

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf  
Leiter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Veränderungen auf Ebene der Genexpression aufgrund von  
Herzinsuffizienz bei  
p38 MAPK $\alpha$  KO-Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Mirjam Pfeffer  
2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Zweitgutachterin: PD Dr. rer. nat. Annika Raupach

Nicht müde werden  
sondern dem Wunder  
leise  
wie einem Vogel  
die Hand hinhalten.

*Hilde Domin*

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikationen:

Tagungsabstracts:

**Alterations in gene expression levels due to heart failure in cardiac p38 MAPKinase KO mice**

**M. Pfeffer**, K. Bottermann, L. M. Leitner, J. Nemmer, J. Stegbauer, R. Deenen, K. Köhrer, A. Gödecke

Poster mit Auszeichnung

95. Jahrestreffen der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Lübeck 2016

## Zusammenfassung

p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase  $\alpha$  (p38 MAPK $\alpha$ ) spielt bei Hypertrophieprozessen des Herzens eine wichtige Rolle und man weiß heute, dass p38 MAPK $\alpha$  unter anderem durch Angiotensin II (AngII) aktiviert wird. Aktuell herrschen aber widersprüchliche Meinungen, ob die Aktivierung von p38 MAPK $\alpha$  vorteilhaft oder schädlich im Rahmen einer erhöhten Nachlast des Herzens ist. Da p38 MAPK $\alpha$  bei der Transkription einer Vielzahl von Genen eine regulatorische Funktion übernimmt, untersucht die vorliegende Arbeit die Rolle von p38 MAPK $\alpha$  auf Ebene der Genexpression im Rahmen erhöhter Nachlast.

Hierfür wurden durch Kreuzung von p38 flox/flox Mäusen mit SM22 $\alpha$ - oder  $\alpha$ -MHC cre-deletierten Mäusen zwei p38 MAPK $\alpha$  *Knock-Out* (KO)-Mausmodelle generiert. Dies führt im Falle des SM22p38 $\alpha$  KO-Modells zu einem KO von p38 MAPK $\alpha$  in glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten. Das zweite KO-Modell ist durch Tamoxifen induzierbar und Kardiomyozyten-spezifisch (iCmp38 $\alpha$ ). AngII (1.5 mg/kg/Tag) wurde mithilfe osmotischer Minipumpen injiziert, um eine Nachlasterrhöhung des Herzens auszulösen. Die Genexpression des Herzens wurde anschließend sowohl mittels Mikroarray-Methode (*Agilent 8x60 Mouse Array*), als auch durch quantitative Echt-Zeit (q)-PCR untersucht. Basierend auf den Mikroarray-Daten wurden 15 Gene ausgewählt, die eine deutlich veränderte Genexpression aufwiesen. Anschließend wurden das Genexpressionsniveau im zeitlichen Verlauf mittels qPCR untersucht, wobei die Genexpression zu vier Zeitpunkten gemessen wurde: vor der AngII-Gabe (*baseline*; Ausgangswert), nach 12, 24 und 48 Stunden (h).

Die Ergebnisse der Microarray-Analyse zeigte unter basalen Bedingungen lediglich minimale Veränderungen auf Ebene der Genexpression zwischen Kontrollen und p38MAPK $\alpha$  KO Mäusen. Nach 48 h AngII-Behandlung dagegen waren signifikante Veränderungen von über 8162 verändert exprimierten Genen ( $p < 0.01$ ) messbar. In der Auswertung des zeitlichen Verlaufs mittels qPCR zeigte sich für alle 15 gemessenen Gene eine ähnliche Regulation innerhalb der ersten 12 h sowohl in Kontroll- als auch in KO-Mäusen. Zwischen 12 h und 24 h zeigte sich dann aber ein signifikanter Expressionsunterschied einiger Gene zwischen Kontroll- und p38 MAPK $\alpha$  KO-Tieren. Es konnten Zytokine (IL-6, IL-1 $\beta$ ) und Chemokine (Cxc11, Cxc15, Ccl2) im Herzen der p38 MAPK $\alpha$  KO Mäuse identifiziert werden, die bereits nach 24 h ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau zeigten und nach 48 h bereits wieder eine Expressionsabnahme aufwiesen. Mit Schwerpunkt auf Genen, von denen man heute weiß, dass sie im Rahmen des kardialen Glukosestoffwechsels wichtig sind, zeigte sich eine signifikante Expressionssteigerung von PDP2 und GLUT4 in Kontrolltieren nach 48 h, während das Expressionsniveau von p38 MAPK $\alpha$  KO-Mäusen unverändert blieb. Dies weist darauf hin, dass im Herzen von p38 MAPK $\alpha$  KO-Tieren ein energetisches Problem auftritt. Kontrolltiere scheinen dagegen auf die erhöhte Nachlast des Herzens mit einer Expressionssteigerung dieser Gene zu reagieren und sich damit den veränderten Druckverhältnissen anzupassen. Darüber hinaus zeigte sich eine massive Expressionssteigerung für Gene des extrazellulären *Remodeling* (Ctgf, Lox) in p38 MAPK $\alpha$  KO-Mäusen nach 48 h der AngII-Behandlung. Dies weist darauf hin, dass auf Ebene der Genexpression *remodeling*- und profibrotische Prozesse angestoßen werden, welche zu einer massiven linksventrikulären Dialatation in p38 MAPK $\alpha$  KO-Herzen beitragen.

Zusammenfassend scheint die Aktivierung von p38 MAPK $\alpha$  im Rahmen von erhöhter Druckbelastung des Herzens bereits in der frühen Phase (zwischen 12 h und 24 h) eine wichtige Rolle im Rahmen der Adaptions- und Hypertrophieprozesse zu spielen. Laut den erhobenen Daten, spielt p38MAPK $\alpha$  eine protektive Rolle im Rahmen von erhöhter Nachlast und induziert kardiale *Remodeling*-Prozesse durch Einwirkung auf Gene des kardialen Glukosestoffwechsels, der Inflammation und der extrazellulären Matrix.

## Summary

p38 MAPKinase  $\alpha$  plays an important role during cardiac hypertrophic processes and is known to be activated downstream of AngiotensinII (AngII) signaling. Presently there are contradictory opinions if activation of p38MAPK $\alpha$  is beneficial or detrimental once the heart has to cope with a higher afterload. As p38MAPK $\alpha$  is highly involved in transcriptional regulation of a plethora of genes, we analyzed the role of p38MAPK $\alpha$  in the context of pressure overload on the level of gene expression.

Therefore, two p38MAPK $\alpha$  Knock-out (KO) mouse models were generated by crossbreeding p38 flox/flox mice either with SM22 $\alpha$ - or  $\alpha$ -MHC cre-deleter mice to achieve either a KO in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes (SM22p38 $\alpha$ ) or a tamoxifen inducible cardiomyocyte specific p38MAPK $\alpha$  KO (iCMp38 $\alpha$ ). AngII (1.5 mg/kg/day) was applied via osmotic mini pumps to induce pressure overload. Gene expression in the heart was analyzed via a microarray approach (Agilent 8x60K Mouse Array) and by quantitative Real-Time (q)-PCR. Based on the microarray data we singled out several genes, which were highly deregulated and analyzed them in a timeline at baseline and after 12 h, 24 h and 48 hours (h) of AngII-treatment by qPCR.

Microarray analysis revealed under basal conditions only minor changes in cardiac gene expression but after 48 h of AngII-treatment significant alterations between control and p38MAPK $\alpha$  KO mice were visible (8162 differentially expressed genes,  $p < 0.01$ ). Timeline analysis by qPCR showed for all investigated genes a similar regulation during the first 12 hours of AngII-treatment. But between 12 h and 24 h the level of gene expression was deregulated between control and p38MAPK $\alpha$  KO mice. We identified several cytokines (IL-6, IL1 $\beta$ ) and chemokines (Cxcl1, Cxcl5, Ccl2) in the heart of p38MAPK $\alpha$  KO mice which were highly upregulated after 24 h and which already dropped again after 48 h. Focusing on genes, which are known to be important for the cardiac metabolism, we could show an upregulation of PDP2 and GLUT4 in WT mice after 48 h, while this was not visible in KO mice. This suggest that an energetic depression might occur in hearts of KO mice. WT mice seem to adapt by upregulation of these genes involved in glucose metabolism. Moreover, genes which are known to be important for extracellular matrix remodeling as Ctgf and Lox were highly upregulated in KO hearts after 48 h of AngII-treatment indicating that an increased ECM remodeling and profibrotic processes contribute to the rapid left ventricular dilation in KO mice.

Taken together, the main activation of p38MAPK $\alpha$  in cardiac hypertrophic response, seems to occur between 12 h and 24 h after induction of pressure overload. According to our data p38MAPK $\alpha$  is protective in pressure overload induced cardiac remodeling by influencing genes of cardiac metabolism, inflammation and ECM remodeling.

## Abkürzungsverzeichnis

AngII.....	Angiotensin II
Angptl4.....	<i>Angiopoetin-like 4</i>
AS.....	Aminosäure
ATP.....	Adenosintriphosphat
Ccl2.....	<i>C-C motif ligand 2</i>
cDNA.....	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Csnk2b.....	Casein Kinase 2 beta
<i>Ct</i> .....	<i>cycle threshold</i>
Ctgf.....	<i>Connective tissue growth factor</i>
Cxcl1.....	<i>C-X-C motif ligand 1</i>
Cxcl5.....	<i>C-X-C motif ligand 5</i>
Cxcr2.....	C-X-C Motiv-Chemokinrezeptor 2
EDV.....	enddiastolisches Volumen
EF.....	Ejektionsfraktion
ERK.....	<i>extracellular signal-regulated</i> Kinasen
ESV.....	endsystolisches Volumen
EZM.....	extrazelluläre Matrix
FC.....	<i>fold change</i> , X-fache Änderung
FOXO3a.....	Forkhead-Box-Protein O3
Gapdh.....	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT4.....	Glukosetransporter Typ 4
Gstz1.....	Gluthation-S Transferase Z1
h.....	<i>hour</i> , Stunde
Has1.....	Hyaluronansynthese 1
Has2.....	Hyaluronansynthese 2
Hprt.....	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
iCM.....	induzierbarer kardiomyozytärer
Il-1 $\beta$ .....	Interleukin-1beta
Il-6.....	Interleukin-6
JNK.....	c-Jun N-terminal Kinasen
KO.....	<i>Knockout</i>
Lcn2.....	Lipocalin 2
Ldh.....	Laktatdehydrogenase
Lox.....	Lysyloxidase
LPL.....	Lipoproteinlipase
LPS.....	Lipopolysaccharide
MAPK.....	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF2A.....	Myozyten-spezifische Enhancer-Faktor 2A
MEF2C.....	Myozyten-spezifischer Enhancer-Faktor 2C
ml.....	<i>Milliliter</i>
MM.....	<i>Master Mix</i>
mRNA.....	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mTOR.....	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
Nudc.....	nuclear distribution Protein
p38 MAPK $\alpha$ .....	mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 $\alpha$
PDH.....	Pyruvat-Dehydrogenase
Pdk4.....	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 4
Pdp2.....	Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase 2
Pfn2.....	Profilin 2

qPCR.....	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
<i>RIN</i> .....	<i>RNA integrity number</i>
Rsp17 .....	Ribosomale Protein S17
SD.....	Standardabweichung
Slc2a4 .....	<i>Solute Carrier Family 2 Member 4</i>
SM22 $\alpha$ .....	<i>Smooth Muscle Protein 22-Alpha</i>
TAC.....	<i>transverse aortic constriction</i>
TF .....	Transkriptionsfaktor
$\alpha$ -MHC.....	<i>alpha-myosin heavy chain</i>
$\mu$ g.....	Mikrogramm
$\mu$ l .....	Mikroliter



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Herzinsuffizienz und kardiale Hypertrophie	1
1.2	p38 MAPK $\alpha$	3
1.3	Phänotyp der p38 MAPK $\alpha$ KO-Modelle	8
1.4	Genexpressionsanalyse	10
1.5	Ziel der Arbeit	11
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	verwendete Laborgeräte	12
2.2	verwendete Kits	12
2.3	Verwendete PCR Primer	13
2.4	Mausstämme und Tiergruppen	14
2.4.1	SM22p38 MAPK $\alpha$ Mäuse	15
2.4.2	iCMp38MAPK $\alpha$ Mäuse	16
2.5	AngII-Behandlung	17
2.6	Methoden zur Bearbeitung von Nukleinsäuren	19
2.6.1	Probengewinnung	19
2.6.2	Aufarbeitung/Aufreinigung	19
2.6.3	mRNA-Isolierung	19
2.6.4	Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von RNA	20
2.6.5	Reverse Transkription	20
2.7	Genexpressionsanalyse mittels Microarray-Technik	20
2.8	Genexpressionsanalyse mittels qPCR	21
2.8.1	SYBR Green	23
2.8.2	Auswertung	25
2.9	Statistik	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Genexpressionsanalysen mittels Microarray-Technik	28
3.1.1	Vergleich der Microarray-Analysen beider Modelle	31
3.1.2	Expressionskinetik ausgewählter Zielgene	31
3.2	Vorversuche	32

3.2.1 Verifizierung eines Referenzgens für die Genexpressionsanalyse	32
3.2.2 Generierung eines Kalibrators	35
<b>3.3 Genexpressionsanalyse im Zeitverlauf von 0-48 h nach Start der AngII-Behandlung</b>	<b>38</b>
3.3.1 Die Expression von Genen, die an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, zeigt ein Maximum nach 24 h	39
3.3.2 zeitlicher Verlauf der Genexpression profibrotischer Zielgene: signifikante Steigerung der Expression von Ctgf und Lox nach 48 h der AngII-Behandlung	42
3.3.3 zeitlicher Verlauf der Genexpression: Glukose- und Fettsäuremetabolismus	44
<b>4 Diskussion</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Notwendigkeit der umfassenden Prüfung interner Kontrollnormen</b>	<b>46</b>
<b>4.2 p38 MAPK<math>\alpha</math> KO als Herzinsuffizienz-Modell</b>	<b>49</b>
<b>4.3 Rolle der p38 MAPK<math>\alpha</math> in der frühen Phase der Anpassung auf eine erhöhte Nachlast</b>	<b>50</b>
4.3.1 Protektive Rolle der p38MAPK $\alpha$ im Rahmen inflammatorischer Prozesse im verwendeten Herzinsuffizienzmodell	50
4.3.2 Steigerung der Expression profibrotischer Gene weist auf EZM- <i>Remodeling</i> in p38 MAPK $\alpha$ KO hin	53
4.3.3 Veränderter Glucose- und Fettsäuremetabolismus	56
<b>4.4 Studienlimitationen und Ausblick</b>	<b>60</b>
<b>4.5 Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
<b>5 Literatur und Quellenverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>Danksagung</b>	

# 1 Einleitung

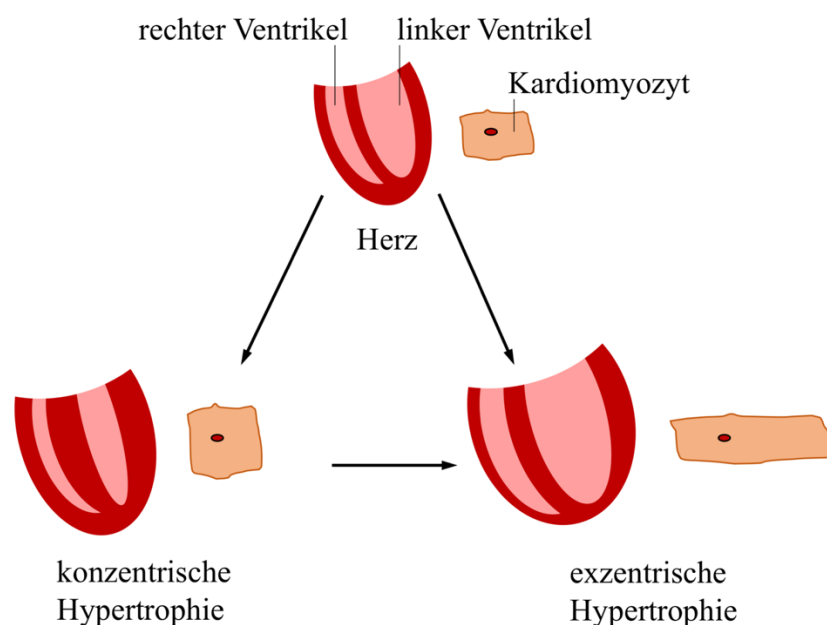
## 1.1 Herzinsuffizienz und kardiale Hypertrophie

Von einer Herzinsuffizienz spricht man, wenn die Pumpleistung des Herzens nicht ausreicht, um das für eine suffiziente Perfusion benötigte Herzzeitvolumen zu gewährleisten und es zum Auftreten klinischer Symptome kommt (Ponikowski et al., 2016). Hierzu zählen unter anderem Kurzatmigkeit, Husten, periphere Ödeme, Stauungshepatitis, Stauungsgastritis, Appetitlosigkeit, Leistungsminderung und Fatigue, welche auf das Rückwärtsversagen des Herzens zurückzuführen sind (Kemp and Conte, 2012). Die Prävalenz der westlichen Bevölkerung liegt nach Daten der Rotterdam-Studie bei 1-2 % und es kommt mit steigendem Alter zu einer deutlichen Zunahme: so liegt die Prävalenz der über 85 Jährigen bereits bei >10% (Mosterd and Hoes, 2007). Ursächlich beruht die Herzinsuffizienz auf einer strukturellen und/oder funktionellen Schädigung des Myokards, welche beispielsweise durch Ischämie, arterielle Hypertension, Diabetes mellitus, Kardiomyopathien oder kardiotoxische Medikamente ausgelöst werden kann (Kemp and Conte, 2012). Den größten Einflussfaktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz stellt die kardiale Hypertrophie dar (van Berlo et al., 2013). Diese ist definiert als Größenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten und lässt sich im Rahmen einer chronischen Druck- oder Volumenbelastung des Herzens beobachten. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen physiologischen und pathologischen Hypertrophieformen. Während es bei der physiologischen kardialen Hypertrophie zur Verlängerung und Verbreiterung der Kardiomyozyten und somit zu einem ausgeglichenen Wachstum des Muskels kommt, zeichnet sich die pathologische Hypertrophie lediglich durch eine Verbreiterung der einzelnen Kardiomyozyten aus (van Berlo et al., 2013). Dies führt zu einer konzentrischen Veränderung des Herzmuskels und damit zu einem erniedrigten Innendurchmesser des linken Ventrikels (Abb. 1). Beispiele für eine physiologische Hypertrophie sind unter anderem Schwangerschaft oder Ausdauersport. Zur pathologischen Hypertrophie kommt es dagegen im Rahmen von Aortenstenosen oder arterieller Hypertonie. Pathophysiologisch besteht der Sinn der Hypertrophie in der Herabsetzung der Wandspannung. Mathematisch lässt sich dies mithilfe des Laplace-Gesetzes erklären:

$$K = \frac{P * r}{2d}$$

Im Rahmen einer erhöhten Nachlast des Herzens (P) kommt es zu einer zunächst erhöhten Wandspannung (K). Kompensiert wird dies durch die Hypertrophie der Herzwand (d) mit gleichzeitiger Verkleinerung des Ventrikelvolumen (r), man spricht von einer konzentrischen Hypertrophie (Abb. 1).

Dies ermöglicht zunächst die Kompensation der erhöhten Arbeitsbelastung des Herzens (Berenji et al., 2005, Heineke and Molckentin, 2006). Dieser Kompensationsmechanismus kann jedoch nur bis zu einem gewissen Ausmaß funktionieren. Kommt es zu einer chronischen Belastung, so führt die Hypertrophie schließlich zu einer Dilatation des linken Ventrikels (Abb. 1). Es zeigt sich dann eine Vergrößerung des linken Ventrikels mit einer Abnahme der Wandstärke. Man spricht von einer exzentrischen Hypertrophie und es kann klinisch zu einer dekompensierten Herzinsuffizienz als Folge dieser Hypertrophie kommen. Im Gegensatz zu einer Druckbelastung kann es im Rahmen einer Volumenbelastung des Herzens, wie beispielsweise bei Klappeninsuffizienzen, direkt zur Entwicklung einer exzentrischen Hypertrophie kommen.



**Abb. 1: Formen kardialer Herzhypertrophie.** Der Herzmuskel kann auf unterschiedliche Arten hypertrophieren, abhängig von der Art der Belastung. Eine erhöhte Nachlast führt in der Regel zunächst zu einer konzentrischen Hypertrophie, während Volumenbelastung meist direkt zu einer exzentrischen Dilatation des Herzens führt. Dabei kommt es bei der exzentrischen Hypertrophie zu einer Längenzunahme der Kardiomyozyten, während es bei der konzentrischen Hypertrophie zu einer Vergrößerung des Durchmessers der Kardiomyozyten kommt. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Bernardo et al., 2010).

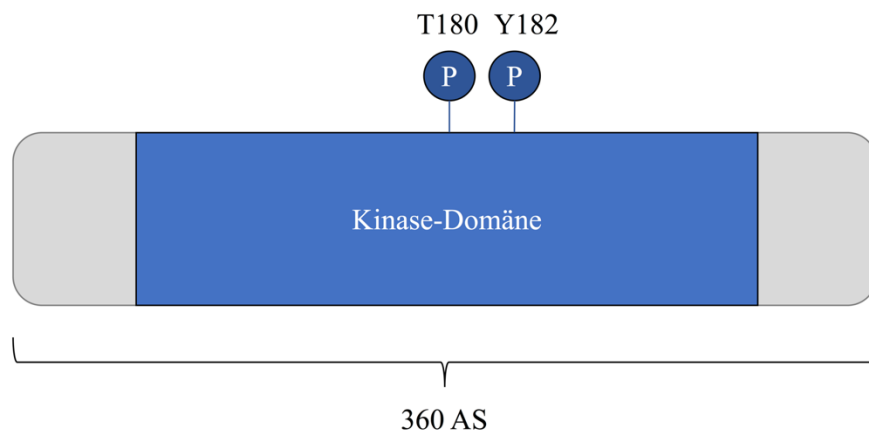
Pathologische Hypertrophieprozesse gehen mit einer kontraktilen Dysfunktion, interstitieller Fibrose und erhöhter Produktion von proinflammatorischen Zytokinen einher (Shimizu and Minamino, 2016). Diese reaktiven Umbauprozesse lassen sich als sogenanntes kardiales *Remodeling* zusammenfassen und finden auf struktureller, funktioneller und metabolischer Ebene statt. Strukturell kommt es zu Umbauprozessen der extrazellulären Matrix (EZM). Damit geht funktionell ein Verlust der kardialen Pumpfunktion einher. Metabolisch gilt normalerweise, dass das Herz in der Lage ist aus unterschiedlichen Energiequellen, wie

Fettsäuren, Glukose, Laktat oder Ketonkörper, ATP zu generieren und sich somit an das jeweilige Nährstoffangebot anzupassen. Im Rahmen von pathologischer Hypertrophie kommt es jedoch zu einem erhöhten Glukose- und reduziertem Fettsäurestoffwechsel (Sambandam et al., 2002). Inwieweit die Prozesse des kardialen *Remodeling* jedoch der Entwicklung einer Herzinsuffizienz entgegenwirken oder die Entwicklung sogar beschleunigen, ist aktuell nicht abschließend geklärt. Bezüglich des metabolischen *Remodeling* scheint der erhöhte Glukosestoffwechsel eine gesteigerte Kontraktionskraft des Herzmuskels zu bewirken (Stanley et al., 2005) und so ein vorteilhafter Kompensationsmechanismus zu sein. Studien konnten zeigen, dass auf molekularer Ebene verschiedene Schlüsselmoleküle, wie AKT, mTOR, ERK1/2 und auch mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) an den kardialen *Remodeling*-Prozessen ausschlaggebend beteiligt sind (Maillet et al., 2013). Unter anderem scheint die mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 $\alpha$  (p38 MAPK $\alpha$ ) eine wichtige Rolle im Rahmen des kardialen *Remodeling* bei pathologischer Hypertrophie zu spielen (Bao et al., 2007).

## 1.2 p38 MAPK $\alpha$

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) gehören zu den Serin-Threoninkinasen und spielen in unterschiedlichsten physiologischen Prozessen eine Rolle. Auf molekularer Ebene wurden bei Säugetieren 14 verschiedene MAPK charakterisiert, welche sich in 7 Subfamilien einteilen lassen. Zu den klassischen und gut erforschten Subfamilien gehören neben den *extracellular signal-regulated* Kinasen (ERK1/2) und den *c-Jun N-terminal* Kinasen (JNK1/2,3) auch die p38-Isoformen (p38  $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ) (Cargnello and Roux, 2011). JNK und p38 werden unter anderem auch als Stress-aktivierte Kinasen (SAPKs) bezeichnet, da sowohl chemische als auch physiologische Stressoren (beispielsweise oxidativer Stress, Infektion, Zytokine) zu einer Aktivierung von JNK und p38 MAPK führen (Kyriakis and Avruch, 2001). Seit der Entdeckung im Jahre 1994 (dabei handelte es sich um die  $\alpha$ -Isoform) wurden in Säugern insgesamt 4 Isoformen von p38 MAPK identifiziert, p38 MAPK  $\alpha$ - $\delta$  (Rose et al., 2010). Die vier Isoformen unterscheiden sich sowohl in ihrer AS-Sequenz, als auch in ihrem Verteilungsmuster. So ist die mRNA Expression von p38 MAPK $\alpha$  ubiquitär vorhanden, die Expression der  $\beta$ -Isoform dagegen lässt sich vor allem im Gehirn nachweisen (Cuenda and Rousseau, 2007). Die  $\gamma$ -Isoform wird überwiegend im Skelettmuskel exprimiert, während die  $\delta$ -Isoform in Lungen-, Niere-, Hoden- und Pankreasgewebe, also überwiegend in Drüsengeweben, nachgewiesen werden kann (Ono and Han, 2000). Vergleicht man die AS-Sequenzen der Isoformen, so zeigt sich eine Homologie von >60% und auch unter den Substraten der Kinase-Isoformen zeichnen sich Schnittmengen ab (Rose et al., 2010). Trotz der hohen Homologie zwischen den Isoformen, unterscheiden sie sich aber in ihrer Funktion. Dies haben unter anderem Untersuchungen an

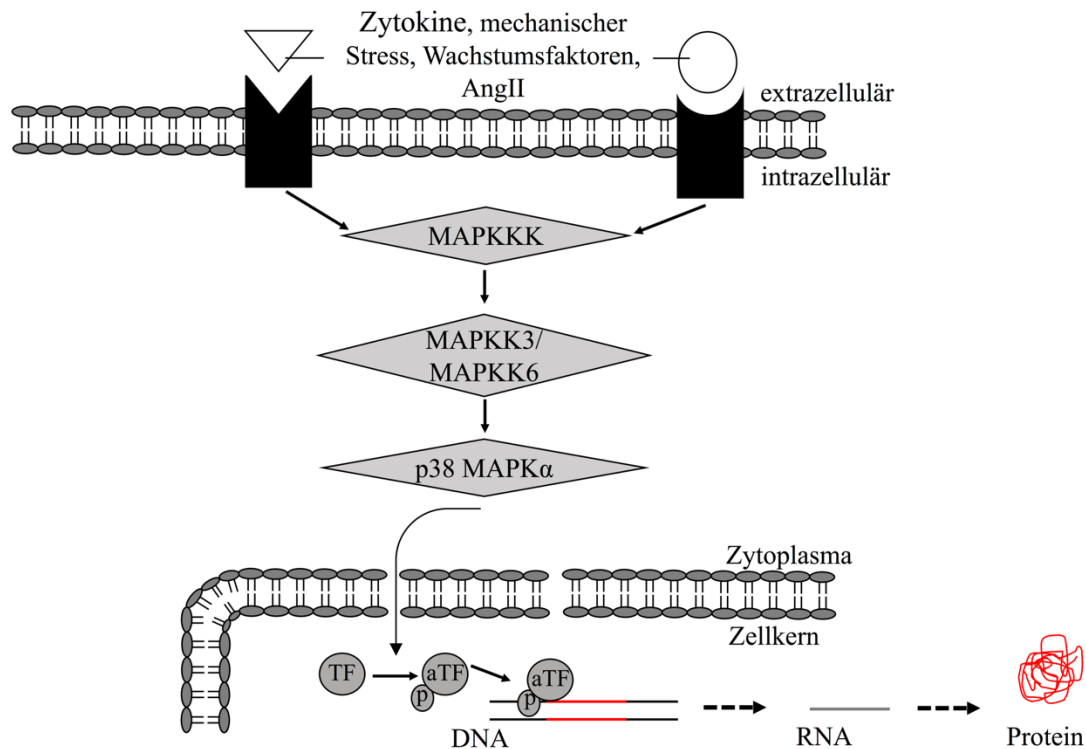
**Knockout (KO)-Mäusen** gezeigt. p38 MAPK $\alpha$  ist die am besten charakterisierte Isoform. p38 MAPK $\alpha$  wurde erstmals 1994 entdeckt und aus LPS-stimulierten Makrophagen isoliert (Han et al., 1994). Ungefähr zeitgleich wurde p38 MAPK $\alpha$  als ein Pyridinyl-Imidazol-bindendes Molekül beschrieben, welches die Produktion proinflammatorischer Zytokine hemmt (Lee et al., 1994). p38 MAPK $\alpha$  wurde also zunächst im Kontext von inflammatorischen Prozessen entdeckt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass p38 MAPK $\alpha$  darüber hinaus an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt ist. So spielt p38 MAPK $\alpha$ -*signaling* nicht nur im Rahmen der Immunantwort, bei der Expression proinflammatorischer Zytokine (Il-1 $\beta$ , Il-6) und bei der Regulation von Proliferation, Zelldifferenzierung und der Funktion von Immunzellen eine Rolle (Rose et al., 2010), sondern man weiß heute, dass p38 MAPK $\alpha$  darüber hinaus eine Rolle bei Zellmigration, Apoptose und der Regulation des Zellzyklus spielt (Thornton and Rincon, 2009, Zarubin and Han, 2005). p38 MAPK $\alpha$  hat ein Molekulargewicht von 41 kDa und besteht aus 360 Aminosäuren (AS). Die Kinase besteht aus einer Kinase-Domäne, welche von einer N-terminalen und C-terminalen Region flankiert wird (Abb. 2). Dieser generelle Aufbau ist allen Mitgliedern der mitogen-aktivierten Kinasen gemein (Cargnello and Roux, 2011). In der Kinase Domäne von p38 MAPK $\alpha$  befinden sich ein Threonin- und ein Tyrosinrest, deren Phosphorylierung für die Aktivierung essentiell ist (Wang, 2007).



**Abb. 2: Schematische Darstellung von p38 MAPK $\alpha$ .** An die Kinase-Domäne grenzt eine N-terminale und C-terminale Region unterschiedlicher Aminosäure (AS) -Abfolge und -Länge, je nach p38MAPK-Isoform. Eingezeichnet sind die beiden Phosphorylierungsstellen, die für die Aktivierung der p38 MAPK $\alpha$  essentiell sind. Dabei handelt es sich um die AS Threonin an Stelle 180, sowie die AS Tyrosin an Stelle 182. Abbildung wurde modifiziert nach (Cargnello and Roux, 2011).

Auf molekularer Ebene erfolgt die Aktivierung von MAP-Kinasen klassischerweise durch eine Aktivierungskaskade von drei hintereinander geschalteten Kinasen (Abb. 3). Durch extrazelluläre Reize, wie mechanischen Stress oder inflammatorische Zytokine kommt es über membranständige Rezeptoren zur Signaltransduktion und Aktivierung einer MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK). Diese wiederum phosphoryliert und aktiviert eine nachgeschaltete

MAPK-Kinase. Dabei handelt es sich für p38 MAPK $\alpha$  klassischerweise um MAPKK3 oder MAPKK6 (Ono and Han, 2000). Durch doppelte Phosphorylierung der beiden Phosphorylierungsstellen wird schließlich p38 MAPK $\alpha$  aktiviert. Neben dem klassischen Weg sind jedoch weitere Aktivierungswege von p38 MAPK $\alpha$  bekannt. Neben der Autophosphorylierung (Li et al., 2005) kann p38 MAPK $\alpha$  auch durch den T-Zell-Antigen-Rezeptor aktiviert werden (Salvador et al., 2005). Studien zeigen, dass es zur Phosphorylierung von p38 MAPK $\alpha$  unter anderem infolge von mechanischem Stress (Takeishi et al., 2001) und nachgeschaltet von G-protein-gekoppelten Rezeptoren (Hayashida et al., 2001, Nishida et al., 2005) kommt, die beispielsweise Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Angiotensin II (AngII) binden und so eine Signaltransduktion ins Zellinnere auslösen. p38 MAPK $\alpha$  phosphoryliert zahlreiche Substrate und reguliert dadurch verschiedene Stoffwechselprozesse. Unter anderem phosphoryliert und aktiviert p38 MAPK $\alpha$  Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise MEF2A, MEF2C, FOXO3 (Trempelec et al., 2013) und führt damit zu einer veränderten Genexpression durch Aktivierung der Transkription (Abb. 3).



**Abb. 3: klassischer Signalweg von p38 MAPK $\alpha$ .** Die Aktivierung von p38 MAPK $\alpha$  erfolgt entlang einer Phosphorylierungskaskade dreier hintereinander geschalteter Kinasen. Eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) wird nachgeschaltet von membranständigen Rezeptoren aktiviert und aktiviert ihrerseits eine MAPK-Kinase (MAPKK), welche durch doppelte Phosphorylierung p38 MAPK $\alpha$  aktiviert. Durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TF) kann es im Anschluss auf Ebene der Genexpression zu Veränderungen kommen. Die Aktivierung erfolgt dabei durch Phosphorylierung (p), sodass der TF anschließend aktiviert (aTF) und ein Zielgen (dargestellt als roter Abschnitt auf DNA) in RNA transkribiert wird. Durch Vorgänge der Translation entstehen schließlich Proteine, die wiederum Stoffwechselwege beeinflussen oder biochemische Prozesse katalysieren. So nimmt p38 MAPK $\alpha$  auf eine Vielzahl von verschiedenen Zellvorgängen Einfluss.

### p38 MAPK $\alpha$ – Rolle im Herzen

Experimentelle Studien zeigen, dass sowohl Myokardischämie (Otsu et al., 2003, Kaiser et al., 2004) als auch eine erhöhte Nachlast (Fischer et al., 2001) des Herzens zu einer Aktivierung von p38 MAPK $\alpha$  führen. Die Aktivierung ist bereits kurz nach Versuchsbeginn messbar und weist auf eine regulatorische Funktion von p38 MAPK $\alpha$  in der frühen Adaptationsphase auf kardialen Stress hin. Es wird dabei jedoch kontrovers diskutiert, ob p38 MAPK $\alpha$  eine vorteilhafte oder schädliche Funktion übernimmt. Unter anderem zeigen Studien mit einer Myokardischämie in Maus- und Rattenmodellen, die p38 MAPK $\alpha$ -Inhibitoren verwendeten, dass die Inhibition der p38 MAPK die kardiale Funktion verbesserte (See et al., 2004) und es nur zu einem abgeschwächten kardialen *Remodeling* im Rahmen der ausgelösten Myokardischämie kam (Liu et al., 2005). Diese Studien lassen zunächst vermuten, dass p38 MAPK $\alpha$  eine schädliche Rolle bei kardialen *Remodeling*-Prozessen zukommt und sich pathologische Zustände durch die Aktivierung der Kinase verschlimmern. Es finden sich jedoch auch Hinweise für eine protektive Rolle von p38 MAPK $\alpha$  im Rahmen einer erhöhten Nachlast.



Nishida et al. untersuchten die Rolle von p38 MAPK $\alpha$  anhand eines KO-Mausmodells bei dem es durch eine experimentell ausgelöste transversale Stenosierung der Aorta (*transverse aortic constriction*, TAC) zu einer erhöhten Nachlast des Herzens kommt. Beobachten ließ sich eine schützende Funktion von p38 MAPK $\alpha$  in Kontrolltieren. Sowohl Kontroll- als auch KO-Tiere entwickelten zwar eine kardiale Hypertrophie, jedoch kam es nur in KO-Tieren zu einer massiven kardialen Fibrose, Dilatation des linken Ventrikels und Apoptose von Kardiomyozyten (Nishida et al., 2004). Hieraus schlossen die Autor\*innen auf eine protektive Rolle im Rahmen einer erhöhten Nachlast. Weitere Hinweise auf eine vorteilhafte Rolle der p38 MAPK $\alpha$  im Herzen im Rahmen einer kardialen Druckbelastung lassen sich aus den Ergebnissen von Braz et al. ableiten. p38 MAPK $\alpha$  KO-Mäuse zeigten nach Einengung der abdominalen Aorta eine signifikant höhere kardiale Hypertrophie als Kontrolltiere (Braz et al., 2003). Gleichwohl es Evidenz für eine schädliche als auch für eine schützende Funktion von p38 MAPK $\alpha$  gibt, bleibt die genaue Rolle im kardialen Gewebe zum aktuellen Zeitpunkt noch ungeklärt und bedarf weiterer Forschung sowohl mittels p38 MAPK $\alpha$ -Inhibitoren, als auch mittels transgener Mausmodelle.

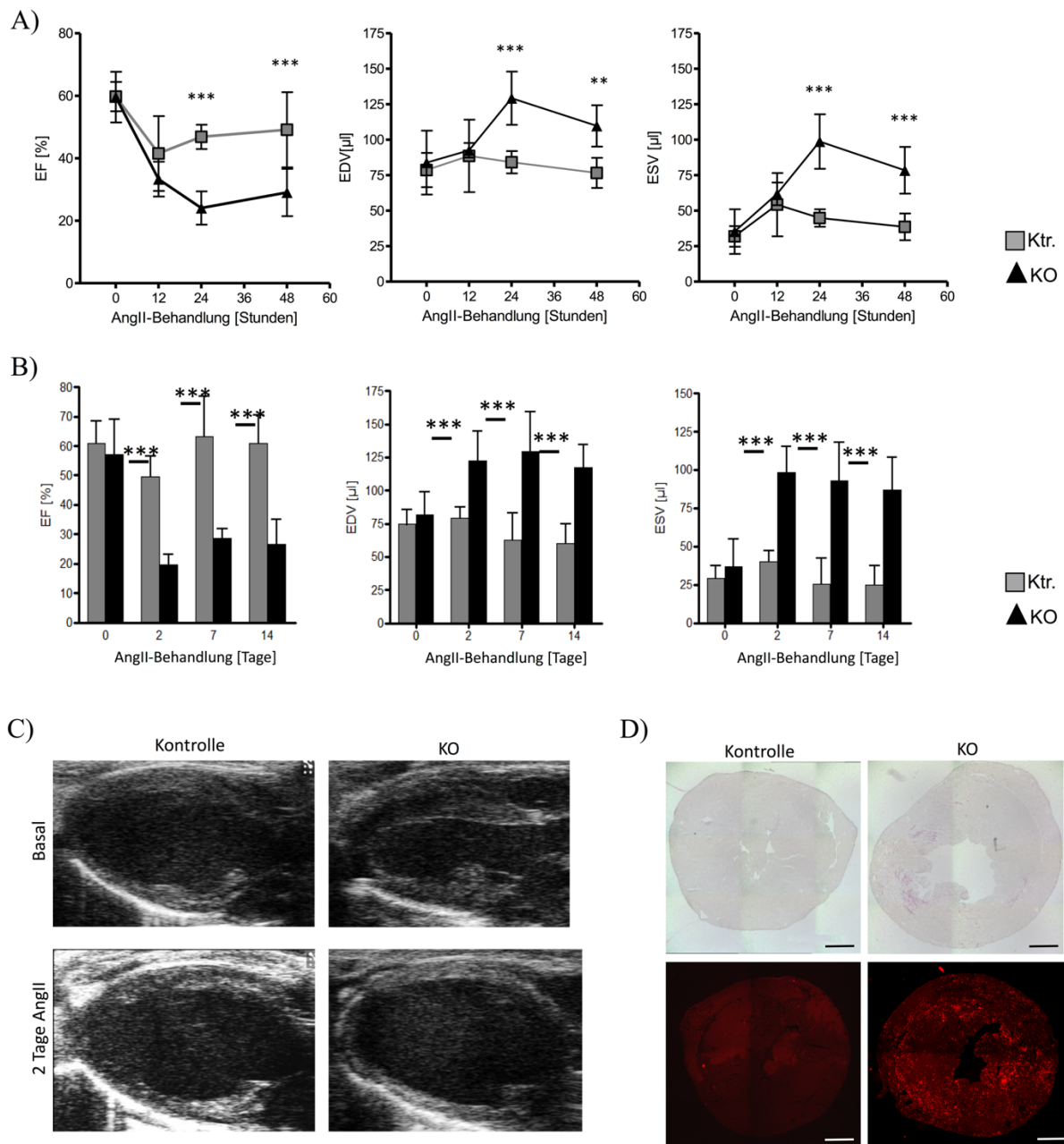
### 1.3 Phänotyp der p38 MAPK $\alpha$ KO-Modelle

Um die Rolle der p38 MAPK $\alpha$  im Rahmen von pathologischen Formen der kardialen Hypertrophie auf Ebene der Genexpression zu untersuchen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei KO-Mausmodelle untersucht. Bei den KO-Modellen handelt es sich einerseits um einen konstitutiven KO, der sich unter dem SM22 $\alpha$ -Promotor in Kardiomyozyten und glatten Gefäßmuskelzellen manifestiert (SM22p38 MAPK $\alpha$  KO) und andererseits um einen induzierbaren und Kardiomyozyten-spezifischen KO (iCM p38 MAPK $\alpha$  KO) (nähere Erläuterung in Kapitel 2.4).

Um das Herz einer erhöhten Nachlast auszusetzen, wurde Angiotensin II (AngII) verabreicht. AngII ist unter anderem an der Modulation der Kontraktionskraft des Herzens, an *Remodeling*- und Wachstumsprozessen sowie an Apoptosevorgängen beteiligt (Rosenkranz, 2004). Die Gabe von AngII über einen längeren Zeitraum und in höherer Konzentration als physiologisch vorhanden (1,5 $\mu$ g/g/Tag) führt zu einer Vasokonstriktion und somit zu einem erhöhten Blutdruck (Crowley et al., 2006). Durch Gabe von AngII mithilfe osmotischer Minipumpen entwickeln Tiere beider KO-Modelle eine dilatative Kardiomyopathie. Beide KO-Modelle zeigen einen deckungsgleichen Phänotyp, der sich bereits nach 2 Tagen der AngII-Behandlung manifestiert (Bottermann et al., unveröffentlichte Daten) und sich wie folgt charakterisieren lässt:

- Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie
- Einlagerung von Lipidtröpfchen in Kardiomyozyten
- Einwanderung von neutrophilen Granulozyten

Kontrolltiere dagegen weisen keine Einschränkungen der Herzfunktion und -struktur auf, wie sich anhand der unveränderten Parameter des enddiastolischen und endsystolischen Volumens, sowie anhand der Ejektionsfraktion zeigt (Abb. 4). Unter basalen Konditionen lassen sich keine signifikanten Unterschiede in den herzspezifischen Parametern zwischen KO und Kontrolltieren feststellen. Bereits nach 2 Tagen der AngII-Behandlung spiegelt sich in den herzspezifischen Parametern die dilatative Kardiomyopathie mit einer insuffizienten Pumpleistung wieder. Dies ist ebenfalls in den echokardiographischen Aufnahmen makroskopisch erkennbar. Abbildung 4 veranschaulicht darüber hinaus die Einlagerung von Lipidtröpfchen, detektiert mittels *Fettrot*-Färbung, und die Markierung von Granulozyten mithilfe der Ly6G-Immunfluoreszenz-Färbung. Aufgrund dieser Beobachtungen und um die Rolle der p38 MAPK $\alpha$  in der frühen Adaptationsphase zu untersuchen, wurde die Genexpressionsanalyse nach 2 Tagen der AngII-Behandlung durchgeführt.



**Abb. 4: Charakterisierung des Phänotyps.** Sowohl der SM22p38 MAPKα KO Phänotyp als auch der iCmp38 MAPKα KO Phänotyp zeichnen sich durch eine dilatative Kardiomyopathie aus, die sich anhand der Herzfunksionsparameter von KO- im Vergleich zu Kontrolltieren nachweisen lässt. A) Herzfunksionsparameter (Ejektionsfraktion (EF), enddiastolisches Volumen (EDV) und endsystolisches Volumen (ESV)) von KO- im Vergleich zu Kontrolltieren des iCmp38 MAPKα KO-Modells. Daten als Mittelwert ± SD; \*\*\*, p<0.001. B) Herzfunksionsparameter (EF, EDV und ESV) von KO- im Vergleich zu Kontrolltieren des SM22p38 MAPKα KO-Modells. Daten als Mittelwert ± SD; \*\*\*, p<0.001. C) Ultraschallbilder von iCmp38 MAPKα Kontroll- und KO-Tieren unter basalen Bedingungen und nach 2 Tagen der AngII-Behandlung. Die dilatative Kardiomyopathie der KO-Tiere ist bereits nach 2d der AngII-Behandlung echokardiographisch erkennbar. Diese lässt sich auch im SM22p38 MAPKα KO-Modell nachweisen (hier nicht abgebildet). D) *Fettrot*-Färbung (obere Zeile) und Anti-Ly6G-Immunfluoreszenzfärbung (untere Zeile) von SM22p38 MAPKα KO- und Kontrollherzen nach 48 Stunden der AngII-Behandlung (modifiziert nach Bottermann et al., unveröffentlichte Daten). Die *Fettrot*-Färbung weist eine Einlagerung von Lipidtröpfchen in Kardiomyozyten nach. Mit der Immunfluoreszenzfärbung lässt sich die Einwanderung von Granulozyten nachweisen. Die echokardiographischen und histologischen Untersuchungen wurden in beiden KO-Modellen von Dr. med. Katharina Bottermann durchgeführt und zeigen einen deckungsgleichen Phänotyp.

## 1.4 Genexpressionsanalyse

Das Genom, die Gesamtheit der Erbinformation, enthält tausende von Genen und definiert den Genotyp eines Organismus. Dabei kommt jedoch nur ein Bruchteil im Phänotyp zur Erscheinung und zwar der Teil der Gene, welche exprimiert werden. Man spricht dabei vom sogenannten Expressionsmuster. Wird ein Gen exprimiert, so bedeutet dies, dass *messenger*-RNA (mRNA) gebildet wird. Durch Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren, mechanische Veränderungen, Hypoxie und viele andere Signale kann sich dieses Expressionsmuster verändern. Einen Phänotyp auf Ebene der Genexpression zu untersuchen und die verantwortlichen Gene zu identifizieren steht häufig im Fokus aktueller Forschung, da man sich auf molekularer Ebene Angriffspunkte verspricht, um so beispielsweise das Auftreten von Krankheiten zu verhindern. Zur Klärung der *in-vivo*-Funktion eines Zielmoleküls, kann es sinnvoll sein Genexpressionsanalysen durchzuführen, bei denen die relative Menge an mRNA von zwei oder mehreren experimentellen Bedingungen verglichen werden. Dabei stehen verschiedene Methoden der Genexpressionsanalyse zur Verfügung, die auf dem Prinzip der Hybridisierung von Nukleinsäureeinzelsträngen beruhen. Häufig ist es sinnvoll eine semiquantitative Methode zur Massendatenerfassung, wie die Microarray-Analyse, mit der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zu kombinieren, die eine hohe quantitative Genauigkeit gewährleistet.

### qPCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine gängige Methode zur Genexpressionsanalyse dar. Erstmals publiziert wurde die Methode 1985 (Saiki et al., 1985) und für die Entwicklung wurde Kary Mullis 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Ursprünglich entwickelt, um ausgewählte DNA-Sequenzen *in-vitro* zu vervielfältigen gelang wenig später die quantitative Analyse der Produktbildung in Echtzeit (auch *real-time* PCR genannt, qPCR) (Higuchi et al., 1993). Durch Zugabe von Ethidiumbromid, bei dem es sich um einen Farbstoff handelt, der in doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert und dabei sein Absorptionsspektrum verändert, konnte die Amplifikation der DNA-Produkte mittels Fluoreszenzmessung in Echtzeit gemessen werden. Heutzutage wird hierzu unter anderem der Farbstoff SYBR Green genutzt, ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff. Sobald sich der Farbstoff in die doppelsträngigen DNA-Moleküle einlagert, steigt die Fluoreszenz an und korreliert mit der Menge an Amplifikationsprodukt. Um die Expression eines Zielgens mittels qPCR quantifizieren zu können, muss die zu quantifizierende mRNA zunächst in die sogenannte *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies gelingt mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Die

cDNA dient anschließend als Ausgangsmaterial der qPCR, die auf dem Prinzip der exponentiellen Vervielfältigung beruht. Die exponentielle Vervielfältigung ist entscheidend, da hierdurch die rechnerische Bestimmung der Ausgangsmenge an cDNA und damit die Bestimmung der Expression des Zielgens möglich wird.

Um die Expression mehrerer Gene miteinander vergleichen zu können und um globale methodische Fehler, wie beispielsweise Messungenauigkeiten bei der photometrischen Quantifizierung oder Pipettierungenauigkeiten, auszugleichen, ist eine Normalisierung auf ein Referenzgen notwendig. Dabei handelt es sich um Gene, die konstitutiv exprimiert werden und unabhängig von äußeren Einflüssen stabil exprimiert werden. Häufig handelt es sich dabei um Gene, die Strukturproteine oder Enzyme von Grundstoffwechselprozessen kodieren. Als klassische Referenzgene gelten beispielsweise Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh), Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (Hprt) und Laktatdehydrogenase (Ldh). Da die qPCR heute eine so gängige Methode ist und in der Literatur viele Referenzgene als allgemein anerkannt gelten, wird die Validierung der Referenzgene heute teilweise übergangen, stellt jedoch eine notwendige Voraussetzung für aussagekräftige Ergebnisse durch qPCR-Analysen dar (Godecke, 2018).

## **1.5 Ziel der Arbeit**

Zusammenfassend wissen wir heute, dass die p38 MAPK $\alpha$  eine wichtige Rolle im Rahmen von pathologischen Hypertrophieprozessen des Herzens und in zahlreiche Regulationswegen auf Ebene der Genexpression involviert ist. Ob die Funktion der p38 MAPK $\alpha$  jedoch eine schützende oder schädigende Funktion übernimmt, wenn das Herz einer erhöhten Nachlast ausgesetzt ist, bleibt Gegenstand aktueller Forschung.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte der p38 MAPK $\alpha$  im Kontext erhöhter Druckbelastung auf Ebene der Genexpression zu untersuchen. Dazu sollen zunächst Genexpressionsanalysen des gesamten Genoms beider KO-Modelle mittels Microarray-Technik erfolgen und anschließend ausgewählte Gene mittels qPCR im Zeitverlauf von 0-48 h nach Start der AngII-Behandlung untersucht werden.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 verwendete Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung und Firma
Analysewaagen	PCB Präzisionswaage (Kern), PE 3600 (Mettler-Toledo), Feinanalysewaage BP 121S (Sartorius)
Eismaschine	Brucheismaschine (Ziegra)
Kühl- und Gefrierschränke	-80°C Gefrierschrank UltimaII (Revco/Thermo Fisher) -20°C Gefrierschrank comfort (Liebherr) -20°C Privileg (Super Energiesparer, Senator)
Minizentrifugen	Technico (Mini), Roth (Rotilabo)
PCR-Maschine	StepOne Plus Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)
Pipetten	Pipetman 10-1000µl (Gilson)
Spektralphotometer	Nanodrop ND 1000 (peqlab)
Stickstofftank	<i>Arpege 110</i> (Air Liquide)
<i>Tissue Ruptor</i>	<i>TissueRuptor</i> (Qiagen)
Tischzentrifugen	5417R, 5810R (Eppendorf)
Vortexer	<i>Vortex-Genie 2</i> (Scientific Industries)

**Tabelle 1: Verwendete Geräte**

### 2.2 verwendete Kits

Kit	Firma
<i>RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit</i>	Qiagen
<i>RNeasy Kit</i>	Qiagen
<i>QuantiTect Reverse Transcription Kit</i> (#205313)	Qiagen
Maxima SYBR Green/ROX 2x qPCR Master Mix (#K0223)	ThermoFisher Scientific

**Tabelle 2: Verwendete Kits**

## 2.3 Verwendete PCR Primer

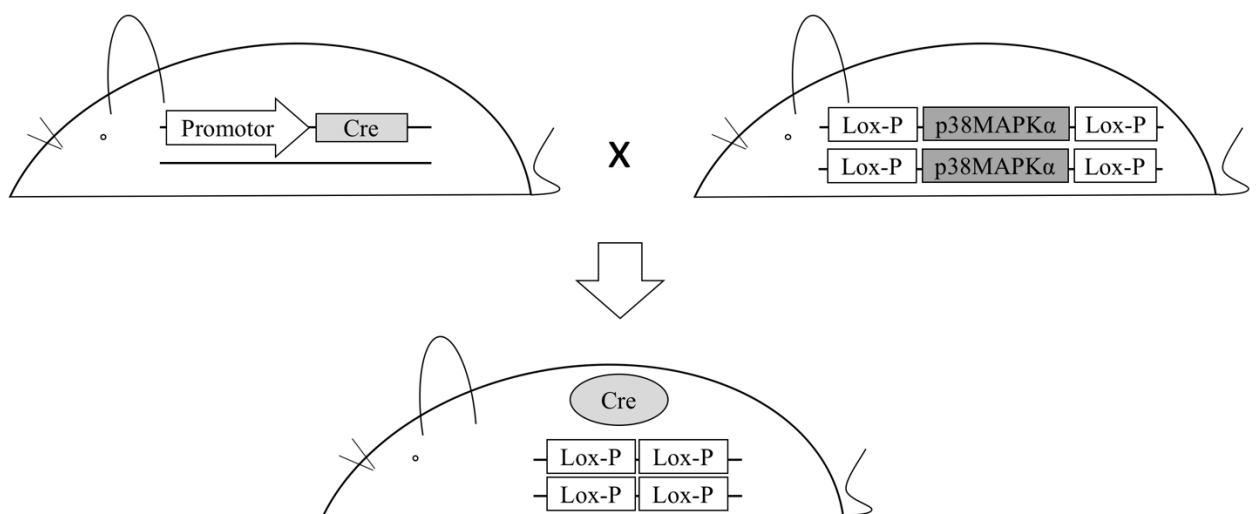
PCR Primer		Sequenz 5' - 3'
Il-6	Fwd	AAGAAATGATGGATGCTACC
	Rev	GAGTTTCTGTATCTCTCTGAAG
Il-1b	Fwd	GGATGATGATAACCTGC
	Rev	CATGGAGAATATCACTTGTTGG
Cxcl5	Fwd	TGTTTGCTTAACCGTAACTC
	Rev	CAGTTTAGCTATGACTTCCAC
Cxcl1	Fwd	AAAGATGCTAAAAGGTGTCC
	Rev	GTATAGTGTTCAGAAGCC
Ccl2	Fwd	CAAGATGATCCCAATGAGTAG
	Rev	TTGGTGACAAAACACTACAGC
Cxcr2	Fwd	CTACTGCAGGATTAAGTTTACC
	Rev	GACGTATATTACAACCACAGC
Slc2a4	Fwd	CAATGGTTGGGAAGGAAAAG
	Rev	AATGAGTATCTCAGGAGGC
Pdk4	Fwd	ACAATCAAGATTTCTGACCG
	Rev	TCTCCTTGAAAATACTTGGC
Pdp2	Fwd	TCTCCAGGGAAGTAAAACC
	Rev	TTTTCAGCCTCGTATCCTC
Ctgf	Fwd	GAGGAAAACATTAAGAAGGGC
	Rev	AGAAAGCTCAAACCTTGACAG
Lox	Fwd	CACCGTATTAGAAAGAAGCC
	Rev	GTCCTTCCTACTTAAGCTAATC
Has1	Fwd	CCTGGTACAACCAAAAGTTC
	Rev	CTCGGAAGTAAGATTTGGAC
Has2	Fwd	GATTATGTACAGGTGTGTGAC
	Rev	CCTCTAAGACCTTCACCATC
Angptl4	Fwd	ATGGAGTAGACAAGACTTCG
	Rev	TCACAGTTGACCAAAAATGG
Lcn2	Fwd	ATATGCACAGGTATCCTCAG
	Rev	GAAACGTTCCCTCAGTTCAG
Nude	Fwd	AGAACTCCAAGCTATCAGAC
	Rev	CTTCAGGATTTCTGTTTCTTC

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten qPCR-Primer der Firma Sigma

## 2.4 Mausstämme und Tiergruppen

Alle Tierexperimente der vorliegenden Arbeit wurden gemäß nationaler Tierschutzrichtlinien durchgeführt und durch das Komitee des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (LANUV, Recklinghausen, Tierversuchsgenehmigung Aktenzeichen: 84-02.04.2014.A220, Nummer: G22014). Für die vorliegende Arbeit war kein Ethikvotum erforderlich. Die Tiere wurden unter Raumtemperatur (20-22°C) und bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Sie hatten stets freien Zugang zu Leitungswasser und Standardfutter. Die Durchführung der Tierversuche, sowie die Organentnahmen erfolgte durch Dr. med. Katharina Bottermann.

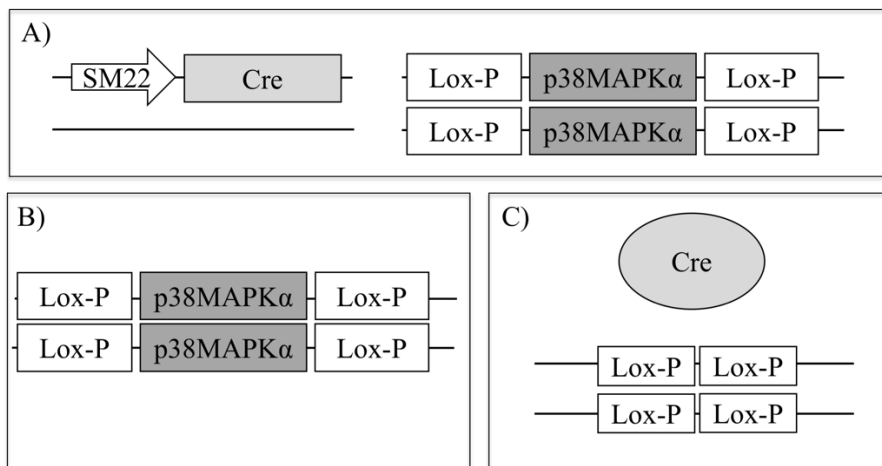
Um Mäuse mit einer gewebsspezifischen Gendeletion der p38 MAPK $\alpha$  (p38 MAPK $\alpha$  KO) zu generieren, wurde das Prinzip des Cre/loxP-Systems (Metzger and Chambon, 2001, Nagy, 2000) verwendet. Es handelt sich dabei um ein Rekombinationssystem, welches mit Hilfe eines Enzyms, der Cre-Rekombinase, gezielt Genabschnitte in ausgewählten Gewebearten entfernen kann. Hierzu werden zwei genetisch veränderte Mauslinien miteinander gekreuzt, wobei eine Mauslinie das gefloxtete Zielgen trägt und die zweite Mauslinie die Cre-Rekombinase exprimiert. Durch Kreuzung der beiden Mauslinien kommt es in der nächsten Generation zu Nachkommen, die sowohl die Cre-Rekombinase exprimieren, als auch das gefloxtete Zielgen enthalten. Bei diesen Tieren kommt es somit zum spezifischen KO des gewünschten Gens. Im Falle der vorliegenden Experimente wurden insgesamt zwei KO-Modelle der p38 MAPK $\alpha$  generiert, die in den weiteren Abschnitten detailliert erklärt werden. Abbildung 5 dient zur Veranschaulichung des Cre/loxP-Prinzips.



**Abb. 5: Illustration zur gewebsspezifischen Gendeletion.** Durch Kreuzung einer Mauslinie mit gefloxtem Zielgen und einer Mauslinie mit Expression der Cre-Rekombinase entsteht eine Mauslinie mit einer gewebsspezifischen Gendeletion der p38 MAPK $\alpha$ .



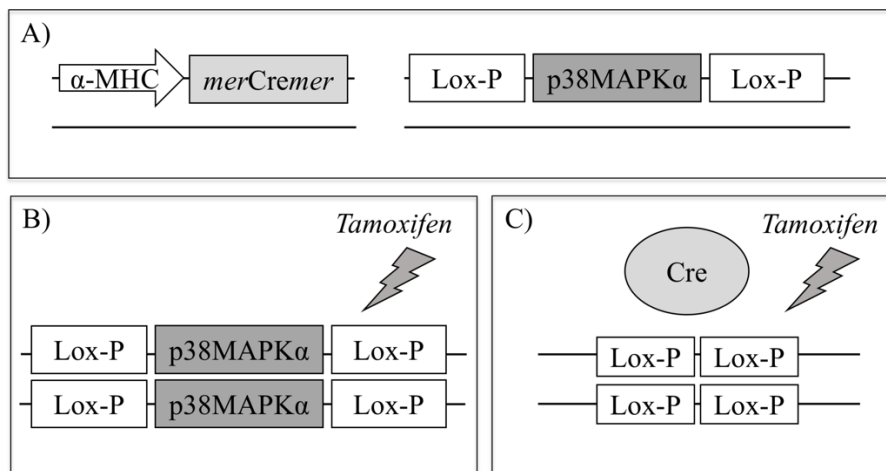
### 2.4.1 SM22p38 MAPK $\alpha$ Mäuse



**Abb. 6: SM22p38MAPK $\alpha$  KO-Modell.** A) Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des SM22-Promotor B) Genotyp der p38flox/flox Wurfgeschwister, welche keine Cre-Rekombinase exprimieren und als Kontrollen verwendet wurden. C) KO der p38MAPK $\alpha$  durch Gendeleation mithilfe des Cre/LoxP-Systems

Zum einen wurden SM22p38MAPK $\alpha$  transgene KO-Mäuse generiert, bei denen die Cre-Rekombinase konstitutiv unter der Kontrolle des SM22-Promotor exprimiert wird. Bei dem SM22-Promotor handelt es sich um einen gewebsspezifischen Promotor für Kardiomyozyten und glatte Gefäßmuskelzellen (C57/B16 Mauslinie, *Klsm22 $\alpha$ -Cre*, Strain Name B6.129S6-*Tagln<sup>tm2(cre)</sup>Yec/J*, Stock Number 006878, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) (Lepore et al., 2005, Zhang et al., 2006). Mäuse dieser Mauslinie wurden anschließend mit Mäusen einer homozygoten Mauslinie gekreuzt, welche eine geflochte p38 MAPK $\alpha$  exprimieren (C57/B16 homozygoten Mauslinie, p38<sup>flox/flox</sup>, Exon 2 and 3) (Ventura et al., 2007). Nachkommen dieser Kreuzung wurden untereinander verpaart, um SM22 $\alpha$ -Cre positive und homozygote p38<sup>flox/flox</sup> Mäuse zu erhalten, die demnach einen Knockout der p38MAPK $\alpha$  in Kardiomyozyten und in glatten Gefäßmuskelzellen aufwiesen. Die p38<sup>flox/flox</sup> Mäuse wurden von M.Pasperakis, Institute of Genetics, Universität Köln, bereitgestellt. Für die vorliegenden Experimente wurden 12 Wochen alte, männliche KO Mäuse verwendet. Als Kontrollen dienten p38<sup>flox/flox</sup> männliche Wurfgeschwister, wie in Abbildung 6 B veranschaulicht ist.

## 2.4.2 iCMp38MAPK $\alpha$ Mäuse



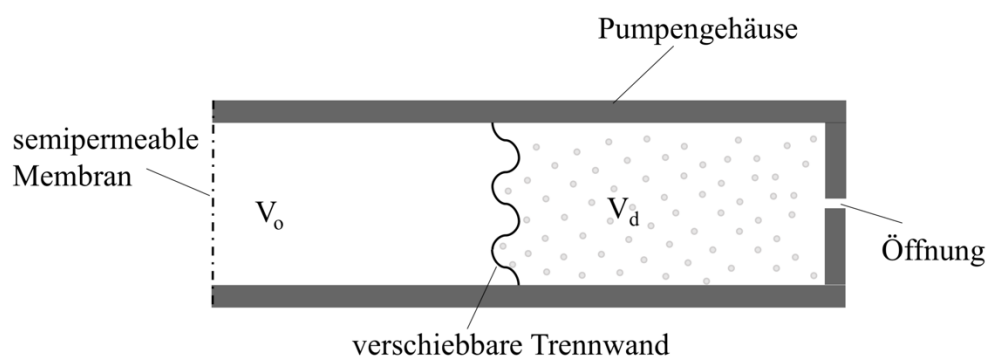
**Abb. 7: iCMp38MAPK $\alpha$  KO-Modell.** A) Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promotor B) Genotyp der p38<sup>flox/flox</sup> Wurfgeschwister, welche keine Cre-Rekombinase exprimieren und ebenfalls mit Tamoxifen behandelt wurden. C) KO der p38MAPK $\alpha$  durch Gendelektion mithilfe des Cre/LoxP-Systems. Im Falle des iCMp38MAPK $\alpha$  KO-Modells wurde der KO erst durch die Behandlung mit Tamoxifen induziert.

Zum anderen wurden iCMp38MAPK $\alpha$  transgene KO-Mäuse generiert, wobei auch hier der KO über das Cre/loxP-System erfolgte. Allerdings handelt es sich hierbei um eine ligandenaktivierbare Cre-Rekombinase. Dies ermöglicht, die Aktivität der Cre-Rekombinase posttranslational zu regulieren (Lukowski et al., 2005). Das Prinzip der modifizierten Cre-Rekombinase beruht darauf, dass erst die Gabe von Hydroxytamoxifen zur Ausbildung des KO führt (Lukowski et al., 2005), da die modifizierte Cre-Rekombinase mit einer mutierten Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors versehen ist und somit erst nach Hydroxytamoxifengabe in den Zellkern einwandern kann, um das Zielgen auszuschalten. Im vorliegenden Modell wurde die modifizierte Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promotor exprimiert, bei dem es sich um einen Kardiomyozyten-spezifischen Promotor handelt. Das heißt, der KO erfolgte lediglich in Herzmuskelzellen und außerdem erst nach Induktion mittels Hydroxytamoxifen. Vorteile dieser Rahmenbedingungen sind einerseits eine hohe Gewebespezifität und andererseits die Induktion des KO nach abgeschlossener embryonaler Entwicklung. Dieser Kardiomyozyten-spezifische und induzierbare KO erfolgte schließlich durch Kreuzung von p38<sup>flox/flox</sup> Mäusen mit heterozygoten Tamoxifen-induzierbarer Cre-Rekombinase *merCremer* (Verrou et al., 1999, Sohal et al., 2001) exprimierenden Mäusen, unter der Kontrolle des  $\alpha$ -MHC Promotor (Heinen et al., 2021). Abbildung 7 dient der Veranschaulichung des erläuterten Verfahrens. Um den KO zu induzieren, wurde den Mäusen über einen Zeitraum von 10 Tagen jeweils 500 $\mu$ g 4OH-Tamoxifen (5mg/ml in Erdnussöl gelöst) intraperitoneal injiziert. Zu Beginn der Induktion waren die Tiere sechs Wochen alt,

anschließend folgte eine Erholungsphase von vier Wochen, bevor anschließend die Experimente durchgeführt wurden. Für die Experimente wurden 12 Wochen alte, männliche KO Mäuse verwendet. Als Kontrollen dienten p38<sup>flox/flox</sup> männliche Wurfgeschwister, welche ebenfalls 500µg 4OH-Tamoxifen intraperitoneal für 10 Tage injiziert bekamen.

## 2.5 AngII-Behandlung

Die Gabe von 1µg/kg/min AngII (Sigma, #A9525) erfolgte über osmotische Minipumpen (*Model 1003D*) über einen Zeitraum von 2 Tagen. Die Funktion der Pumpen basiert darauf, wie das Schema in Abbildung 8 veranschaulicht, dass Wasser als treibende Kraft für die Wirkstofffreisetzung ins umliegende Gewebe genutzt wird. Dabei enthält die Pumpe einerseits ein Kompartiment 1, in dem sich der gewünschte Wirkstoff in gelöster Form befindet ( $V_d$ ) und andererseits ein Kompartiment 2, in dem sich eine osmotisch aktive Flüssigkeit befindet ( $V_o$ ). Letztere ist vom umliegenden Gewebe durch eine semipermeable Membran getrennt, welche für Wasser durchlässig ist. Nach Implantation der Pumpe, welche dann letztendlich in wässrigem Milieu zu liegen kommt, strömt Wasser entlang des osmotischen Gradienten durch die semipermeable Membran. Das Volumen in  $V_o$  dehnt sich aus und es kommt durch einen zunehmenden Druck zur Verschiebung der Trennwand und schließlich zur Freisetzung des gelösten Wirkstoffes ins umliegende Gewebe, da Kompartiment 1 eine Öffnung besitzt. Das einströmende Volumen an Wasser durch die semipermeable Membran entspricht der Menge an abgegebenem Wirkstoff-Volumen, da die Pumpe an sich nicht deformierbar ist. Die Flussrate wird also durch die Permeabilität der semipermeablen Membran bestimmt (Theeuwes and Yum, 1976).



**Abb. 8: Prinzip der osmotischen Minipumpe.**  $V_o$ : Volumen mit osmotisch aktiver Flüssigkeit,  $V_d$ : Volumen mit gelöstem Wirkstoff. Kommt es zum Eintritt von Wasser durch die semipermeable Membran, dehnt sich das Volumen in  $V_o$  aus, wodurch sich Druck auf die verschiebbare Trennwand aufbaut und es schließlich zur Freigabe des gelösten Wirkstoffes ins umliegende Gewebe kommt. Modifiziert nach (Theeuwes and Yum, 1976).

Je nach Pumpenmodell liegt eine unterschiedliche Flussrate vor. Das verwendete Modell 1003D verfügt über eine Rate von 1µl/h bei einer Gesamtfüllmenge von 100µl. Da die Funktion der Pumpe auf dem Osmose-Prinzip beruht, ist eine möglichst vollständige Füllung der Minipumpe

(mindestens 90%) unerlässlich, auch wenn der Versuchszeitraum kürzer als die mögliche Infusionsdauer der enthaltenen Wirkstoffmenge ist. Das Wiegen der Minipumpe vor der Implantation und nach der Explantation ermöglicht die Validierung des Füllzustandes und erfolgte bei jedem Versuchstier. Entsprach der Füllzustand zu Beginn nicht mehr als 90%, so wurde die Pumpe erneut befüllt bevor sie implantiert wurde.

Um die kontinuierliche und zeitnahe Wirkstoffabgabe nach Implantation zu garantieren, mussten die Pumpen zunächst für mindestens 4-6 Stunden bei 37°C inkubiert werden. Direkt im Anschluss wurden die befüllten Minipumpen dann subkutan im Unterhautfettgewebe der Mäuse implantiert. Hierfür wurden die Tiere zunächst mit 2,5%-igem Isofluran volatil anästhesiert, die Nackenregion rasiert, desinfiziert und eine kleine Hautinzision gesetzt. Im Bereich der Hautinzision wurde dann eine subkutane Aussparung stumpf präpariert und die Minipumpe implantiert. Die Wundfläche wurde schließlich mit 4 bis 5 Stichen verschlossen. Die Durchführung der hier beschriebenen Methode erfolgte durch Dr. med. Katharina Bottermann.

## 2.6 Methoden zur Bearbeitung von Nukleinsäuren

### 2.6.1 Probengewinnung

Die Organentnahme erfolgte durch Dr. med. Katharina Bottermann. Anschließend wurden Gewebeproben der Herzspitzen mit einem Maximalgewicht von 30mg (Feuchtgewicht) entnommen und umgehend in 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Das Maximalgewicht wurde nicht überschritten, um eine optimale RNA-Gewinnung und Reinheit in den weiteren Schritten zu gewährleisten. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C archiviert.

### 2.6.2 Aufarbeitung/Aufreinigung

Zur Aufarbeitung wurden die gefrorenen Gewebeproben mit 300 µl RNA-Lyse/Bindungspuffer und 1% beta-Mercaptoethanol (*RNeasy-Fibrous Tissue-Mini-Kit*, Qiagen) versehen und anschließend mithilfe des *Tissue Ruptors*, bei dem es sich um eine Art Stabmixer zur Homogenisierung von Gewebeproben handelt, bei Raumtemperatur für 60 Sekunden homogenisiert. Es folgten direkt im Anschluss die weiteren Arbeitsschritte zur Isolierung von mRNA.

### 2.6.3 mRNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mittels des *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Qiagen) und beruht auf einem Verfahren, welches sich der Kombination aus der selektiven Bindungseigenschaft einer Silikagel-Membran und der Mikrosäulenzentrifugationstechnik bedient. Während der mRNA-Isolierung über einer Säule wurde eine Behandlung mit DNase durchgeführt. Im Detail erfolgten nacheinander folgende Arbeitsschritte: Nach der Homogenisierung wurde 590µl RNase freies Wasser und 10µl Proteinkinase K hinzugefügt. Bei 10000g erfolgte eine dreiminütige Zentrifugation. Anschließend wurde der Überstand (ca. 900µl) abgenommen und in ein 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit ½ Volumen an 96% Ethanol (in der Regel 450µl) vermischt. Nach Empfehlung des *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Qiagen) wurden 700µl der Lösung im Anschluss auf eine *RNeasy Mini Spin Säule* (Qiagen) pipettiert, die im Kit enthalten waren. Diese wurde im Anschluss für 15 Sekunden bei 10000g zentrifugiert. Wenn Lösungsmenge übrig war (in der Regel weitere 200µl), wurde die Restmenge erneut auf die Säule gegeben und es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 15 Sekunden. Im nächsten Schritt wurde 350µl des Waschpuffer RW1 (Qiagen) hinzugefügt und für 15 Sekunden zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit der DNase durch Hinzufügen von 10µl DNase-Lösung (Qiagen) und 70 µl RDD-Puffer (Qiagen) und eine

Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Zuletzt erfolgten drei Waschschriffe mittels RW1-Puffer (Qiagen) und RPE-Puffer (Qiagen), wie laut *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* empfohlen. Zuletzt wurde die *RNeasy Mini Spin* Säule in ein 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und die mRNA mit 40µl RNase freiem Wasser von der Säule eluiert. Direkt im Anschluss erfolgte die photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung. Danach wurde die mRNA entweder direkt in cDNA umgeschrieben oder bei -20° gelagert.

#### **2.6.4 Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von RNA**

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe des Spektralphotometer Nanodrop ND-1000 (peqlab) und der zugehörigen Software ND 1000 V.3.2.1. Dabei ermittelte die Software automatisch sowohl die E260 (entspricht der Extinktion bei 260nm) zur Konzentrationsbestimmung als auch den Quotient E260/E280 zur Reinheitsbeurteilung der Probe.

#### **2.6.5 Reverse Transkription**

Mithilfe des *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) wurde die gewonnene mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Zunächst wurde mRNA mit RNase freiem Wasser soweit verdünnt, bis die gewünschte Zielkonzentration für die geplante PCR von 30 ng/µl erreicht war. Anschließend wurde jede Probe von genomischer DNA gereinigt. Hierfür wurden 12µl der verdünnten mRNA mit 2µl *gDNA Wipeout*-Puffer (Qiagen) für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde der Ansatz auf Eis gelagert. Zu den vorhandenen 14µl wurde anschließend 1µl Quantiscript Reverse Transkriptase (Qiagen), 1µl RT-Primer Mix (Qiagen) und 4µl RT-Puffer (Qiagen) hinzugefügt. Das Gemisch wurde durch Vortexen vermischt und es erfolgte die reverse Transkription durch die Inkubation bei 42°C für 15 min. Um die Reaktion schließlich zu beenden, wurde jede Probe für 3 min bei 95°C erhitzt. Bei dieser Temperatur wird die reverse Transkriptase inaktiviert und die Reaktion damit beendet. Die gewonnene cDNA konnte entweder direkt für PCR-Reaktionen genutzt oder bei -20°C aufbewahrt werden.

### **2.7 Genexpressionsanalyse mittels Microarray-Technik**

Mithilfe der Microarray-Analyse ist es möglich in nur einem Experiment die Genexpression von tausenden Genen bis hin zum gesamten Transkriptom eines Organismus simultan zu bestimmen. Dieses Hochdurchsatzverfahren ermöglicht somit eine Massendatenerfassung, gilt jedoch nur als semiquantitative Methode und wird daher häufig mit quantitativ genaueren Methoden wie der qPCR kombiniert. Das Prinzip der Microarray-Technik beruht auf einem Microchip mit einer großen Datenkapazität. Tausende Testfelder innerhalb des Microchips

enthalten jeweils Oligonukleotid-Einzelstränge einer definierten Gen-Sequenz. Diese Microchips werden von verschiedenen Firmen zur Verfügung gestellt. Wird Fluoreszenzmarkierte cDNA hinzugegeben und bindet auf dem Microarray an das komplementäre Oligonukleotid, so kann mit einer hochauflösenden Laserkamera die Absorption der Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden und somit die Expression detektiert werden. Microarray-Analysen zur Genexpressionsanalyse des gesamten Mausgenoms wurden mithilfe des BMFZ (Biologisch-Medizinische Forschungszentrum, Düsseldorf) aus mRNA von SM22p38MAPK $\alpha$  *KO*- und Kontrolltieren unter basalen Bedingungen und nach 48h der AngII Behandlung durchgeführt. Je Gruppe wurden dafür Proben von vier Tieren genutzt (Gruppen: Kontrolle Basal, Kontrolle AngII, *KO* Basal, *KO* AngII). Entsprechend erfolgte aus mRNA der iCmp38MAPK $\alpha$  *KO*- und Kontrolltieren Microarray-Analysen.

Die hierfür verwendete mRNA wurde wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben aufgearbeitet. Anschließend wurde die Konzentration mithilfe des Nanodrop ND-1000 bestimmt und schließlich auf 100 ng/ $\mu$ l verdünnt. Eine mRNA-Qualitätsprüfung erfolgte durch Dr. rer. nat. Rene Deenen (Mitarbeiter des BMFZ Düsseldorf) durch Prüfung der RNA-Integrität mittels des BioAnalyzer 2100 (Agilent). Durch Elektrophorese der ribosomalen RNA (rRNA) werden einzelne rRNA-Fragmente anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Grundsätzlich gilt, dass rRNA schnell in kleine Fragmente abgebaut wird, sobald RNasen im Umfeld vorhanden sind. Der Grad der Degradation lässt sich bestimmen, in dem man ein Verhältnis von langen zu kurzen rRNA-Fragmenten bildet. So lässt sich die *RNA integrity number* (RIN-Wert) bestimmen. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde das Verhältnis der 28S zur 18S gebildet. Es können RIN-Werte zwischen 1 und 10 erreicht werden. Dabei gibt 10 die höchst erreichbare Qualität und 1 das größte Ausmaß an Degradation an. Laut Schroeder et al. weist bereits ein Verhältnis von  $>2$  auf eine hohe Probenqualität hin (Schroeder et al., 2006). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben zeichneten sich alle durch einen RIN-Wert  $>8$  aus. Nach erfolgreicher Qualitätskontrolle wurde die Microarray-Analyse mittels des Agilent *SurePrint G3 Mouse GE 8x60K* Microarray durch Dr. rer. nat. Rene Deenen durchgeführt (Bottermann et al., *in preparation*).

## **2.8 Genexpressionsanalyse mittels qPCR**

Der Ablauf einer qPCR setzt sich aus drei verschiedenen Phasen zusammen. Mit der ersten Phase beginnt die Amplifikation, bei der das Fluoreszenzsignal noch nicht die Grenze des Hintergrundsignals überschreitet. Es folgt die Phase der qPCR, in der der exponentielle Anstieg des gebildeten qPCR-Produktes durch das Fluoreszenzsignal messbar ist und mit diesem quantitativ korreliert. Idealerweise sollte sich das qPCR-Produkt in jedem Zyklus verdoppeln

(exponentielles Wachstum). Durch Verlust an Enzymaktivität und Substraten nimmt in der dritten und letzten Phase der qPCR die Amplifikationsreaktion ab, kommt schließlich zum Erliegen und es bildet sich ein Plateau der Signalintensität (Wilhelm et al., 2003). Das Prinzip der qPCR erlaubt, wie in der Einleitung beschrieben, die Quantifizierung der Ausgangsmenge an DNA, basierend auf der Stärke des Fluoreszenzsignals in der exponentiellen Phase der Amplifikation. In dieser Phase korreliert das Fluoreszenzsignal mit der Menge an synthetisierter DNA. Es können hierfür entweder interkalierende Farbstoffe (beispielsweise SYBR Green) oder fluoreszenzmarkierte Primer (beispielsweise TaqMan) verwendet werden. Die Experimente der vorliegenden Arbeit erfolgten mittels des interkalierenden Farbstoffes SYBR Green 1 (Maxima SYBR Green/ROX 2x qPCR Master Mix, von ThermoFisher Scientific). Die Fluoreszenzsignale der Proben wurden dabei mithilfe der beiliegenden Software ausgewertet. Für die Berechnung der ursprünglichen Menge an cDNA-Transkripten muss dabei ein Schwellenwert (*threshold*) festgelegt werden. Für alle qPCR-Durchläufe der vorliegenden Arbeit wurde der Schwellenwert mittels der StepOne Software v2.2.2 ermittelt und manuell auf den Wert *threshold*=1 gesetzt, da die ermittelten Werte um 1 undulierten. Grundsätzlich gilt, dass der Schwellenwert den Wert an Fluoreszenz beschreibt, an dem sich das Fluoreszenzsignal deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt und sich die DNA-Amplifikation in der logarithmischen Phase mit exponentiellem Wachstum befindet. In dieser Phase führt eine Erhöhung des qPCR-Zyklus um 1 zu einer Verdopplung der DNA-Menge. Mit dem Ct (*cycle threshold*) -Wertes ist dann der qPCR-Zyklus gemeint, an dem dieser Schwellenwert erreicht wird. Für die Auswertung müssen der Ct-Wert und die Effizienz bestimmt werden. Ersterer beschreibt wie bereits erwähnt den Zyklus, an dem ein benutzerdefinierter Schwellenwert der Fluoreszenz innerhalb der logarithmischen Phase erreicht wird. Die Effizienz ist definiert als Prozent der qPCR-Produktzunahme pro Zyklus. Für die qPCR-Messungen der vorliegenden Arbeit wurden als Matrize jene cDNA-Proben verwendet, die wie in Kapitel 1.4 beschrieben hergestellt wurden. Alle Primer, die in den durchgeführten qPCR-Messungen verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgelistet. Es handelt sich dabei um Intron-übergreifende Primer, wodurch die Amplifikation genomischer DNA als Fehlerquelle ausgeschlossen werden kann.

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis angesetzt. Alle Experimente wurden mit dem StepOne Plus Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) System durchgeführt. Dabei erfolgte die Amplifikation der Gene wie folgend beschrieben. Zunächst wurden die Proben auf 95°C für 10 Minuten erhitzt, dies diente der Aktivierung der Taq-Polymerase. Anschließend erfolgten 40 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 60 Sekunden im Wechsel. Im Anschluss



erfolgte die Bestimmung der Schmelzkurve in einem separaten Zyklus. Dieser begann mit 95°C für 15 Sekunden, anschließend 60°C für 60 Sekunden und zuletzt wurde die Temperatur alle 15 Sekunden um 0,3°C angehoben, bis zum Erreichen von 90°C. Zur Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse wurde sowohl die komparative Ct-Methode als auch die X<sub>0</sub>-Methode verwendet (siehe Kapitel 1.6.2).

Für alle Messzeitpunkte und Genotypen liegen biologische Replikate von n=4 vor.

### 2.8.1 SYBR Green

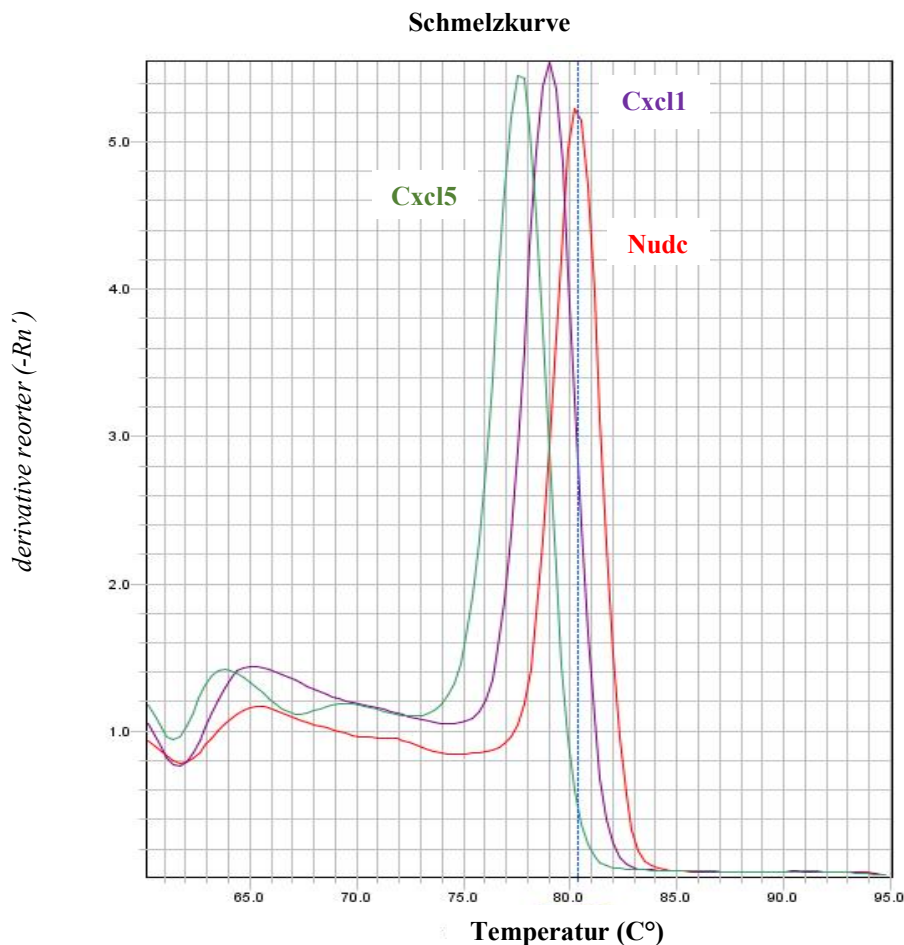
Die Fluoreszenz-Messungen der qPCR-Versuche erfolgten mithilfe des Maxima SYBR Green/ROX 2x qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific). Neben dem interkalierenden Farbstoff SYBR Green 1 enthält der Master Mix (MM) Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase und Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) in einem optimierten qPCR-Puffer. Pro qPCR-Ansatz wurde 10µl des MM verwendet. Diesem wurde 1µl cDNA hinzugefügt, die wie in Kapitel 1.4.5 beschrieben, bereits die gewünschte Zielkonzentration von 30ng/µl enthielt. Zusätzlich wurde jedem qPCR-Ansatz jeweils 0,9µl des *Fwd/Rev* Primer des zu untersuchenden Gens hinzugefügt. Schließlich wurde der Ansatz durch 7,2µl RNase freies Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt. Tabelle 4 veranschaulicht die Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes.

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen (µl)</b>
SYBR Green MM (2x)	10µl
RNase freies Wasser	7,2µl
cDNA [30ng/µl]	1µl
<i>Fwd</i> Primer [450nM]	0,9µl
<i>Rev</i> Primer [450nM]	0,9µl
<i>Gesamtmenge pro Well</i>	<i>20µl</i>

**Tabelle 4: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes.** Die qPCR erfolgte mit 96-Well qPCR-Platten. Jedes Well enthielt dabei einen Ansatz mit 20µl aus den genannten Komponenten.

Die Spezifität der Primer wurde durch die Schmelzkurve (*Melt Curve*) am Ende jeder qPCR validiert. Das Prinzip beruht darauf, dass der Schmelzpunkt jedes Fragments durch seine Länge und spezifische Nukleotid-Zusammensetzung definiert ist. Wenn der spezifische Schmelzpunkt, also die spezifische Schmelztemperatur erreicht ist, liegen 50% der ursprünglich doppelsträngigen DNA als Einzelstränge vor. Wenn alle Fragmente, die durch einen bestimmten Primer detektiert werden, dieselbe Größe haben, zeigt die Schmelzkurve nur einen Peak. Dies deutet darauf hin, dass lediglich das korrekte und gesuchte Transkript während der qPCR

vervielfältigt wurde. Zur Veranschaulichung der Transkriptionsspezifität zeigt Abbildung 9 die Schmelzkurven dreier exemplarisch ausgewählten Primer (Nude, Cxc1, Cxc15).



**Abb. 9: exemplarische Darstellung dreier Schmelzkurven.** Die Spezifität von *Nude* (rot), *Cxc11* (violett) und *Cxc15* (grün) wurde verifiziert durch die Analyse der spezifischen Schmelzkurven. Diese wurde bestimmt durch einem Zyklus beginnend mit 95°C für 15 Sekunden, anschließend 60°C für 60 Sekunden und zuletzt wurde die Temperatur alle 15 Sekunden um 0,3°C angehoben, bis zum Erreichen von 90°C. Für jedes Transkript gibt es eine spezifische Temperatur, abhängig von der individuellen Länge und Nukleotid-Zusammensetzung des Transkripts, bei welcher der Doppelstrang denaturiert und der interkalierende Farbstoff freigesetzt wird. Die Darstellung des *derivative reporter (-Rn')* auf der Y-Achse beruht auf der negativen Ableitung der gemessenen Fluoreszenz ( $R_n$ ), die von der Software während der qPCR identifiziert wurde. Dadurch wird ermöglicht spezifisch für jeden Primer einen Peak bei der Temperatur zu visualisieren, bei der die Änderungsrate der Fluoreszenz am größten ist. Dies ist dann die Schmelztemperatur für den untersuchten Primer. Umso spitzer der Verlauf der Kurve, desto spezifischer wird die gewünschte cDNA mit dem verwendeten Primer amplifiziert.

Jedes Gen wurde während einer qPCR-Messung als technisches Duplikat gemessen und mit einer endogenen Kontrolle, dem Referenzgen, verglichen. Das Referenzgen wurde ebenfalls als technisches Duplikat gemessen. Jede qPCR-Platte (*MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate 0.1 ml* von Life Technologies (#4346907)) beinhaltete außerdem Proben einer Kalibrator-cDNA, um die Messergebnisse verschiedener Platten miteinander vergleichbar zu machen (siehe Kapitel 3.2.2). Die Messungen der Gene in der Kalibrator cDNA erfolgten als technische

Triplette. Zusätzlich enthielt jede Platte eine Negativkontrolle für jeden verwendeten Primer, um eine Verunreinigung des MM oder der Primer mit genomischer DNA oder cDNA auszuschließen.

## 2.8.2 Auswertung

Zwei gängige Methoden zur Auswertung von qPCR-Daten sind komparative Ct-Methode ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) und die  $X_0$ -Methode. Zur quantitativen Analyse der Zielgene in der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode als auch die  $X_0$ -Methode verwendet. Beide Methoden benötigen dabei ein Referenzgen als endogene Kontrolle. Als Referenzgen diente in allen vorliegenden Experimenten *Nucd*, das in Vorversuchen validiert wurde, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Die Auswertung erfolgte bei beiden Methoden mithilfe des *StepOne 2.1* Programm (Applied Biosystems). Wie bereits erwähnt, handelt es sich beim sogenannten Ct-Wert um den Reaktionszyklus, bei dem ein der Schwellenwert erreicht wird. Zu Beginn einer jeden Auswertung wurde der Ct-Mittelwert aus den technischen und biologischen Replikaten gebildet und hieraus die  $\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Zustände (KO vs. Kontrolle, verschiedene Messzeitpunkte) ermittelt.

### Komparative Ct-Methode ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Hierbei handelt es sich um eine relative Quantifizierung der Genexpression. Das Expressionslevel des Zielgens wird zunächst mit Hilfe des Genexpressionslevels des Referenzgens normalisiert und anschließend mit dem gewünschten Zustand (KO vs. Kontrolle, verschiedene Messzeitpunkte) verglichen. Die Auswertung erfolgt demnach anhand eines Verhältnisses und wird als x-fache Änderung (*Fold Change*, FC) angegeben (Livak and Schmittgen, 2001). Der Schwellenwert (*threshold*) wurde durch die StepOne Software v2.2.2 ermittelt und befand sich für alle Messungen um den Wert 1. Der Schwellenwert wurde dann zur finalen Auswertung für alle qPCR-Durchläufe manuell auf *threshold* =1 gesetzt. Für die Berechnung wurde zunächst der  $\Delta Ct$ -Wert durch Subtraktion des Ct-Wertes des Referenzgens vom Zielgen jeder einzelnen Probe gebildet:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

Anschließend wurde der Mittelwert ( $\Delta Ct$ -Mean) verschiedener Proben des gleichen Zustandes (n=4) ermittelt. Der  $\Delta\Delta Ct$ -Wert schließlich errechnete sich durch die Subtraktion verschiedener Zustände (also beispielsweise  $\Delta Ct$ -Mean KO und  $\Delta Ct$ -Mean Kontrolle).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Mean}_{KO}} - \Delta Ct_{\text{Mean}_{Kontrolle}}$$

Das relative Verhältnis (*Fold Change*, FC) des Genexpressionslevels zweier Zustände zueinander wurde dann im letzten Schritt mit der Formel:

$$FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

errechnet. So lässt sich schließlich eine Steigerung oder Abnahme der Expression des Zielgens bei Werten  $\neq 1$  detektieren. Werte  $<1$  wiesen auf eine Abnahme der Expression hin. Durch Bildung des Kehrwertes wurde der FC errechnet. So ergibt sich, dass ein FC von 2 (rote Zwei) eine zweifache Steigerung der Expression und ein FC von 2 (grüne Zwei) eine zweifache Abnahme der Expression darstellt. Aufgrund experimentell bedingter Fluktuationen zwischen den jeweiligen Experimenten, wurden in der vorliegenden Arbeit lediglich Genexpressionsänderungen, die einen FC  $>2$  aufwiesen, berücksichtigt.

### **X<sub>0</sub>-Methode**

Bei der X<sub>0</sub>-Methode wird auf der Basis eines Fluoreszenzwertes X zum Zyklus n auf die ursprünglich in der Probe vorliegende cDNA Menge X<sub>0</sub> zum Zeitpunkt t=0 zurück gerechnet. (Sasse et al., 2003, Thomsen et al., 2010). Die Gleichung lautet:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_{amp})^n$$

- E<sub>amp</sub> ist die Effizienz der qPCR
- n ist die Nummer des Reaktionszyklus
- und X<sub>n</sub> der Wert an cDNA des Reaktionszyklus n

Für die Auswertungen der vorliegenden Arbeit gelten folgende Voraussetzungen:

- E<sub>amp</sub> entspricht dem Wert 1 ( $\cong 100\%$  Effizienz der qPCR)
- X<sub>n</sub>=1: Das bedeutet, dass manuell ein Schwellenwert (*threshold*) gesetzt wurde, für den gilt, dass sich das Fluoreszenzsignal signifikant vom Hintergrundsignal abhebt. Während jedem Versuchsdurchlauf ermittelte die StepOne Software v2.2.2 den Grenzwert, der sich jedes Mal um den Wert 1 befand und schließlich manuell auf den genauen Wert X<sub>n</sub>=1 festgelegt wurde.
- n entspricht dann dem Reaktionszyklus zu dem dieser spezifische Grenzwert erreicht wurde (und entspricht damit dem Ct-Wert)

Unter diesen Voraussetzungen lässt sich X<sub>0</sub> errechnen. X<sub>0</sub> spiegelt dann die ursprüngliche Menge an cDNA in der Probe wieder. Sind also n und X<sub>n</sub> bekannt, so kann mithilfe der oben genannten Formel nach X<sub>0</sub> aufgelöst werden (Thomsen et al., 2010):

$$X_0 = \frac{X_n}{2^n} = \frac{1}{2^{Ct}}$$

Um Änderungen der Genexpression zwischen zwei Zuständen zu identifizieren, wurde dann im letzten Schritt der errechnete X<sub>0</sub>-Wert des Zielgens durch den errechneten X<sub>0</sub>-Wert des

Referenzgens der gleichen Probe dividiert. Hierdurch wurde sowohl die statistische Auswertung zweier Zustände zueinander (Vergleich zwischen zwei Kollektiven, beispielsweise KO vs. Kontrolle) als auch die Analyse des Genexpressionsniveaus über einen Zeitverlauf ermöglicht (Vergleich der Expression nach 24h vs. basalem Messzeitpunkt).

## **2.9 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte durch Bestimmung des Mittelwerts mit der zugehörigen Standardabweichung und wurde mithilfe der Programme Microsoft Office Professional Plus 2013 Excel und Graph Pad Prism 5 durchgeführt. Die statistische Auswertung der Zeitachsen-Analyse erfolgte mit Hilfe von ANOVA. Die Signifikanz wurde mittels t-Test überprüft und bei einem Wert  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

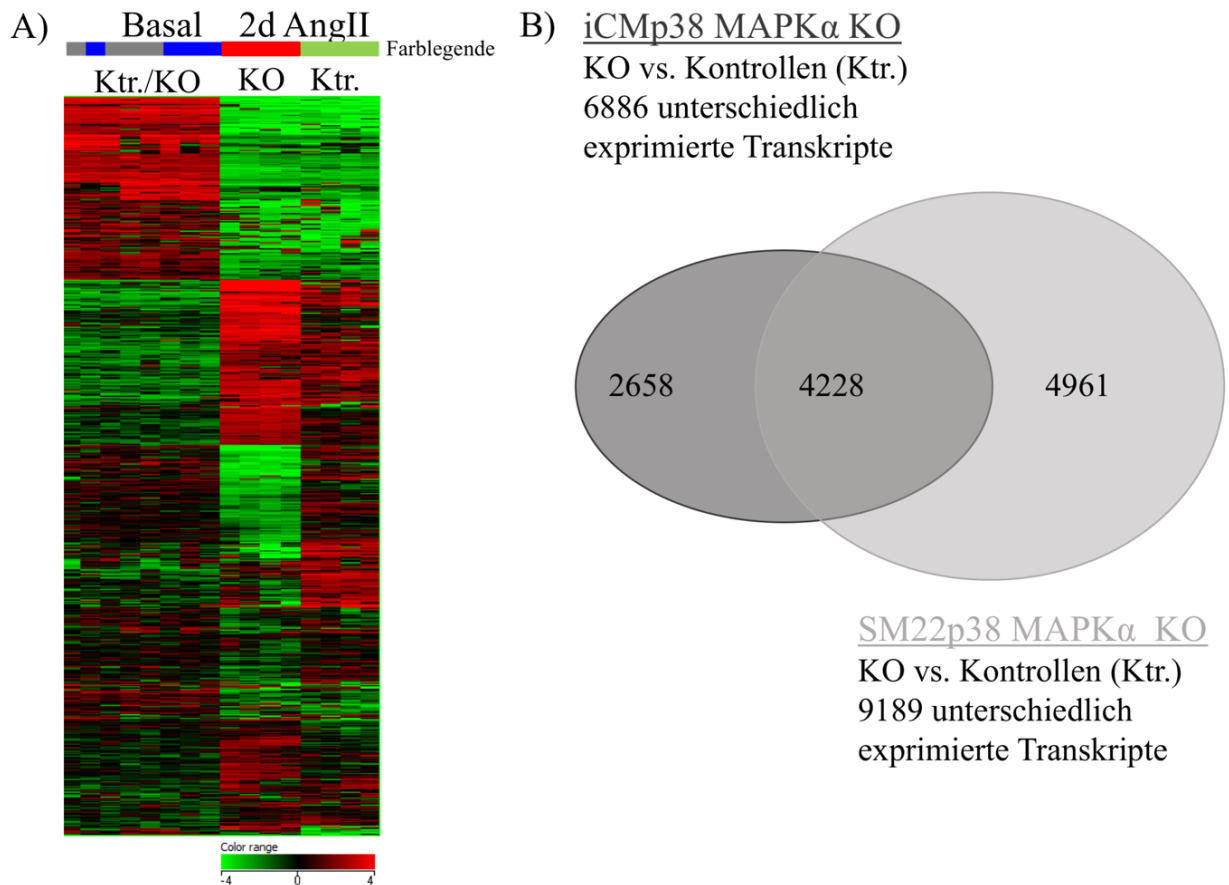
### 3 Ergebnisse

Für alle Versuche der vorliegenden Arbeit gilt, dass die Generierung der Gewebeproben in Kooperation mit Dr. med. Katharina Bottermann und Dr. rer. nat. Lucia Leitner erfolgte. Die Microarray-Analyse erfolgte durch Dr. rer. nat. Rene Deenen, Mitarbeiter des BMFZ (Biologisch-Medizinische Forschungszentrum, Düsseldorf). Die Daten der Mikroarray-Analyse, sowie das validierte Referenzgen wurden für weitere Projekte verwendet, darunter beispielsweise die Dissertationsarbeiten von Dr. rer. nat. Lucia Leitner und Dr. med. Jana Nemmer.

#### 3.1 Genexpressionsanalysen mittels Microarray-Technik

Um die Rolle der p38 MAPK $\alpha$  auf Ebene der Genexpression zu untersuchen und die molekularen Mechanismen hinter dem Phänotyp zu verstehen, wurden zunächst Microarray-Transkriptionsanalysen des gesamten Genoms von Herzgewebeproben durchgeführt. Hierfür wurde, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, mRNA aus Gewebeproben der Herzspitzen von SM22p38 MAPK $\alpha$  und iCmp83 MAPK $\alpha$  KO- und Kontroll-Mäusen gewonnen. Das Genexpressionsprofil der SM22p38 MAPK $\alpha$  KO- und Kontrollen (n=4 pro Zeitpunkt [basal und nach 48h AngII] und Kondition [KO und Kontrolle]) wurde mit Hilfe des Agilent 8x60K Maus-Arrays durch Dr. rer. nat. Rene Deenen erstellt. Gleiches gilt für das Genexpressionsprofil der iCmp38 MAPK $\alpha$  KO- und Kontrollherzproben. Betrachtet man zunächst die Ergebnisse der SM22p38 MAPK $\alpha$ -Microarray-Analyse so weisen Kontrollen 8626 und KO-Proben 18104 signifikant veränderte Transkripte nach AngII-Behandlung im Vergleich zu Basalproben auf. Vergleicht man AngII-behandelte KO- mit AngII-behandelten Kontrollen, so lassen sich 9189 signifikant veränderte Transkripte ( $p < 0.05$ ) detektieren. Legt man einen FC von  $>2$  fest, so lassen sich immer noch 5041 signifikant veränderte Transkripte erfassen. Abbildung 10 A) zeigt exemplarisch die *Heatmap* der SM22p38 MAPK $\alpha$ -Microarraydaten. Hier wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt, das heißt, die Auswertung der einzelnen Transkriptionsprofile erfolgte aufgrund der Ähnlichkeit der gemessenen Genexpressionsveränderungen. Jede Spalte (insgesamt 16) spiegelt die Ergebnisse einer Gewebeprobe wieder und jede Zeile entspricht einem untersuchten Gen. Die Farbskala (*color range*) repräsentiert, inwieweit eine Steigerung der Expression eines Gens (rot) messbar ist oder ob es zu einer Abnahme der Genexpression (grün) kommt. Die *Heatmap* veranschaulicht, dass unterschiedliche Genexpressionsmuster zwischen basalen Bedingungen und nach 2 Tagen der AngII-Behandlung messbar sind. Insgesamt wurden 16 Proben untersucht, vier KO und vier Kontrollproben zum basalen Zeitpunkt (grau und blau abgebildet

in der Farblegende) und vier KO und vier Kontrollproben nach 2d AngII-Behandlung (rot und hellgrün dargestellt in der Farblegende). Es wird deutlich, dass das hierarchische *Clustering* zu keiner klaren Gruppentrennung von Kontroll- und SM22p38 MAPK KO-Herzen führt, also ein sehr ähnliches Genexpressionsprofil festgestellt wurde. Im Gegensatz dazu veranschaulicht das *Clustering* bei genauerer Betrachtung einen deutlichen Unterschied der Genexpression zwischen KO und Kontrollen nach 2 Tagen der AngII-Behandlung. Vergleicht man auch im iCmp38 MAPK $\alpha$  KO-Modell die Genexpression von AngII-behandelte KO- mit AngII-behandelten Kontrollproben, so lassen sich 6886 signifikant veränderte Transkripte ( $p < 0.05$ ) detektieren.



**Abb. 10: Microarray Genexpressionsanalyse des Herzens vor und nach 2 Tagen der AngII-Behandlung**

A) *Heatmap* der Agilent 8x60K Array-Analyse von jeweils 4 KO und 4 Kontrollen (Ktr.) des SM22p38 MAPK $\alpha$ -Modells sowohl unter basalen Konditionen (KO blau dargestellt, Ktr. grau dargestellt) als auch nach 2 Tagen (2d) der AngII-Behandlung (KO rot dargestellt, Ktr. hellgrün dargestellt). Hochregulierte Gene werden rot, runterregulierte Gene grün dargestellt. Die *Heatmap* veranschaulicht, dass bereits die AngII-Behandlung zu einer sichtbaren Veränderung der Genexpression sowohl in KO als auch Ktr. führt. Darüber hinaus zeigt sich aber ein deutlicher Unterschied der Genexpression zwischen KO und Ktr. nach 2d AngII. Unter basalen Bedingungen konnte das Gerät anhand des Expressionsmusters nicht sicher zwischen KO/Ktr. unterscheiden, wogegen sich das Expressionsmuster von KO vs. Ktr. nach 2d AngII deutlich unterscheidet. B) Mengendiagramm der signifikant veränderten Gentranskripte von iCMp38 MAPK $\alpha$  KO vs. Ktr. ( $p < 0.05$ , 6886 Transkripte) nach 2d AngII-Behandlung und SM22p38 MAPK $\alpha$  KO vs. Ktr. ( $p < 0.01$ , 9189 Transkripte) nach 2d AngII-Behandlung. Die Schnittmenge beider Modelle beträgt 4228 signifikant veränderte Gentranskripte.



### 3.1.1 Vergleich der Microarray-Analysen beider Modelle

Da das Ziel dieser Arbeit darin lag, die Rolle der p38 MAPK $\alpha$  im Rahmen erhöhter Nachlast zu untersuchen, waren für die weiteren Überlegungen vor allem die Beobachtungen jener Microarray-Daten von besonderem Interesse, welche die Genexpression von AngII-behandelten KO mit AngII-behandelten Kontrollen verglichen. Wie bereits erwähnt, führten beide KO-Modelle zu einem ähnlichen Phänotyp. Abbildung 10 B veranschaulicht, dass sich im SM22p38 MAPK $\alpha$  KO-Modell 9189 und im iCMp38 MAPK $\alpha$  KO-Modell 6886 signifikant veränderte Transkripte detektieren lassen, wenn man die Expressionsspiegel von AngII-behandelten KO- mit AngII-behandelten Kontrollen vergleicht. Durch die Verwendung der Funktion „*Comparison Analysis*“ in dem Softwarepaket *Ingenuity pathway analysis* (IPA, Qiagen) wurde eine gemeinsame Schnittmenge von 4228 differentiell regulierter Gene von beiden Modellen ermittelt. Die Beobachtung, dass beide KO-Modelle zum gleichen Phänotyp führen, der sich durch die Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie, die Einlagerung von Lipidtröpfchen in Kardiomyozyten und die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Herzgewebe auszeichnet, lässt vermuten, dass die verantwortlichen Genänderungen, die den Phänotyp auslösen, innerhalb dieser Überschneidungsmenge zu finden sind.

### 3.1.2 Expressionskinetik ausgewählter Zielgene

Basierend auf den Ergebnissen der Microarray-Analysen wurde im nächsten Schritt der zeitliche Verlauf von Genexpressionsveränderungen mittels qPCR untersucht. Hierfür wurden vor dem Hintergrund des Phänotyps, der sich durch die Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie, der Einlagerung von Lipidtröpfchen und dem Nachweis von entzündlichen Prozessen durch die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten charakterisieren ließ (siehe Kapitel 1.3), 15 Gene ausgewählt. Die ausgewählten Gene sind zum einen in der Literatur dafür bekannt bei den genannten Prozessen eine Rolle zu spielen und wiesen zum anderen in den Microarray-Analysen der iCM- und SM22p38 MAPK $\alpha$  KO Modelle eine gleichförmige veränderte Genexpression auf. Wie Tabelle 5 veranschaulicht, lassen sich die ausgewählten Gene in drei Gruppen einteilen:

- Gruppe 1: Gene, die an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind
- Gruppe 2: profibrotische Gene, die für die extrazelluläre Matrix (EZM) relevant sind
- Gruppe 3: Gene, die den Glukose- oder Fettsäuremetabolismus regulieren

Zielgen	FC	
	iCM	SM22
	Expressionssteigerung/Expressionsabnahme	
<b>Inflammation</b>		
Il1 $\beta$	4,2	12,5
Il6	-	33,1
Cxcl5	6,4	117,9
Cxcl1	-	28,9
Ccl2	-	20,6
Cxcr2	12,9	13,1
Lcn2	7,2	35
<b>EZM Remodeling</b>		
Ctgf	4,4	11,9
Lox	-	31,4
Has1	-	13,5
Has2	-	-
<b>Metabolismus</b>		
Angptl4	4,7	64,7
Pdp2	3	7,9
Pdk4	-	5,11
Slc2a4	6,3	7,6

**Tabelle 5: Microarray-Daten der 15 ausgewählten Gene.** Mithilfe der Microarray-Daten beider KO-Modelle wurde eine Vorauswahl an Zielgenen getroffen. Da die ausgewählten Gene beider Modelle gleiche Regulationstendenzen zeigen, wurden diese anschließend mit Hilfe von qPCR-Messungen untersucht und mittels  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ausgewertet. Die Regulation wurde als FC (*fold change*) angegeben. (rot) symbolisiert eine Steigerung der Genexpression, (grün) eine Abnahme der Genexpression in KO verglichen zu Kontrollproben nach 48h AngII-Behandlung.

## 3.2 Vorversuche

Zur Auswertung der Genexpression mittels qPCR war sowohl die Verifizierung eines geeigneten Referenzgens, als auch die Generierung eines Kalibrators notwendig, bevor der zeitliche Verlauf der Genexpressionsänderungen untersucht werden konnte.

### 3.2.1 Verifizierung eines Referenzgens für die Genexpressionsanalyse

Um Aussagen über die Genexpression einzelner Gene treffen zu können wird grundsätzlich eine interne Kontrolle benötigt, um die gemessenen Signale normalisieren zu können. Gemäß den Ergebnissen der Microarray-Analysen zeigten sich in der Literatur häufig verwendete Referenzgene, wie beispielsweise das Gen der Laktatdehydrogenase (Ldh) oder der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (Hprt), als ungeeignet. Sie waren signifikant dereguliert nach Behandlung mit AngII und somit nicht als Referenzgene in den vorliegenden

Experimenten verwendbar. Das Gen, das für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase codiert, Gapdh, ein ebenfalls häufig verwendetes Referenzgen, zeigte zwar keine signifikanten Genexpressionsveränderungen, konnte aber ebenfalls nicht verwendet werden, da dessen Expressionsspiegel deutlich höher als das der Zielgene lag und dies zu einer deutlichen Fehleranfälligkeit bei der Auswertung der Ergebnisse führen kann. Um also ein geeignetes Referenzgen zu identifizieren, wurden die Ergebnisse der Microarray-Analysen durch Dr. rer. nat. Lucia Leitner nach Transkripten durchsucht, welche eine nahezu unveränderte Genexpression zu allen Zeitpunkten und Konditionen aufwiesen. Fünf solcher potentiell geeigneten Gene stellten das Ribosomale Protein S17 (Rps17), *nuclear distribution* Protein (Nudc), Profilin 2 (Pfn2), Gluthation-S Transferase Z1 (Gstz1) als auch die Casein Kinase 2 beta (Csnk2b) dar. Weitere Untersuchungen, um ein geeignetes Referenzgen unter diesen fünf Genen auszuwählen erfolgten mittels qPCR. Die Genexpression der fünf potentiell geeigneten Referenzgenen wurde in verschiedenen Gewebeproben (Herz, Leber, Niere und Fettgewebe) untersucht. Dabei wurden Herz-, Leber-, Nieren- und Fettgewebeproben sowohl aus je zwei iCM p38 MAPK $\alpha$  KO und zwei Kontrollproben zum basalen Zeitpunkt gewonnen und, wie in Kapitel 1.6 beschrieben, aufgearbeitet. Zusätzlich wurden Herzgewebeproben von je zwei iCM p38 MAPK $\alpha$  KO und Kontrollproben nach 2 Tagen der AngII-Behandlung gewonnen. Dies erfolgte mit dem Ziel, ein geeignetes Referenzgen für verschiedene Gewebe zu validieren, um weitere Projekte im Rahmen der p38 MAPK $\alpha$  Forschung zu ermöglichen. In jeder Versuchsprobe wurde die Genexpression aller fünf Referenzgene gemessen und mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Dabei wurden je zwei Versuchsproben miteinander verglichen und zwei Referenzgene zueinander in Bezug gesetzt. Ein FC nahe 1 zeigte, dass der Expressionsspiegel der potentiell geeigneten Referenzgene, die zueinander in Bezug gesetzt wurden, eine stabile Genexpression aufwiesen. Eine weitere Bedingung für ein geeignetes Referenzgen stellt ein Expressionsspiegel nahe des Expressionsspiegels der Zielgene dar. Von den potenziellen Referenzgenen erfüllte Nudc beide Bedingungen und zeigte eine stabile Expression unter allen Versuchsbedingungen und in allen Geweben, als auch ein Expressionslevel nahe derer der Zielgene. Nudc wurde daher in allen Versuchen der vorliegenden Arbeit als Referenzgen verwendet. Abbildung 11 veranschaulicht exemplarisch Auswertungsergebnisse und zeigt bezüglich Herz-, Leber-, Niere und Fettgewebeproben, dass sich für Nudc und Rps17 jeweils ein FC nahe 1 reproduzierbar nachweisen ließ. Die Verifizierung des Referenzgens Nudc in Leber-, Niere und Fettgewebe wurde für folgende Versuchsreihen der Arbeitsgruppe verwendet. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit war die Verifizierung in Herzgewebeproben entscheidend.

<b>A) Expressionsunterschied KO vs. Ktr. Leber (<math>2^{-\Delta\Delta CT}</math>)</b>					
	Bezug Rps17	BezugCsnk2b	Bezug Pfn2	Bezug Nudc	Bezug Gstz1
Rps17	-	1,35	1,06	<b>1,10</b>	1,26
Csnk2b	<b>1,35</b>	-	1,42	1,49	1,69
Pfn2	1,06	1,42	-	1,04	1,19
Nudc	<b>1,10</b>	1,49	1,04	-	1,14
Gstz1	1,26	1,69	1,19	1,14	-

<b>B) Expressionsunterschied KO vs. Ktr. Niere (<math>2^{-\Delta\Delta CT}</math>)</b>					
	Bezug Rps17	BezugCsnk2b	Bezug Pfn2	Bezug Nudc	Bezug Gstz1
Rps17	-	1,43	1,75	<b>1,13</b>	1,05
Csnk2b	1,43	-	1,23	1,27	1,50
Pfn2	1,75	1,23	-	1,55	1,84
Nudc	<b>1,13</b>	1,27	1,55	-	1,19
Gstz1	1,05	1,50	1,84	1,19	-

<b>C) Expressionsunterschied KO vs. Ktr. Fettgewebe (<math>2^{-\Delta\Delta CT}</math>)</b>					
	Bezug Rps17	BezugCsnk2b	Bezug Pfn2	Bezug Nudc	Bezug Gstz1
Rps17	-	1,16	6,66	<b>1,14</b>	3,37
Csnk2b	1,16	-	5,76	1,01	2,92
Pfn2	6,66	5,76	-	5,85	1,98
Nudc	<b>1,14</b>	1,01	5,85	-	2,96
Gstz1	3,37	2,92	1,98	2,96	-

<b>D) Expressionsunterschied KO vs. Ktr. Herz (<math>2^{-\Delta\Delta CT}</math>)</b>					
		Bezug Csnk2b	Bezug Nudc	Bezug Pfn2	Bezug Rps17
<b>Basal</b>	Csnk2b	-	1,73	1,62	1,60
	Nudc	1,73	-	1,06	<b>1,08</b>
	Pfn2	1,62	1,06	-	1,01
	Rps17	1,60	<b>1,08</b>	1,01	-
<b>2d AngII</b>	Csnk2b	-	1,03	1,15	1,09
	Nudc	1,03	-	1,12	<b>1,12</b>
	Pfn2	1,15	1,12	-	1,26
	Rps17	1,09	<b>1,12</b>	1,26	-

**Abb. 11: Validierung des Referenzgens.** Exemplarische Darstellung der Referenzgenvalidierung von Leber-, Niere, Fettgewebe und Herzproben von iCM p38 MAPK $\alpha$  KO und Kontrolltieren. (rot) entspricht einer Expressionssteigerung, (grün) einer Expressionsabnahme des untersuchten Gens im Vergleich zum Bezugsgen. Insgesamt wurden alle zu validierenden Gene zueinander in Bezug gesetzt und mittels  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. A) Beispielhafte Auswertung von Lebergewebeproben, wobei je ein iCM p38 MAPK $\alpha$  KO verglichen zur Kontrolle ausgewertet wurde und je zwei Referenzgene zueinander in Bezug gesetzt wurden. Entsprechendes Vorgehen für Nierengewebe (B) und Fettgewebe (C). D) zeigt Auswertungen von Herzproben mit Darstellung der Ergebnisse sowohl zum basalen Messzeitpunkt als auch nach 2d der AngII-Behandlung. Für alle erhobenen Versuche gilt, dass Nudc und Rps17 reproduzierbare Ergebnisse mit einem FC nahe 1 zeigten.

### 3.2.2 Generierung eines Kalibrators

Globale methodische Fehler bei der Durchführung von qPCR-Messungen betreffen die Expression aller Gene einer Gewebeprobe und können grundsätzlich durch die Verwendung von Referenzgenen als interne Kontrolle ausgeglichen werden. Unklar bleibt dabei jedoch zunächst, wie stark die Schwankungen zwischen einzelnen Versuchsdurchläufen, also verschiedenen qPCR-Platten, zu gewichten ist. Um die Daten verschiedener qPCR-Durchläufe miteinander vergleichen zu können bedarf es einer Kalibrierung, wodurch eine Eichung aller Versuchsdurchläufe zueinander ermöglicht wird. Hierfür wurde ein Kalibrator entwickelt. Ein RNA-Gemisch aus zwei Herzproben, je ein p38 MAPK $\alpha$  KO und eine Kontrolle, wurde in einem einzigen Ansatz mittels reverser Transkription in cDNA transkribiert, wie in Kapitel 2.6.5 beschrieben. Nur unter der Voraussetzung des Umschreibens in cDNA in einem einzigen Schritt ist gewährleistet, dass die Kalibrator-Messungen jeder einzelnen qPCR-Platte miteinander vergleichbar sind. Die generierte Kalibrator-cDNA wurde anschließend bei jeder qPCR Messung verwendet. Grundsätzlich gilt, ist der *CtMean* des untersuchten Gens der Kalibrator cDNA auf unterschiedlichen Platten identisch, so lassen sich die Ergebnisse der Platten direkt miteinander verrechnen und in Beziehung setzen. Dies war insbesondere für die qPCR-Untersuchungen im zeitlichen Verlauf relevant.

Auf jeder PCR-Platte wurde ein technisches Triplet der Kalibrator-cDNA erstellt, um Fehlerquellen zu minimieren. Die Daten aller Kalibratormessungen wurden gesammelt und auf ihre Reproduzierbarkeit innerhalb der einzelnen qPCR-Messungen für jeden Primer geprüft. Tabelle 6 zeigt dies beispielhaft für Nudc. An Tabelle 6 ist zunächst abzulesen, dass insgesamt 23 qPCR-Messungen zur Datenerhebung der Genexpressionsanalyse im Zeitverlauf erfolgt sind. Nudc wurde dabei als Referenzgen auf jeder Platte und als technisches Triplet in der Kalibrator-cDNA gemessen. Die Analyse der 23 *CtMean*-Werte von Nudc zeigt eine Schwankung des *CtMean* von 2,3 %. Diese Fluktuationen lassen sich durch minimale Pipettierunterschiede zwischen den Versuchsdurchläufen erklären und nicht verhindern. Diese Schwankungen wurden toleriert und nicht weiter in die Berechnungen mit einbezogen. Tabelle 7 veranschaulicht die Standardabweichung aller 15 gemessenen Gene in der Kalibrator-cDNA. Die vorliegenden Ergebnisse dienen zur Validierung der einzelnen Versuchsdurchläufe und zeigten, dass die Messdaten der einzelnen qPCR-Durchläufe miteinander verrechnet werden konnten. So wurde ermöglicht, dass der zeitliche Verlauf der Genexpressionsänderung einzelner Zielgene untersucht werden konnte.

<b>Kalibrator-cDNA</b>				
<b>Datum der qPCR</b>	<b>Primer</b>	<b>CtMean</b>		
30.03.15	Nudc	20,83		
30.03.15	Nudc	20,82		
30.03.15	Nudc	20,49		
31.03.15	Nudc	20,77		
01.04.15	Nudc	21,08		
12.04.15	Nudc	21,18		
13.04.15	Nudc	20,88		
18.04.15	Nudc	20,78		
05.08.15	Nudc	20,84		
05.08.15	Nudc	20,77		
06.08.15	Nudc	21,52		
11.02.16	Nudc	21,83		
13.02.16	Nudc	21,80		
18.02.16	Nudc	21,92		
19.02.16	Nudc	21,85		
20.02.16	Nudc	21,82		
03.03.16	Nudc	21,92		
10.03.16	Nudc	21,57		
11.03.16	Nudc	21,03		
12.10.16	Nudc	21,74		
12.10.16	Nudc	20,79		
12.10.16	Nudc	21,77		
12.10.16	Nudc	21,72		
		<b>M</b>	<b>SD</b>	<b>SD in %</b>
		21,29	0,491370415	2,31

**Tabelle 6: Kalibratoranalyse am Beispiel Nudc.** Pro qPCR-Durchlauf wurde für jeden verwendeten Primer eine Kalibrierung mithilfe der generierten Kalibrator-cDNA durchgeführt. Dies erfolgte durch Tripletmessungen, welche gemittelt wurden (*Ct-Mean*). Um die generierten Daten auf Reproduzierbarkeit zu prüfen und damit die Verrechnung der einzelnen Daten miteinander zu ermöglichen, wurde anschließend eine Analyse aller Kalibratormessungen durchgeführt. Dabei wurden alle Kalibratormessungen des Primers Nudc gemittelt (M, Mittelwert) und die Standardabweichung (SD) bestimmt. Diese betrug 2,31%.

<b>Kalibrator-cDNA</b>			
<b>Primer</b>	<b>M</b>	<b>SD</b>	<b>SD in %</b>
Il1 $\beta$	24,57	0,202471292	0,82
Il6	24,85	0,286489692	1,15
Ctgf	17,59	0,262628119	1,49
Lox	20,11	0,222254841	1,11
Pdk4	18,01	0,238836904	1,33
Pdp2	25,85	0,419378637	1,62
Slc2a4	21,50	0,25916494	1,21
Lcn2	18,66	0,321487047	1,72
Angptl4	20,74	0,243418356	1,17
Cxcl5	22,48	0,27965582	1,24
Cxcl1	22,42	0,224229255	1,00
Cxcr2	24,91	0,250186589	1,00
Ccl2	20,03	0,419929548	2,10
Has1	25,88	0,445151895	1,72
Has2	27,20	0,184184627	0,68
Nudc	21,29	0,491370415	2,31

**Tabelle 7: Kalibratoranalyse der 15 untersuchten Gene und des Referenzgens.** Im Gegensatz zum Referenzgen Nudc, bei dem der Mittelwert (M) der *CtMean*-Werte aus 23 verschiedenen qPCR-Durchläufen gebildet wurde, beruht die Mittelung der restlichen Zielgene auf jeweils 7 qPCR-Messungen. Die Standardabweichung (SD) betrug maximal 2,31 %, sodass die Daten aller erhobene qPCR-Durchläufe als vergleichbar beurteilt wurden und miteinander verrechnet werden konnten, um den zeitlichen Verlauf der Genexpressionsänderungen der einzelnen Zielgene zu messen.

### **3.3 Genexpressionsanalyse im Zeitverlauf von 0-48 h nach Start der AngII-Behandlung**

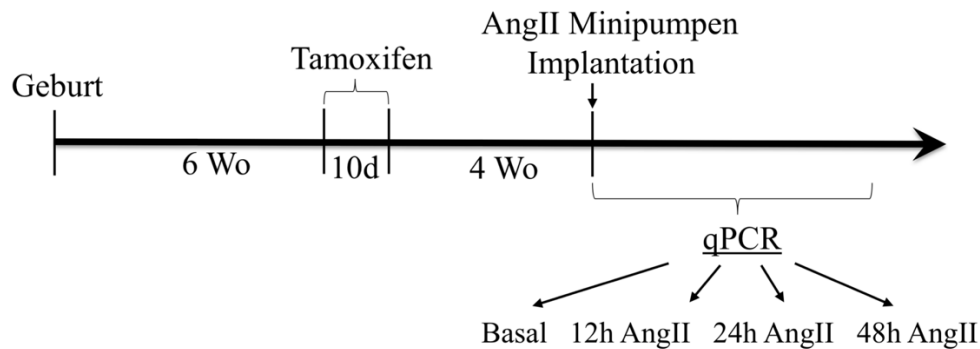
Anschließend wurden weitere Messzeitpunkte festgelegt, um die Genexpression im Zeitverlauf von 0-48 h nach Start der AngII-Behandlung zu untersuchen. Das Ziel lag dabei in der Aufklärung der Rolle von p38 MAPK $\alpha$  während der frühen Adaptationsphase auf eine erhöhte Nachlast. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR-Untersuchungen unter Verwendung von SYBR Green, wie in Kapitel 2.7 beschrieben. Für alle Auswertungen der Genexpressionsanalyse wurde aufgrund von minimalen Pipettierunterschieden zwischen den einzelnen Versuchsdurchläufen ein Cut-off von  $\geq 2$  FC gesetzt. Das heißt, Änderungen des Genexpressionsniveaus mit einem FC  $\leq 2$  wurden als nicht relevant gewertet.

Die Auswertung erfolgte für jedes untersuchte Gen mittels der  $X_0$ -Methode. Um das Genexpressionsniveau über die Zeit darzustellen wurden die Ergebnisse der  $X_0$ -Methode anschließend auf den Mittelwert der Kontrolltiere zum basalen Messzeitpunkt bezogen. Das heißt dieser Mittelwert wurde gleich 1 gesetzt und diente als Bezugspunkt der KO- und Kontrollwerte aller anderen Zeitpunkte. Ein FC von beispielsweise 3 bedeutet demnach eine 3-fache Steigerung der Expression im Vergleich zum basalen Kontrollwert.

Untersucht wurden alle 15 Zielgene im zeitlichen Verlauf unter basalen Konditionen (vor Einsetzen der AngII-Minipumpe), sowie nach 12, 24 und 48 h der AngII-Behandlung (siehe Abb. 12).

Mithilfe von qPCR-Messungen wurden zunächst Genexpressionsanalysen der 15 ausgewählten Gene (Il-1 $\beta$ , Il-6, Cxcl1, Cxcl5, Ccl2, Cxcr2, Angptl4, Pdp2, Pdk4, Slc2a4, Lcn2, Lox, Ctgf, Has1, Has2) von iCmp38 MAPK $\alpha$  KO- und Kontrollherzproben nach 48 h AngII-Behandlung durchgeführt (n=4). Hiermit konnten zunächst die Ergebnisse der Microarray-Analysen, welche ebenfalls Gewebeproben von iCmp38 MAPK $\alpha$  KO- und Kontrolltieren nach 48 h AngII-Behandlung beinhalteten, bestätigt werden.





**Abb. 12: Veranschaulichung der qPCR-Messzeitpunkte.** Zur Analyse der Genexpression von iCmp38 MAPK $\alpha$  KO- und Kontrollen anhand einer Zeitachse wurden 15 Gene zu 4 verschiedenen Messzeitpunkten mittels qPCR untersucht. Ausgehend von einem basalen Messzeitpunkt, welcher dem Zeitpunkt direkt vor Einbau der AngII-Minipumpen (Basal) entspricht, wurde die Genexpression nach 12, 24 und 48 h der AngII-Behandlung untersucht. Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, bekamen alle Tiere nach 6 Wochen Tamoxifen injiziert, das in KO-Tieren den spezifischen KO induzierte. Nach einer Erholungsphase von 4 Wochen begann die Zeitachsenanalyse mit dem basalen Messzeitpunkt.

### 3.3.1 Die Expression von Genen, die an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, zeigt ein Maximum nach 24 h

Die  $X_0$ -Methode erlaubt eine Auswertung der ursprünglich enthaltenen cDNA-Menge und damit die Darstellung des Genexpressionsniveaus verglichen zum basalen Messergebnis. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der  $X_0$ -Auswertung graphisch. Die Genexpression von Il-6 ist in Kontrollen nach 12 h um das 162-fache erhöht und in KO-Proben um das 217-fache. Für Il-1 $\beta$  zeigt sich nach 12 h eine Steigerung der Genexpression um das 5,2-fache in Kontrollen und um das 7-fache im KO. Diese Beobachtung der gleichförmigen Regulation auf Ebene der Genexpression in den ersten 12 h der AngII-Behandlung gilt für alle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit und zeigt, dass iCmp38 MAPK $\alpha$  KO- und Kontrollherzen in den ersten 12 h der AngII-Behandlung in gleicher Weise auf die erhöhte Nachlast reagieren.

Für die Interleukine Il-6 und Il-1 $\beta$  lässt sich darüber hinaus die allgemeine Aussage treffen, dass nach 24 h der AngII-Behandlung ein Maximum der Genexpression in KO-Proben beobachtet werden kann. Dabei ist die Genexpression für Il6 um das 382-fache erhöht und für Il-1 $\beta$  um das 8,8-fache verglichen zum basalen Kontrollwert. Nach 48 h fällt das Genexpressionsniveau von Il-6 im KO auf das 89,8-fache des basalen Kontrollwertes ab. Auch für Il-1 $\beta$  lässt sich nach 48 h eine deutliche Abnahme der Expression mit Annäherung an den Ursprungswert nachweisen. Nach 48 h ist das Expressionsniveau der KO-Proben noch um das 4,5-fache des basalen Kontrollwertes erhöht.

Die Genexpression des Chemokin Cxcl5 (*c-x-c chemokine 5*) hat sich nach 12 h auf das 37,8-fache in Kontrollen und auf das 35,3-fache in KO-Proben erhöht. Nach dieser gleichförmigen

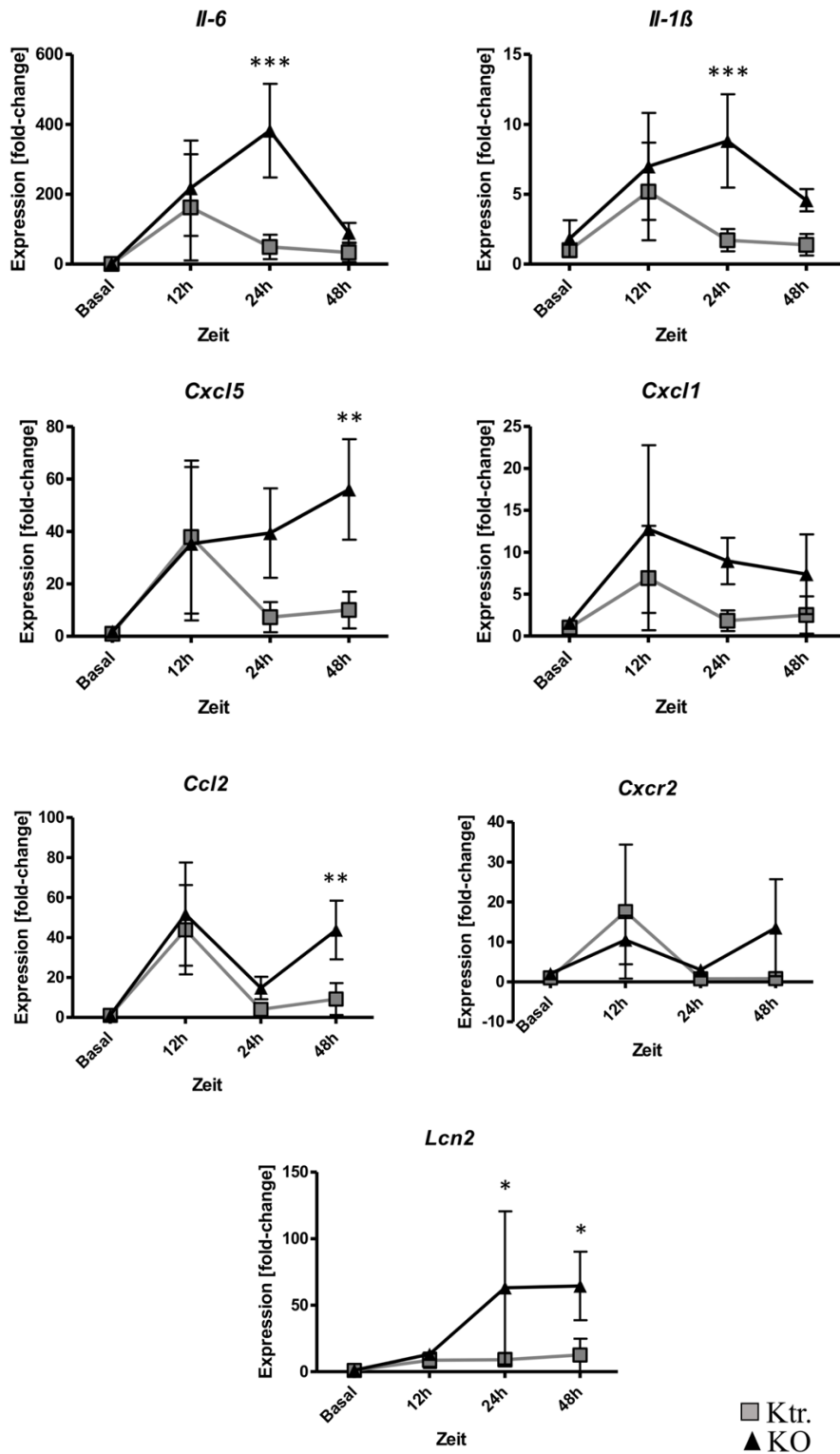
Steigerung der Expression folgt eine Abnahme auf das 7,2-fache des basalen Kontrollwertes, also eine deutliche Tendenz zum Expressionsniveau der basalen Genexpression. In KO-Proben zeigt sich dagegen eine weitere Steigerung der Genexpression auf das 39,3-fache nach 24 h und das 56-fache nach 48 h.

Auch für *Cxcl1* gilt, dass nach 12 h ein Maximum der Expression beobachtbar ist. In Kontrollen ist die Genexpression nach 12 h um das 6,9-fache erhöht verglichen zum Basalwert und in KO um das 12,7-fache. Nach 48 h beträgt das Expressionsniveau in Kontrollen noch das 2,5-fache und in KO-Proben lässt sich noch eine 7,3-fach erhöhte Genexpression nachweisen.

Sowohl in *iCmp38 MAPK $\alpha$*  KO-Tieren, als auch in Kontrollen ist das Genexpressionsniveau von *Ccl2* in den ersten 12 h zunächst deutlich hochreguliert. In Kontrollen liegt eine Steigerung der Expression um das 43,9-fache und im KO um das 51,7-fache verglichen zum basalen Kontrollmesswert vor. Anschließend fällt das Expressionsniveau nach 24 h sowohl in Kontrollen (auf das 4-fache) als auch in KO-Proben (auf das 14-fache) ab. Im Anschluss steigt der Messwert im KO dann erneut an, sodass nach 48 h ein Expressionsniveau gemessen wird, dass um das 43,7-fache erhöht ist im Vergleich zum basalen Messzeitpunkt.

Die Genexpression von *Cxcr2* zeigt nach 12 h eine Steigerung der Expression um das 17,5-fache in Kontrollen und 10,5-fache in KO-Proben. Nach 24 h ist das Expressionsniveau in Kontrollen auf das Ausgangsniveau gefallen und bleibt dort auch nach 48 h stabil und unverändert. In KO-Proben liegt das Genexpressionslevel nach 24 h nur noch um ein 2,9-faches höher als zum basalen Kontrollmesszeitpunkt und ist demnach ebenfalls deutlich gesunken. Jedoch zeigt sich nach 48 h eine erneute Steigerung der Genexpression auf das 13,5-fache.

Die Genexpression von *Lcn2* weist nach 12 h eine Steigerung der Expression in Kontrollen auf das 8,5-fache und in KO-Proben auf das 13,1-fache auf. Die Genexpression in Kontrollen steigt im weiteren Verlauf nur geringfügig und weist nach 24 h eine 9-fache und nach 48 h eine 12,5-fache Steigerung auf. Im KO lässt sich dagegen eine 63-fache Steigerung der Expression nach 24 h und eine 64,5-fache Steigerung nach 48 h nachweisen.



**Abb. 13:** graphische Darstellung der untersuchten inflammatorischen Gene mittels qPCR und unter Auswertung mit Hilfe der  $X_0$ -Methode. Die Genexpression der Interleukine Il6 und Il1 $\beta$ ; der Chemokine Cxcl5, Cxcl1, Ccl2; des Chemokinin-Rezeptors Cxcr2 und des proinflammatorischen Glykoproteins Lcn2 wurde von iCM p38 MAPK $\alpha$  KO (schwarz) und iCM p38 MAPK $\alpha$  Kontrollen (grau) unter basalen Bedingungen, sowie nach 12 h, 24 h und 48 h der AngII-Behandlung gemessen. Jeder Messwert wurde auf den Mittelwert der basalen Kontrolltiere normalisiert, welcher als Bezugspunkt den Wert 1 annimmt. Der *Fold change* beschreibt dann die x-fache Änderung der Genexpression verglichen zum basalen Kontrollwert. Daten entsprechen Mittelwert  $\pm$  SD, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  ( $n=4$  pro Messpunkt).

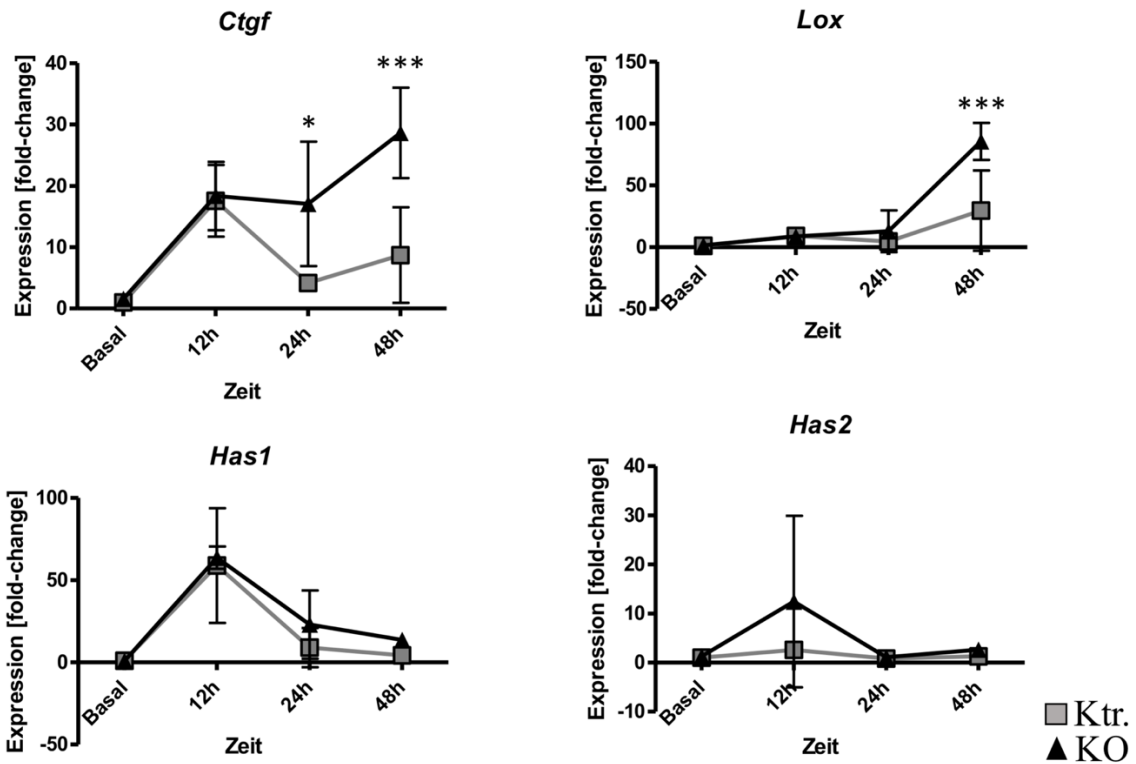
### **3.3.2 zeitlicher Verlauf der Genexpression profibrotischer Zielgene: signifikante Steigerung der Expression von Ctgf und Lox nach 48 h der AngII-Behandlung**

Im Falle von Ctgf konnte eine Steigerung der Expression nach 12 h auf das 17,5-fache in Kontrollen bzw. das 18,3-fache in KO-Proben detektiert werden. Mithilfe der  $X_0$ -Methode konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass innerhalb der ersten 48 h das Expressionsniveau von Ctgf in KO-Proben steigt, wohingegen sich das Expressionsniveau der Kontrollen wieder in Richtung des Ausgangsniveaus reduziert. Nach 48 h liegt das Genexpressionsniveau der Kontrollen noch um das 8,7-fache höher als der basale Kontrollwert. In KO-Proben beträgt das Genexpressionsniveau das 28,6-fache des basalen Kontrollwertes.

Das Expressionsniveau von Has1 zeigt in KO-Proben eine Expressionssteigerung auf das 63,7-fache nach 12 h und sinkt anschließend auf das 23-fache nach 24 h bzw. das 13,7-fache nach 48 h. Auch in Kontrollen ist eine sehr ähnliche Dynamik der Genexpression beobachtbar. Im Vergleich zum basalen Kontrollwert steigt das Genexpressionsniveau auf das 58,9-fache nach 12 h an, fällt nach 24 h auf das 8,9-fache und liegt nach 48 h bei dem 4,2-fachen des basalen Kontrollwertes.

Has2 dagegen scheint deutlich unbeeinflusst durch die Versuchsbedingungen in seiner Genexpression. Die maximale Steigerung der Expression liegt nach 12 h in KO-Proben vor und beträgt das 12,4-fache verglichen zum basalen Kontrollwert. Bereits nach 24 h ist das Genexpressionsniveau in KO-Proben auf das 1,1-fache des basalen Kontrollwertes gesunken und liegt nach 48 h bei dem 2,6-fachen. Das maximale Genexpressionsniveau in Kontrollen wird mit dem 2,6-fachen verglichen zum basalen Kontrollwert nach 12 h erreicht.

Für Lox2 zeigt sich im zeitlichen Verlauf der Genexpression eine deutliche Steigerung nach 48 h auf das 85,6-fache in KO bzw. das 29,5-fache in Kontrollen verglichen zum basalen Kontrollwert. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der  $X_0$ -Auswertung graphisch.



**Abb. 14:** graphische Darstellung der untersuchten profibrotischen Gene mittels qPCR und unter Auswertung mit Hilfe der  $X_0$ -Methode. Die Genexpression von Ctgf, Lox, Has1, Has2 wurde von iCM p38 MAPK $\alpha$  KO (schwarz) und iCM p38 MAPK $\alpha$  Kontrollen (grau) unter basalen Bedingungen, sowie nach 12 h, 24 h und 48 h der AngII-Behandlung gemessen. Jeder Messwert wurde auf den Mittelwert der basalen Kontrolltiere normalisiert, welcher als Bezugspunkt den Wert 1 annimmt. Der *Fold change* beschreibt dann die x-fache Änderung der Genexpression verglichen zum basalen Kontrollwert. Daten entsprechen Mittelwert  $\pm$  SD, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  ( $n=4$  pro Messpunkt).

### 3.3.3 zeitlicher Verlauf der Genexpression: Glukose- und Fettsäuremetabolismus

Da sich der Phänotyp, wie in der Einleitung beschrieben, unter anderem durch eine Einlagerung von Lipidtröpfchen in Kardiomyozyten auszeichnet, wurde ebenfalls die Genexpression von *Angptl4* untersucht. Zum basalen Messzeitpunkt zeigt sich die Genexpression um das 2,8-fache höher in KO-Proben als zum basalen Kontrollwert. Nach 12 h liegt jedoch sowohl in KO-Proben als auch in Kontrollen eine Steigerung der Genexpression von *Angptl4* auf das 6,8-fache in Kontrollen und auf das 11-fache in KO-Proben vor. Nach 24 h sinkt das Genexpressionsniveau der Kontrollen deutlich auf ein 2,6-faches des basalen Kontrollwertes, wogegen es in KO-Proben auf das 11,6-fache erhöht bleibt. Nach 48 h ist das Genexpressionsniveau dann in Kontrollen auf das 1,4-fache des basalen Kontrollwertes gefallen und demnach nicht mehr signifikant erhöht. In KO-Proben bleibt eine Steigerung um das 7,3-fache des basalen Kontrollwertes nachweisbar (Abb. 15).

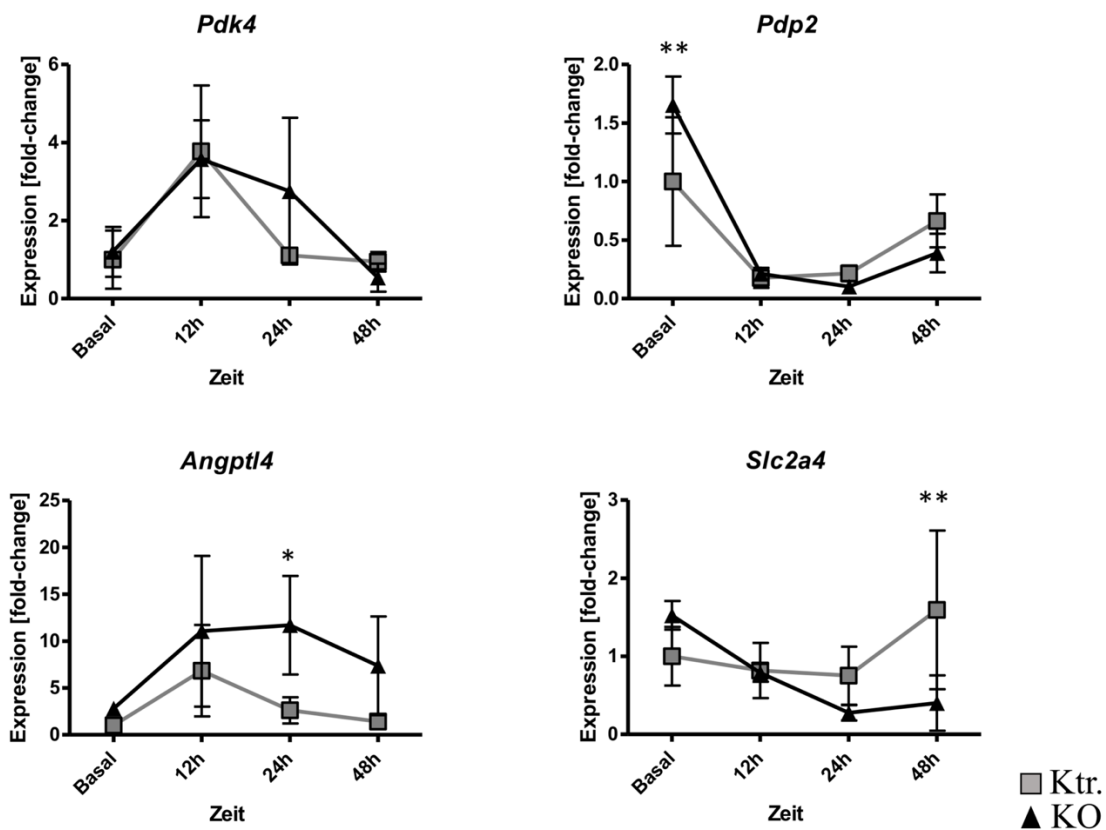
Ähnliche Beobachtungen, wie bereits in Bezug auf inflammatorische und profibrotische Gene wurden auch hinsichtlich des Glukosemetabolismus gemacht. Es zeigt sich in den ersten 12 h eine gleichförmige Regulation der Genexpression in KO und Kontrollen.

Im Falle von *Pdp2* kommt es in den ersten 12 h zu einer gleichförmigen Abnahme in Kontrollen und KO-Proben. Dabei lässt sich in Kontrollen ein 5,6-fach niedrigeres Genexpressionsniveau und in KO-Proben ein 4,7-fach niedrigeres Genexpressionsniveau verglichen zum basalen Kontrollwert nachweisen. Nach 24 h ist das Expressionsniveau von *Pdp2* in Kontrollen noch um das 4,6-fache und in KO-Proben um das 9,7-fache niedriger als zum basalen Kontrollwert. Nach 48 h ist das Genexpressionsniveau in Kontrollen mit einem FC von 1,5 nicht mehr signifikant verändert. In KO-Proben bleibt das Genexpressionsniveau um das 2,5-fache erniedrigt verglichen zum basalen Kontrollwert.

Für *Pdk4* lässt sich eine gegensätzliche Regulation zu *Pdp2* beobachten: Innerhalb der ersten 12 h kommt es zu einer gleichförmigen Steigerung der Expression in Kontrollen und KO-Proben. Mittels der  $X_0$ -Methode zeigt sich im zeitlichen Verlauf eine Steigerung der Expression um das 3,8-fache in Kontrollen und um das 3,6-fache in KO-Proben verglichen zum basalen Kontrollwert. Nach 24 h sinkt das Genexpressionsniveau von *Pdk4* in Kontrollen auf das 1,1-fache verglichen zum basalen Kontrollwert und ist demnach nicht mehr signifikant erhöht. Das Genexpressionsniveau in KO-Proben ist erst nach 48 h auf das Niveau des basalen Kontrollwertes gesunken.

*Slc2a4* codiert für den Glukosetransporter 4. Die Kernbeobachtung nach Auswertung mittels der  $X_0$ -Methode liegt für *Slc2a4* darin, dass nach 48 h eine Steigerung der Expression in Kontrollen um das 1,9-fache und eine Abnahme der Expression um das 2,5-fache in KO-Proben

verglichen zum basalen Kontrollwert ist. Diese gegensätzliche Regulation, bestehend in einer Steigerung in Kontrollen und einer Abnahme der Expression in KO-Proben tritt jedoch erst nach 48 h auf. An dieser Stelle wäre ein späterer Messzeitpunkt von Interesse, um die weitere Entwicklung dieser Regulationstendenzen zu detektieren. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der  $X_0$ -Auswertung graphisch.



**Abb. 15: graphische Darstellung der untersuchten metabolischen Gene mittels qPCR und unter Auswertung mit Hilfe der  $X_0$ -Methode.** Die Genexpression *Pdk4*, *Pdp2*, *Angptl4*, *Slc2a4* wurde von iCM p38 MAPK $\alpha$  KO (schwarz) und iCM p38 MAPK $\alpha$  Kontrollen (grau) unter basalen Bedingungen, sowie nach 12 h, 24 h und 48 h der AngII-Behandlung gemessen. Jeder Messwert wurde auf den Mittelwert der basalen Kontrolltiere normalisiert, welcher als Bezugspunkt den Wert 1 annimmt. Der *Fold change* beschreibt dann die x-fache Änderung der Genexpression verglichen zum basalen Kontrollwert. Daten entsprechen Mittelwert  $\pm$  SD, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  ( $n=4$  pro Messpunkt).

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der p38 MAPK $\alpha$  im Rahmen einer erhöhten Nachlast des Herzens auf Ebene der Genexpression innerhalb von 48 h untersucht. Die erhobenen Daten weisen bezüglich ausgewählter Gene auf eine frühe Induktion kardialer *Remodeling*-Prozesse durch Modulation von Genen des kardialen Glukosestoffwechsels, der Inflammation und der extrazellulären Matrix.

Wesentliche Befunde dieser Arbeit:

- Gene, die im Rahmen einer Immunantwort auf eine erhöhte Nachlast aktiviert werden, weisen in KO-Proben ein Maximum nach 24 h auf. Die inflammatorischen Veränderungen in Kontrollen sind dagegen nach 24 h bereits auf das Basalniveau zurückgefallen, was als Hinweis auf eine protektive Rolle der p38MAPK $\alpha$  im Rahmen inflammatorischer Prozesse als Antwort auf eine Druckbelastung des Herzens gedeutet werden kann.
- Die Steigerung der Expression profibrotischer Gene in KO-Proben mit kontinuierlichem Anstieg innerhalb der ersten 48 h weist bereits auf Expressionsebene auf ein *EZM-Remodeling* hin.
- In Bezug auf den kardialen Stoffwechsel weisen die erhobenen Daten auf einen gesteigerten Glukosestoffwechsel in Kontrollen hin, welcher als Kompensationsmechanismus gedeutet werden kann, um mit der erhöhten Nachlast effizienter umzugehen.

In der folgenden Diskussion sollen jedoch nicht nur die Ergebnisse im Kontext aktueller Forschungsergebnisse diskutiert, sondern auch experimentelle Herangehensweisen kritisch hinterfragt werden. In gründlichen Vorversuchen wurde ein geeignetes Referenzgen identifiziert sowie ein Kalibrator generiert, um eine hohe Reliabilität und Validität zu gewährleisten. Dies ermöglicht letztendlich erst verlässliche qPCR-Analysen, die ohne eine umfassende Prüfung der verwendeten internen Kontrollen nicht möglich sind.

### 4.1 Notwendigkeit der umfassenden Prüfung interner Kontrollnormen

Das Prinzip der PCR hat seit seiner Erfindung im Jahre 1985 weite Bereiche der Forschung revolutioniert. Heutzutage ist die Technik der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) häufig so standardisiert und automatisiert, dass das Gefühl entsteht, es könnten kaum Fehler auftreten. Doch schon 2009 forderten Bustin et al. sogenannte *MIQE*-Richtlinien (*Minimum Information*



*for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*), da sie in zahlreichen Publikationen einen Mangel an experimentellen Angaben fanden, wodurch es unabhängigen Leser\*innen der Studien nicht möglich war, die Qualität der dargelegten Ergebnisse kritisch zu evaluieren (Bustin et al., 2009). Laut der Autor\*innen seien diese Richtlinien ein Minimum an notwendigen Informationen, um qPCR-Ergebnisse ausreichend beurteilen zu können. Unter anderem fordern die Autor\*innen, ausgewählte Referenzgene zunächst zu validieren, da ansonsten eine korrekte Quantifizierung nicht möglich sei. Ein Gen ist dann als Referenzgen geeignet, wenn es eine stabile Expression unter allen experimentellen Konditionen aufweist (Chervoneva et al., 2010). Es gibt Gene, die in der Literatur weitverbreitet und als geeignet gelten. Hierzu gehören unter anderem Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (Gapdh), Lactatdehydrogenase (Ldh),  $\beta$ -Actin, 28S rRNA oder Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (Hprt) (Dheda et al., 2004) (Thellin et al., 1999) (Zhong and Simons, 1999).

Eine Vielzahl an Studien zeigen jedoch, dass die Expression eines geeigneten Referenzgens variieren kann, beispielsweise in unterschiedlichen Geweben oder unter verschiedenen experimentellen Konditionen (Schmittgen and Zakrajsek, 2000, Aerts et al., 2004, Dheda et al., 2004). Es ist demnach unabdingbar für die Generierung aussagekräftiger Ergebnisse, zunächst das gewählte Referenzgen zu validieren. Umso erstaunlicher ist das Ergebnis einer von Guenin et al. durchgeführten Metastudie zu qPCR-Ergebnissen. Die Studie zeigte, dass von 188 veröffentlichten qPCR-Versuchen lediglich 3,2% eine geeignete Validierung der verwendeten Referenzgene durchführten (Guenin et al., 2009). Bis heute ist die Debatte um verwendete Referenzgene aktuell. Molina et al. publizierten 2018 eine Arbeit zur methodisch korrekten Auswahl eines Referenzgens von Herzgewebeproben. Das Ziel der Arbeitsgruppe bestand ursprünglich darin, einen Grundstock an verwendbaren Referenzgenen für Gewebeproben des menschlichen Herzens zu identifizieren, unabhängig von kardialen Pathologien oder Versuchsbedingungen. Hierzu wurden 16 Referenzgene mittels verschiedener Methoden evaluiert. Die Autor\*innen der Studie geben zwar schlussendlich einen Grundstock an verwendbaren Referenzgenen an, empfehlen grundsätzlich jedoch drei bis fünf Referenzgene gleichzeitig zu verwenden (Molina et al., 2018). Inwieweit dies bei einer 96-well PCR-Platte praktikabel ist, kann in Zweifel gezogen werden. So bräuchte man unter Einbezug von technischen Replikaten bereits 10 Kavitäten einer Mikrotiterplatte, um mittels fünf Referenzgenen die interne Kontrolle für lediglich ein Zielgen zu messen. Entscheidet man sich aus Gründen der Praktikabilität schließlich gegen die Verwendung mehrerer Referenzgene, so ist es umso elementarer, ein geeignetes Referenzgen in Vorversuchen für alle Versuchsbedingungen zu etablieren. Denn laut den *MIQE*-Richtlinien ist eine Normierung auf

ein einzelnes Referenzgen ohne experimentelle Prüfung und ohne Nachweis von Evidenz für die Eignung des verwendeten Referenzgens inakzeptabel (Bustin et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit war es nicht nur notwendig, einen endogenen Standard in Form eines geeigneten Referenzgenes, sondern auch einen exogenen Standard in Form eines Kalibrators zu etablieren. Dieser diente dazu, die quantitative Aussage verschiedener Versuchsdurchläufe – im Falle dieser Arbeit Messergebnisse verschiedener PCR-Platten – miteinander vergleichen zu können. Bei der Kalibrator-Probe handelt es sich um eine cDNA, die wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben aus mehreren Gewebeproben in einem einzigen Ansatz hergestellt wurde. Die Kalibrator-Probe enthält dadurch alle zu messenden Zielgene und das Referenzgen in konstanter Konzentration und wird anschließend bei jedem Versuchsansatz mit amplifiziert. Theoretisch werden die Ergebnisse verschiedener Versuche durch die Verwendung des Kalibrators als Bezugspunkt miteinander verrechnet. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Phase der experimentellen Datenerhebung, dass die Reproduzierbarkeit der Kalibrator-Ct-Messwerte so geringe Fluktuationen zeigte, dass auf ein mathematisches Verrechnen verzichtet werden konnte.

Retrospektiv entstand während der Auswertung der Ergebnisse jedoch der Eindruck, eine Auffälligkeit der Kalibrator-cDNA Messergebnisse zu erkennen. Am Beispiel von *Nudc* soll dies veranschaulicht werden. Vergleicht man den ersten und letzten Ct-Messwert miteinander, zwischen denen mehr als ein Jahr Zeit lag, so lässt sich Folgendes beobachten: Am 30.03.2015 wurde ein Ct-Wert von 20,83 und am 12.10.2016 ein Ct-Wert von 21,72 gemessen. Beschränkt man sich auf diese zwei Messwerte, so scheint es eine Änderung des Ct-Wertes über die Zeit gegeben zu haben. Es lässt sich an dieser Stelle daher die Frage stellen, ob die messbaren Fluktuationen der Kalibrator-cDNA vielleicht auf eine DNA-Degradation während der Lagerung zurückzuführen sein könnte. Studien, die bereits die Lagerungsstabilität von cDNA untersucht haben, zeigen, dass beispielweise wiederholte Gefrier/Auftauzyklen die Lagerungsstabilität beeinflussen (Baoutina et al., 2019). Es wurde vermutet, dass eine erhöhte Scherung während des Mischvorgangs mit dem Vortexmischer nach Auftauen der Probe eine Ursache sein könnte (Rossmanith et al., 2010). Rossmanith et al. untersuchten die DNA-Stabilität in einem Zeitraum von vier Wochen und identifizierten darüber hinaus auch eine erhöhte Scherspannung während des Einfriervorgangs als Quelle erhöhter DNA-Degradation. Es empfiehlt sich daher unter Berücksichtigung der Literatur, das Einfrieren der Kalibrator-cDNA in mehreren Proben-Aliquots, um häufige Gefrier/Auftau-Zyklen zu vermeiden. Dies wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit berücksichtigt und die Kalibrator-cDNA wurde in 20µl Teilproben aliquotiert und bei -20°C gelagert. Eine Teilprobe wurde maximal

zweimal aufgetaut/eingefroren. Eine Langzeitstudie über einen Zeitraum von 100 Tagen und mit wöchentlichen PCR-Messungen zeigte, dass die DNA-Stabilität auch abhängig vom Lösungsmittel ist. Die geringste DNA-Degradation war in 50% Glycerol-bidestilliertem Wasser mittels PCR zu messen und betrug eine Änderung des Ct-Werts um 0,2 (Roder et al., 2010).

Im Falle der vorliegenden Arbeit handelt es sich bei den Fluktuationen der Ct-Messwerte der Kalibrator-cDNA jedoch höchstwahrscheinlich um keine Veränderungen aufgrund einer DNA-Degradation. Hinweis hierfür ist unter anderem, dass noch am 13.03.2016 und ebenfalls in einem anderen Versuchsansatz am 12.10.2016 Ct-Messwerte von 21,03 und 20,79 erfolgten, die demnach nahe am zuerst gemessenen Wert von 20,83 liegen (siehe Tabelle 6, Kapitel 3.2.2).

## **4.2 p38 MAPK $\alpha$ KO als Herzinsuffizienz-Modell**

Sowohl das SM22p38 MAPK $\alpha$  KO- als auch das iCmp38 MAPK $\alpha$  KO-Modell zeigten nach der Behandlung mit AngII, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, bereits nach 48 h die Ausbildung einer systolischen Herzinsuffizienz. Die qPCR-Analysen erfolgten mittels dem iCmp38 MAPK $\alpha$ -Modell, da durch den induzierbaren und Kardiomyozyten-spezifischen KO explizit die Rolle in Herzmuskelzellen untersucht werden konnte und auch entwicklungsbiologische Einflüsse der p38 MAPK $\alpha$  unbeeinflusst blieben. Hierin lagen Vorteile des iCmp38 MAPK $\alpha$  KO-Modell gegenüber dem SM22p38 MAPK $\alpha$  KO-Modell. Die erhöhte Nachlast wurde experimentell durch die Behandlung mit AngII erzeugt. An dieser Stelle stellte sich die Frage, inwiefern AngII selbst einen direkten Einfluss auf die Signaltransduktion der p38 MAPK $\alpha$  hat und ob die zu beobachteten Veränderungen auf Ebene der Genexpression auf die Behandlung mit AngII zurückzuführen sind. Zur Abgrenzung des AngII-Einflusses gegenüber den Auswirkungen der erhöhten Nachlast wurden die Ergebnisse der Kontrollen nach 48 h AngII-Behandlung herangezogen.

Auch die Kontrolltiere erhielten AngII in gleichen Konzentrationen. Sie entwickelten jedoch keine Herzinsuffizienz. Betrachtet man die Ergebnisse der Microarray-Daten (siehe Kapitel 3.1 Abb. 10), so lässt sich in der *Heatmap* erkennen, dass sich das Genexpressionsmuster von KO und Kontrollen zum basalen Messzeitpunkt kaum unterscheiden lassen. Nach 48 h der AngII-Behandlung lässt sich dagegen ein deutlicher Unterschied in der Genexpression zwischen KO und Kontrollen erkennen. Die beobachteten Veränderungen der Genexpression im hier vorliegenden Modell stehen demnach im Zusammenhang mit dem p38MAPK $\alpha$  KO und der erhöhten Nachlast und sind nicht auf die AngII-Wirkung zurück zu führen.

### **4.3 Rolle der p38 MAPK $\alpha$ in der frühen Phase der Anpassung auf eine erhöhte Nachlast**

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erläutert, weiß man heute, dass p38 MAPK $\alpha$  an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt ist und eine wichtige Rolle im Rahmen von Hypertrophieprozessen des Herzens spielt. Evidenz für die Aktivierung der p38 MAPK $\alpha$  im Rahmen von Herzinsuffizienz bieten zahlreiche Studien. Sowohl in Tierversuchen als auch in Myokardbiopsien von Herzinsuffizienzpatienten wurde eine Aktivierung der p38 MAPK $\alpha$  nachgewiesen (Arabacilar and Marber, 2015, Takeishi, 2002, Bellahcene et al., 2006). Gleichwohl wird kontrovers diskutiert, ob p38 MAPK $\alpha$  eine protektive oder eine schädliche Rolle spielt. Unter anderem weisen Studien mit p38-Inhibitoren darauf hin, dass die Inhibition der p38 MAPK $\alpha$  eine verbesserte kardiale Funktion zeige (See et al., 2004, Bao et al., 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen jedoch in der frühen Phase der Anpassung auf eine erhöhte Druckbelastung insgesamt auf eine protektive Rolle der p38 MAPK $\alpha$  hin.

#### **4.3.1 Protektive Rolle der p38MAPK $\alpha$ im Rahmen inflammatorischer Prozesse im verwendeten Herzinsuffizienzmodell**

1990 wurde erstmals durch Levine et al. beschrieben, dass Herzinsuffizienzpatienten ein erhöhtes Expressionsniveau an TNF $\alpha$ , einem inflammatorischen Zytokin, aufweisen (Levine et al., 1990). Allgemein gilt, dass die große Gruppe der Zytokine in fünf Untergruppen eingeteilt werden kann: Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine. Heute weiß man, dass neben TNF $\alpha$  weitere proinflammatorische Zytokine im Rahmen einer Herzinsuffizienz erhöht sind, wie beispielsweise Interleukin-1 beta (Il-1 $\beta$ ) oder Interleukin-6 (Il-6) (Yndestad et al., 2006, Brenes-Castro et al., 2018). Dies führt in der Pathogenese der Herzinsuffizienz durch eine sterile Inflammation zum Fortschreiten der Erkrankung (Nakayama and Otsu, 2013, Chen and Nuñez, 2010). p38 MAPK $\alpha$  wird dabei in der Literatur vor allem durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Bildung proinflammatorischer Zytokine bewirken, als proinflammatorisch beschrieben (Clerk and Sugden, 2006). Aktivierte Transkriptionsfaktoren durch p38 MAPK $\alpha$  sind dabei unter anderem GATA-4, AP-1, SRF und NF- $\kappa$ B, die mittels elektrophoretischen Mobilität-*Shift-Assays* (EMSA) identifiziert wurden (Tenhunen et al., 2006). Andererseits ist auch bekannt, dass Zytokine, wie beispielsweise Il6, über den MAPK-Weg wirken (Sinfield et al., 2013, Motoaki Sano et al., 2001). Zusammenfassend kann einerseits eine erhöhte p38 MAPK $\alpha$ -Aktivität in einer erhöhten Zytokinbildung enden und andererseits können Zytokine wie Il6 p38 MAPK $\alpha$  aktivieren.

Die Interpretation der hier vorliegenden Ergebnisse ist vor allem dadurch erschwert, dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, welcher Zelltyp die gemessenen und erhöhten Genexpressionsniveaus an Zytokinen gebildet hat. p38 MAPK $\alpha$  war ausschließlich in Kardiomyozyten ausgeschaltet. Grundsätzlich ist bekannt, dass Il6 von vielen verschiedenen Zelltypen produziert werden kann, darunter unter anderem T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Endothelzellen, Adipozyten und Fibroblasten (Mihara et al., 2011). Tenhunen et al. haben in ihren Versuchen darüber hinaus Hinweise auf eine Il6-Bildung in Kardiomyozyten mittels immunhistologischer Färbung nachweisen können (Tenhunen et al., 2006). Dass sowohl in Kontroll- als auch in KO-Herzgewebeproben die Il6-Expressionsniveaus in den ersten 12 h gleichförmig verändert sind, könnte darauf hinweisen, dass Il6 zu diesem Zeitpunkt entweder nicht in Kardiomyozyten gebildet wurde oder zumindest nicht abhängig von p38 MAPK $\alpha$  reguliert wird. Da bereits nach 24 h das Expressionsniveau von Il6 in Kontrollen wieder auf das Ausgangsniveau gesunken ist, wogegen es in KO-Proben weiter steigt, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass p38 MAPK $\alpha$  hier eine entscheidende regulatorische Funktion übernimmt und sich *downstream* von Il6 in der Signalkaskade befindet und rückkoppelnd wiederum auf die weitere Il6 Produktion wirkt. Hinweise für eine Regulation des MAP-Kinase-Signalweges *downstream* von Il6 fanden Kumar et al. sowohl in Zellkultur von Kardiomyozyten als auch in *in vivo* Experimenten (Kumar et al., 2019). Kumar et al. konnten zeigen, dass Il6 ein entscheidender Mediator im *Crosstalk* zwischen Kardiomyozyten und Fibroblasten ist und eine kardiale Hypertrophie und Fibrose im Rahmen einer erhöhten Nachlast fördert (Kumar et al., 2019). Die Experimente erfolgten dabei mittels eines TAC (*transverse aortic constriction*) Modells, das heißt die transversale Aorta wurde bandagiert und dadurch eine erhöhte Nachlast erzeugt.

Eine andere Hypothese, die das Steigen des Il6-Expressionsniveau in KO-Herzgewebeproben nach 24 h im Gegensatz zum gesunkenen Expressionsniveau in Kontrollen erklären würde, schließt die progrediente Einwanderung von Granulozyten ins kardiale Gewebe der KO-Tiere ein. Es lässt sich an dieser Stelle diskutieren, ob die gleichförmige Erhöhung während der ersten 12 h auf eine erste Einwanderung von zytokinbildenden Immunzellen in KO und Kontrollen zurückzuführen ist, wogegen die zusätzliche Erhöhung des Expressionslevels bis zum Maximum nach 24 h auf eine zweite und weitere Einwanderung von zytokinbildenden Immunzellen ausschließlich in KO-Proben hindeutet. Wie in der Einleitung bereits erklärt, zeigt der Phänotyp der KO-Tiere nach zwei Tagen durchaus eine Einwanderung von Granulozyten, die mit einer immunhistologischen Färbung identifiziert wurde. Die aufgestellte Hypothese würde nahelegen, dass die p38 MAPK $\alpha$  eine regulatorische Funktion in den Kontrolltieren

wahrnimmt und eine weitere Einwanderung verhindert. Bisher unveröffentlichte Daten von Bottermann et al. weisen jedoch darauf hin, dass die erhöhten Il6 und Il1 $\beta$ -Level auch nach einer Granulozytendepletion nachweisbar sind (Bottermann et al., unveröffentlichte Daten). Somit scheint das erhöhte Expressionsniveau nicht nur auf eine Einwanderung von Immunzellen zurückzuführen zu sein.

Die Aussage, dass das Expressionsniveau für KO und Kontrollen in den ersten 12 h gleichförmig verändert und nach 24 h ein Maximum des Expressionsniveaus in KO-Gewebeproben zu sehen war, lässt sich für Il1 $\beta$  ebenfalls treffen. Auch für das Expressionsniveau von Cxcl5 gilt in Kontrollen, dass es nach 24 h bereits wieder auf das Ausgangsniveau gesunken ist. In KO-Proben steigt das Expressionsniveau dagegen weiter an, ohne ein Maximum aufzuweisen, sodass auch nach 48 h eine weitere Erhöhung des Expressionslevels zu messen ist. Dies ist insofern eine spannende Beobachtung, da man weiß, dass sowohl Il6 als auch Il1 $\beta$  die Bildung von Cxcl5 induzieren können (McLoughlin et al., 2004, Strieter et al., 2009). Daraus folgend lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Cxcl5 erst zeitversetzt nach Il6 und Il1 $\beta$  sein Expressionsmaximum erreicht, nachdem das Expressionsniveau von Il6 und Il1 $\beta$  gesunken ist. Das Maximum der Expression von Cxcl1 ist dagegen schon nach 12 h erreicht und ebbt im Anschluss daran in Kontrollen und KO-Proben ab. Die Ergebnisse weisen in Bezug auf Cxcl1 allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen KO und Kontrollen auf. Grundsätzlich sei an dieser Stelle anzumerken, dass Chemokine wie Cxcl5 und Cxcl1 zur Gruppe der CXC-Chemokine gehören und unter anderem von Monozyten, Neutrophilen, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet werden. Sie wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und ihre Signaltransduktion erfolgt über den Rezeptor (Cxcr2), was promiskutives Verhalten genannt wird, da mehrere Chemokine einer Subfamilie über den gleichen Rezeptor wirken (Toksoy, 2008). Die qPCR-Ergebnisse der Genexpression von Cxcr2 zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen KO und Kontrollen, auch wenn eine Tendenz einer Steigerung der Expression mit Maximum nach 12 h zu erkennen ist. Ccl2 gehört ebenfalls zur Gruppe der Chemokine, allerdings zu den sogenannten CC-Chemokinen. Diese unterscheiden sich von den CXC-Chemokinen zum einen darin, dass strukturell zwei Cysteine direkt nebeneinander liegen und nicht wie bei den CXC-Chemokinen durch eine Aminosäure getrennt sind. Zum anderen unterscheiden sie sich funktionell, da ihre chemotaktische Wirkung vor allem auf Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen (Palomino and Marti, 2015) wirkt. In den ersten 24 h ändert sich das Genexpressionsniveau von Ccl2 in KO und Kontrollen in gleichem Maße. Nach 48 h ist jedoch ein >40-fach erhöhtes Expressionsniveau in KO-Proben nachweisbar. Ccl2 scheint im Rahmen

von Herzinsuffizienz eine große Rolle zu spielen. Sowohl tierexperimentelle Untersuchungen als auch klinische Studien mit Herzinsuffizienzpatient\*innen zeigen eine Steigerung des Ccl2 Expressionsniveaus (Hanna and Frangogiannis, 2020). Stumpf et al. konnten zeigen, dass ein erhöhter Ccl2-Serumspiegel mit einer verstärkten Symptomatik und einer signifikant erhöhten systolischen Dysfunktion einhergehen (Stumpf et al., 2008). Im Kontext dieser Hinweise deuten die erhobenen Daten in Bezug auf Ccl2 auf eine protektive Rolle der p38MAPK $\alpha$  hin, da in Kontrolltieren nach 48 h kein erhöhtes Expressionslevel gemessen wird, sondern lediglich in KO-Proben.

Bezüglich der inflammatorischen Antwort auf eine erhöhte Nachlast weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine protektive Rolle der p38 MAPK $\alpha$  hin, da die gemessenen Zyto- und Chemokine über das Auslösen einer sterilen Inflammation in KO-Tieren zur Entstehung einer Herzinsuffizienz beitragen. Gleichwohl bleiben die genaue Signalkaskade und die beteiligten Zelltypen zum jetzigen Zeitpunkt unverstanden.

Auf molekularer Ebene weisen auch die Ergebnisse von Lipocalin 2 (Lcn2) auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz in KO-Tieren hin. Lcn2 ist ein proinflammatorisches Glykoprotein, das von einer Vielzahl von Zellen gebildet wird, und sowohl als Biomarker von Nierenschädigung anerkannt als auch in Serum- und Urinproben von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz signifikant erhöht ist (Ahmad et al., 2012). Ahmad et al. bezeichnen Lcn2 als potentiellen Marker in der Diagnostik bei Patienten mit kardiorenalem Syndrom und Herzinsuffizienz. In den vorliegenden Versuchen lässt sich in KO-Proben bereits nach 24 h ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau detektieren, das im Vergleich zum basalen Messzeitpunkt >60-fach erhöht ist. Diese Beobachtungen gehen Hand in Hand mit der Aussage, dass Lcn2 ein potentieller Biomarker im Rahmen von Herzinsuffizienz sein kann.

#### **4.3.2 Steigerung der Expression profibrotischer Gene weist auf EZM-Remodeling in p38 MAPK $\alpha$ KO hin**

In der Pathogenese einer Herzinsuffizienz spielt die extrazelluläre Matrix (EZM) eine entscheidende Rolle (Creemers and Pinto, 2011). Unter der EZM versteht man grundsätzlich den dreidimensionalen Raum zwischen den Zellen eines Gewebe- oder Organkomplexes, also den Interzellularraum. Die Hauptbestandteile sind Kollagenfasern, retikuläre und elastische Fasern, Glykosaminoglykane, Proteoglykane und Glykoproteine. Die extrazelluläre Matrix ist in der Lage Wasser zu binden und trägt somit essentiell zur Elastizität eines Gewebes bei. Produziert werden die einzelnen Bestandteile der EZM vor allem durch Fibroblasten und Myofibroblasten. Sogenannte profibrotische Gene führen über eine Stimulation der Fibroblasten zu einer vermehrten Produktion von EZM, was später in einer pathologischen

Fibrosebildung enden kann (Bonnans et al., 2014). Grundsätzlich gilt, dass die EZM keine konstante Masse darstellt, sondern als ein dynamisches Fließgleichgewicht verstanden werden muss, das sich im ständigen Auf- und Abbau befindet (Theocharis et al., 2019). Dabei kann die genaue Zusammensetzung je nach äußeren Bedingungen variieren. So weiß man beispielsweise bereits seit langem, dass eine erhöhte Nachlast des Herzens zu einer veränderten Zusammensetzung der kardialen EZM führt (Weber et al., 1994). Diese strukturellen Veränderungen sind Teil des kardialen *Remodeling* und führen neben einer vermehrten Fibrosierung zu einer chronischen Inflammation und schließlich zu einer eingeschränkten Herzfunktion bis hin zu einer dilatativen Herzinsuffizienz, wie sie ebenfalls im hier verwendeten Modell zu beobachten ist (siehe Kapitel 1.3). Therapeutische Optionen, um eine Fibrosierung zu behandeln, stehen bisher kaum zur Verfügung, weshalb es von großem Interesse ist, in Zukunft mögliche Zielstrukturen und -moleküle zu erforschen (Leask, 2015). Zu den profibrotischen Genen zählt unter anderem *Connective tissue growth factor* (Ctgf). Seine regulatorische Funktion in der Fibrosierung ist für mehrere Organe beschrieben, darunter auch das Herz (Chen et al., 2000, Koitabashi et al., 2007, Morikawa et al., 2007). Unter physiologischen Bedingungen wird Ctgf überwiegend von Fibroblasten gebildet, gleichwohl konnten unter pathologischen Bedingungen und während *Remodeling*-Prozessen eine erhöhte Expression auch in Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Creemers and Pinto, 2011). Auslöser einer erhöhten Expression können unter anderem Wachstumsfaktoren, Zytokine, AngII, Hypoxie oder mechanischer Streß sein (Kubota and Takigawa, 2014). Chen et al. zeigten, dass experimentell ausgelöste Myokardinfarkte im Mausmodell zunächst zu einem erhöhten Ctgf-Expressionsniveau führen, was wiederum mit einer gesteigerten Expression von Fibronectin, Kollagen I und III korreliert (Chen et al., 2000). In den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit zeigt sich in den ersten 12 h der AngII-induzierten kardialen Druckbelastung zunächst eine Steigerung der Ctgf-Expression in KO und Kontrollen in gleichem Maße. Bereits nach 24 h ist das Expressionsniveau von Ctgf in Kontrollen nahezu auf das Basalniveau abgefallen, wogegen es im KO nach 48 h signifikant erhöht ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass p38 MAPK $\alpha$  nicht nur im Rahmen der Immunantwort, sondern auch im Rahmen der Fibrosierung eine wichtige Funktion zukommt. Die Ergebnisse auf Expressionsebene weisen darauf hin, dass in KO-Proben eine Fibrosierung des Gewebes auf makroskopischer Ebene zu erwarten wäre. Bisher unveröffentlichte Daten von Bottermann et al., die unter anderem histologische Untersuchungen einschließen, zeigen eine Fibrosierung des kardialen Gewebes nach 14 Tagen AngII-Behandlung (Bottermann et al., unveröffentlichte Daten). Nach 48 h ist makroskopisch hingegen noch keine Fibrosierung nachweisbar.



An dieser Stelle lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Ctgf ein geeigneter und früher Fibrose-Marker sein könnte. Vielversprechende Studien zeigen bereits für verschiedene Krankheiten, dass Ctgf ein geeigneter Fibrosemarker sein und beispielsweise im Serum oder im Urin gemessen werden kann (Ramazani et al., 2018). Im Kontext der akuten Herzinsuffizienz zeigen klinische Studien, dass neben klassischen Biomarkern, wie dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP), weitere potentielle Biomarker wie Ctgf zur Diagnostik und Prognosebestimmung einer Herzinsuffizienz geeignet sein könnten (Mukherji et al., 2017). Dabei lag der Fokus weniger auf der Frage, ob Ctgf ein Fibrosemarker sein könne, sondern darauf, hochsensible und zu einem sehr frühen Krankheitsstadium erhöhte Biomarker zu identifizieren. In der MANPRO-Studie wurden 212 Patienten mit Herzinsuffizienzsymptomen wie Kurzatmigkeit untersucht und insgesamt zeigte sich, dass ein erhöhter Ctgf-Spiegel mit einer reduzierten linksventrikulären Ejektionsfraktion einhergeht (Behnes et al., 2013). Koitabashi et al. zeigten, dass Ctgf auch im Rahmen von chronischer Herzinsuffizienz als Biomarker geeignet ist. 52 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz wurden klinisch untersucht und die Plasmakonzentration von Ctgf wurde gemessen. Die Plasmakonzentration von Ctgf war dabei signifikant erhöht und korrelierte mit der NYHA-Klassifikation (Koitabashi et al., 2008).

Es ist bekannt, dass p38 MAPK $\alpha$  an der Signaltransduktion von Ctgf beteiligt sein kann (Gu et al., 2012, Ramazani et al., 2018), unklar bleibt jedoch bezüglich den hier vorliegenden Ergebnissen, ob es sich um eine direkte regulatorische Funktion der p38 MAPK $\alpha$  bezüglich der Ctgf-Expression handelt. Dies stellt lediglich eine mögliche Hypothese dar. Es könnte sich stattdessen auch um einen sekundären Ctgf-Expressionsanstieg handeln, weil beispielsweise die Dilatation über eine Mechanotransduktion zur Freisetzung von Cytokinen führen kann, welche in Fibroblasten die Ctgf-Stimulation auslösen könnte.

Auch für Lox, das ebenfalls zu den profibrotischen Genen zählt und für die Lysyloxidase codiert, lässt sich eine signifikante Steigerung der Expression nach 48 h in KO-Proben beobachten. Lox spielt eine wichtige Rolle in der enzymatischen Quervernetzung von Elastin und Kollagenen und wird überwiegend von Fibroblasten produziert. Al-u'datt et al. fassen in ihrem Review mehrere Studien zusammen, die insgesamt zeigen, dass eine Inhibition von Enzymen der Lox-Familie die kardiale Funktion verbessern und Lox als ein Zielmolekül in der Therapie der Herzinsuffizienz dargestellt werden kann (Al-u'datt et al., 2019). In seiner Funktion führt Lox durch die Quervernetzung der EZM-Proteine zu einer erhöhten Zugfestigkeit und Steifigkeit des kardialen Gewebes und trägt damit wesentlich zur Pathogenese von kardialen Erkrankungen bei.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit in Bezug auf die profibrotischen Gene *Ctgf* und *Lox* auf eine antifibrotische und regulatorische Funktion von p38 MAPK $\alpha$  im Rahmen einer erhöhten Nachlast hin, auch wenn die genaue Signaltransduktion nicht bekannt ist. Die Ergebnisse sind als ein Hinweis zu verstehen und es bedarf weiterer experimenteller Versuche, um die Rolle der p38 MAPK $\alpha$  im Rahmen von fibrotischen Prozessen zu erforschen.

### 4.3.3 Veränderter Glucose- und Fettsäuremetabolismus

Der Herzmuskel ist grundsätzlich in der Lage, ATP sowohl aus Fettsäuren als auch aus Glukose, Ketonkörpern und Laktat zu bilden (Bertero and Maack, 2018). Es stehen ihm also verschiedene Substrate als Energiequelle zur Verfügung. Diese sogenannte metabolische Flexibilität ermöglicht eine Energiegewinnung, die angepasst an das aktuell verfügbare Nährstoffangebot ist. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt der Hauptanteil der Energiegewinnung zu 60-90% durch die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und lediglich 10-40% des kardialen Grundumsatzes wird durch die Glykolyse bereitgestellt (Stanley et al., 2005). Unter erhöhter Belastung wird ATP dagegen zu einem größeren Anteil aus Glukose gewonnen (Kundu et al., 2015). Bezüglich des metabolischen *Remodeling* scheint der erhöhte Glukosestoffwechsel eine gesteigerte Kontraktionskraft des Herzmuskels zu bewirken (Stanley et al., 2005) und so zunächst ein vorteilhafter Kompensationsmechanismus zu sein. Die Regulation der einzelnen Stoffwechselwege und damit die Entscheidung über präferierte Substrate erfolgt einerseits durch Aktivierung oder Hemmung regulatorischer Schlüsselenzyme auf Proteinebene, andererseits über eine veränderte Genexpression (Bertero and Maack, 2018). Schlussendlich wird die Expression der metabolischen Schlüsselenzyme durch Transkriptionsfaktoren reguliert, deren *upstream*-Signalkaskaden jedoch häufig noch unbekannt sind oder deren Regulation durch mehrere Moleküle möglich ist. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit weisen bezüglich des kardialen Stoffwechsels unter einer erhöhten Nachlast erstmals auf eine Schlüsselrolle der p38 MAPK $\alpha$  hin.

*Angiopoetin-like 4* (*Angptl4*) ist ein Gen, das für das gleichnamige Protein kodiert und unter anderem eine wichtige Rolle im Fettsäuremetabolismus spielt. *Angptl4* wirkt inhibierend auf die Lipoproteinlipase (LPL) (Aryal et al., 2019). Eine Induktion von *Angptl4* deutet demnach auf eine verminderte kardiale Energiegewinnung aus Fettsäuren hin, die durch die LPL aus Lipoproteinen hydrolysiert werden (Yu et al., 2005). Yu et al. beobachteten, dass die Überexpression von *Angptl4* zu einer erniedrigten LPL-Aktivität führt und der Triglycerid-Gehalt in kardialem Gewebe sinkt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen bezüglich der Expression von *Angptl4* ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau in KO-Herzen. Das

Expressionsniveau der Kontrollproben zeigt zwar einen Anstieg in den ersten 12 h und dann einen Abfall auf das Ausgangsniveau. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen geben an dieser Stelle also keinen Hinweis darauf, dass p38 MAPK $\alpha$  über eine Steigerung der Expression von Angptl4 die LPL und damit die Energiegewinnung aus Fettsäuren hemmt. Die Genese der beobachtbaren Lipidtröpfchen-Einlagerung, die den Phänotyp unter anderem charakterisieren, lassen sich vorerst nicht in Verbindung mit einer veränderten Angptl4-Expression bringen.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Expression von Genen metabolischer Enzyme, die in die Energiegewinnung aus Glukose involviert sind, diskutiert werden. Grundsätzlich gilt, dass die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 4 (PDK4) vom gleichnamigen Gen (Pdk4) kodiert wird und über eine Phosphorylierung der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) zu deren Inaktivierung führt. Die Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase 2 (PDP2) kann als ihr Gegenspieler verstanden werden und führt über eine Dephosphorylierung der PDH zur Aktivierung des Enzyms. Die Funktion der PDH liegt in der Bildung von Acetyl-CoA aus Pyruvat, welches wiederum durch Einschluss in den Zitratzyklus die Grundlage der ATP-Bildung und damit der Energiegewinnung bildet. Ähnlich wie bei den bereits untersuchten und diskutierten Genen weist auch die Genexpressionsanalyse von Pdk4 und Pdp2 in den ersten 12 h eine gleichförmige Regulation in KO und Kontrollen auf. Innerhalb der ersten 12 h der Druckbelastung erfolgt eine Steigerung der Expression von Pdk4 und eine Abnahme der Expression von Pdp2. Hypothetisch wäre dies ein Hinweis auf eine gesteigerte PDH-Aktivität und damit auf eine gesteigerte Energiegewinnung aus Glukose in der frühen Adaptionsphase auf eine erhöhte Nachlast. Da sich kein Unterschied zwischen KO und Kontrollen zeigt, lässt sich hieraus schließen, dass diese Veränderung nicht über p38 MAPK $\alpha$  reguliert wird. Nach 48 h scheint es jedoch so, als steige die Genexpression von Pdp2 in Kontrollen. An dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, dass es sich bei der Beobachtung jedoch um keinen signifikanten Unterschied handelt. Man muss daher in weiteren Untersuchungen zum einen die Fallzahl erhöhen und zum anderen gegebenenfalls die Genexpression zu einem späteren Zeitpunkt untersuchen. Erst dann lässt sich sagen, ob die Hypothese einer gesteigerten Pdp2-Expression in Kontrollen stimmt. Sheeran et al. zeigten anhand von *in vitro* und *in vivo* Versuchen eine Adaptation auf Ebene der Genexpression sowie eine veränderte Aktivität der PDH auf Proteinebene bei Patient\*innen mit systolischer Herzinsuffizienz (Sheeran et al., 2019). Hierfür wurden 21 Myokardbiopsien von Gesunden und 27 Myokardbiopsien von Patient\*innen mit einer fortgeschrittenen (NYHA IV) systolischen Herzinsuffizienz entnommen. Untersuchungen der Proteinaktivität mittels Western Blot zeigen eine signifikant erhöhte PDH-Expression (63%) in den Proben der Herzinsuffizienzpatient\*innen. Darüber hinaus wiesen Sheeran et al. eine erniedrigte PDK4-

Proteinexpression und eine unveränderte Pdp2-Proteinexpression nach. In einem nächsten Schritt untersuchten Sheeran et al. in Kardiomyozyten-Zellkulturen die Genexpression von Pdk4. Pdk4 wies nach 24 h AngII-Behandlung, das hier als Modell ausgewählt wurde, um eine Hypertrophie auszulösen, eine erniedrigte Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen auf (Sheeran et al., 2019). Die Frage, ob eine erhöhte PDH-Aktivität im Rahmen einer Herzinsuffizienz als Kompensationsmechanismus gedeutet werden kann, wird bisher weder in der erwähnten Studie noch in vorhandener Fachliteratur untersucht. Auch eine Regulation von Pdp2 *downstream* der p38 MAPK $\alpha$  ist eine Hypothese, die bisher in der Literatur noch nicht diskutiert worden zu sein scheint. Abbildung 15 dient an dieser Stelle zur Veranschaulichung der Hypothese, die aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit abgeleitet wird.

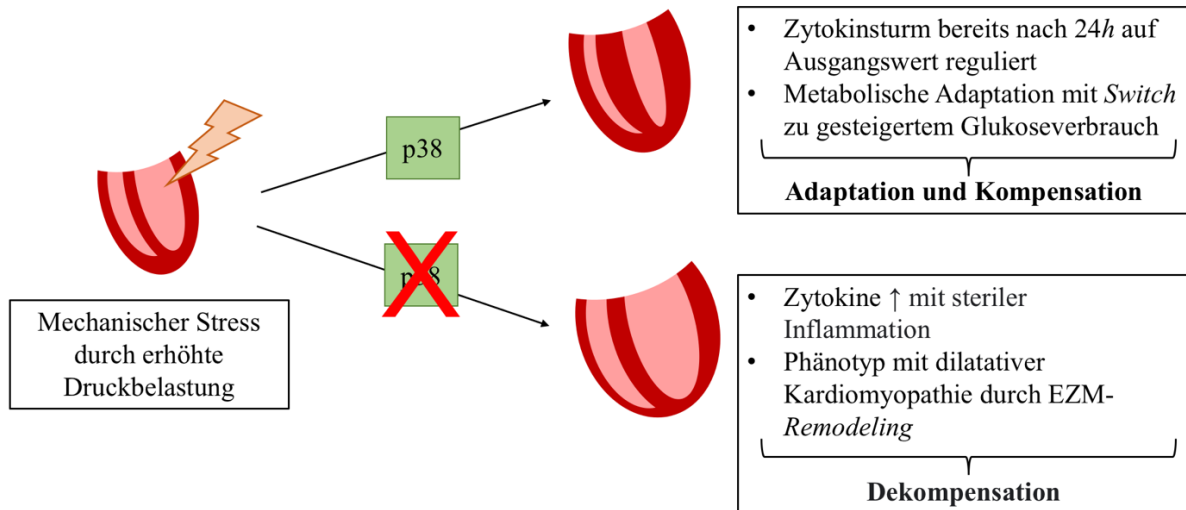
Auf zellulärer Ebene spielt sich die Bildung von Acetyl-CoA im Mitochondrium ab. Ein Transport von Glukose in den Intrazellularraum stellt daher einen entscheidenden Schritt in der Energiegewinnung aus Glukose dar und ist nur mithilfe von Glukosetransportern möglich. *Solute Carrier Family 2 Member 4 (Slc2a4)* ist das Gen, das für den Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4) kodiert, der neben GLUT1 zu den Hauptvertretern im kardialen Gewebe zählt (Szablewski, 2017). Im Gegensatz zu GLUT1, dem Transporter, der sich permanent an der Plasmamembran befindet, liegt GLUT4 unter physiologischen Ruhebedingungen überwiegend intrazellulär in Vesikeln vor und die Translokation an die Zelloberfläche erfolgt als Antwort auf verschiedene Stimuli (Shao and Tian, 2015). Für Skelettmuskelzellen ist bereits bekannt, dass p38 MAPK $\alpha$  zu einer erhöhten Transkription von GLUT4 führen kann (McGee and Hargreaves, 2006) und auch in Herzmuskelzellen beschreiben Montessuit et al. p38 MAPK $\alpha$  als einen starken Induktor von GLUT4 (Montessuit et al., 2004). Studien, die den Zusammenhang von Herzinsuffizienz und GLUT4 untersuchen, zeigen, dass im Rahmen einer Herzinsuffizienz eine erniedrigte Expression von GLUT4 zu beobachten ist (Abel et al., 1999, Tian and Abel, 2001). Diese Aussagen bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Der zeitliche Verlauf der Genexpression von *Slc2a4*, also dem Gen, das für GLUT4 kodiert, zeigt in KO-Proben eine Erniedrigung des Expressionsniveau im Vergleich zum Ausgangsniveau. KO-Tiere, die nach 48h bereits eine dilatative Kardiomyopathie und eine Herzinsuffizienz ausgebildet haben, weisen also eine signifikant niedrigere Genexpression von GLUT4 im Vergleich zu Kontrollen auf. Unterstreichen lässt sich dabei, dass das Genexpressionsniveau der Kontrollen dagegen im Vergleich zum Ausgangsniveau steigt. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit bestätigen nicht nur Aussagen aus vergangenen Studien, sondern identifizieren p38 MAPK $\alpha$  zum ersten Mal als Schlüsselmolekül im metabolischen

*Remodeling.* Im Kontext der vorliegenden Arbeit lässt sich insgesamt die Hypothese aufstellen, dass p38 MAPK $\alpha$  als Adaptation auf eine erhöhte Nachlast über eine erhöhte Expression von GLUT4, sowie über eine Aktivitätssteigerung der PDH durch eine Erhöhung von Pdp2, insgesamt zu einer gesteigerten Energiegewinnung aus Glukose führt. Dies kann als wichtiger Mechanismus in der Kompensation auf eine erhöhte Nachlast gedeutet werden und würde somit p38 MAPK $\alpha$  als kardioprotektiv identifizieren. Abbildung 16 soll an dieser Stelle die aufgestellte Hypothese verdeutlichen. In Zukunft stehen weitere Untersuchungen aus, die unter anderem eine erhöhte Fallzahl berücksichtigen sollten, um die aufgestellte Hypothese zu prüfen.



Firma *Qiagen* mit ein und konnten so Schlüsselsignalwege identifizieren. In Zukunft stehen mit genannten Versuchsmethoden noch eine Reihe an Experimenten aus, um die Rolle der p38 MAPK $\alpha$  im Rahmen einer erhöhten Druckbelastung des Herzens zu erforschen.

#### 4.5 Zusammenfassung



**Abb. 17: Veranschaulichung der vermuteten kompensatorischen Rolle der p38 MAPK $\alpha$  im Rahmen erhöhter Nachlast.** Dabei spielt p38 MAPK bereits in der frühen Phase der Adaptation, bereits nach 24 h, eine regulatorische Funktion. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen insgesamt auf eine protektive Funktion schließen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum einen, dass der Phänotyp des p38 MAPK $\alpha$  KO, der sich durch eine dilatative Herzinsuffizienz auszeichnet, auf Ebene der Genexpression von einer massiv veränderten Genexpression begleitet ist. Zum anderen lässt sich anhand der Ergebnisse vermuten, dass p38 MAPK $\alpha$  im Rahmen einer erhöhten Druckbelastung des Herzens eine regulatorische Funktion übernimmt. Diese regulatorische Funktion kann anhand der erhobenen Daten als kardioprotektiv interpretiert werden. Bereits in der frühen Phase der Adaptation, innerhalb der ersten 24 h, übernimmt p38 MAPK $\alpha$  eine entscheidende Rolle, indem die Genexpression von Genen beeinflusst wird, die sowohl in den Bereichen der Immunantwort, der *Remodeling*-Prozesse, als auch des kardialen Metabolismus Schlüsselrollen spielen (Abb. 17). Alle 15 untersuchten Gene weisen in den ersten 12 h eine gleichförmige Regulation in KO und Kontrollen auf, woraus sich schließen lässt, dass die regulatorische Funktion der p38 MAPK $\alpha$  erst nach der Phase der akuten Druckbelastung im Rahmen der Kompensation des Myokards auf Ebene der Genexpression Einfluss nimmt. Zur genaueren Abklärung der Rolle von p38 MAPK $\alpha$  stehen weiterführende Untersuchungen wie Messungen von Proteinexpression, IPA-Analysen oder Untersuchungen zum kardialen Substratverbrauch aus.

## 5 Literatur und Quellenverzeichnis

- ABEL, E. D., KAULBACH, H. C., TIAN, R., HOPKINS, J. C. A., DUFFY, J., DOETSCHMAN, T., MINNEMANN, T., BOERS, M. E., HADRO, E., OBERSTEBERGHANUS, C., QUIST, W., LOWELL, B. B., INGWALL, J. S. & KAHN, B. B. 1999. Cardiac hypertrophy with preserved contractile function after selective deletion of GLUT4 from the heart. *Journal of Clinical Investigation*, 104, 1703-1714.
- AERTS, J. L., GONZALES, M. I. & TOPALIAN, S. L. 2004. Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 36, 84-6, 88, 90-1.
- AHMAD, T., FIUZAT, M., FELKER, G. M. & O'CONNOR, C. 2012. Novel biomarkers in chronic heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, 9, 347-359.
- AL-U'DATT, D. A., ALLEN, B. G. & NATTEL, S. 2019. Role of the lysyl oxidase enzyme family in cardiac function and disease. *Cardiovascular Research*.
- ARABACILAR, P. & MARBER, M. 2015. The case for inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase in heart failure. *Front Pharmacol*, 6, 102.
- ARYAL, B., PRICE, N. L., SUAREZ, Y. & FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. 2019. ANGPTL4 in Metabolic and Cardiovascular Disease. *Trends in Molecular Medicine*, 25, 723-734.
- BAO, W., BEHM, D. J., NERURKAR, S. S., AO, Z., BENTLEY, R., MIRABILE, R. C., JOHNS, D. G., WOODS, T. N., DOE, C. P., COATNEY, R. W., OHLSTEIN, J. F., DOUGLAS, S. A., WILLETTE, R. N. & YUE, T. L. 2007. Effects of p38 MAPK Inhibitor on angiotensin II-dependent hypertension, organ damage, and superoxide anion production. *J Cardiovasc Pharmacol*, 49, 362-8.
- BAOUTINA, A., BHAT, S., PARTIS, L. & EMSLIE, K. R. 2019. Storage Stability of Solutions of DNA Standards. *Analytical Chemistry*, 91, 12268-12274.
- BEHNES, M., BRUECKMANN, M., LANG, S., WEIß, C., AHMAD-NEJAD, P., NEUMAIER, M., BORGGREFE, M. & HOFFMANN, U. 2013. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2): diagnostic and prognostic value in acute heart failure. *Clinical Research in Cardiology*, 103, 107-116.
- BELLAHCENE, M., JACQUET, S., CAO, X. B., TANNO, M., HAWORTH, R. S., LAYLAND, J., KABIR, A. M., GAESTEL, M., DAVIS, R. J., FLAVELL, R. A., SHAH, A. M., AVKIRAN, M. & MARBER, M. S. 2006. Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Contributes to the Early Cardiodepressant Action of Tumor Necrosis Factor. *Journal of the American College of Cardiology*, 48, 545-555.
- BERENJI, K., DRAZNER, M. H., ROTHERMEL, B. A. & HILL, J. A. 2005. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289, H8-H16.
- BERNARDO, BERNARDO, B., WEEKS, K., PRETORIUS, L. & MCMULLEN, J. R. 2010. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & therapeutics (Oxford)*, 128, 191-227.
- BERTERO, E. & MAACK, C. 2018. Metabolic remodelling in heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, 15, 457-470.
- BONNANS, C., CHOU, J. & WERB, Z. 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 786-801.
- BRAZ, J. C., BUENO, O. F., LIANG, Q., WILKINS, B. J., DAI, Y. S., PARSONS, S., BRAUNWART, J., GLASCOCK, B. J., KLEVITSKY, R., KIMBALL, T. F., HEWETT, T. E. & MOLKENTIN, J. D. 2003. Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J Clin Invest*, 111, 1475-86.



- BRENES-CASTRO, D., CASTILLO, E. C., VÁZQUEZ-GARZA, E., TORRE-AMIONE, G. & GARCÍA-RIVAS, G. 2018. Temporal Frame of Immune Cell Infiltration during Heart Failure Establishment: Lessons from Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 3719.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J. & WITWER, C. T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55, 611-22.
- CARGNELLO, M. & ROUX, P. P. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75, 50-83.
- CHEN, G. Y. & NUÑEZ, G. 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, 10, 826-837.
- CHEN, M., LAM, A., ABRAHAM, J., SCHREINER, G. & JOLY, A. 2000. CTGF Expression is Induced by TGF- in Cardiac Fibroblasts and Cardiac Myocytes: a Potential Role in Heart Fibrosis.
- CHERVONEVA, I., LI, Y., SCHULZ, S., CROKER, S., WILSON, C., WALDMAN, S. A. & HYSLOP, T. 2010. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC Bioinformatics*, 11, 253.
- CLERK, A. & SUGDEN, P. H. 2006. Inflammation My Heart (by p38-MAPK). *Circulation Research*, 99, 455-458.
- CREEMERS, E. E. & PINTO, Y. M. 2011. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc Res*, 89, 265-72.
- CROWLEY, S. D., GURLEY, S. B., HERRERA, M. J., RUIZ, P., GRIFFITHS, R., KUMAR, A. P., KIM, H. S., SMITHIES, O., LE, T. H. & COFFMAN, T. M. 2006. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 17985-90.
- CUENDA, A. & ROUSSEAU, S. 2007. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1358-75.
- DHEDA, K., HUGGETT, J. F., BUSTIN, S. A., JOHNSON, M. A., ROOK, G. & ZUMLA, A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 37, 112-4, 116, 118-9.
- FISCHER, T. A., LUDWIG, S., FLORY, E., GAMBARYAN, S., SINGH, K., FINN, P., PFEFFER, M. A., KELLY, R. A. & PFEFFER, J. M. 2001. Activation of cardiac c-Jun NH(2)-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases with abrupt changes in hemodynamic load. *Hypertension*, 37, 1222-8.
- GODECKE, A. 2018. qPCR-25 years old but still a matter of debate. *Cardiovasc Res*, 114, 201-202.
- GU, J., LIU, X., WANG, Q.-X., TAN, H.-W., GUO, M., JIANG, W.-F. & ZHOU, L. 2012. Angiotensin II increases CTGF expression via MAPKs/TGF-β1/TRAF6 pathway in atrial fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 318, 2105-2115.
- GUENIN, S., MAURIAT, M., PELLOUX, J., VAN WUYTSWINKEL, O., BELLINI, C. & GUTIERREZ, L. 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot*, 60, 487-93.
- HAN, J., LEE, J. D., BIBBS, L. & ULEVITCH, R. J. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265, 808-11.
- HANNA, A. & FRANGOIANNIS, N. G. 2020. Inflammatory Cytokines and Chemokines as Therapeutic Targets in Heart Failure. *Cardiovascular Drugs and Therapy*.

- HAYASHIDA, W., KIHARA, Y., YASAKA, A., INAGAKI, K., IWANAGA, Y. & SASAYAMA, S. 2001. Stage-specific differential activation of mitogen-activated protein kinases in hypertrophied and failing rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 33, 733-44.
- HEINEKE, J. & MOKKENTIN, J. D. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 589-600.
- HEINEN, A., GÖDECKE, S., FLÖGEL, U., MIKLOS, D., BOTTERMANN, K., SPYCHALA, A. & GÖDECKE, A. 2021. 4-hydroxytamoxifen does not deteriorate cardiac function in cardiomyocyte-specific MerCreMer transgenic mice. *Basic Research in Cardiology*, 116.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G. & WATSON, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11, 1026-30.
- KAISER, R. A., BUENO, O. F., LIPS, D. J., DOEVENDANS, P. A., JONES, F., KIMBALL, T. F. & MOKKENTIN, J. D. 2004. Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo. *J Biol Chem*, 279, 15524-30.
- KEMP, C. D. & CONTE, J. V. 2012. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol*, 21, 365-71.
- KOITABASHI, N., ARAI, M., KOGURE, S., NIWANO, K., WATANABE, A., AOKI, Y., MAENO, T., NISHIDA, T., KUBOTA, S., TAKIGAWA, M. & KURABAYASHI, M. 2007. Increased Connective Tissue Growth Factor Relative to Brain Natriuretic Peptide as a Determinant of Myocardial Fibrosis. *Hypertension*, 49, 1120-1127.
- KOITABASHI, N., ARAI, M., NIWANO, K., WATANABE, A., ENDOH, M., SUGUTA, M., YOKOYAMA, T., TADA, H., TOYAMA, T., ADACHI, H., NAITO, S., OSHIMA, S., NISHIDA, T., KUBOTA, S., TAKIGAWA, M. & KURABAYASHI, M. 2008. Plasma connective tissue growth factor is a novel potential biomarker of cardiac dysfunction in patients with chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 10, 373-379.
- KUBOTA, S. & TAKIGAWA, M. 2014. Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 128, 181-196.
- KUMAR, S., WANG, G., ZHENG, N., CHENG, W., OUYANG, K., LIN, H., LIAO, Y. & LIU, J. 2019. HIMF (Hypoxia-Induced Mitogenic Factor)-IL (Interleukin)-6 Signaling Mediates Cardiomyocyte-Fibroblast Crosstalk to Promote Cardiac Hypertrophy and Fibrosis. *Hypertension*, 73, 1058-1070.
- KUNDU, B. K., ZHONG, M., SEN, S., DAVOGUSTTO, G., KELLER, S. R. & TAEGTMEYER, H. 2015. Remodeling of glucose metabolism precedes pressure overload-induced left ventricular hypertrophy: review of a hypothesis. *Cardiology*, 130, 211-20.
- KYRIAKIS, J. M. & AVRUCH, J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81, 807-69.
- LEASK, A. 2015. Getting to the Heart of the Matter. *Circulation Research*, 116, 1269-1276.
- LEE, J. C., LAYDON, J. T., MCDONNELL, P. C., GALLAGHER, T. F., KUMAR, S., GREEN, D., MCNULTY, D., BLUMENTHAL, M. J., HEYS, J. R., LANDVATTER, S. W., STRICKLER, J. E., MCLAUGHLIN, M. M., SIEMENS, I. R., FISHER, S. M., LIVI, G. P., WHITE, J. R., ADAMS, J. L. & YOUNG, P. R. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372, 739-46.
- LEPORE, J. J., CHENG, L., MIN LU, M., MERICKO, P. A., MORRISEY, E. E. & PARMACEK, M. S. 2005. High-efficiency somatic mutagenesis in smooth muscle cells and cardiac myocytes in SM22alpha-Cre transgenic mice. *Genesis*, 41, 179-84.

- LEVINE, B., KALMAN, J., MAYER, L., FILLIT, H. M. & PACKER, M. 1990. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure.
- LI, J., MILLER, E. J., NINOMIYA-TSUJI, J., RUSSELL, R. R., 3RD & YOUNG, L. H. 2005. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circ Res*, 97, 872-9.
- LIU, Y. H., WANG, D., RHALEB, N. E., YANG, X. P., XU, J., SANKEY, S. S., RUDOLPH, A. E. & CARRETERO, O. A. 2005. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase protects the heart against cardiac remodeling in mice with heart failure resulting from myocardial infarction. *J Card Fail*, 11, 74-81.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LUKOWSKI, R., WEBER, S., WEINMEISTER, P., FEIL, S. & FEIL, R. 2005. Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus. *Biospectrum*.
- MAILLET, M., VAN BERLO, J. H. & MOLKENTIN, J. D. 2013. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 38-48.
- MCGEE, S. L. & HARGREAVES, M. 2006. Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: Molecular mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33, 395-399.
- MCLOUGHLIN, R. M., HURST, S. M., NOWELL, M. A., HARRIS, D. A., HORIUCHI, S., MORGAN, L. W., WILKINSON, T. S., YAMAMOTO, N., TOPLEY, N. & JONES, S. A. 2004. Differential Regulation of Neutrophil-Activating Chemokines by IL-6 and Its Soluble Receptor Isoforms. *The Journal of Immunology*, 172, 5676-5683.
- METZGER, D. & CHAMBON, P. 2001. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods*, 24, 71-80.
- MIHARA, M., HASHIZUME, M., YOSHIDA, H., SUZUKI, M. & SHIINA, M. 2011. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 122, 143-159.
- MOLINA, C. E., JACQUET, E., PONIEN, P., MUNOZ-GUIJOSA, C., BACZKO, I., MAIER, L. S., DONZEAU-GOUGE, P., DOBREV, D., FISCHMEISTER, R. & GARNIER, A. 2018. Identification of optimal reference genes for transcriptomic analyses in normal and diseased human heart. *Cardiovasc Res*, 114, 247-258.
- MONTESSUIT, C., ROSENBLATT-VELIN, N., PAPAGEORGIOU, L., CAMPOS, L., PELLIEUX, C., PALMA, T. & LERCH, R. 2004. Regulation of glucose transporter expression in cardiac myocytes: p38 MAPK is a strong inducer of GLUT4. *Cardiovascular Research*, 64, 94-104.
- MORIKAWA, H., TAMORI, A., NISHIGUCHI, S., ENOMOTO, M., HABU, D., KAWADA, N. & SHIOMI, S. 2007. Expression of Connective Tissue Growth Factor in the Human Liver with Idiopathic Portal Hypertension. *Molecular Medicine*, 13, 240-245.
- MOSTERD, A. & HOES, A. W. 2007. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*, 93, 1137-46.
- MOTOAKI SANO, KEIICHI FUKUDA, TOSHIHIKO SATO, HARUKO KAWAGUCHI, MAKOTO SUEMATSU, SATOSHI MATSUDA, SHIGEO KOYASU, HIDEO MATSUI, KEIKO YAMAUCHI-TAKIHARA, M. H., YOSHIHIKO SAITO & OGAWA, S. 2001. ERK and p38 MAPK, but not NF- B, Are Critically Involved in Reactive Oxygen Species-Mediated Induction of IL-6 by Angiotensin II in Cardiac Fibroblasts.

- MUKHERJI, A., ANSARI, U., BORGGREFE, M., AKIN, I. & BEHNES, M. 2017. Clinically Relevant Biomarkers in Acute Heart Failure: An Update. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18.
- NAGY, A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 26, 99-109.
- NAKAYAMA, H. & OTSU, K. 2013. Translation of hemodynamic stress to sterile inflammation in the heart. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24, 546-553.
- NISHIDA, K., YAMAGUCHI, O., HIROTANI, S., HIKOSO, S., HIGUCHI, Y., WATANABE, T., TAKEDA, T., OSUKA, S., MORITA, T., KONDOH, G., UNO, Y., KASHIWASE, K., TANIKE, M., NAKAI, A., MATSUMURA, Y., MIYAZAKI, J., SUDO, T., HONGO, K., KUSAKARI, Y., KURIHARA, S., CHIEN, K. R., TAKEDA, J., HORI, M. & OTSU, K. 2004. p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol Cell Biol*, 24, 10611-20.
- NISHIDA, M., TANABE, S., MARUYAMA, Y., MANGMOOL, S., URAYAMA, K., NAGAMATSU, Y., TAKAGAHARA, S., TURNER, J. H., KOZASA, T., KOBAYASHI, H., SATO, Y., KAWANISHI, T., INOUE, R., NAGAO, T. & KUROSE, H. 2005. G alpha 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 280, 18434-41.
- ONO, K. & HAN, J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, 12, 1-13.
- OTSU, K., YAMASHITA, N., NISHIDA, K., HIROTANI, S., YAMAGUCHI, O., WATANABE, T., HIKOSO, S., HIGUCHI, Y., MATSUMURA, Y., MARUYAMA, M., SUDO, T., OSADA, H. & HORI, M. 2003. Disruption of a single copy of the p38alpha MAP kinase gene leads to cardioprotection against ischemia-reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun*, 302, 56-60.
- PALOMINO, D. C. T. & MARTI, L. C. 2015. Chemokines and immunity. *Einstein (São Paulo)*, 13, 469-473.
- PONIKOWSKI, P., VOORS, A. A., ANKER, S. D., BUENO, H., CLELAND, J. G. F., COATS, A. J. S., FALK, V., GONZALEZ-JUANATEY, J. R., HARJOLA, V. P., JANKOWSKA, E. A., JESSUP, M., LINDE, C., NIHOYANNOPOULOS, P., PARISSIS, J. T., PIESKE, B., RILEY, J. P., ROSANO, G. M. C., RUILOPE, L. M., RUSCHITZKA, F., RUTTEN, F. H., VAN DER MEER, P. & GROUP, E. S. C. S. D. 2016. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*, 37, 2129-2200.
- RAMAZANI, Y., KNOPS, N., ELMONEM, M. A., NGUYEN, T. Q., ARCOLINO, F. O., VAN DEN HEUVEL, L., LEVTCHENKO, E., KUYPERS, D. & GOLDSCHMEDING, R. 2018. Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics. *Matrix Biology*, 68-69, 44-66.
- RODER, B., FRUHWIRTH, K., VOGL, C., WAGNER, M. & ROSSMANITH, P. 2010. Impact of Long-Term Storage on Stability of Standard DNA for Nucleic Acid-Based Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 4260-4262.
- ROSE, B. A., FORCE, T. & WANG, Y. 2010. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev*, 90, 1507-46.
- ROSENKRANZ, S. 2004. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*, 63, 423-32.

- ROSSMANITH, P., RÖDER, B., FRÜHWIRTH, K., VOGL, C. & WAGNER, M. 2010. Mechanisms of degradation of DNA standards for calibration function during storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 407-417.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-4.
- SALVADOR, J. M., MITTELSTADT, P. R., GUSZCZYNSKI, T., COPELAND, T. D., YAMAGUCHI, H., APPELLA, E., FORNACE, A. J., JR. & ASHWELL, J. D. 2005. Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol*, 6, 390-5.
- SAMBANDAM, N., LOPASCHUK, G. D., BROWNSEY, R. W. & ALLARD, M. F. 2002. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev*, 7, 161-73.
- SASSE, A., WALLICH, M., DING, Z., GOEDECKE, A. & SCHRADER, J. 2003. Coxsackie-and-adenovirus receptor mRNA expression in human heart failure. *Journal of Gene Medicine*, 5, 876-882.
- SCHMITTGEN, T. D. & ZAKRAJSEK, B. A. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 46, 69-81.
- SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, S., MENZEL, W., GRANZOW, M. & RAGG, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *Bmc Molecular Biology*, 7.
- SEE, F., THOMAS, W., WAY, K., TZANIDIS, A., KOMPA, A., LEWIS, D., ITESCU, S. & KRUM, H. 2004. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. *J Am Coll Cardiol*, 44, 1679-89.
- SHAO, D. & TIAN, R. 2015. Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. 331-351.
- SHEERAN, F. L., ANGEROSA, J., LIAW, N. Y., CHEUNG, M. M. & PEPE, S. 2019. Adaptations in Protein Expression and Regulated Activity of Pyruvate Dehydrogenase Multienzyme Complex in Human Systolic Heart Failure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-11.
- SHIMIZU, I. & MINAMINO, T. 2016. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 97, 245-62.
- SINFIELD, J. K., DAS, A., O'REGAN, D. J., BALL, S. G., PORTER, K. E. & TURNER, N. A. 2013. p38 MAPK alpha mediates cytokine-induced IL-6 and MMP-3 expression in human cardiac fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430, 419-424.
- SOHAL, D. S., NGHIEM, M., CRACKOWER, M. A., WITT, S. A., KIMBALL, T. R., TYMITZ, K. M., PENNINGER, J. M. & MOLKENTIN, J. D. 2001. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res*, 89, 20-5.
- STANLEY, W. C., RECCHIA, F. A. & LOPASCHUK, G. D. 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 85, 1093-129.
- STRIETER, R. M., KUNKEL, S. L., BURDICK, M. D., LINCOLN, P. M. & WALZ, A. 2009. The Detection of a Novel Neutrophil-Activating Peptide (ENA-78) Using a Sensitive Elisa. *Immunological Investigations*, 21, 589-596.
- STUMPF, C., LEHNER, C., RAAZ, D., YILMAZ, A., ANGER, T., DANIEL, W. G. & GARLICH, C. D. 2008. Platelets contribute to enhanced MCP-1 levels in patients with chronic heart failure. *Heart*, 94, 65-69.

- SZABLEWSKI, L. 2017. Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. *International Journal of Cardiology*, 230, 70-75.
- TAKEISHI, Y. 2002. Activation of mitogen-activated protein kinases and p90 ribosomal S6 kinase in failing human hearts with dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*.
- TAKEISHI, Y., HUANG, Q., ABE, J., GLASSMAN, M., CHE, W., LEE, J. D., KAWAKATSU, H., LAWRENCE, E. G., HOIT, B. D., BERK, B. C. & WALSH, R. A. 2001. Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch. *J Mol Cell Cardiol*, 33, 1637-48.
- TENHUNEN, O., RYSÄ, J., ILVES, M., SOINI, Y., RUSKOAHO, H. & LESKINEN, H. 2006. Identification of Cell Cycle Regulatory and Inflammatory Genes As Predominant Targets of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in the Heart. *Circulation Research*, 99, 485-493.
- THEEUWES, F. & YUM, S. I. 1976. Principles of the Design and Operation of Generic Osmotic Pumps for the Delivery of Semisolid or Liquid Drug Formulations. *Animals of Biomedical Engineering*, No.4.
- THELLIN, O., ZORZI, W., LAKAYE, B., DE BORMAN, B., COUMANS, B., HENNEN, G., GRISAR, T., IGOUT, A. & HEINEN, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75, 291-295.
- THEOCHARIS, A. D., MANOU, D. & KARAMANOS, N. K. 2019. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *The FEBS Journal*, 286, 2830-2869.
- THOMSEN, R., SOLVSTEN, C. A., LINNET, T. E., BLECHINGBERG, J. & NIELSEN, A. L. 2010. Analysis of qPCR data by converting exponentially related Ct values into linearly related X0 values. *J Bioinform Comput Biol*, 8, 885-900.
- THORNTON, T. M. & RINCON, M. 2009. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci*, 5, 44-51.
- TIAN, R. & ABEL, E. D. 2001. Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis. *Circulation*, 103, 2961-2966.
- TOKSOY, A. 2008. Die Expression von Chemokinen bei entzündlichen Reaktionen der Haut.
- TREMPOLEC, N., DAVE-COLL, N. & NEBREDA, A. R. 2013. SnapShot: p38 MAPK substrates. *Cell*, 152, 924-924 e1.
- VAN BERLO, J. H., MAILLET, M. & MOLKENTIN, J. D. 2013. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest*, 123, 37-45.
- VENTURA, J. J., TENBAUM, S., PERDIGUERO, E., HUTH, M., GUERRA, C., BARBACID, M., PASPARAKIS, M. & NEBREDA, A. R. 2007. p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet*, 39, 750-8.
- VERROU, C., ZHANG, Y., ZURN, C., SCHAMEL, W. W. & RETH, M. 1999. Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer. *Biol Chem*, 380, 1435-8.
- WANG, Y. 2007. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation*, 116, 1413-23.
- WEBER, K. T., SUN, Y. & GUARDA, E. 1994. Structural remodeling in hypertensive heart disease and the role of hormones.
- WILHELM, J., PINGOUD, A. & HAHN, M. 2003. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Res*, 31, e56.
- YNDESTAD, A., DAMAS, J. K., OIE, E., UELAND, T., GULLESTAD, L. & AUKRUST, P. 2006. Systemic inflammation in heart failure--the whys and wherefores. *Heart Fail Rev*, 11, 83-92.

- YU, X., BURGESS, S. C., GE, H., WONG, K. K., NASSEM, R. H., GARRY, D. J., SHERRY, A. D., MALLOY, C. R., BERGER, J. P. & LI, C. 2005. Inhibition of cardiac lipoprotein utilization by transgenic overexpression of Angptl4 in the heart.
- ZARUBIN, T. & HAN, J. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*, 15, 11-8.
- ZHANG, J., ZHONG, W., CUI, T., YANG, M., HU, X., XU, K., XIE, C., XUE, C., GIBBONS, G. H., LIU, C., LI, L. & CHEN, Y. E. 2006. Generation of an adult smooth muscle cell-targeted Cre recombinase mouse model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, e23-4.
- ZHONG, H. & SIMONS, J. W. 1999. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, 259, 523-6.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Axel Gödecke für die Ermöglichung dieser Arbeit und das exzellente Vermitteln wissenschaftlichen Arbeitens. Mit seiner Hilfe durfte ich Forschung als dynamischen Prozess begreifen und fand stets Unterstützung bei allen theoretischen und praktischen Fragen. Ich bin dankbar, Mitglied des IRTG 1902 gewesen zu sein. Hierdurch wurden mir nicht nur Kongressteilnahmen ermöglicht, sondern mir wurde die Möglichkeit geschenkt junge forschungsbegeisterte Menschen kennen zu lernen und mithilfe erfahrener Professoren unsere Projekte weiter zu entwickeln.

Ich möchte mich außerdem bei allen Mitarbeitern und Ex-Mitarbeitern des Instituts bedanken. Ihr habt mich von Anfang an als Teil des Instituts aufgenommen, standet mir immer mit Rat und Tat zur Seite und habt mir gezeigt was „gute wissenschaftliche Praxis“ heißt. Ganz besonders möchte ich mich aber vor allem bei meiner Arbeitsgruppe „p38“ bedanken: Dr. med. Katharina Bottermann und Dr. rer. nat. Lucia Leitner – Ihr habt jeden Tag im Labor zu einem Besonderen gemacht! In euerm Büro gab’s stets was zu lachen und ihr standet mir immer mit helfender Hand zur Seite.

Cora Ballmann und Franziska Wohlfarth: Danke für euer Da-Sein, eure Freundschaft, die gemeinsamen Doktorarbeits-Kämpfe und so viel mehr. Ihr seid mir Verbündete und Wegbegleiterinnen und das ist eins der größten Geschenke in meinem bisherigen Leben.

Danke an meine Schwester, Sarah Werner, und Dominik Dees für die Korrektur dieser Arbeit. Auch an meine Paten, Cornelia Hirt und Martin Schmeisser sei ein Dank gerichtet: Ihr habt immer an mich geglaubt und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, Monika und Andreas Pfeffer, die es mir ermöglicht haben zu studieren und zu promovieren und deren Unterstützung ich stets spüren darf.