Genotypen bei der TAC-operierten Gruppe eine signifikante Zunahme des Myozytendurchmessers ($p < 0,0001$). Durch die DYRK1A-Überexpression in den DYRK1A/tTA-transgenen Tieren konnte diese Zunahme nicht verhindert werden. (B) Dargestellt ist der Quotient aus Herz- zu Körpergewicht der TAC-sham-operierten Mäuse beider Genotypen. Dieser Parameter zeigt eine hypertrophie-induzierte Gewichtszunahme des Herzens an. Sowohl die DYRK1A/tTA- also auch die tTA-transgenen Mäuse zeigten in der TAC-Gruppe eine signifikante Zunahme dieses Parameters. Der Eichbalken entspricht 20 μm .

Die Messung der Myozytendurchmesser der transgenen Mausherzen nach TAC-sham-Operation ergab, dass eine gesteigerte Expression von DYRK1A in Kardiomyozyten der Maus die durch TAC-induzierte Hypertrophie nicht verhindern kann. Die Herzen beider Genotypen, DYRK1A/tTA und tTA, hypertrophierten signifikant. Der Durchmesser der Kardiomyozyten vergrößerte sich bei beiden transgenen Mauslinien nahezu identisch (tTA-sham (n=700): $62,03 \pm 0,47$ Pixel; tTA-TAC (n=700): $68,77 \pm 0,57$ Pixel; DYRK1A/tTA-sham (n=400): $62,12 \pm 0,70$ Pixel; DYRK1A/tTA-TAC (n=900): $68,29 \pm 0,55$ Pixel; $p < 0,0001$).

Dieses Ergebnis spiegelte auch das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht wider (Abb. 3.15 (B)). Nach TAC-Operation erhöhte sich dieses Verhältnis sowohl bei den DYRK1A/tTA-doppelt-transgenen Mäusen als auch bei den tTA-einfach-transgenen Mäusen (tTA-sham (n=9): $5,61 \pm 0,17$ mg/g; tTA-TAC (n=9): $8,99 \pm 0,16$ mg/g; DYRK1A/tTA-sham (n=5): $5,94 \pm 0,22$ mg/g; DYRK1A/tTA-TAC (n=9): $9,89 \pm 0,61$ mg/g; $p < 0,0001$).

3.6.4.3 Untersuchung der Hypertrophiemarker *Bnp* und *Myh6/Myh7*

In einem insuffizienten Herzen kommt es zur Veränderung der Expression zahlreicher Gene. Ein wichtiger klinischer Marker der Herzinsuffizienz ist das *B-type natriuretic peptide* (BNP). Dieses Protein wird in der Herzinsuffizienz kompensatorisch hochreguliert, um die Natriuresis zu verstärken und die kardiale Hypertrophie zu verhindern (Braunwald und Bristow 2000; de Lemos *et al.* 2003). Außerdem kommt es in den insuffizienten Kardiomyozyten zu einer Verschiebung der Expression von α - (*Myh6*) *myosin heavy chain* zu β - (*Myh7*) *myosin heavy chain*. In der Herzinsuffizienz wird fast ausschließlich die Isoform *Myh7* exprimiert (1.4) (Lowes *et al.* 1997; Miyata *et al.* 2000).

Die echokardiographischen und histologischen Untersuchungen ergaben, dass die TAC-operierten Mäuse beider Genotypen (tTA- vs. DYRK1A/tTA-transgene Mäuse) vier Wochen nach Operation eine deutliche Hypertrophie aufwiesen. Die Expression von DYRK1A verhinderte die induzierte Hypertrophie nicht. Es sollte daher mit Hilfe der quantitativen *Real-time* RT-PCR in den Kardiomyozyten geprüft werden, wie sich die mRNA-Expression von *Bnp* (Abb. 3.16 (A)) und das Verhältnis von *Myh6* zu *Myh7* (Abb. 3.16 (B)) in den TAC-Sham-operierten Mäusen ändert. Das Expressionsniveau von *Bnp* wurde auf 18S RNA normalisiert.

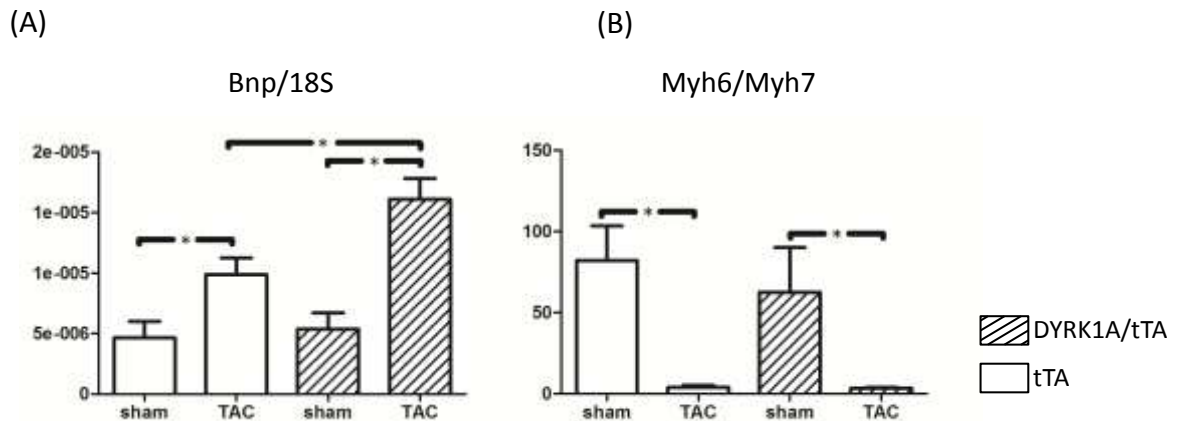


Abb. 3.16: Analyse der Hypertrophiemarker *Bnp* und *Myh7* mittels *Real-time* RT-PCR in TAC-sham-operierten tTA- vs. DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen. TTA- und DYRK1A/tTA-transgene Mäuse wurden entweder einer TAC- oder sham-Operation unterzogen und vier Wochen nach OP die Herzen entnommen. Aus den Homogenaten wurde RNA isoliert und cDNA revers transkribiert. Mittels *Real-time* RT-PCR wurden das Expressionsniveau von *Bnp* (A) und die Verschiebung des Expressionsmusters von *Myh6* zu *Myh7* (B) gemessen. Die Normalisierung des Hypertrophiemarkers *Bnp* erfolgte auf *18S* RNA. (A) Die TAC-operierten transgenen Mäuse beider Genotypen wiesen einen signifikanten Anstieg der *Bnp/18S*-Expression auf. Es wurde eine signifikante Zunahme der *Bnp/18S*-Expression auch bei den TAC-DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen im Vergleich zu den TAC-tTA-transgenen Mäusen beobachtet. (B) Das Expressionsmuster von *Myh6* zu *Myh7*, welches in der Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert wird, verschob sich bei beiden Genotypen vier Wochen nach TAC-Operation sehr deutlich in Richtung der *Myh7* mRNA-Expression ($p < 0,0001$).

Die Untersuchung der mRNA-Expression von *Bnp* ergab, dass in den TAC-operierten Mäusen beider Genotypen ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu den sham-operierten Mäusen vorlag. Auch zwischen den Gruppen TAC-tTA und TAC-DYRK1A/tTA konnte eine signifikante Zunahme der *Bnp*-Expression festgestellt werden (*Bnp/18S*: sham-tTA (n=10): $4,64e-6 \pm 1,37e-6$; TAC-tTA (n=9): $9,86e-6 \pm 1,38e-6$; sham-DYRK1A/tTA (n=6): $5,37e-6 \pm 1,34e-6$; TAC-DYRK1A/tTA (n=9): $1,61e-5 \pm 1,73e-6$; $p < 0,0001$).

Bei der Analyse des Expressionsmusters von *Myh6* und *Myh7* stellte sich heraus, dass sich das Verhältnis von *Myh6/Myh7* bei den TAC-operierten Mäusen beider Genotypen (tTA vs. DYRK1A/tTA) signifikant in Richtung *Myh7* verschob (*Myh6/Myh7*: sham-tTA (n=10): $82,20 \pm 21,22$; TAC-tTA (n=9): $4,12 \pm 1,24$; sham-DYRK1A/tTA (n=6): $62,58 \pm 27,49$; TAC-DYRK1A/tTA (n=9): $3,47 \pm 0,57$; $p < 0,0001$).

Die Hochregulation von *Bnp* und das Verschieben des Expressionsmusters in Richtung *Myh7* sind typische Expressionsänderungen der Herzinsuffizienz. Die DYRK1A-Überexpression in den DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen hatte keinen Einfluss auf deren Expression.

3.7 Einfluss von DYRK1A auf die Calcineurin-induzierte Hypertrophie

3.7.1 Untersuchung der Herzfunktion mittels Echokardiographie

Durch die transaortale Konstriktion (TAC) sind neben dem Calcineurin/NFAT-Signalweg viele andere Signaltransduktionswege aktiv. Um spezifisch die Calcineurin-induzierte Hypertrophie zu untersuchen, wurden DYRK1A/tTA-doppelt-transgene und Calcineurin- (CnA-) transgene Mäuse zur Gewinnung von DYRK1A/CnA/tTA-dreifach-transgenen Mäusen verpaart. Transgene Mäuse, die herzspezifisch Calcineurin überexprimieren, entwickeln eine massive Myokardhypertrophie mit folgender Herzinsuffizienz. Das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht erfährt eine 2-3fache Steigerung im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine gleichzeitige Überexpression von DYRK1A die Calcineurin-vermittelte Hypertrophie antagonisieren kann.

Vorteil der Echokardiographie ist, dass sie eine nicht-invasive Untersuchungsmethode darstellt, die problemlos an unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt werden kann. Zusätzlich sind die ermittelten Ergebnisse sehr gut miteinander vergleichbar. Um eine optimale Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde die echokardiographische Untersuchung stets von der dazu ausgebildeten Technischen Assistentin Frau Spitalieri durchgeführt. Die Untersuchung der transgenen Mäuse erfolgte acht und zwölf Wochen nach der Geburt (vgl. 3.6.1). Es wurden vier verschiedene Genotypen verglichen: tTA, DYRK1A/tTA, CnA/tTA und DYRK1A/CnA/tTA (Abb. 3.17).

Erwartungsgemäß hypertrophierten die Herzen CnA/tTA-transgener Mäuse acht Wochen nach Geburt. Der Durchmesser der Septumwand (SW) vergrößerte sich signifikant im Vergleich zu den tTA-Wildtyp-Mäusen. Die Dicke der Hinterwand und der linksventrikuläre endsystolische und -diastolische Durchmesser veränderten sich nicht signifikant. Durch die zusätzliche DYRK1A-Expression konnte die Hypertrophie des Septums nicht verhindert werden. Bereits nach zwölf Wochen hatten die CnA/tTA-transgenen Mäuse Zeichen der dilatativen Kardiomyopathie entwickelt. Echokardiographisch zeigte sich dies in einer signifikanten Zunahme des linkventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVEDD). Die signifikante Hypertrophie des Septums hatte Bestand. Die Verkürzungsfraction (FS) war als funktioneller Wert nach zwölf Wochen signifikant reduziert. Allerdings unterschieden sich die genannten Parameter im Vergleich zu den dreifach-transgenen DYRK1A/CnA/tTA-Mäusen nicht wesentlich. Die DYRK1A-Überexpression schien hierbei keinen protektiven Einfluss zu haben.

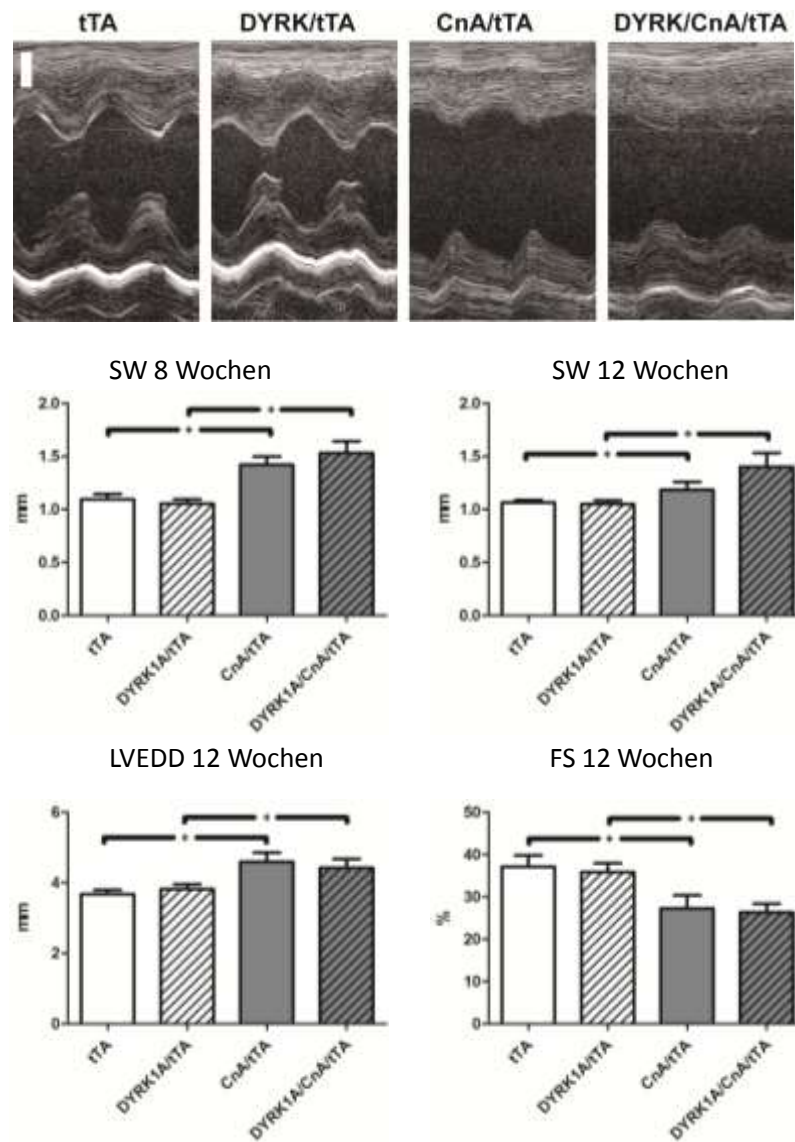


Abb. 3.17: Echokardiographische Untersuchung der tTA-, DYRK1A/tTA-, CnA/tTA- und DYRK1A/CnA/tTA-transgenen Mäuse. Die Echokardiographie erfolgte im M-Mode in der longitudinalen Achse. Acht Wochen nach Geburt zeigten sich in den CnA/tTA- und den DYRK1A/CnA/tTA-transgenen Mäusen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (tTA vs. CnA/tTA und DYRK1A/tTA vs. DYRK1A/CnA/tTA) eine signifikante Vergrößerung des Septums (SW). Auch nach zwölf Wochen war das Septum der beiden Calcineurin-transgenen Gruppen signifikant hypertrophiert. Hier konnte zusätzlich eine signifikante Vergrößerung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVEDD) und eine Reduktion der Verkürzungsfraction (FS) bei den CnA/tTA- und den DYRK1A/CnA/tTA-transgenen Mäusen festgestellt werden (n=7-14 pro Gruppe; Eichbalken: 1 mm).

Zur übersichtlichen Darstellung sind die Werte der echokardiographischen Untersuchung in nachfolgender Tabelle aufgeführt:

Tab. 3.2.: Echokardiographieergebnisse der tTA-, DYRK1A/tTA-, CnA/tTA- und DYRK1A/CnA/tTA-transgenen Mäuse im Alter von acht und zwölf Wochen im M-Mode der longitudinalen Achse.

8 Wochen	tTA n=14	DYRK1A/tTA n=7	CnA/tTA n=10	DYRK1A/CnA/tTA n=8
SW (mm)	1,09 ± 0,05	1,05 ± 0,04	1,42 ± 0,08	1,53 ± 0,11
12 Wochen	tTA n=14	DYRK1A/tTA n=7	CnA/tTA n=10	DYRK1A/CnA/tTA n=8
SW (mm)	1,06 ± 0,02	1,05 ± 0,04	1,18 ± 0,07	1,40 ± 0,13
LVEDD (mm)	3,68 ± 0,12	3,82 ± 0,14	4,600 ± 0,25	4,42 ± 0,26
FS (%)	37,12 ± 2,64	35,85 ± 2,09	27,30 ± 3,05	26,34 ± 2,05

3.7.2 Untersuchung der Herzmorphologie mittels histologischer Färbung und Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht

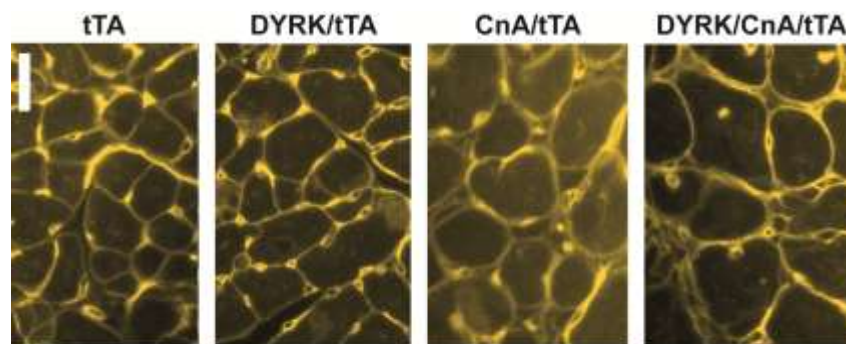
Die Herzmorphologie wurde wie im Versuch 3.6.4.2 mit der histologischen *Wheat-Germ-Agglutinin-* (WGA-) Färbung (Abb. 3.18 (A)) und dem Herzgewicht/Körpergewicht Verhältnis (Abb. 3.18 (B)) analysiert. Die transgenen Mäuse wurden unter Isoflurananästhesie getötet, das Herz entnommen und Paraffinschnitte in horizontaler Ebene angefertigt. Durch Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffs an WGA konnte unter dem Mikroskop die Zellmembran sichtbar gemacht werden. Die Zellen wurden in 400facher Vergrößerung fotografiert und anschließend mit Hilfe des Programms ImageJ der kleinste Durchmesser der Kardiomyozyten gemessen (vgl. 2.2.7.4.1). Bereits das Erstellen der Fotos geschah hinsichtlich der Gruppenzuordnung verblindet. Untersucht wurden transgene Mäuse mit den folgenden Genotypen: tTA, DYRK1A/tTA, CnA/tTA, DYRK1A/CnA/tTA.

Die WGA-Untersuchung in zwölf Wochen alten Tieren ergab, dass die DYRK1A/tTA-transgenen Tiere im Vergleich zu den tTA-transgenen Tieren eine geringe aber signifikante Vergrößerung des Myozytendurchmessers aufwiesen (tTA (n=1100): $62,97 \pm 0,42$ Pixel; DYRK1A/tTA (n=600): $66,46 \pm 0,65$ Pixel; $p < 0,0001$). Echokardiographisch zeigte sich in den CnA/tTA-transgenen Tieren im Vergleich zu den tTA-transgenen Tieren eine signifikante Hypertrophie. Dies konnte in der histologischen Untersuchung bestätigt werden. Der Myozytendurchmesser vergrößerte sich signifikant (CnA/tTA (n=700): $75,81 \pm 0,81$ Pixel; $p < 0,0001$). Allerdings konnte in diesem Versuch

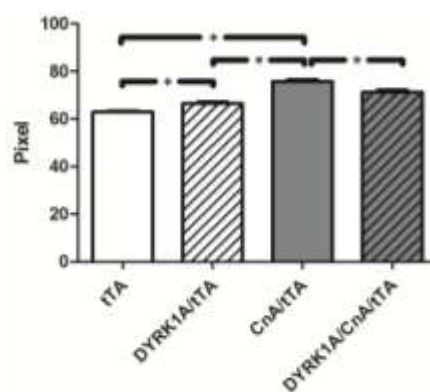
in den dreifach-transgenen DYRK1A/CnA/tTA-Mäusen eine leichte Reduktion des Durchmessers festgestellt werden. Das bedeutet, dass DYRK1A in diesem Model die durch CnA-induzierte Hypertrophie signifikant antagonisieren konnte, wenn auch in geringem Maße (DYRK1A/CnA/tTA (n=400): $71,27 \pm 0,96$ Pixel; $p=0,0005$).

Die Herzgewichte der zwölf Wochen alten transgenen Mäuse wurden ins Verhältnis zu ihrem Körpergewicht gesetzt. Sowohl bei den tTA- vs. CnA/tTA-transgenen Mäuse als auch bei den DYRK1A/tTA- vs. DYRK1A/CnA/tTA-transgenen Mäuse war dieses Verhältnis signifikant erhöht. Hier konnte die Überexpression von DYRK1A das durch Calcineurin erhöhte Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht nicht verringern (tTA (n=18): $5,62 \pm 0,14$ mg/g; DYRK1A/tTA (n=11): $5,95 \pm 0,16$ mg/g; CnA/tTA (n=10): $12,04 \pm 0,51$ mg/g; DYRK1A/CnA/tTA (n=11): $11,91 \pm 0,38$ mg/g; $p<0,0001$).

(A)



Myozytendurchmesser



(B)

hw/bw

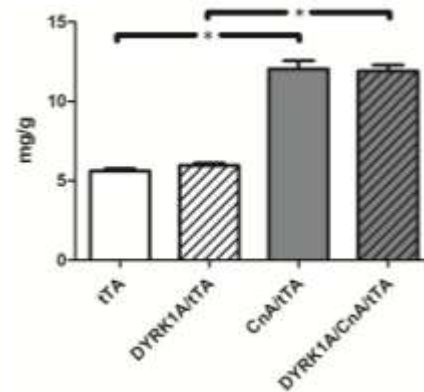


Abb. 3.18: Die Herzmorphologie in tTA-, DYRK1A/tTA-, CnA/tTA- und DYRK1A/CnA/tTA-transgenen Mäusen wurde mittels Histologie und Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht untersucht. (A) Die DYRK1A/tTA-transgenen Mäuse hatten im Vergleich zu den tTA-transgenen Mäusen einen geringen, aber signifikant größeren Myozytendurchmesser ($p<0,0001$). Die CnA/tTA-transgenen Tiere wiesen den größten Durchmesser auf. Dieser konnte durch die zusätzliche DYRK1A-Überexpression signifikant reduziert werden ($p=0,0005$). Der Eichbalken entspricht $20 \mu\text{m}$. Es wurden >400 Zellen pro Gruppe gemessen. (B) Anhand des Quotienten aus Herz- und Körpergewicht konnte die induzierte Hypertrophie in den Calcineurin-transgenen Mäusen beurteilt werden. Beide CnA-überexprimierenden Gruppen (CnA/tTA und DYRK1A/CnA/tTA) wiesen ein deutlich vergrößertes Herz- zu Körpergewicht Verhältnis auf. Durch die DYRK1A-Überexpression in den DYRK1A/CnA/tTA-transgenen Mäusen konnte das Verhältnis nicht reduziert werden (mindestens sieben Mäuse pro Gruppe).

3.7.3 Untersuchung der Hypertrophiemarker *Bnp* und *Myh6/Myh7*

Wie bereits im TAC-induzierten Hypertrophiemodell ausgeführt, wurden auch in dem Calcineurin-Modell die Expression der Hypertrophiemarker *Bnp* und *Myh6/Myh7* untersucht (Abb. 3.19). Im insuffizienten Herzen steigt das Expressionsniveau von β -MHC (*Myh7*), wohingegen die Expression der Isoform α -MHC (*Myh6*) abnimmt. Daher wurde in diesem Versuch die Änderung des Verhältnisses *Myh6/Myh7* mittels quantitativer *Real-time* RT-PCR untersucht. Die mRNA-Expression von *Bnp* wurde auf die von *18S* RNA normalisiert. Analysiert wurden tTA-, DYRK1A/tTA-, CnA/tTA- und DYRK1A/CnA/tTA-transgene Mäuse, die zuvor unter 3.7.1 und 3.7.2 echokardiographisch und histologisch untersucht wurden.

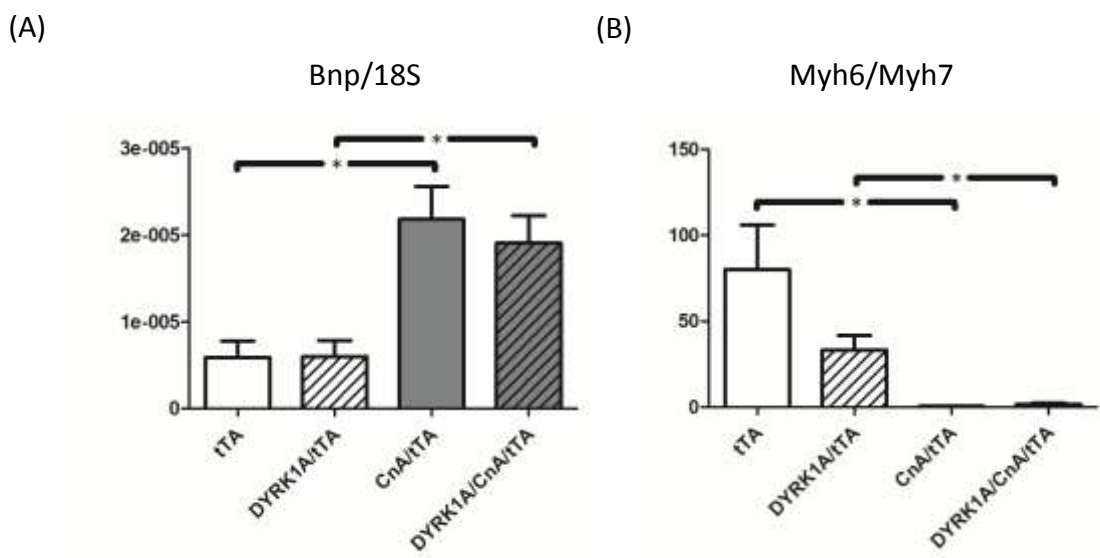


Abb. 3.19: Analyse der Hypertrophiemarker *Bnp* und β -MHC (*Myh7*) mittels *Real-time* RT-PCR in tTA-, DYRK1A/tTA-, CnA/tTA- und DYRK1A/CnA/tTA-transgenen Mäusen. (A) Bei den CnA/tTA-überexprimierenden Mäusen konnte in den Herzen eine deutlich erhöhte mRNA-Expression von *Bnp* nachgewiesen werden ($p=0,0025$). Durch die zusätzliche DYRK1A-Überexpression in den DYRK1A/CnA/tTA-dreifach-transgenen Mäusen konnte die Expression nicht signifikant reduziert werden. (B) Bei den beiden Genotypen, die CnA überexprimieren (CnA/tTA und DYRK1A/CnA/tTA), verschob sich das *Myh6/Myh7* Expressionsmuster sehr stark zur *Myh7* Expression. Die Überexpression von DYRK1A konnte dieses Verhältnis nicht verändern ($p<0,05$).

In diesem Versuch wurden die transgenen Mäuse (tTA, DYRK1A/tTA, CnA/tTA und DYRK1A/CnA/tTA) mit Hilfe der quantitativen *Real-time* RT-PCR hinsichtlich der Expression der Hypertrophiemarker *Bnp* und *Myh7* untersucht. BNP wird im insuffizienten Herzen verstärkt exprimiert. Dies konnte in einem deutlich erhöhten mRNA-Expressionsniveau bei den CnA/tTA-transgenen Mäusen im Vergleich zu den tTA- und DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen bestätigt werden (*Bnp/18S*: tTA (n=8): $5,88e-6 \pm 1,91e-6$; DYRK1A/tTA (n=7): $5,98e-6 \pm 1,86e-6$; CnA/tTA

(n=9): $2,18e-5 \pm 3,77e-6$). Dieses erhöhte Niveau konnte durch die DYRK1A-Überexpression bei den DYRK1A/CnA/tTA-transgenen Mäusen nicht bedeutend verringert werden (*Bnp/18S*: DYRK1A/CnA/tTA (n=5): $1,91e-5 \pm 3,15e-6$; $p < 0,05$).

Auch die Verschiebung des Expressionsmusters von *Myh6* und *Myh7* zugunsten der Expression von *Myh7* weist auf eine Herzinsuffizienz hin. Dies war in diesem Versuch bei beiden CnA-überexprimierenden Genotypen der Fall. Das Verhältnis von *Myh6/Myh7* war bei den Gruppen tTA vs. CnA/tTA und DYRK1A/tTA vs. DYRK1A/CnA/tTA jeweils bei den Calcineurin-überexprimierenden Mäusen signifikant reduziert (*Myh6/Myh7*: tTA (n=8): $80,00 \pm 25,99$; DYRK1A/tTA (n=7): $33,32 \pm 8,32$; CnA/tTA (n=9): $0,58 \pm 0,11$; DYRK1A/CnA/tTA (n=5): $1,67 \pm 0,89$; $p < 0,05$).

3.8 Einfluss von DYRK1A auf den Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg in Kardiomyozyten

Das Ergebnis des Versuchs 3.4.3 zeigte unter anderem, dass die adenovirale DYRK1A-Transduktion neonataler Rattenkardiomyozyten zu einer geringen, aber signifikanten Hypertrophie führte. Dasselbe Resultat war auch *in vivo* in DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen nachweisbar (3.7.2). Diese Tiere entwickelten im Vergleich zu den tTA-transgenen Mäusen eine signifikante Zunahme des Myozytendurchmessers. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass DYRK1A den Phosphorylierungsstatus von MEK1/2 in Nicht-Kardiomyozyten steigern konnte (Kelly und Rahmani 2005). Weiter induziert die Phosphorylierung und damit Aktivierung von MEK1/2 in Kardiomyozyten eine signifikante Hypertrophie (Bueno *et al.* 2000). In diesem Experiment sollte daher der Effekt von DYRK1A auf den MAPK-Signalweg sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden.

3.8.1 Einfluss der DYRK1A-Überexpression auf die Aktivierung und Gesamtmenge von MEK1/2

Der Einfluss einer gesteigerten DYRK1A-Expression auf die MEK-Phosphorylierung wurde sowohl in neonatalen Rattenkardiomyozyten als auch in transgenen Mäusen untersucht. Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden isoliert und 24 h nach der Isolation mit Ad-DYRK1A adenoviral

transduziert. Als Kontrollgruppe dienten Zellen aus der gleichen Isolation, die mit einem Balt-CMV- β gal-Adenovirus (Ad-LacZ) in der gleichen Viruskonzentration transduziert wurden (MOI 10). Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen lysiert (Abb. 3.20 (A)). Um in den DYRK1A-transgenen Tieren die MEK-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden die Herzen homogenisiert und Proteinlysate hergestellt. In der ersten Gruppe wurden tTA-transgene Tiere mit DYRK1A/tTA-transgenen Tieren verglichen (Abb. 3.20 (B)). Die zweite Gruppe wies zu den eben Genannten zusätzlich die Genotypen CnA/tTA und DYRK1A/CnA/tTA auf (Abb. 3.20 (C)). Bei den durchgeführten Western Blots wurden folgende Proteinbanden mit den jeweils spezifischen Antikörpern angefärbt: Phospho-MEK1/2 (p-MEK1/2), Total-MEK1/2 (t-MEK1/2) und zur Normalisierung GAPDH. Neben dem Effekt einer gesteigerten DYRK1A-Expression auf die MEK-Phosphorylierung (p-MEK1/2) sollte des Weiteren untersucht werden, ob sich die Gesamtkonzentration von MEK1/2 (t-MEK1/2) veränderte.

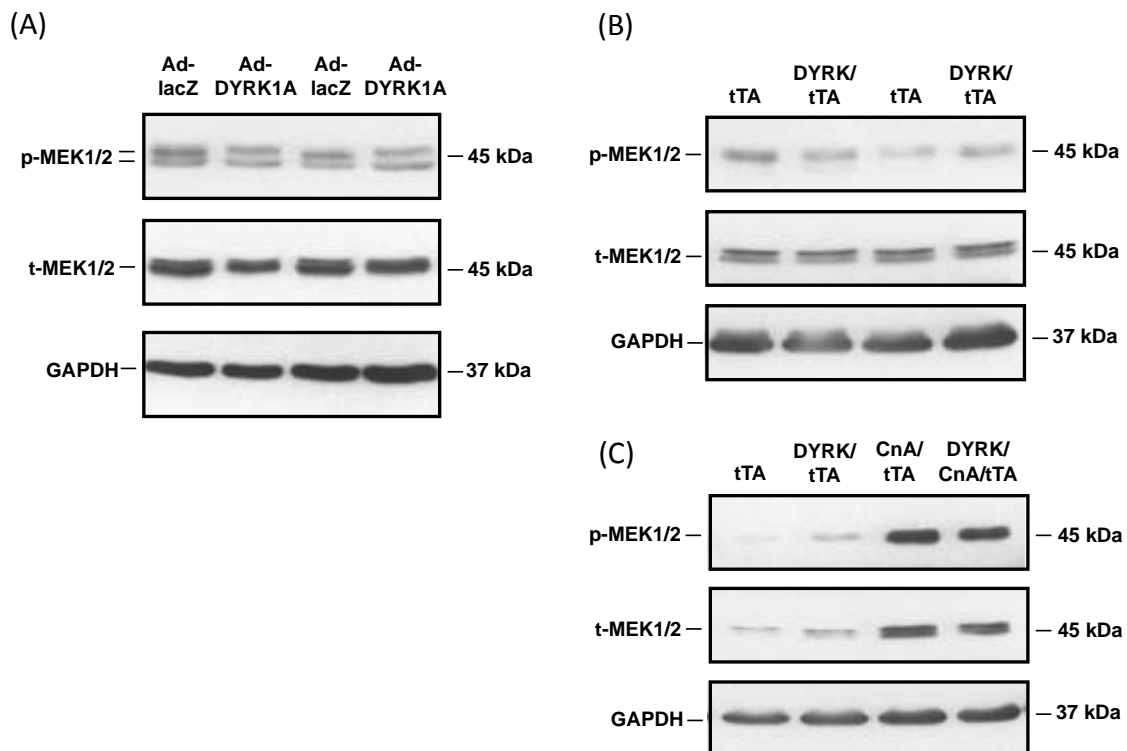


Abb. 3.20: Effekt einer gesteigerten DYRK1A-Expression *in vitro* (A) und *in vivo* (B) und (C) auf die Phosphorylierung und Gesamtkonzentration von MEK1/2. In diesem Versuch sollte in DYRK1A adenoviral transduzierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (A) und in DYRK1A-transgenen Mäusen (B) geprüft werden, wie sich die Phosphorylierung und Gesamtkonzentration von MEK1/2 ändert. (A) Der dargestellte Western Blot zeigt deutlich, dass die adenovirale DYRK1A-Überexpression die Phosphorylierung von MEK1/2 (p-MEK1/2) nicht stimulierte. Auch die Gesamtmenge von MEK1/2 (t-MEK1/2) unterschied sich nicht. (B) Ebenfalls änderte sich *in vivo* bei DYRK1A-überexprimierenden transgenen Mäusen p-MEK1/2 im Vergleich zu der Kontrollgruppe (tTA) nicht. Dasselbe galt für t-MEK1/2. (C) Bei den transgenen Mäusen, die Calcineurin (CnA) überexprimieren, war im Vergleich zu den tTA- und DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen sowohl die Phosphorylierung von Mek1/2 als auch die Expression von Mek1/2 gesteigert. Allerdings blieb das Verhältnis von p-MEK1/2 zu t-MEK1/2 annähernd gleich. Somit ließ sich *in vitro* und *in vivo* nach DYRK1A-Überexpression kein Effekt auf den MAPK-Signalweg feststellen.

Die Untersuchungen zeigten, dass sich die Phosphorylierung von MEK1/2 sowohl durch eine adenovirale Überexpression von DYRK1A in neonatalen Rattenkardiomyozyten als auch durch transgene DYRK1A-Überexpression in transgenen Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen nicht bedeutend änderte. Somit ließ sich kein Effekt einer gesteigerten DYRK1A-Expression *in vitro* und *in vivo* auf die Phosphorylierung und Gesamtmenge von MEK feststellen.

3.9 Messung der NFAT-Aktivität *in vivo*

In den folgenden Versuchen sollte in verschiedenen Mausmodellen untersucht werden, wie sich die transkriptionelle NFAT-Aktivität durch eine gesteigerte DYRK1A-Expression ändert. Ein Effekt von DYRK1A auf die NFAT-Aktivität war eher unter stimulierten Bedingungen zu erwarten, da DYRK1A im Zellkern lokalisiert vorliegt. Zum einen sollte der Einfluss einer gesteigerten DYRK1A-Expression auf die transkriptionelle NFAT-Aktivität in dem TAC- und Calcineurin-induzierten Hypertrophie-Modell anhand der mRNA-Expression von *Rcan1-4* und zum anderen in der Phenylephrin-stimulierten NFAT-Luciferase-transgenen Maus untersucht werden.

3.9.1 Messung der NFAT-Aktivität mittels der Expression von *Rcan1-4* in den TAC- und Calcineurin-induzierten Hypertrophie-Modellen

RCAN1 (früher MCIP1 oder DSCR1) ist ein Calcineurin-Inhibitor, der durch direkte Interaktion mit der katalytischen Untereinheit A den Calcineurin/NFAT-Signalweg inhibiert. Der Promotor des Gens *Rcan1* besitzt 15 NFAT-Bindungsstellen. Das Exon 4 des Gens (*Rcan1-4*) ist ein guter Indikator für die transkriptionelle NFAT-Aktivität. Da die Expression von RCAN1 durch Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs gesteigert wird, jedoch RCAN1 Calcineurin inhibiert, stellt dies einen negativen Feedback-Mechanismus dar. In diesem Versuch sollte mit Hilfe der quantitativen *Real-time* RT-PCR zum einen geprüft werden, ob die mRNA-Expression von *Rcan1-4* in TAC-sham-operierten Mäusen verändert war. Die Vergleichsgruppen bildeten tTA- und DYRK1A/tTA-transgene Mäuse (Abb. 3.21 (A)). Zum anderen wurde analysiert, ob in den tTA-, DYRK1A/tTA-, CnA/tTA- und DYRK1A/CnA/tTA-transgenen Mäusen ein unterschiedliches mRNA-Expressionsniveau von *Rcan1-4* nachzuweisen war (Abb. 3.21 (B)). Die Herzen der Tiere wurden vier Wochen nach der TAC-sham-Operation bzw. bei dem Calcineurin-induzierten Hypertrophie-Modell im Alter von zwölf Wochen homogenisiert, die RNA isoliert und daraus die cDNA

synthetisiert. Mittels quantitativer *Real-time* RT-PCR wurde die mRNA-Expression von *Rcan1-4* und *18S* ermittelt. Die Expression der *18S* RNA diente zur Normalisierung.

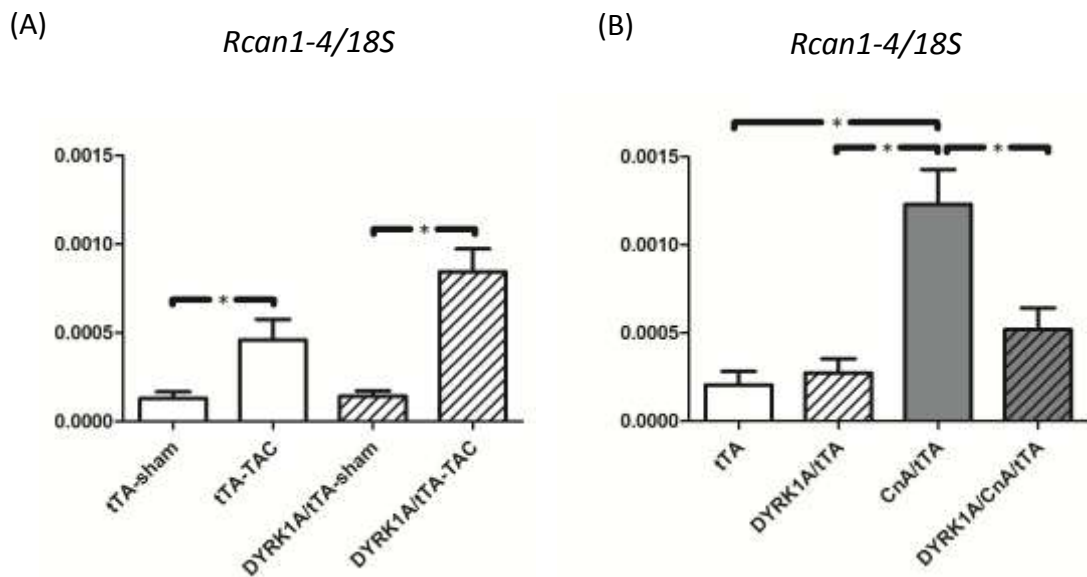


Abb. 3.21: Analyse der NFAT-Aktivität mittels der Expression von *Rcan1-4* in den TAC- und Calcineurin-induzierten Hypertrophie-modellen. Mit Hilfe der *Real-time* RT-PCR wurden die mRNA-Expressionsniveaus von *Rcan1-4* und *18S* ermittelt. (A) In den TAC-operierten Mäusen beider Genotypen (tTA vs. DYRK1A/tTA) war vier Wochen nach erfolgter Operation die mRNA-Expression von *Rcan1-4* signifikant erhöht. Als Kontrollgruppe dienten jeweils die sham-operierten Mäuse mit dem gleichen Genotyp. (B) Das Ergebnis bei den CnA/tTA-transgenen Mäusen zeigte im Vergleich zu den tTA-transgenen Mäusen eine deutlich gesteigerte *Rcan1-4*-Expression. Diese war jedoch bei den DYRK1A/CnA/tTA-dreifach-transgenen Mäusen signifikant reduziert. Die Normalisierung erfolgte auf *18S* RNA.

Sowohl Mäuse mit dem Genotyp tTA als auch mit dem Genotyp DYRK1A/tTA zeigten in der TAC-Gruppe eine signifikante Zunahme der *Rcan1-4* mRNA-Expression. Somit ist bei den TAC-operierten Mäusen von einer gesteigerten NFAT-Aktivität auszugehen. Eine gesteigerte DYRK1A-Expression bewirkte keine Änderung der NFAT-Aktivität und die *Rcan1-4* Expression konnte nicht verhindert werden (*Rcan1-4/18S*: tTA-sham (n=10): $1,29e-4 \pm 3,85e-5$; tTA-TAC (n=9): $4,60e-4 \pm 1,16e-4$; DYRK1A/tTA-sham (n=6): $1,42e-4 \pm 3,05e-5$; DYRK1A/tTA-TAC (n=9): $8,45e-4 \pm 1,29e-4$; $p < 0,05$). Die Untersuchung der transgenen Mäuse mittels der quantitativen *Real-time* RT-PCR hinsichtlich der *Rcan1-4*-Expression ergab, dass bei den CnA/tTA-transgenen Mäusen im Vergleich zu den tTA- und den DYRK1A/tTA-transgenen Tieren eine signifikante Zunahme der Expression vorlag (*Rcan1-4/18S*: tTA (n=8): $2,06e-4 \pm 7,63e-5$; DYRK1A/tTA (n=7): $2,73e-4 \pm 8,16e-5$; CnA/tTA (n=8): $1,23e-3 \pm 1,98e-4$; $p < 0,0003$). Durch die Überexpression von DYRK1A in den DYRK1A/CnA/tTA-transgenen Mäusen konnte das hohe *Rcan1-4*-Expressionsniveau in den Herzen

CnA/tTA-überexprimierender Mäuse signifikant reduziert werden (*Rcan1-4/18S*: DYRK1A/CnA/tTA (n=5): $5,19e-4 \pm 1,23e-4$; $p < 0,02$).

3.9.2 Messung der NFAT-Aktivität in der NFAT-abhängigen Luciferase-exprimierenden transgenen Maus

In diesem Versuch sollte mit Hilfe einer transgenen Maus, die einen spezifischen NFAT-Luciferase Reporter in Kardiomyozyten exprimiert, die NFAT-Aktivität *in vivo* gemessen werden. Es war aufgrund der intranukleären DYRK1A-Lokalisation zu erwarten, dass eine gesteigerte DYRK1A-Expression die transkriptionelle NFAT-Aktivität eher unter Bedingung beeinflusst, in denen NFAT durch Stimulation von Calcineurin nukleär vorliegt. Daher sollten die transgenen Mäuse kontinuierlich über eine Woche mittels einer Phenylephrin-freisetzenden, mikro-osmotischen Pumpe stimuliert werden, wodurch es zu einer Translokation von NFAT in den Zellkern kommen sollte. Da die Kinetik des Biolumineszenzsignals nicht bekannt war, mussten Vorversuche zur Etablierung der Methode der molekularen Bildgebung durchgeführt werden.

Die NFAT-Luciferase- (NFAT-Luc-) transgene Maus besitzt ein herzspezifisches Transgen-Konstrukt, bestehend aus einem minimalisierten Promotor des *α -myosin heavy chain* (α -MHC) Gens, der unter anderem so modifiziert ist, dass neun Kopien der NFAT-Bindungsstellen des Interleukin-4 (IL-4) Promotors 5'wärts eingefügt wurden. Dieser Promotor wiederum liegt 5'wärts einer Luciferase kodierenden DNA Sequenz und reguliert so in Abhängigkeit der NFAT-Aktivität die Expression des Enzyms Luciferase (vgl. Abb.2.3) (Wilkins *et al.* 2004). Steigt die NFAT-Aktivität in den Kardiomyozyten an, transloziert NFAT in den Zellkern und bindet dort unter anderem an die NFAT-Bindungsstellen des Promotor-Reporter-Konstrukts. Dies führt zu einer gesteigerten Expression des Enzyms Luciferase. In Anwesenheit von Luciferin und Co-Substraten entsteht Licht, das in dem Bioluminometer IVIS Lumina II (Caliper LifeSciences) transkutan detektiert werden kann. Es wurden zwei transgene Genotypen untersucht: die NFAT-Luc/tTA-doppelt-transgene Maus (Kontrolle) und die NFAT-Luc/DYRK1A/tTA-dreifach-transgene Maus.

Die Applikation des Substrates Luciferin erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion mit einer Dosis von 150 mg/kg Körpergewicht. Fünf Minuten nach der Applikation startete die erste Messung. Diese Zeit wird benötigt, damit Luciferin in das Gefäßsystem und über das Blut ins Herz gelangt. Nach Aufnahme des Substrates Luciferin in die Kardiomyozyten war zu erwarten, dass aufgrund der Expression des Enzyms Luciferase ein Biolumineszenzsignal detektiert werden kann.

Je nach NFAT-Aktivität und somit Luciferase-Expression sollte das Lichtsignal stärker (NFAT-Stimulation) oder schwächer (NFAT-Hemmung) ausfallen. Die Durchführung einer Messung ist detailliert im Abschnitt 2.2.8.2 beschrieben.

3.9.2.1 Test des Biolumineszenzsignals in NFAT-Luciferase-transgenen Mäusen und Wildtyp-Mäusen

Die wichtigste Voraussetzung war, dass ausschließlich Mäuse mit dem minimalisierten α MHC-Promotor, der herzspezifisch exprimiert wird und nach Bindung von NFAT das Enzym Luciferase synthetisiert, ein Lichtsignal auslösen. Meist wird das System der molekularen Bildgebung *in vivo* für subkutane Tumore verwendet, bei denen das Lichtsignal ungehindert aus dem Körper detektiert werden kann. Daher musste des Weiteren geprüft werden, ob das Biolumineszenzsignal stark genug ist, um durch den Thorax mit seinen knöchernen Strukturen hindurch gemessen werden zu können.

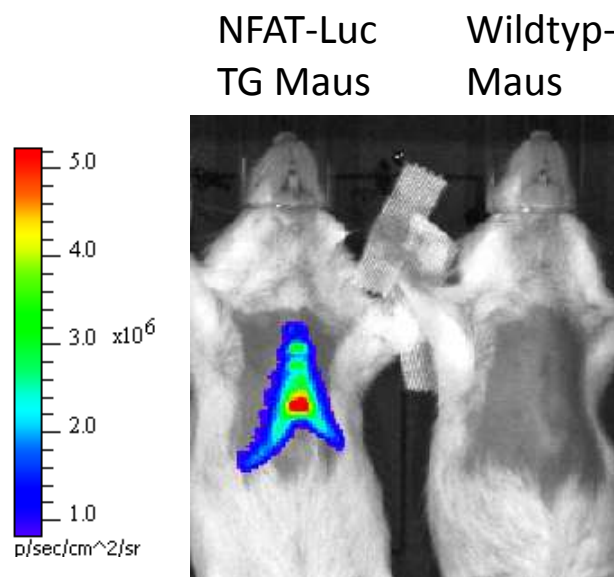


Abb. 3.22: Messung der Luciferase-Aktivität in NFAT-Luciferase-transgenen Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Die NFAT-Luciferase-transgene Maus (links) erzeugte einige Minuten nach intraperitonealer Luciferin-Injektion eine deutliche Photonen-Emission über der Herzregion. Hingegen war bei der Wildtyp-Maus (rechts) zu keiner Zeit ein Signal nachweisbar. Zur Vermeidung von Streustrahlung wurden die Mäuse vor der Messung in der Herzregion rasiert.

Wie die Abbildung 3.22 verdeutlicht, zeigten ausschließlich die transgenen Mäuse ein Biolumineszenzsignal, die in ihrem Herzen die Luciferase exprimierten. Bei allen Tieren ohne dieses Transgen-Konstrukt war zu keiner Zeit ein Biolumineszenzsignal nachweisbar.

3.9.2.2 Untersuchung der Kinetik des Biolumineszenzsignals nach Luciferin-Injektion

Des Weiteren sollte vor Versuchsbeginn die Kinetik des Biolumineszenzsignals über den Zeitraum von circa einer Stunde nach Injektion von Luciferin untersucht werden. Die Kenntnis über die exakte Kinetik des Biolumineszenzsignals ist essentiell für die Vergleichbarkeit der verschiedenen Messungen, damit das maximale Luciferase-Signal erfasst werden kann.

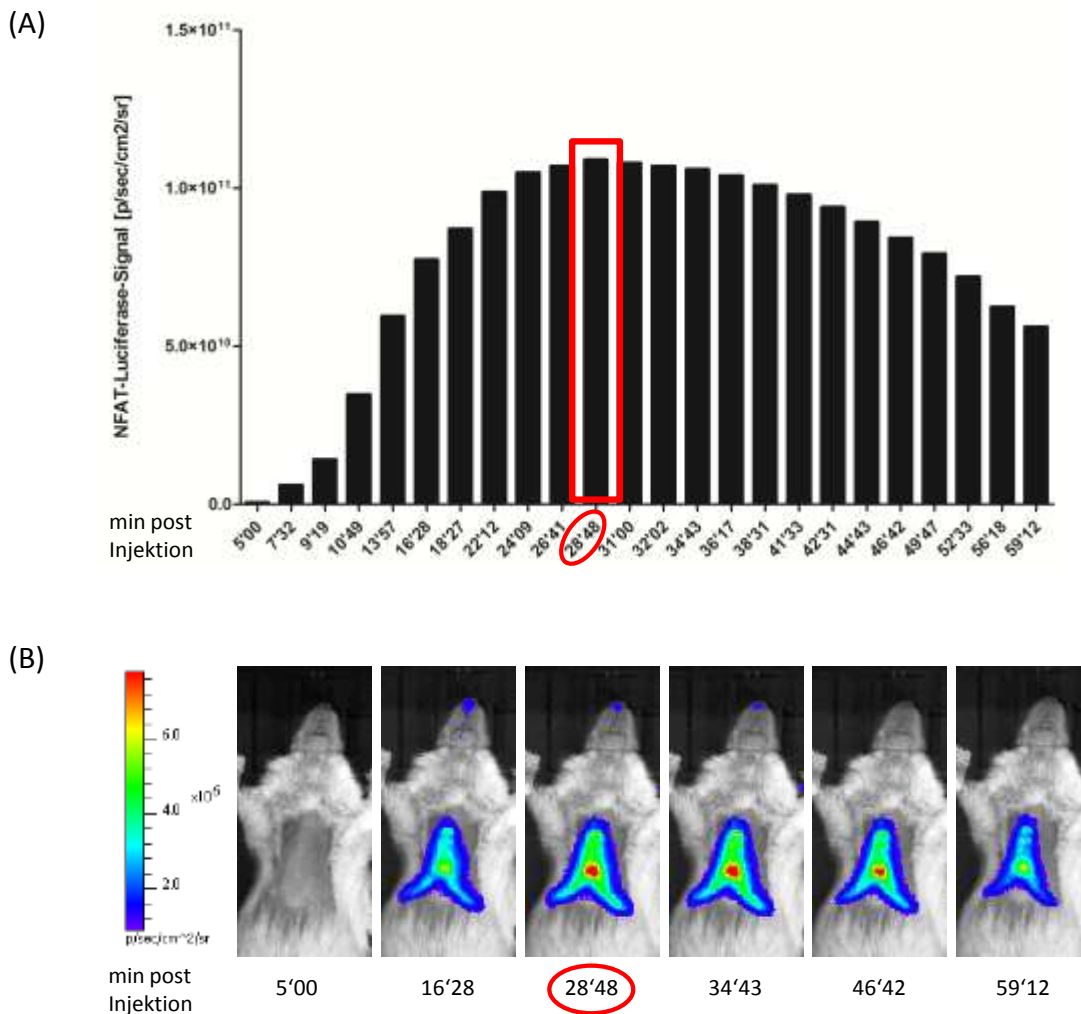


Abb. 3.23: Darstellung der Kinetik des Luciferase-Signals einer NFAT-Luciferase-transgenen Maus über einen Zeitraum von einer Stunde. Das maximale Biolumineszenzsignal trat stets nach unterschiedlichen Zeitpunkten ein. Daher wurde in dem folgenden Versuch bei jeder Maus in jeder Messung der Zeitverlauf dargestellt, um ein maximales Signal zu erhalten. Dieser Wert wurde für die Auswertung und den Vergleich der Mäuse untereinander herangezogen. (A) Der zeitliche Verlauf einer Messung einer NFAT-Luciferase-transgenen Maus ist exemplarisch dargestellt. Fünf Minuten nach intraperitonealer Injektion des Substrates Luciferin wurde die erste Messung gestartet. Meist war zu diesem Zeitpunkt noch keine Lumineszenz messbar. Jedoch war bereits nach circa 7 min ein deutliches Signal nachweisbar, das sich im Verlauf von etwa 30 min auf ein maximales Signal steigerte und nach einer Zeit von circa 5 min wieder abnahm. (B) Ausgewählte Bilder der Messung des NFAT-Luciferase Signals nach verschiedenen Zeitpunkten. Nach 28'48 min konnte das maximale Signal in dem Bioluminometer IVIS Lumina II detektiert werden. Die Farbskala zeigt die Intensität des Signals in der Einheit Photonen/Zeit/Quadratcentimeter/Winkel (p/sec/cm²/sr) an. Mit rot umrandet ist der Zeitpunkt des maximalen Biolumineszenzsignals. Im Versuch 3.8.2 floss nur der maximale Wert einer Messung in die Auswertung ein.

Der Kurvenverlauf des Biolumineszenzsignals war bei den Messungen sehr ähnlich, aber nicht exakt gleich. Daher wurde in dem Versuch 3.9.2 zur Auswertung und Vergleichbarkeit der transgenen Mäuse untereinander bei jeder Messung jeder Maus stets die exakte Kinetik abgebildet. Auf diese Weise konnte der maximale Wert erfasst und Schwankungen der Anflutung des Luciferins ausgeglichen werden. Bei der Abbildung dieser exemplarischen Kinetik zeigte sich, dass 5 min nach der intraperitonealen Luciferin-Injektion noch kein adäquates Signal auslösbar war. Allerdings zeigte sich nach circa 10 min ein deutliches Biolumineszenzsignal, das sich auf einen maximalen Wert nach circa 30 min nach Applikation steigern lies. Danach fiel das Signal langsamer ab, als es bis zum Erreichen des Maximalwerts zunahm (Abb. 3.23).

3.9.3 Untersuchung des Biolumineszenzsignals in NFAT-Luc/tTA- und NFAT-Luc/DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen

Die NFAT-Luc/tTA-doppelt-transgenen Mäuse und die NFAT-Luc/DYRK1A/tTA-dreifach-transgenen Mäuse sollten mit dem Sympathomimetikum Phenylephrin (PE) adrenerg stimuliert werden. Hierfür wurden den Mäusen mikro-osmotische Pumpen implantiert, die konstant eine Dosis von 0,1 mg/kgKG/Tag PE abgaben. Die Annahme war, dass PE durch eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration den Calcineurin/NFAT-Signalweg aktivieren würde. Das aktivierte NFAT sollte in den Nukleus gelangen und dort die NFAT-Bindungsstellen des minimalisierten α MHC-Promotors besetzen. Dies hätte die gesteigerte Expression der Luciferase zur Folge und somit eine korrelierende Zunahme des Biolumineszenzsignals. Um diese Zunahme erfassen zu können, war vor der Pumpenimplantation eine Vor-Messung des basalen Niveaus (prae) notwendig. Dieser Messwert galt als Referenzwert für die folgenden Messungen. Den Mäusen wurden nach der prae-Messung mikro-osmotische Phenylephrin-Pumpen implantiert. Die Abgabe des Phenylephrins durch die Pumpe erfolgte direkt nach der Implantation. Die weiteren Messungen erfolgten zwölf Stunden und sieben Tage nach Pumpenimplantation (Abb. 3.24).

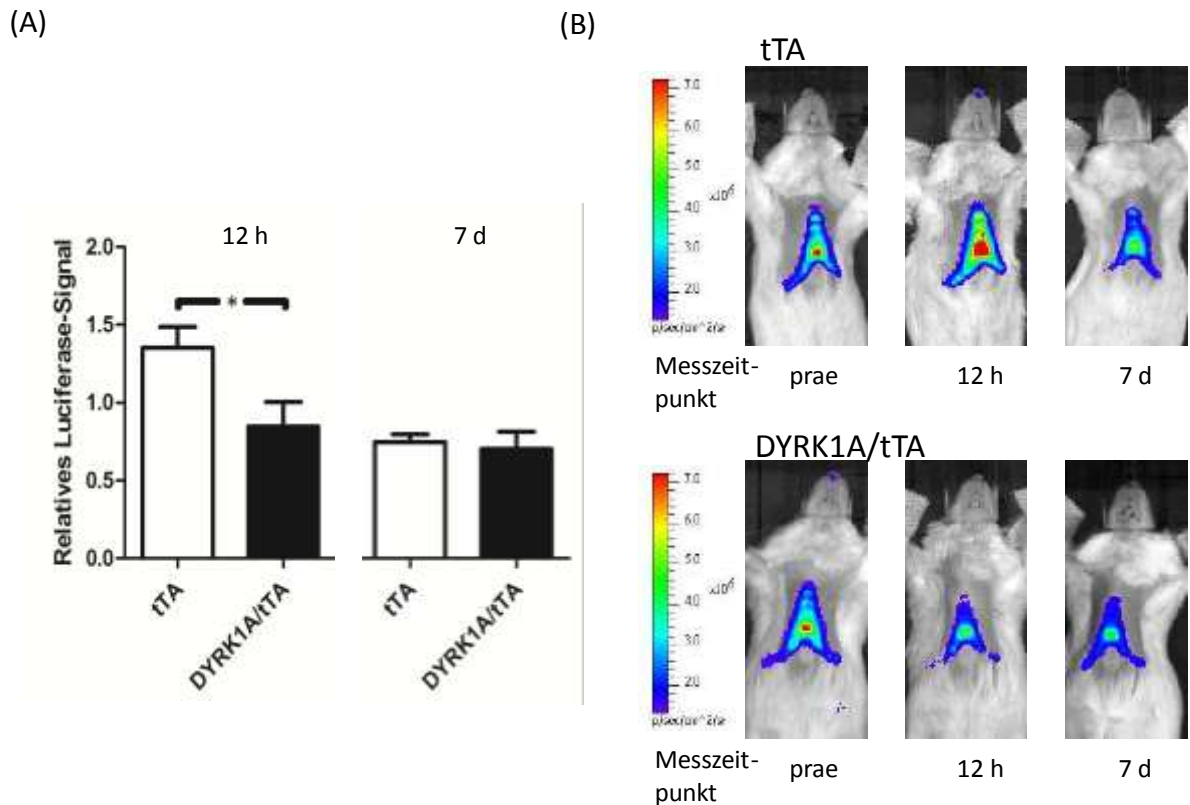


Abb. 3.24: Messung der transkutanen Lichtemission *in vivo* bei NFAT-Luciferase/tTA- vs. NFAT-Luciferase/DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen. Vor der Minipumpenimplantation wurde bei den NFAT-Luciferase-transgenen Mäusen (tTA vs. DYRK1A/tTA) eine Messung durchgeführt, um das Grundniveau des Biolumineszenzsignals zu bestimmen. Zu diesem prae-Wert wurden die Messwerte der zwölf Stunden (h) und sieben Tage (d) Messung ins Verhältnis gesetzt. Die mikro-osmotischen Pumpen gaben kontinuierlich Phenylephrin (PE) in einer Dosis von 0,1 mg/kgKG/Tag ab. (A) 12 h und 7 d nach der PE-Pumpenimplantation wurden die Mäuse untersucht. Bereits nach 12 h war ein signifikanter Unterschied des relativen Luciferase-Signals (bezogen auf die prae-Messung) nachzuweisen. Im Zeitraum von einer Woche nahm dieser Unterschied ab und stabilisierte sich auf einem Niveau unter dem prae-Wert (7 d). Dieses Ergebnis zeigt, dass die transgene DYRK1A-Überexpression eine akute NFAT-abhängige Transkription reduzieren kann. Jedoch lag die Lichtemission nach 7 d kontinuierlicher PE-Stimulation unter dem prae-Niveau von 1,0 und war in beiden Genotypen identisch. (B) Darstellung der transgenen Mäuse mit ihrem spezifischen Biolumineszenzsignal vor der Pumpenimplantation (prae) und 12 h bzw. 7 d nach kontinuierlicher PE-Stimulation. Die Farbskala zeigt die Intensität des Signals in der Einheit Photonen/Zeit/Quadratmeter/Winkel ($\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$) an. $N=4$ pro Gruppe; $p=0<0,05$).

In diesem Modell konnte eine signifikante Reduktion der transkutanen Lichtemission zwölf Stunden nach der Minipumpenimplantation in NFAT-Luc/DYRK1A/tTA-transgenen Mäuse im Vergleich zu den NFAT-Luc/tTA-transgenen Mäuse beobachtet werden. Dieses Ergebnis lässt den Rückschluss zu, dass die transgene DYRK1A-Überexpression eine akute NFAT-abhängige Transkription reduzieren kann. Jedoch sank die Lichtemission sieben Tage nach kontinuierlicher PE-Stimulation wieder auf ein niedrigeres Niveau als vor der Minipumpenimplantation ab und war bei beiden Genotypen nahezu identisch (relatives Luciferase-Signal: 12 h: NFAT-Luc/tTA ($n=4$):

1,35 ± 0,13; NFAT-Luc/DYRK1A/tTA (n=4): 0,85 ± 0,16; relatives Luciferase-Signal: 7 d: NFAT-Luc/tTA: 0,75 ± 0,05; NFAT-Luc/DYRK1A/tTA: 0,70 ± 0,11; p<0,05).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte *Dyrk1a* als die am stärksten exprimierte Isoform in murinen Kardiomyozyten identifiziert werden, während *Dyrk6* die Isoform mit der zweithöchsten mRNA-Expression darstellte. Der Unterschied in der Expressionsmenge war zwischen diesen beiden Isoformen signifikant höher als zwischen den weiteren Isoformen *Dyrk1b*, -2, -3 und -4. Überdies konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass DYRK1A durch eine adenoviral bzw. transgen gesteigerte Calcineurin-Aktivität vermehrt exprimiert wird. Die planimetrische Hypertrophieanalyse von Kardiomyozyten neonataler Ratten ergab, dass die Kardiomyozyten bei einer PE-Dosis von 5 μ M signifikant hypertrophierten. Diese PE-induzierte Hypertrophie konnte durch eine gesteigerte DYRK1A-Aktivität signifikant verringert werden. Wurden die Zellen lediglich mit DYRK1A adenoviral transduziert, führte dies zu einer geringen, aber signifikanten Hypertrophie der Kardiomyozyten. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die subzelluläre NFATc3-Lokalisation analysiert. Die Untersuchung der prozentualen NFAT-Kernlokalisation mit steigenden Calcineurin-Konzentrationen zeigte, dass bei der Transduktion der Kardiomyozyten mit der MOI 10 eine circa 50 %ige nukleäre NFAT-Lokalisation vorlag. Infolgedessen wurde untersucht, wie sich die NFAT-Lokalisation verhält, wenn DYRK1A pharmakologisch durch Harmin oder mittels Knockdown durch eine siRNA gehemmt wird. Hier zeigte sich, dass der nukleäre NFATc3-Anteil durch Harmin und Ad-*Dyrk1a*-siRNA nach Calcineurin-Stimulation signifikant auf über 65 % gesteigert werden konnte. Überdies konnte gezeigt werden, dass DYRK1A *in vitro* und *in vivo* die Phosphorylierung von MEK1/2 in Kardiomyozyten nicht zu beeinflussen scheint. Darüber hinaus konnte keine Veränderung in der MEK1/2-Gesamtmenge festgestellt werden.

DYRK1A/tTA-transgene Mäuse wurden hinsichtlich der herzspezifischen Überexpression und Lokalisation von DYRK1A analysiert. Es ist bekannt, dass in DYRK1A-überexprimierenden Mäusen embryonale Entwicklungsfehler vorliegen. Um diese zu umgehen, wurde im Vorfeld der vorliegenden Arbeit eine transgene Maus generiert, die herzspezifisch und erst nach abgeschlossener Entwicklung eine DYRK1A-Überexpression induziert. Ermöglicht wurde das durch ein Tetracyclin-reguliertes Expressionssystem (Tet-off), das in der Phase der Herzentwicklung eine gesteigerte DYRK1A-Expression durch Doxycyclin verhindert. Die Funktionalität des Tet-off-

Systems konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. In den ersten vier Lebenswochen verhinderte Doxycyclin, das den Mäusen über das Trinkwasser verabreicht wurde, eine gesteigerte DYRK1A-Expression. Vier Wochen nach Absetzen des Doxycyclins (im Alter von acht Wochen) trat eine deutliche DYRK1A-Überexpression auf. Mit Hilfe der *Real-time* RT-PCR und einer immunhistochemischen Färbung wurde die herzspezifische Überexpression und nukleäre Lokalisation von *Dyrk1a* in DYRK1A/tTA-transgenen Mauskardiomyozyten nachgewiesen. Zur weiteren Analyse bekamen die tTA- und DYRK1A/tTA-transgenen Mäuse eine minimal-invasive transaortale Konstriktion im Aortenbogen (*transaortic constriction*, TAC). Die Kontrollgruppe bildeten Mäuse, die zwar ebenfalls eine minimal-invasive Operation bekamen, jedoch keine Aortenkonstriktion (sham). Vier Wochen nach der Operation wurden die Mäuse mittels Echokardiographie hinsichtlich morphometrischer Daten, Histologie und hinsichtlich der RNA-Expression der Hypertrophiemarker *Bnp* und *beta- (Myh7) myosin heavy chain* untersucht. Die vierwöchige Aortenkonstriktion verursachte echokardiographisch bei beiden Genotypen (tTA vs. DYRK1A/tTA) eine deutliche Hypertrophie und die Verkürzungsfraction war signifikant reduziert. Die Antwort auf die TAC-Operation war bei beiden Genotypen sehr ähnlich. Die gesteigerte DYRK1A-Expression hatte keinen Effekt auf die TAC-induzierte Hypertrophie und Herzfunktion *in vivo*. Dies wurde durch vergleichbare Myozytendurchmesser in WGA-gefärbten Paraffinschnitten und dem Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht bestätigt. Überdies war die *Bnp*-Expression in TAC- vs. sham-operierten Tieren bei beiden Genotypen signifikant erhöht. Bei den TAC-operierten DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen war sie sogar signifikant höher als bei den TAC-operierten tTA-transgenen Mäusen. Das schließt einen funktionellen Vorteil einer gesteigerten DYRK1A-Expression in adulten Tieren nahezu aus. Bei der Analyse des Expressionsmusters von *Myh6* und *Myh7* stellte sich heraus, dass sich das Verhältnis von *Myh6/Myh7* bei den TAC-operierten Mäusen beider Genotypen, wie erwartet, signifikant in Richtung *Myh7* verschob. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen DYRK1A-exprimierenden und Kontroll-Mäusen festgestellt werden.

Da bei der TAC-induzierten Hypertrophie eine Vielzahl von Signalwegen aktiviert wird, wurden DYRK1A/tTA-doppelt-transgene und Calcineurin- (CnA-) einfach-transgene Mäuse verpaart, um eine spezifische Calcineurin-induzierte Hypertrophie zu erreichen. Die CnA/tTA- und DYRK1A/CnA/tTA-transgenen Mäuse wurden im Alter von acht und zwölf Wochen echokardiographisch untersucht. Wie erwartet, entwickelten Calcineurin-transgene Mäuse im Alter von acht Wochen eine massive kardiale Hypertrophie und spätestens im Alter von zwölf Wochen eine dilatative Kardiomyopathie. Nach acht Wochen wiesen die Calcineurin-transgenen Mäuse eine signifikante Hypertrophie des Septums auf, die durch eine gesteigerte DYRK1A-

Expression nicht verhindert werden konnte. Im Alter von zwölf Wochen hatten die Calcineurin-überexprimierenden Mäuse eine ausgeprägte Herzvergrößerung und eine reduzierte Verkürzungsfraction. Auch diese Parameter waren in den DYRK1A-überexprimierenden Mäusen nicht verändert. Die histologische Analyse im Alter von zwölf Wochen ergab in den Calcineurin/tTA-transgenen Mäusen eine signifikante Vergrößerung des Myozytendurchmessers. In dieser Analyse konnte jedoch eine geringe Reduktion des Myozytendurchmessers in den DYRK1A/CnA/tTA-dreifach-transgenen gegenüber CnA/tTA-zweifach-transgenen Mäusen beobachtet werden. Dennoch waren das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht und die *Bnp*-Expression in den Calcineurin-überexprimierenden Gruppen (CnA/tTA und DYRK1A/CnA/tTA) im Vergleich zu den tTA- und DYRK1A/tTA-Kontrollgruppen weiterhin signifikant und gleichartig erhöht.

Um die Diskrepanz zwischen den anti-hypertrophen Effekten einer gesteigerten DYRK1A-Expression *in vitro* und dem Fehlen eines anti-hypertrophen Effekts in den transgenen Tiermodellen weiter zu analysieren, wurde der Calcineurin/NFAT-Signalweg hinsichtlich der NFAT-Aktivität untersucht. Die Exon-4-Isoform (*Rcan1-4*) des Gens *Rcan1* ist ein guter Indikator für die transkriptionelle NFAT-Aktivität. Sowohl bei den Mäusen mit dem Genotyp tTA als auch bei den Mäusen mit dem Genotyp DYRK1A/tTA lag bei der TAC-Gruppe eine gleichartig ausgeprägte, signifikante Zunahme der *Rcan1-4* mRNA-Expression vor. Bei den tTA- gegenüber CnA/tTA-transgenen Mäusen war die *Rcan1-4*-Expression erwartungsgemäß signifikant erhöht, wohingegen sie bei den DYRK1A/CnA/tTA- gegenüber CnA/tTA-transgenen Mäusen erniedrigt war. Überdies wurde die transkriptionelle NFAT-Aktivität mittels der Phenylephrin-stimulierten NFAT-Luciferase-transgenen Maus untersucht. Diese Mäuse exprimieren in Kardiomyozyten unter der Kontrolle eines NFAT-sensitiven Promotors das Enzym Luciferase (NFAT-Luc). Sie wurden mit DYRK1A- und/oder tTA-transgenen Mäusen verpaart und mit einer kontinuierlichen Phenylephrin-Infusion, mittels einer mikro-osmotischen Pumpe, stimuliert. In diesem Modell konnte eine signifikante Reduktion der transkutanen Lichtemission zwölf Stunden nach der Minipumpenimplantation in NFAT-Luc/DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen im Vergleich zu NFAT-Luc/tTA-transgenen Mäusen beobachtet werden.

4.2 Einfluss von DYRK1A auf den aktivierten Calcineurin/NFAT-Signalweg *in vitro*

Der Calcineurin/NFAT-Signalweg ist ein gut untersuchter Transduktionsweg und bisherige Arbeiten legen nahe, dass er sowohl notwendig als auch hinreichend für eine kardiomyozytäre Hypertrophie ist (Molkentin *et al.* 1998). Molkentin *et al.* untersuchten transgene Mäuse, die herzspezifisch aktiviertes Calcineurin überexprimierten. Dabei entwickelten diese eine massive konzentrische kardiale Hypertrophie, die nach zwei bis drei Monaten in der Herzinsuffizienz endete (Molkentin *et al.* 1998). Bueno *et al.* generierten Calcineurin-*knockout* Mäuse und stellten fest, dass die transgenen Mäuse nach transaortaler Konstriktion und Katecholamininfusion nur eine geringe Herzhypertrophie aufwiesen (Bueno *et al.* 2002). Verschiedene Studien konnten eine Verhinderung der kardialen Hypertrophie durch Hemmung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs zeigen (De Windt *et al.* 2001; Frank *et al.* 2007; Rothermel *et al.* 2001). In unstimulierten Zellen liegt NFAT phosphoryliert im Zytoplasma vor. Steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach einer Stimulation an, wird NFAT durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert. Dies führt zu einer Translokation von NFAT in den Zellkern (Beals *et al.* 1997; Hogan *et al.* 2003; Molkentin *et al.* 2008). Die NFAT-Lokalisation innerhalb des Kardiomyozyten hängt folglich vom Phosphorylierungszustand ab. Die Abhängigkeit der NFAT-Lokalisation von dessen Phosphorylierungszustand deckt sich mit den Beobachtungen dieser Arbeit. Obwohl die NFAT-Phosphorylierung nicht direkt gemessen wurde, stieg durch Stimulation von NFATc3-GFP mit Ad-Calcineurin der nukleäre NFAT Anteil signifikant von etwa 10 % auf 50 % an. Wurde DYRK1A durch Harmin gehemmt bzw. durch Transduktion mit Ad-*Dyrk1a*-siRNA die Expression von DYRK1A reduziert, so stieg der nukleäre NFAT-Anteil signifikant auf über 65 % an (3.5). Dies bestätigt die Annahme, dass DYRK1A *in vitro* Einfluss auf den Hypertrophie-induzierenden Calcineurin/NFAT-Signalweg in Kardiomyozyten hat und dass die NFAT-Lokalisation durch Kinasen und Phosphatasen reziprok reguliert wird. Das belegen auch indirekt die Beobachtungen von Kuhn *et al.* die sowohl in Harmin-behandelten als auch in Ad-miR-DYRK1A transduzierten Kardiomyozyten eine beachtliche Hypertrophie feststellten. Die relative Zellgröße der Harmin-induzierten Hypertrophie war hierbei annähernd so groß wie nach Phenylephrinstimulation (Kuhn *et al.* 2009).

Im nachfolgenden Abschnitt soll der Frage nachgegangen werden, ob der Einfluss auf die NFAT-Lokalisation die Phenylephrin-induzierte kardiale Hypertrophie verhindern kann.

Das Herzmyokard exprimiert sowohl α_1 - als auch β_1 -Rezeptoren, die beide zu den G-Proteingekoppelten Rezeptoren zählen (Brodde und Michel 1999; Karliner *et al.* 1985). Phenylephrin (PE) stellt einen nicht-spezifischen Agonisten am α_1 -Rezeptor dar (Endoh *et al.* 1991). Diese Rezeptoren kommen auch im Gefäßsystem vor, verursachen hier eine Vasokonstriktion und somit eine Blutdruck steigernde Wirkung (Wakatsuki *et al.* 2004; Navarro-Sobrinio *et al.*, 2010). PE wirkt über den α_1 -adrenergen Rezeptor am Herzen positiv inotrop, wobei ein langfristiger Effekt einer kardialen PE-Stimulation die Entwicklung eines hypertrophen Phänotyps bewirkt (Meidell *et al.* 1986; Lee HR *et al.* 1988; Waspé *et al.* 1990). Die Stimulation des Rezeptors führt über die Aktivierung der membranständigen Phospholipase C aus dem Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zur Bildung der zwei Second Messenger Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). DAG aktiviert unter anderem die Proteinkinase C (PKC), die Enzyme im Zytosol und die Genexpression beeinflusst. Der hydrophile Botenstoff IP₃ diffundiert ins Zytosol, setzt Ca²⁺-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum frei und erhöht somit die Ca²⁺-Konzentration im Zytosol. Auf diese Weise wird die Kraftentwicklung der Myofilamente erhöht und die Kontraktionskraft des Herzens gesteigert. Eine intrazelluläre Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration führt in Herzmuskelzellen auch zur Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs. Der Transkriptionsfaktor NFAT transloziert in den Zellkern, um dort die vermehrte Expression prohypertropher Gene zu bewirken. Eine kontinuierliche PE-Stimulation wirkt folglich sowohl direkt an der Herzmuskelzelle, als auch indirekt über eine Vasokonstriktion prohypertroph. Im Versuch 3.4 wurde der direkte Effekt von PE auf Kardiomyozyten neonataler Ratten genutzt. Aus der Arbeit von Prasad *et al.* war bekannt, dass eine PE-Dosis von 20 μ M eine signifikante Hypertrophie in Kardiomyozyten auslöst (Prasad *et al.* 2007). Allerdings war es fragwürdig, ob eine derartig hohe PE-Dosis durch DYRK1A antagonisierbar ist. Daher wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit unterschiedlichen PE-Konzentrationen angefertigt. Das Ziel war eine möglichst geringe PE-Dosis zu finden, die eine signifikante Hypertrophie der Kardiomyozyten bewirkt. Die Dosis-Wirkungs-Kurve ergab, dass bereits eine PE-Dosis von 5 μ M die Kardiomyozyten veranlasste signifikant zu hypertrophieren (3.4.2). Im folgenden Versuch konnte die PE-induzierte Hypertrophie mittels adenoviral transduziertem DYRK1A verhindert werden (3.4.2). Dieses Resultat deckt sich mit den Beobachtungen von Kuhn *et al.* (Kuhn *et al.* 2009) und deutet auf ein sehr vielversprechendes anti-hypertrophes Potenzial einer verstärkten DYRK1A-Aktivität hin.

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass eine gesteigerte DYRK1A-Expression *in vitro* Einfluss auf den Calcineurin/NFAT-Signalweg nimmt, die Lokalisation von NFAT innerhalb der Kardiomyozyten reguliert (3.5) und die PE-induzierte Hypertrophie in kultivierten Kardiomyozyten verhindern kann (3.4).

4.3 Einfluss von DYRK1A auf die MAPK-Signalkaskade *in vitro* und *in vivo*

In dem Versuch 3.4.3 konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten, die lediglich mit Ad-DYRK1A transduziert wurden, eine geringe, aber signifikante Hypertrophie aufwiesen. Dasselbe Resultat war auch bei den DYRK1A/tTA-transgenen Mäusen zu beobachten. Diese Tiere zeigten in der histologischen Analyse, im Vergleich zu den tTA-transgenen Mäusen, eine geringe, aber signifikante Zunahme des Myozytendurchmessers (3.7.2). Durch verschiedene Studien ist bekannt, dass in der kardialen Hypertrophieentwicklung der Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg eine bedeutende Rolle spielt. Zum Beispiel entwickeln transgene Mäuse, die herzspezifisch konstitutiv aktives Mek1 überexprimieren, eine signifikante Hypertrophie (Bueno *et al.* 2000). Der MAPK-Transduktionsweg besteht aus mehreren Signalwegen, deren Kinasen kaskadenartig verschaltet sind. Am Ende des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs steht unter anderem die Phosphorylierung und Aktivierung von Erk (*extracellular-regulated kinases*), deren Zielproteine einen modulierenden Effekt auf die Genexpression haben (Abb. 1.2). Die Aktivierung von Ras und Raf führt zu einer Phosphorylierung von Mek, welches wiederum Erk aktiviert (Therrien *et al.* 1996). Die Aktivierung von Erk setzt Vorgänge um, die das Wachstum, die Differenzierung und Apoptose von Zellen beeinflussen (Reddy *et al.* 2003). Kelly und Rahmani konnten zeigen, dass DYRK1A den Phosphorylierungsstatus von Mek1/2 in PC12-Zellen steigert (Kelly und Rahmani 2005). Allerdings scheint dieser Einfluss auf die Proteine Ras, B-Raf und Mek1 unabhängig von der DYRK1A-Kinaseaktivität zu sein. Sie stellten fest, dass DYRK1A eine Interaktion, bevorzugt mit GTP-gebundenem Ras, eingeht. Dabei bildet sich ein Ras/Raf/Mek-Multiproteinkomplex und die Aktivität des Proteins Erk wird dadurch gesteigert (Kelly und Rahmani 2005). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass in Kardiomyozyten kein Effekt einer gesteigerten DYRK1A-Expression auf den MAPK-Signalweg erkennbar ist. Durch die Überexpression von DYRK1A in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten und in DYRK1A-transgenen Mäusen konnte keine signifikante Steigerung der Mek-Phosphorylierung im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Auch die Gesamtmenge von Mek änderte sich nicht relevant (3.8.1). Somit scheint der Einfluss von DYRK1A auf den MAPK-Signalweg eine hohe Zellspezifität aufzuweisen. Dies zeigt sich auch in Versuchen von Kelly und Rahmani, die eine Aktivierung des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs durch DYRK1A in PC12-Zellen, aber nicht in HeLa- oder COS-7-Zellen fanden (Kelly und Rahmani 2005). Es ist möglich, dass DYRK1A als pleiotrope Kinase (Aranda *et al.* 2010) weitere Substrate aufweist, die bisher nicht bekannt sind, jedoch von Bedeutung in der kardialen Hypertrophieentstehung sind. Die echokardiographischen Untersuchungen, das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis sowie die Analyse der Hypertrophiemarker *Bnp* und *Myh7* wiesen in den DYRK1A/tTA- vs tTA-transgenen Tiere keine signifikanten hypertrophie-relevanten Veränderungen auf (3.7). Daher

scheint die biologische Signifikanz einer DYRK1A-bedingten Hypertrophie in Kardiomyozyten eher fraglich zu sein.

4.4 Analyse der DYRK1A-Expression durch eine gesteigerte Calcineurin-Aktivität

Die Regulation der Aktivität einer Kinase in der Zelle stellt einen physiologischen Prozess dar, dessen Aufklärung unter anderem neue Ansatzpunkte für künftige pharmakologische Interventionen eröffnen kann. Häufige Regulationsprozesse beinhalten das Abdämpfen einer überschüssigen Stimulation (negativer Feedback) oder eine Verstärkung eines zu geringen Stimulus (positiver Feedback). Neue Erkenntnisse zur DYRK1A-Regulation könnten ein wichtiger Baustein in der Untersuchung des Einflusses von DYRK1A auf den Calcineurin/NFAT-Signalweg sein. In der Literatur sind Regulationsmechanismen der DYRK1A-Expression oder -Funktion in unterschiedlichen Geweben beschrieben worden. So scheint die DYRK1A-Expression und -Proteinmenge in der Leber zirkadianen Veränderungen zu unterliegen (Kurabayashi *et al.* 2010). Der Transkriptionsfaktor E2F1 steigert die Promotor-Aktivität von DYRK1A und damit die *Dyrk1a*-Expression auf mRNA-Ebene (Maenz *et al.* 2008). Einige Studien zeigten eine DYRK1A-Regulation durch direkt interagierende Proteine. So steigert beispielsweise die Bindung von 14-3-3 β an ein zu autophosphorylierenden Serin-Rest in der C-terminalen Domäne von DYRK1A die katalytische Aktivität um den Faktor zwei (Alvarez *et al.* 2007). Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass in Knochenmarks-Makrophagen aktiviertes NFAT die DYRK1A-Expression steigert. Dieser Kontrollmechanismus entspricht einer negativen Feedback-Regulation (Lee Y *et al.* 2009). Kuhn *et al.* stimulierten neonatale Rattenkardiomyozyten mit Phenylephrin oder Endothelin und stellten bei beiden Substanzen ebenfalls eine signifikant gesteigerte DYRK1A-Expression fest (Kuhn *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte in Kardiomyozyten die Hypothese einer negativen Feedback-Regulation bestätigt werden. Eine gesteigerte NFAT-Aktivität, hervorgerufen durch adenoviral- bzw. transgen-vermittelte Calcineurin-Überexpression, führte zu einer signifikant gesteigerten DYRK1A-Expression (3.3). Es wird angenommen, dass das Motiv T/AGGAAA als NFAT-Bindungssequenz an einem Promotor dient (Yang J *et al.* 2000). Mit Hilfe des *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) könnte in weiteren Untersuchungen die NFAT-Interaktion mit dem Promotor von DYRK1A direkt überprüft werden.

4.5 Existieren neben NFAT weitere Substrate von Calcineurin, die eine Hypertrophie induzieren?

Das am besten untersuchte Substrat der Phosphatase Calcineurin ist zweifelsohne der Transkriptionsfaktor NFAT. Allerdings existieren noch weitere Zielproteine, die durch Calcineurin dephosphoryliert werden. Es ist denkbar, dass ein unzureichender Effekt von DYRK1A auf die Hypertrophie durch Calcineurin-Substrate vermittelt wird, die NFAT-unabhängig agieren. So dephosphoryliert Calcineurin beispielsweise *Dual Leucine Zipper-bearing Kinase* (DLK), die in synaptischen Endigungen eine Rolle spielt (Mata *et al.* 1996). Außerdem erfolgt eine Calcineurin-abhängige Dephosphorylierung des Proteins *calcium-regulated heat-stable protein with a molecular mass of 24 kDA* (CRHSP-24). Dieses scheint bei der Amylase-Sekretion des Pankreas eine Rolle zu spielen (Grobowski *et al.* 1998). Über eine Funktion dieser Proteine in Kardiomyozyten ist bisher nichts bekannt. In COS-7-Zellen konnte das Protein *Kinase Suppressor of Ras* (KSR) als weiteres Substrat identifiziert werden (Dougherty *et al.* 2009). Das Protein KSR ist als Chaperon ein positiver Regulator des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs, dessen Bedeutung für das Herz vielfach belegt ist (Therrien *et al.* 1996; Morrison DK 2001; Bueno *et al.* 2000). Wie beschrieben führt die Aktivierung dieses Transduktionswegs zu einer Hypertrophie (1.3). In Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration dephosphoryliert Calcineurin das Protein KSR. Da bei der Herzinsuffizienz intrazellulär eine vermehrte Ca^{2+} -Konzentration vorliegt, wird wahrscheinlich sowohl NFAT als auch KSR vermehrt dephosphoryliert. Inwieweit sich dies auf die MAPK-Aktivität in Kardiomyozyten auswirken könnte, ist aber noch unzureichend verstanden und könnte Gegenstand künftiger Untersuchungen sein. Die Annahme über einen möglichen Einfluss wird dadurch bestätigt, dass in der vorliegenden Arbeit bei den Calcineurin/tTA- vs. tTA-transgenen Tieren eine deutlich vermehrte Mek-Phosphorylierung und -Gesamtmenge vorlagen. Beide Parameter änderten sich bei den dreifach-transgenen DYRK1A/CnA/tTA-Mäusen jedoch nicht (3.8.1, Abb. 3.20 (C)). Deshalb besteht die Möglichkeit, dass aufgrund der verstärkten Aktivität des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs in den Calcineurin-transgenen Mäusen eine Hypertrophie resultierte, die durch DYRK1A-Überexpression nicht verhindert werden konnte.

4.6 Einfluss von DYRK1A auf den aktivierten Calcineurin/NFAT-Signalweg *in vivo*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine DYRK1A-Überexpression die NFAT-abhängige Hypertrophie (3.4) und nukleäre NFAT-Lokalisation (3.5) in kultivierten Kardiomyozyten signifikant inhibieren kann. Daher sollte im weiteren Verlauf die Funktion von DYRK1A auf die myokardiale Hypertrophie *in vivo* in zwei verschiedenen Mausmodellen evaluiert werden. Eine gesteigerte DYRK1A-Expression während der Embryonalentwicklung ist mit Herzklappenfehlern und Gefäßschäden assoziiert (Arron *et al.* 2006; Ahn *et al.* 2006). Die beiden Veränderungen des kardiovaskulären Systems können zu einer Herzhypertrophie mit folgender Herzinsuffizienz führen. Daher wurde in dieser Arbeit ein induzierbares transgenes Mausmodell verwendet, das in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe generiert wurde. Das transgene Mausmodell mit einer Tetracyclin-kontrollierten DYRK1A-Expression schloss die Möglichkeit einer embryonalen Fehlentwicklung des Herz-Kreislaufsystems weitgehend aus. Die induzierbare Überexpression von DYRK1A wurde durch das Tet-off-System von Sanbe *et al.* erreicht und wird unter 2.2.9.1 detailliert beschrieben (Sanbe *et al.* 2003). In dieser Arbeit wurde sowohl die induzierbare als auch die herzspezifische Überexpression von DYRK1A in den transgenen Mäusen nachgewiesen (3.6.1, 3.6.2 und 3.6.3). Die myokardiale Hypertrophie wurde durch zwei verschiedene Mausmodelle induziert. Zum einen wurden transgene Mäuse einer Ligatur-Operation der Aorta descendens unterzogen (TAC). Zum anderen wurden DYRK1A/tTA-transgene Mäuse mit konstitutiv Calcineurin-überexprimierenden Mäusen verpaart. Es ist bekannt, dass Calcineurin-transgene Mäuse eine massive Hypertrophie mit einer zwei- bis dreifachen Steigerung des Herzgewicht/Körpergewicht Verhältnisses zeigen (Molkentin *et al.* 1998). Obwohl in dieser Arbeit anti-hypertrophe Effekte einer gesteigerten DYRK1A-Expression in isolierten Kardiomyozyten festgestellt wurden, konnte eine transgene DYRK1A-Überexpression bei beiden Mausmodellen die induzierte Hypertrophie nicht bedeutend verhindern (3.6 und 3.7).

Die Mausmodelle offenbarten die vermehrte Aktivierung von maladaptiven Genen, die unempfindlich auf eine gesteigerte DYRK1A-Expression reagierten. Hierzu zählen *Bnp* und die Expressionsverschiebung der MHC-Isoformen *Myh6* zu *Myh7* (3.6.4.3 und 3.7.3). Das *B-type natriuretic peptide* (BNP) ist ein kardiales Hormon, das vor allem im Myokard des linken Ventrikels synthetisiert wird. Einige Studien *in vitro* und *in vivo* haben gezeigt, dass BNP in der myokardialen Hypertrophie vermehrt exprimiert wird (Jacobshagen *et al.* 2008; Fiedler *et al.* 2002; Alter *et al.* 2007). Es stellt den wichtigsten klinischen laborchemischen Marker einer Herzinsuffizienz dar. Eine myokardiale Dehnung bei Volumen- und Druckbelastung wirkt als Stimulus für die

Freisetzung von BNP ins Blut (de Lemos *et al.* 2003). Die Höhe des BNP-Spiegels im Blut korreliert dabei mit dem Schweregrad der systolischen und diastolischen Herzinsuffizienz und ist ein prognostischer Marker eines Patienten mit Dyspnoe (Christ *et al.* 2006). Die Promotorregion von BNP besitzt drei mögliche NFAT-Bindungssequenzen (Molkentin *et al.* 1998). Umso erstaunlicher war, dass in den DYRK1A-transgenen Mäusen die *Bnp*-Expression nicht reduziert war. Dies deutet einerseits auf eine möglicherweise unzureichende Hemmung von NFAT durch DYRK1A *in vivo* hin und zeigt sehr sicher eine unzureichende Reduktion der Herzbelastung in DYRK1A-überexprimierenden Mäusen an. Dies bestätigt indirekt auch die Expressionsvermehrung von *Rcan1-4*. Das Protein RCAN1 (früher MCIP1 oder DSCR1) inhibiert die Calcineurin-Aktivität durch eine direkte Interaktion mit der katalytischen Untereinheit A. Das Exon 4 des Gens (*Rcan1-4*) wird aufgrund von 15 NFAT-Bindungsstellen in seiner Promotorregion NFAT-abhängig exprimiert, was einem negativen Feedback-Mechanismus entspricht (Yang J *et al.* 2000). Demzufolge ist *Rcan1-4* ein guter Indikator für die transkriptionelle NFAT-Aktivität. In der Analyse der TAC-operierten Mäuse lässt die dauerhafte Erhöhung der *Rcan1-4*-Expression auf eine insuffiziente Hemmung der NFAT-Aktivität durch DYRK1A schließen. Die aortale Konstriktion aktiviert NFAT, das in den Zellkern transloziert und dort unter anderem den Promotor des *Rcan1-4* Gens stimuliert. Auch hier konnte eine transgene DYRK1A-Expression die NFAT-Aktivität nicht inhibieren (3.9.1).

Kardiales Myosin wandelt bei jeder Kontraktion die chemische Energie aus der ATP-Hydrolyse in mechanische Energie um. Früher ging man davon aus, dass der humane Herzventrikel zu 100 % die langsamere Isoform β -MHC (*Myh7*) exprimiert, was einen Isoformwechsel im insuffizienten Herzen ausschloss (Gorza *et al.* 1984). Neuere Arbeiten zeigten jedoch, dass im gesunden Herzen die α -MHC-Isoform (*Myh6*) circa 10 % der Gesamtmenge des ventrikulären Myosins ausmacht (Miyata *et al.* 2000). In der Herzinsuffizienz verschwindet dieser Anteil fast vollständig, so dass der β -MHC-Anteil 100 % annimmt (Lowes *et al.* 1997; Nakao *et al.* 1997). Lange Zeit war nicht geklärt, ob die geringen Veränderungen der MHC-Isoformen ausreichen, um eine kardiale Dysfunktion zu verursachen. Eine Vielzahl von Studien belegte, dass die Leistung des Herzmuskels sensitiv auf kleine Veränderungen des α -MHC Anteils reagiert. Herron und McDonald zeigten, dass ein Anstieg der α -MHC-Isoform auf 12 % bereits ausreicht, um die Ausgangsleistung der Kardiomyozyten um 50 % zu steigern (Herron und McDonald 2002). β -MHC ist in der kardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz verstärkt exprimiert. Daher wird es (wie BNP) in der Herz-Kreislaufforschung als Surrogatparameter der Expression maladaptiver Gene angesehen. Entgegen einer zu erwartenden Tendenz war die Expression von *Myh7* trotz verstärkter DYRK1A-Expression nicht signifikant reduziert. Dies trifft sowohl auf das TAC- als auch auf das Calcineurin-Modell der Hypertrophie zu (3.6.4.3 und 3.7.3).

Die transgene DYRK1A-Überexpression in beiden hypertrophieinduzierenden Mausmodellen konnte keinen protektiven Effekt hinsichtlich der *Bnp*-, der *Myh7*- und der *Rcan1-4*-Expression bewirken. Dies spricht dafür, dass auch auf Ebene der Genexpressionsänderung kein günstiger Einfluss von der DYRK1A-Überexpression in Kardiomyozyten ausgeht.

Schließlich zeigte die Analyse der NFAT-Aktivität in der NFAT-abhängigen Luciferase exprimierenden transgenen Maus, dass die transkriptionelle NFAT-Aktivität nicht aufrecht erhalten werden kann. Dagegen wies der Versuch nach, dass die transgene DYRK1A-Überexpression kurzfristig die NFAT-abhängige Transkription *in vivo* reduzieren kann. Die Lichtemission sank jedoch sieben Tage nach kontinuierlicher PE-Stimulation wieder auf ein niedrigeres Niveau als vor der Minipumpenimplantation ab. Das Niveau war bei beiden Genotypen (tTA vs. DYRK1A/tTA) nahezu identisch (3.9.3). Daher könnten die Aktivierung von alternativen pro-hypertrophen Signalwegen und die Herunterregulation der NFAT-Aktivität den anti-hypertrophen Effekt von DYRK1A in den Mausmodellen weiter limitieren. Die Daten dieser Arbeit lassen daher vermuten, dass bei adulten Kardiomyozyten sowohl für eine gesteigerte DYRK1A-Expression als auch für vorgeschaltete Stimuli, wie die PE-induzierte NFAT-Aktivität, eine ausgeprägte Kompensationskapazität besteht. Das deckt sich mit den Beobachtungen von Gwack *et al.* die feststellten, dass bestimmte Neuronengebiete im Gehirn beim Down-Syndrom eine starke Kompensationskapazität entwickeln und nur bestimmte Neuronenpopulationen unter gesteigerter DYRK1A-Expression eine dauerhafte Dysregulation der NFAT-Aktivität aufweisen (Gwack *et al.* 2006).

4.7 Abschließende Bemerkungen

In einigen Forschungsarbeiten konnte die Bedeutung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs in der Entstehung einer pathologischen Herzhypertrophie aufgezeigt werden. Aber auch in anderen Organen spielt dieser Transduktionsweg eine große Rolle und wird intensiv erforscht. Daher erschließt sich um diesen Signalweg ein immer größer werdendes Netzwerk von Interaktionspartnern mit hemmenden oder stimulierenden Einflüssen. Die Kinase DYRK1A konnte in HeLa- und Jurkat-T-Zellen als NFAT-Kinase identifiziert werden. In diesen Zellen kann DYRK1A die Translokation von NFAT in den Zellkern verhindern und hat dadurch einen hemmenden Einfluss auf den Transkriptionsfaktor NFAT. Unter kardialen Aspekten konnte *in vitro* ein protektiver Effekt einer gesteigerten DYRK1A-Expression auf den Calcineurin/NFAT-Signalweg festgestellt werden, nicht jedoch *in vivo* bei der detaillierten Analyse transgener Mäuse. Die

Ergebnisse dieser Arbeit erlauben jedoch den Schluss, dass DYRK1A eine von zahlreichen Komponenten in der Calcineurin/NFAT-Regulation darstellt. Dabei scheint die Rolle von DYRK1A auf eine akute Hemmung der NFAT-Aktivität begrenzt. Als Limitation muss angemerkt werden, dass zahlreiche Erkenntnisse dieser Arbeit auf künstlicher Überexpression von DYRK1A beruhen. Diese Ergebnisse sind daher erst vollständig interpretierbar, wenn Modelle der reduzierten DYRK1A-Expression vorliegen. Auch die Übertragung der Ergebnisse von der Maus zum Menschen sollte durch künftige Untersuchungen an humanem Probenmaterial unterstützt werden.

5 Zusammenfassung

Die myokardiale Hypertrophie stellt zunächst einen Kompensationsmechanismus dar, der die gesteigerte Druckbelastung der Ventrikelwand normalisiert. Eine anhaltende Herzhypertrophie korreliert jedoch mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz und dem plötzlichen Herztod. Die Calcium/Calmodulin-aktivierte Phosphatase Calcineurin ist mit dem nachgeschalteten Transkriptionsfaktor NFAT in der Entstehung der Herzhypertrophie ein ausführlich untersuchter Signalweg. Aktiviertes Calcineurin dephosphoryliert NFAT, das in den Zellkern transloziert und dort ein pro-hypertrophes Genprogramm initiiert. Zu den Proteinen, die dadurch vermehrt exprimiert werden, gehören unter anderem β -MHC, ANF und BNP. Kürzlich konnten zwei Arbeitsgruppen die Kinase DYRK1A, eine von sechs Mitgliedern der Serin-Threonin-Kinase-Familie *Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinases* (DYRKs), als NFAT-Kinase in nicht-kardiomyozytären Zellen identifizieren (Arron *et al.* 2006; Gwack *et al.* 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von DYRK1A in Kardiomyozyten *in vitro* und *in vivo* untersucht. *Dyrk1a* konnte in isolierten Kardiomyozyten adulter Mäuse als die am stärksten exprimierte Isoform identifiziert werden. Überdies lassen die Daten dieser Arbeit auf eine negative Feedback-Regulation der DYRK1A-Expression schließen. Durch eine Calcineurin-vermittelte NFAT-Stimulierung konnte eine signifikant vermehrte DYRK1A-Expression festgestellt werden. *In vitro* konnte DYRK1A eine Phenylephrin-induzierte Hypertrophie in kultivierten Kardiomyozyten antagonisieren. In diesem Versuch fiel weiterhin auf, dass ein geringer pro-hypertropher Effekt in den Ad-DYRK1A-transduzierten Zellen auftrat. Diese Tendenz war auch in der immunhistologischen Analyse *in vivo* bei den DYRK1A/tTA- vs. tTA-transgenen Mäusen nachweisbar. Der daraufhin untersuchte Einfluss von DYRK1A auf den Hypertrophie-induzierenden MAPK-Signalweg konnte *in vitro* und *in vivo* nicht festgestellt werden. Nach adenoviraler Calcineurin-Transduktion von Kardiomyozyten konnte eine circa 50 %ige Kernlokalisierung von NFAT festgestellt werden, welcher im unstimulierten Zustand nahezu ausschließlich zytoplasmatisch vorliegt. Diese konnte durch eine endogene Hemmung von DYRK1A signifikant gesteigert werden. Somit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass DYRK1A in Kardiomyozyten den Hypertrophie-induzierenden Calcineurin/NFAT-Signalweg inhibiert und die kardiomyozytäre Hypertrophie hemmt.

Für die Untersuchung eines gesteigerten DYRK1A-Einflusses auf die kardiale Hypertrophie *in vivo* wurde die DYRK1A/tTA-transgene Mauslinie detailliert analysiert. Eine ubiquitäre DYRK1A-Expression in der Embryonalentwicklung führt zu Herzfehlern und der Herzinsuffizienz. Daher wurde im Vorfeld dieser Arbeit eine Maus generiert, die herzspezifisch und nur in Abwesenheit von Doxycyclin DYRK1A überexprimiert. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl die induzierbare als auch herzspezifische DYRK1A-Überexpression nachgewiesen werden. In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss einer gesteigerten DYRK1A-Expression auf die myokardiale Hypertrophie analysiert. Mit Hilfe zweier Interventionen wurde die Hypertrophie erreicht. Zum einen wurde ein Mausmodell, das einer Ligatur-Operation der Aorta descendens unterzogen wurde, zum anderen eine Calcineurin-überexprimierende Mauslinie gewählt. Die transgenen Mäuse wurden mittels Echokardiographie, histologischer Färbung, des Herzgewicht/Körpergewicht Verhältnisses und des mRNA-Expressionsniveaus von *Bnp*, *Myh7* und *Rcan1-4* untersucht. In beiden Modellen konnte kein protektiver Effekt einer DYRK1A-Überexpression festgestellt werden. Zur Analyse der transkriptionellen NFAT-Aktivität *in vivo* wurde das NFAT-Luciferase-Mausmodell verwendet. Diese Mäuse exprimieren in Kardiomyozyten unter der Kontrolle eines NFAT-sensitiven Promotors das Enzym Luciferase über (NFAT-Luc). Hier konnte auf einen akuten, zeitlich begrenzten Einfluss von DYRK1A auf die transkriptionelle NFAT-Aktivität geschlossen werden.

Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass eine herzspezifische DYRK1A-Überexpression *in vivo* kompensiert werden kann, was einen anti-hypertrophen Effekt limitieren könnte.

6 Literaturverzeichnis

Ahn KJ, Jeong HK, Choi HS, Ryoo SR, Kim YJ, Goo JS, Choi SY, Han JS, Ha I, Song WJ (2006): DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol Dis* 22(3): 463-472

Altafaj X, Dierssen M, Baamonde C, Marti E, Visa J, Guimera J, Oset M, Gonzalez RM, Florez J, Fillat C (2001): Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing *Dyrk1A* (*minibrain*), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* 10: 1915-1923

Alter P, Rupp H, Rominger MB, Vollrath A, Czerny F, Figiel JH, Adams P, Stoll F, Klose KJ, Maisch B (2007): B-type natriuretic peptide and wall stress in dilated human heart. *Mol Cell Biochem* 314, 179-191

Alvarez M, Estivill X, de la Luna S (2003): DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly. *J Cell Sci* 116: 3099-3107

Alvarez M, Altafaj X, Aranda S, de la Luna S (2007): DYRK1A autophosphorylation on serine residue 520 modulates its kinase activity via 14-3-3 binding. *Mol Biol Cell* 18 (4): 1167-1178

Aranda S, Laguna A, de la Luna S (2010): DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J* 25 (2): 449-462

Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, (2006): NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441 (7093): 595-600

Bähler J, Pringle JR (1998): Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev* 12, 1356-1370

Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (2007): The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408(3): 297-315

Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA (2007): Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1883-H1891

Bauerfeind R, Takei K, De Camilli P (1997): Amphiphysin I is associated with coated endocytic intermediates and undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J Biol Chem* 272(49): 30984-30992

Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR (1997): Nuclear Export of NF-ATc Enhanced by Glycogen Synthase Kinase-3. *Science* 275: 1930-1933

Becker W, Joost HG (1999): Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62, 1-17

Becker W, Weber Y, Wetzel K, Eirmbter K, Tejedor FJ, Joost HG (1998): Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol Chem* 273 (40):25893-25902

Boulikas T (1993): Nuclear localization signals (NLS). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*: 3(3): 193-227

Braunwald E, Bristow MR (2000): Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation* 102 (20 Suppl 4): IV 14-23

Brodde OE, Michel MC (1999): Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51 (4): 651-690

Bueno OF, De Windt LJ, Tymith KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 19: 6341-6350.

Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN, Molkentin JD (2002): Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta⁻deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(7): 4586-4591

Bustamante JO, Ruknudin A, Sachs F (1991): Stretch-activated channels in heart cells: relevance to cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 Suppl 2: 110-113

Campbell LE, Proud CG (2002): Differing substrate specificities of members of the DYRK family of arginine-directed protein kinases. *FEBS Lett* 510: 31-36

Chen-Hwang MC, Chen HR, Elzinga M, Hwang YW (2002): Dynamin is a minibrain kinase/dual specificity Yak1-related kinase 1A substrate. *J Biol Chem* 277: 17597-17604

Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976): Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127: 1550-1557

Christ M, Laule-Kilian K, Hochholzer W, Klima T, Breidthardt T, Perruchoud AP, Mueller C (2006): Gender-specific risk stratification with B-type natriuretic peptide levels in patients with acute dyspnea: insights from the B-type natriuretic peptide for acute shortness of breath evaluation study. *J Am Coll Cardiol* 48: 1808–1812

Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T (1984): Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Eng J Med* 311: 819-823

Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE (1997): The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J* 18 (2): 208-225

de Graaf K, Hekerman P, Spelten O, Herrmann A, Packman LC, Bussow K, Muller- Newen G, Becker W (2004): Characterization of cyclin L2, a novel cyclin with an arginine/serine-rich domain: phosphorylation by DYRK1A and colocalization with splicing factors. *J Biol Chem* 279: 4612-4624

de Graaf K, Czajkowska H, Rottmann S, Packman LC, Lilischkis R, Luscher B, Becker W (2006): The protein kinase DYRK1A phosphorylates the splicing factor SF3b1/SAP155 at Thr434, a novel in vivo phosphorylation site. *BMC Biochem* 7: 1471-1484

de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH (2003): B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 362: 316-322

Deschamps AM, Spinale FG (2006): Pathways of matrix metalloproteinase induction in the heart: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res* 69: 666-676

de Windt LJ, Lim HW, Bueno OF, Liang Q, Delling U, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, del Monte F, Hajjar RJ (2001): Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(6): 3322-3327

Dickhuth HH, Rocker K, Mayer F, König D, Korsten-Reck U (2004): Endurance training and cardiac adaptation (athlete's heart). *Herz* 29: 373-380

Dorn GW, Force T (2005): Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 115: 527-537

Dougherty MK, Ritt DA, Zhou M, Specht SI, Monson DM, Veenstra TD, Morrison DK (2009): KSR2 is a calcineurin substrate that promotes ERK cascade activation in response to calcium signals. *Mol Cell* 34(6): 652-662

Endoh M, Hiramoto T, Ishihata A, Takanashi M, Inui J (1991): Myocardial alpha 1-adrenoceptors mediate positive inotropic effect and changes in phosphatidylinositol metabolism. Species differences in receptor distribution and the intracellular coupling process in mammalian ventricular myocardium. *Circ Res* 68(5): 1179-1190

Fentzke RC, Korcarz CE, Lang RM, Lin H, Leiden JM (1998): Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. *J Clin Invest* 101(11): 2415-2426

Fentzke RC, Korcarz CE, Shroff SG, Lin H, Leiden JM, Lang RM (2001): The left ventricular stress-velocity relation in transgenic mice expressing a dominant negative CREB transgene in the heart. *J Am Soc Echocardiogr* 14(3): 209-218

Fiedler B, Lohmann SM, Smolenski A, Linnemuller S, Pieske B, Schroder F, Molkentin JD, Drexler H, Wollert KC (2002): Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11363-11368

Fotaki V, Dierssen M, Alcantara S, Martinez S, Marti E, Casas C, Visa J, Soriano E, Estivill X, Arbones ML (2002): *Dyrk1A* Haploinsufficiency Affects Viability and Causes Developmental Delay and Abnormal Brain Morphology in Mice. *Mol Cell Biol* 22: 6636-6647

Fotaki V, Martínez De Lagrán M, Estivill X, Arbonés M, Dierssen M (2004): Haploinsufficiency of *Dyrk1A* in mice leads to specific alterations in the development and regulation of motor activity. *Behav Neurosci* 118(4): 815-821

Frank D, Kuhn C, van Eickels M, Gehring D, Hanselmann C, Lippl S, Will R, Katus HA, Frey N (2007): Calsarcin-1 protects against angiotensin-II induced cardiac hypertrophy. *Circulation* 116 (22): 2587-2596

Frey N, McKinsey TA, Olson EN (2000): Decoding calcium signals in cardiac growth an function. *Nat Med* 6 (11): 1221-1227

Garrett S, Menold MM, Broach JR (1991): The *Saccharomyces cerevisiae* YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. *Mol Cell Biol* 11 (8): 4045-4052

Gorza L, Mercadier JJ, Schwartz K, Thornell LE, Sartore S, Schiaffino S (1984): Myosin types in the human heart. An immunofluorescence study of normal and hypertrophied atrial and ventricular myocardium. *Circ Res* 54 (6): 694-702

Gossen M, Bujard H (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (12): 5547-51

Groblewski GE, Yoshida M, Bragado MJ, Ernst SA, Leykam J, Williams JA (1998): Purification and characterization of a novel physiological substrate for calcineurin in mammalian cells. *J Biol Chem* 273 (35): 22738-22744

Guimera J, Casas C, Pucharcos C, Solans A, Domenech A, Planas AM, Ashley J, Lovett M, Estivill X, Pritchard MA (1996): A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum Mol Genet* 5: 1305-1310

Guimera J, Casas C, Estivill X, Pritchard M (1999): Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* 57: 407-418

Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG (2006): A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441 (7093): 646-650

Hämmerle B, Vera-Samper E, Speicher S, Arencibia R, Martinez S, Tejedor FJ (2002): Mnb/Dyrk1A Is Transiently Expressed and Asymmetrically Segregated in Neural Progenitor Cells at the Transition to Neurogenic Divisions. *Dev Biol* 246: 259-273

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988): The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52

Heineke J, Molkentin JD (2006): Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 589-600

Heisenberg M, Böhl K (1979): Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means. *Z Naturforsch* 34c: 143-147

Herron TJ, McDonald KS (2002): Small amounts of alpha-myosin heavy chain isoform expression significantly increase power output of rat cardiac myocyte fragments. *Circ Res* 90(11): 1150-1152

Hilfiker-Kleiner D, Limbourg A, Drexler H (2005): STAT3-mediated activation of myocardial capillary growth. *Trends Cardiovasc Med* 15 (4): 152-157

Himpel S, Tegge W, Frank R, Leder S, Joost HG, Becker W (2000): Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *J Biol Chem* 275, 2431-2438

Himpel S, Panzer P, Eirnbter K, Czajkowska H, Sayed M, Packman LC, Blundell T, Kentrup H, Grotzinger J, Joost HG (2001): Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem J* 359, 497 – 505

Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003): A Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17: 2205-2232

Hongo K, White E, Orchard CH (1995): Effect of stretch on contraction and the Ca²⁺ transient in ferret ventricular muscles during hypoxia and acidosis. *Am J Physiol* 269: C690-697

Hunter T, Plowman GD (1997): The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* 22, 18-22

Jacobshagen C, Gruber M, Teucher N, Schmidt AG, Unsold BW, Toischer K, Nguyen Van P, Maier LS, Kogler H, Hasenfuss G (2008): Celecoxib modulates hypertrophic signalling and prevents load-induced cardiac dysfunction. *Eur J Heart Fail* 10, 334-342

Jacoby JJ, Kalinowski A, Liu MG, Zhang SS, Gao Q, Chai GX, Ji L, Iwamoto Y, Li E, Schneider M (2003): Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (22): 12929-12934

Kang PM, Izumo S (2003): Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends Mol Med* 9: 177-182

Karliner JS, Simpson PC, Taylor JE, Honbo N, Woloszyn W (1985): Adrenergic receptor characteristics of cardiac myocytes cultured in serum-free medium: comparison with serum-supplemented medium. *Biochem Biophys Res Commun* 128 (1): 376-382

Karliner JS, Kagiya T, Simpson PC (1990): Effects of pertussis toxin on alpha 1-agonist-mediated phosphatidylinositide turnover and myocardial cell hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Experientia* 46 (1): 81-84

Kelly PA, Rahmani Z (2005): DYRK1A enhances the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells by forming a complex with Ras, B-Raf, and MEK1. *Mol Biol Cell* 16: 3562-3573

Kentrup H, Becker W, Heukelbach J, Wilmes A, Schurmann A, Huppertz C, Kainulainen H, Joost HG (1996): Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* 271: 3488-3495

Klingebiel TM: Der Einfluss der Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated Kinase (DYRK) auf die kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz. Med. Diss. Göttingen 2009

Komuro I, Yazaki Y (1993): Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 55:55-75

Kuhn C, Frank D, Will R, Jaschinski C, Frauen R, Katus HA, Frey N (2009): DYRK1A is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 284: 17320-17327

Kurabayashi N, Hirota T, Sakai M, Sanada K, Fukada Y (2010): DYRK1A and glycogen synthase kinase 3beta, a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping. *Mol Cell Biol* 30 (7): 1757-1768

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Langendorff O (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch* 61: 291-332

Leder S, Weber Y, Altafaj X, Estivill X, Joost HG, Becker W (1999): Cloning and characterization of DYRK1B, a novel member of the DYRK family of protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 474-479

Lee HR, Henderson SA, Reynolds R, Dunnmon P, Yuan D, Chien KR (1988): Alpha 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression. *J Biol Chem* 263(15): 7352-7358.

Lee Y, Ha J, Kim HJ, Kim YS, Chang EJ, Song WJ, Kim HH (2009): Negative feedback Inhibition of NFATc1 by DYRK1A regulates bone homeostasis. *J Biol Chem* 284 (48): 33343-33351

Leite MF, Page E, Ambler SK (1994): Regulation of ANP secretion by endothelin-1 in cultured atrial myocytes: desensitization and receptor subtype. *Am J Physiol* 267 (6 Pt 2): 193-203

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP (1990): Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 322 (22): 1561-1566

Li K, Zhao S, Karur V, Wojchowski DM (2002): DYRK3 activation, engagement of protein kinase A/cAMP response element-binding protein, and modulation of progenitor cell survival. *J Biol Chem* 277: 47052-47060

Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, Doevendans PA (2003): Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J* 24(10): 883-896

Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D (2002): Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 106 (24): 3068-3072

Locher MR, Razumova MV, Stelzer JE, Norman HS, Patel JR, Moss RL (2009): Determination of rate constants for turnover of myosin isoforms in rat myocardium: implications for in vivo contractile kinetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 27(31): 4152-4160

Lochhead PA, Sibbet G, Kinstrie R, Cleghon T, Rylatt M, Morrison DK, Cleghon V (2003): dDYRK2: a novel dual-specificity tyrosine-phosphorylation- regulated kinase in *Drosophila*. *Biochem J* 374, 381-391

Lochhead PA, Sibbet G, Morrice N, Cleghon V (2005): Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell* 121: 925-936

Loh S, Cram D, Skurray R (1989): Nucleotide sequence of the leading region adjacent to the origin of transfer an plasmid F and its conservation among conjugative plasmids. *Mol Gen Genet* 219: 177-186

Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeyer TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF (1997): Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* 10(4): 231-236

Maenz B, Hekerman P, Vela EM, Galceran J, Becker W (2008): Characterization of the human DYRK1A promoter and its regulation by the transcription factor E2F1. *BMC Mol Biol* 9: 30

Mao J, Maye P, Kogerman P, Tejedor FJ, Toftgard R, Xie W, Wu G, Wu D (2002): Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J Biol Chem* 277: 35156-35161

Marban E, Kusuoka H (1987): Maximal Ca²⁺-activated force and myofilament Ca²⁺ sensitivity in intact mammalian hearts. Differential effects of inorganic phosphate and hydrogen ions. *J Gen Physiol* 90 (5): 609-623

Maron BJ, Pelliccia A (2006): The heart of trained athletes: cardiac Remodeling and the risk of sports, including sudden death. *Circulation* 114: 1633-1644

Marsh NA (1979): Langendorff and the perfused heart [proceedings]. *J Physiol* 291: 31-40

Marti E, Altafaj X, Dierssen M, de la Luna S, Fotaki V, Alvarez M, Perez-Riba M, Ferrer I, Estivill X (2003): DYRK1A-Expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res* 964: 250-263

Mata M, Merritt SE, Fan G, Yu GG, Holzman LB (1996): Characterization of dual leucine zipper-bearing kinase, a mixed lineage kinase present in synaptic terminals whose phosphorylation state is regulated by membrane depolarization via calcineurin. *J Biol Chem* 271 (28): 16888-16896

Matsuo R, Ochiai W, Nakashima K, Taga T (2000): A new expression cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody. *J Immunol Methods* 247 (1-2): 141-151

McKinsey TA, Olson EN (2005): Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes. *J Clin Invest* 115(3): 538-546

Meidell RS, Sen A, Henderson SA, Slahetka MF, Chien KR (1986): Alpha 1-adrenergic stimulation of rat myocardial cells increases protein synthesis. *Am J Physiol* 251(5 Pt 2): H1076-1084

Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA (2000): Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res* 86(4): 386-390

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998): A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93 (2): 215-228

Morrison DK (2001): KSR: a scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci* 114: 1609-1612

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998): Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954-958, 960, 962

Mudd JO, Kass DA (2008): Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451, 919-928

Mueller C, Scholer A, Laule-Kilian K, Martina B, Schindler C, Buser P, Pfisterer M, Perruchoud AP (2004): Use of B-type natriuretic peptide in the evaluation and management of acute dyspnea. *N Engl J Med*; 350: 647-654

Murakami N, Xie W, Lu RC, Chen-Hwang MC, Wieraszko A, Hwang YW (2006): Phosphorylation of amphiphysin I by minibrain kinase/dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase, a kinase implicated in Down syndrome. *J Biol Chem* 281 (33): 23712-23724

Nakao K, Minobe W, Roden R, Bristow MR, Leinwand LA (1997): Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest* 100 (9): 2362-2370

Navarro-Sobrino M, Rosell A, Penalba A, Ribó M, Alvarez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Montaner J (2010): Catecholamine-induced heart injury in mice: differential effects of isoproterenol and phenylephrine. *Histol Histopathol* 25 (5): 589-597

Nieminen MS, Böhm M, Cowie MR, Drexler H, Filippatos GS, Jondeau G, Hasin Y, Lopez-Sendon J, Mebazaa A, Metra M (2005): Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 26 (4): 384-416

Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, Viola JPB, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, Rao A (2000): Concerted Dephosphorylation of the Transcription Factor NFAT1 Induces a Conformational Switch that Regulates Transcriptional Activity. *Mol Cell* 6: 539-550

Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Da Costa Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A (2004): A Conserved Docking Motif for CK1 Binding Controls the Nuclear Localization of NFAT1. *Mol Cell Biol* 24: 4184-4195

Okui M, Ide T, Morita K, Funakoshi E, Ito F, Ogita K, Yoneda Y, Kudoh J, Shimizu N (1999): High-level expression of the Mnb/Dyrk1A gene in brain and heart during rat early development. *Genomics* 62: 165-171

Prasad AM, Ma H, Sumbilla C, Lee DI, Klein MG, Inesi G (2007): Phenylephrine hypertrophy, Ca²⁺-ATPase (SERCA2), and Ca²⁺ signaling in neonatal rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 292 (6): C2269-2275

Raich WB, Moorman C, Lacefield CO, Lehrer J, Bartsch D, Plasterk RH, Kandel ER, Hobert O (2003): Characterization of *Caenorhabditis elegans* homologs of the Down syndrome candidate gene DYRK1A. *Genetics* 163, 571-580

Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N (2003): Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 22: 395-403

Remme WJ, Swedberg K; Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Cardiology (2001): Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J* 22 (17): 1527-1560

Rochat-Steiner V, Becker K, Micheau O, Schneider P, Burns K, Tschopp J (2000): FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting Serine/Threonine Kinase that Induces FADD Phosphorylation and Inhibits Fas-mediated Jun NH₂-terminal Kinase Activation. *J Exp Med* 192, 1165-1174

Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986): Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368

Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, Nicol RL, Mammen P, Yang J, Antos CL, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN (2001): Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (6): 3328-3333

Sadoshima J, Izumo (1993): Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 73 (3): 413-423

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Ehrlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354

Sanbe A, Gulick J, Hanks MC, Liang Q, Osinska H, Robbins J (2003): Reengineering Inducible Cardiac-Specific Transgenesis with an attenuated Myosin Heavy Chain Promoter. *Circ Res* 92: 609-616

Seifert A, Allan LA, Clarke PR (2008): DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *FEBS J* 275(24): 6268-6280

Shimoyama M, Hayashi D, Zou Y, Takimoto E, Mizukami M, Monzen K, Kudoh S, Hiroi Y, Yazaki Y, Nagai R (2000): Calcineurin inhibitor attenuates the development and induces the regression of cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension. *Circulation* 102 (16): 1996-2004

Singer VL, Paragas VB, Larison KD, Wells KS, Fox CJ, Haugland RP (1994): Fluorescence-based signal amplification technology. *Am Biotechnol Lab* 12: 55-56

Sitz JH, Baumgärtel K, Hämmerle B, Papadopoulos C, Hekerman P, Tejedor FJ, Becker W, Lutz B (2008): The Down syndrome candidate dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A phosphorylates the neurodegeneration-related septin 4. *Neuroscience* 157 (3): 596-605

Skurat AV, Dietrich AD (2004): Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases. *J Biol Chem* 279: 2490-2498

Smith DJ, Stevens ME, Sudanagunta SP, Bronson RT, Makhinson M, Watabe AM, O'Dell TJ, Fung J, Weier HU, Cheng JF (1997): Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat Genet* 16: 28-36

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85

Song WJ, Sternberg LR, Kasten-Sportes C, Keuren ML, Chung SH, Slack AC, Miller DE, Glover TW, Chiang PW, Lou L (1996): Isolation of human and murine homologues of the *Drosophila* minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region". *Genomics* 38: 331-339

Souza GM, Lu S, Kuspa A (1998): YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in *Dictyostelium*. *Development* 125(12): 2291-2302

Statistisches Bundesamt: Gesundheit - Todesursachen in Deutschland (Fachserie 12, Reihe 4). Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2009a, Seite 3

Statistisches Bundesamt: Krankheitskosten - aus der Reihe „Gesundheitsberichterstattung des Bundes“. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2009b, Heft 48

Sussman MA, Lim HW, Gude N, Taigen T, Olson EN, Robbins J, Colbert MC, Gualberto A, Wieczorek DF, Molkentin JD (1998): Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* 281 (5383): 1690-1693

Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, Tavazzi L, Smiseth OA, Gavazzi A, Haverich A (2005): Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 26 (11): 1115-11140

Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkentin JD (2000): Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (3): 1196-1201

Tejedor F, Zhu XR, Kaltenbach E, Ackermann A, Baumann A, Canal I, Heisenberg M, Fischbach KF, Pongs O (1995): *minibrain*: A New Protein Kinase Family Involved in Postembryonic Neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* 14, 287-301

Therrien M, Michaud NR, Rubin GM, Morrison DK (1996): KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes Dev* 10: 2684-2695

Ullrich A, Schlessinger J (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212

van Rooij E, Doevendans PA, Crijns HJ, Heeneman S, Lips DJ, van Bilsen M, Williams RS, Olson EN, Bassel-Duby R, Rothermel BA (2004): MCIP1 overexpression suppresses left ventricular Remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* 94 (3): 18-26

Wakatsuki T, Schlessinger J, Elson EL (2004): The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem Sci* 29 (11): 609-617

Wang J, Kudoh J, Shintani A, Minoshima S, Shimizu N (1998): Identification of Two Novel 5 Noncoding Exons in Human *MNB/DYRK* Gene and Alternatively Spliced Transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 250: 704-710

Waspel LE, Ordahl CP, Simpson PC (1990): The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J Clin Invest* 85(4): 1206-1214

Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Frackowiak J, Dowjat K, Silverman WP, Reisberg B, deLeon M, Wisniewski T, Adayev T (2004): Cell type and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain Res* 1010: 69-80

Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN (2003): A mechanistic role of cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 111: 1497-1504

WHO: Physician Guidelines (for GPs) designed to be translated and distributed worldwide to primary care physicians. World Health Organization, Genf, 1995

Wilkins BJ, Molkenin JD (2002): Calcineurin and cardiac hypertrophy: Where have we been? Where are we going? *J Physiol* 541: 1-8

Wilkins BJ, Molkenin JD (2004): Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 322 (4): 1178-1191

Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR, Molkenin JD (2004): Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* 94 (1): 110-118

Woods YL, Cohen P, Becker W, Jakes R, Goedert M, Wang X, Proud CG (2001a): The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem J* 355: 609-615

Woods YL, Rena G, Morrice N, Barthel A, Becker W, Guo S, Unterman TG, Cohen P (2001b): The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem J* 355: 597-607

Yang EJ, Ahn YS, Chung KC (2001): Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem* 276 (43): 39819-39824.

Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS (2000): Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res* 87(12): E61-68

Zhu H, Lo HW (2010): The Human Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 (GLI1) Family of Transcription Factors in Gene Regulation and Diseases. *Curr Genomics* 11 (4): 238-245

Zhuo L, Gong J, Yang R, Sheng Y, Zhou L, Kong X, Cao K (2009): Inhibition of proliferation and differentiation and promotion of apoptosis by cyclin L2 in mouse embryonic carcinoma P19 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 390 (3): 451-457

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Abteilung wissenschaftlich zu arbeiten. Auf diese Weise habe ich praktische Erfahrungen in der modernen Herz-Kreislaufforschung sammeln können. Ich bedanke mich für seine konstruktive Kritik und das Interesse an meiner Arbeit.

Bei Dr. med. Tim Seidler möchte ich mich ganz besonders für die Überlassung des Themas und das große Vertrauen in meine Arbeit bedanken. Seine motivierenden Gespräche in schwierigen Phasen des Projekts und die uneingeschränkte Unterstützung bei Fragen oder Problemen haben wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen.

Ein großer Dank gilt Dr. rer. nat. Cornelia Grebe für die großartige Unterstützung bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation und der täglichen Laborarbeit. Ihr offenes Ohr und ihre ständige Ansprechbarkeit waren mir stets eine große Hilfe.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. med. Theda-Maria Klingebiel für ihre geduldige und zeitintensive Einarbeitung in die Methodik und Thematik meiner Arbeit bedanken. Das freundschaftliche Verhältnis, auch über das Labor hinaus, und das Projekt DYRK1A werden uns immer ein Stück weit verbinden.

Ein großer Dank gilt auch der Medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Göttingen, stellvertretend Herrn Dekan Prof. Dr. med. C. Frömmel, für die Aufnahme in das „Stipendien-Programm für Exzellenz innerhalb Gö4med“. Die damit verbundene finanzielle Unterstützung war sehr hilfreich.

Überdies möchte ich mich bei allen Kollegen aus dem Labor ganz besonders bedanken: Jessica, Karina, Gudrun, Sebastian, Nadine, Conny, Tim, Theda, Christian und Moritz. Ihnen danke ich nicht nur für die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft in der Laborarbeit, sondern auch für das freundschaftliche und kollegiale Verhältnis.

Dr. med. Karl Toischer danke ich für die Hilfe bei den operativen Mausmodellen und Christian Dullin für seine freundliche Unterstützung bei der Etablierung der Molekularen Bildgebung.

Ein herzlicher Dank gilt Eva Hellmuth für ihre uneingeschränkte Unterstützung. Einen sehr großen Teil dieser Arbeit verdanke ich ihrer liebevollen Aufmunterung bei Rückschlägen, ihrem Verständnis für die vielen Stunden im Labor, ihrem großen Vertrauen in mich und dem Wissen sie an meiner Seite zu haben.

Abschließend möchte ich von Herzen meinen Eltern und Geschwistern für die zeitintensive Unterstützung bei der Korrektur danken. Ich danke ihnen dafür, dass sie mich auf meinem Weg begleitet und mich in meiner Arbeit bestärkt haben.

Lebenslauf

Ich, Simon Philipp Grau, wurde am 23. November 1982 als Sohn von Friedrich Grau, Pfarrer, und Edith Habertzeth-Grau, Ernährungsberaterin und Versicherungskauffrau, in Stuttgart geboren. Ich wuchs zusammen mit meinen Geschwistern Tobias und Leila in Plochingen (1982 - 1996) und Denkendorf (1996 - 2002) auf. Mein Bruder Tobias ist 30 Jahre alt und von Beruf Jurist. Meine Schwester Leila ist 25 Jahre alt und absolviert derzeit das Referendariat als Grund- und Hauptschullehrerin.

Ab 1988 besuchte ich die Panorama Grundschule Plochingen, bevor ich 1992 auf das Gymnasium Plochingen wechselte und 2002 meine Allgemeine Hochschulreife erlangte. Von September 2002 bis August 2003 machte ich meinen Zivildienst im Kreiskrankenhaus Plochingen in der chirurgischen Abteilung. Daran schloss sich die Ausbildung zum Rettungssanitäter beim Arbeiter-Samariter-Bund (ASB) in Mannheim an (September 2003 bis Januar 2004), bevor ich ein Semester Physik an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen studierte. Im Juli 2004 begann ich die Ausbildung zum Medizinisch-Technischen Assistenten im Fachbereich Radiologie (MTAR) im Universitätsklinikum Tübingen, die ich aufgrund meines Studienplatzes für Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen nicht beendete. Zum Wintersemester 2005 begann ich mein Studium für Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen und absolvierte nach vier Semestern den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Während des klinischen Teils meines Studiums sammelte ich praktische Erfahrungen in den Bereichen Innere Medizin, Augenheilkunde, Allgemein- und Viszeralchirurgie, Orthopädie und Intensivmedizin. Nach dem zweiten klinischen Semester begann ich meine Promotion mit dem Titel „Zum Einfluss von DYRK1A auf den aktivierten Calcineurin/NFAT-Signalweg und die Hypertrophie in Kardiomyozyten“ in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß und der Betreuung von Dr. med. Tim Seidler. Im Rahmen dessen war ich Stipendiat im 'Studienprogramm für Exzellenz innerhalb „Gö4med“ für Studierende der Universitätsmedizin Göttingen'. Im Februar 2011 werde ich mit der Durchführung des Praktischen Jahres beginnen und voraussichtlich im Frühjahr 2012 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung absolvieren.