

Konditionale Inaktivierung des
Na⁺/H⁺-Austauschers *Nhe1* in Herzmuskelzellen
und dessen Rolle bei der Entstehung
von Herzhypertrophie

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biochemiker J. Christopher Hennings
geboren am 03.07.1978 in Hamburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Christian Hübner
Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Michaela Kuhn
Institut für Physiologie, Universität Würzburg
3. Prof. Dr. Thomas Zimmer
Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.02.2012

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Ae3	Anionenaustauscher 3
ACTB	Beta-Actin
ATPase	Adenosintriphosphat-Hydrolase
BCECF	2'-7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein
BSA	engl. <i>Bovine serum albumine</i>
Ca ²⁺	Calcium-Ion
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calcium-Ionen Konzentration
CaCl	Calciumchlorid
cDNA	engl. <i>Complementary DNA</i>
cGMP	engl. <i>Cyclic guanosin monophosphate</i>
CH ₃ COOH	Essigsäure
Cl ⁻	Chlorid-Ion
cm <i>Nhe1</i> -KO	Kardiomyozyten-spezifische <i>Nhe1</i> -KO Maus
cpm	engl. <i>Counts per minute</i>
CsCl	Cäsiumchlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	desoxy-Guansintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
floxed	engl. <i>flanked by loxP</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatase-Dehydrogenase
GFP	engl. <i>Green fluorescent protein</i>
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure

HCO ₃ ⁻	Bicarbonat-Ion
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HPLC-H ₂ O	engl. <i>High pressure liquid chromatography</i> -Wasser
HRP	engl. <i>Horse-radish peroxidase</i>
I/R	Ischämie- und Reperfusionsexperiment
K ⁺	Kalium-Ion
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
<i>Klf5</i>	engl. <i>Krüppel-like factor 5</i>
KO	engl. <i>knock out</i>
Li ⁺	Lithium-Ion
LiCl	Lithiumchlorid
LV/BW	Verhältnis linksventrikuläre Masse zu Körpermasse
Mer	engl. <i>Mutated estrogen receptor</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
miRNA	Mikro-RNA
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (Druck)
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)-1-propansulfonsäure
mRNA	engl. <i>Messenger RNA</i>
<i>Myh6</i>	engl. <i>Myosin heavy chain 6</i>
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium-Ion
[Na ⁺] _i	intrazelluläre Natrium-Ionen Konzentration
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCX	Natrium-Calcium Austauscher
NH ₄ ⁺	Ammonium-Ion
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NHE	Natrium-Protonen Austauscher

NMDG	N-Methyl-D-glucamin
PAS	engl. <i>Periodic acid-Schiff</i>
PBS	engl. <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	engl. <i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
pH	lat. <i>Potentia hydrogenii</i>
pH _i	intrazellulärer pH
PKC	Proteinkinase C
RbCl	Rubidiumchlorid
RNA	engl. <i>Ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuclease
rpm	engl. <i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>Slc26a6</i>	engl. <i>Solute carrier 26 a6</i>
SD	engl. <i>Standard deviation</i>
SDS	engl. <i>Sodium dodecyl sulfat</i>
SEM	engl. <i>Standard error of the mean</i>
SSC	engl. <i>Saline-sodium citrate</i>
SSPE	engl. <i>Saline-sodium phosphate EDTA</i>
swe	engl. <i>Slow-wave epilepsy</i>
TAC	engl. <i>Transverse aortic constriction</i>
TBST	engl. <i>Tris-buffered saline Tween</i>
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz.....	3
2.2 Homöostase und intrazellulärer pH.....	4
2.3 Na ⁺ /H ⁺ -Austausch in Zellen.....	5
2.4 Die Klonierung von NHE1.....	7
2.5 Die NHE-Genfamilie.....	8
2.6 Na ⁺ /H ⁺ -Austausch und Herzerkrankungen.....	11
3. Ziele der Arbeit	14
4. Material und Methoden	15
4.1 Mikrobiologische Methoden.....	15
4.1.1 Herstellung von chemokompetenten Bakterien.....	15
4.1.2 Transformation von chemokompetenten Bakterien.....	15
4.1.3 Screening einer Lambda-Bibliothek.....	16
4.2 Klonierungsmethoden.....	18
4.2.1 Restriktionsverdau.....	18
4.2.2 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden, Dephosphorylierung.....	18
4.2.3 Gelelektrophorese und DNA-Isolation aus Gelen.....	19
4.2.4 Ligation.....	19
4.3 Isolation von Nukleinsäuren.....	20
4.3.1 Isolation von DNA aus Bakterien.....	20
4.3.2 Slot-Lysis Methode.....	20
4.3.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	21
4.3.4 Isolation von DNA aus Phagen.....	21
4.3.5 Aufreinigung von DNA für die ES-Zellkultur.....	22
4.3.6 DNA-Extraktion aus 96-well Platten.....	22
4.3.7 Phenol-Chloroform Extraktion von genomischer DNA der Maus.....	23
4.3.8 HotSHOT DNA-Extraktion.....	23
4.3.9 Isolation von RNA.....	23
4.4 Isolation von Proteinen.....	24
4.4.1 Extraktion von Membranproteinen.....	24
4.4.2 Extraktion von cytosolischen Proteinen.....	25
4.5 Molekularbiologische Methoden.....	25
4.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	25
4.5.2 Southern Blot.....	25
4.5.3 Hinweise zum Arbeiten mit RNA.....	26
4.5.4 Northern Blot.....	26
4.5.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit ³² P.....	27
4.5.6 Western Blot.....	28
4.5.7 Strippen von Western Blot Membranen.....	29
4.6 Histologische Methoden.....	29
4.6.1 PAS-Reaktion und Fibrosebestimmung.....	29
4.7 Zellbiologische Methoden.....	29
4.7.1 ES-Zellkultur und Blastocysteninjektion.....	29
4.7.2 pHi Messung in isolierten Kardiomyozyten.....	30
4.7.3 Messung der Calcium Transienten (cytoplasmatisches Calcium).....	31
4.8 Eingriffe an Mäusen.....	31
4.8.1 Akute Kardiomyozytenisolation.....	31
4.8.2 Implantieren osmotischer Minipumpen.....	32
4.8.3 Blutdruckmessung.....	32
4.8.4 Invasive Hämodynamik.....	32

4.8.5 Bestimmung der linksventrikulären Masse	33
4.9 Statistische Methoden.....	33
5. Ergebnisse	34
5.1 Herstellung des konditionalen <i>Nhe1</i> Mausmodells.....	34
5.1.1 Klonierung des Konstrukts und embryonale Stammzellkultur	34
5.1.2 Generierung von <i>cm Nhe1</i> -KO Mäusen	37
5.2 Funktionelle Charakterisierung von <i>cm Nhe1</i> -KO Mäusen in einem pharmakologischen Hypertrophiemodell.....	43
5.2.1 <i>Nhe1</i> und Herzhypertrophie.....	43
6. Diskussion	48
6.1 Herstellung des konditionalen <i>Nhe1</i> Mausmodells.....	48
6.1.1 Klonierung des Konstrukts und embryonale Stammzellkultur	48
6.1.2 Generation von <i>cm Nhe1</i> -KO Mäusen	50
6.2 Funktionelle Charakterisierung von Kardiomyozyten-spezifischen <i>Nhe1</i> -KO Mäusen in einem pharmakologischen Hypertrophiemodell.....	57
6.2.1 <i>Nhe1</i> und Herzhypertrophie.....	57
7. Schlußfolgerungen	64
8. Literatur	65
9. Anhang.....	72
<i>Oligonucleotide</i>	72
<i>Sonden</i>	72
<i>Tabellarischer Lebenslauf</i>	73
<i>Danksagung</i>	76
<i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	77

1. Zusammenfassung

Herzinsuffizienz ist eine Diagnose mit schwerwiegenden Konsequenzen, die Millionen von Menschen betrifft. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass das insuffiziente Herz nicht mehr in der Lage ist, die Gewebe des Körpers mit ausreichend Blut und Sauerstoff zu versorgen. Einer Herzinsuffizienz geht in der Regel eine Hypertrophie des Herzens voraus, um die gesteigerte Arbeitsanforderung an das Herz zu kompensieren. Diese Herzhypertrophie kann wiederum die Versorgung des Herzmuskels verschlechtern, so dass es zu einem Umbau des Herzmuskelgewebes kommt, der die Herzmuskelfunktion weiter verschlechtert. Die Möglichkeiten, diesen Prozess therapeutisch zu beeinflussen, sind immer noch sehr beschränkt.

Ein Merkmal der Herzhypertrophie ist die Aktivierung des Wachstumsfaktor-aktivierten Na^+/H^+ -Austauschers NHE1, der nahezu ubiquitär exprimiert wird. Es wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass pharmakologische Hemmstoffe von NHE1 die Entstehung von Herzhypertrophie in experimentellen Tiermodellen vermindern oder unterbinden können. Geeignete Tiermodelle, um diesen Zusammenhang zu beweisen, standen bisher nicht zur Verfügung, da konstitutive *Nhe1*-KO Mäuse einen sehr schweren früh letalen Phänotyp mit Epilepsie aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein konditionales Mausmodell für *Nhe1* generiert und mit einer transgenen Mauslinie mit induzierbarer cre-Rekombinase unter einem Kardiomyozyten-spezifischen Promotor verpaart. Durch Aktivierung der cre-Rekombinase mit Tamoxifen wurde eine Kardiomyozyten-spezifische Inaktivierung von *Nhe1* erreicht. Die konditionale Inaktivierung von *Nhe1* in Kardiomyozyten wurde mit molekularbiologischen und funktionellen Methoden bestätigt und die Rolle von *Nhe1* in Kardiomyozyten im Verlauf einer experimentellen Herzhypertrophie untersucht.

Überraschenderweise waren Tiere mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Inaktivierung von *Nhe1* in einem Herzhypertrophiemodell nicht gegenüber Kontrolltieren geschützt. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Schutz vor der Entstehung einer Herzhypertrophie könnte darin bestehen, dass die Rolle des ubiquitär exprimierten *Nhe1* in anderen Zellen des Herzgewebes als in Kardiomyozyten für die Ausbildung einer Herzhypertrophie wichtiger ist. Weitere

Studien sind notwendig, um zu klären, ob *Nhe1* über Blutgefäße und/oder kardiale Fibroblasten die Entstehung einer Herzhypertrophie beeinflusst. Diese Arbeit zeigt erstmals, dass die Funktion von *Nhe1* in Kardiomyozyten bei der Entstehung einer Herzhypertrophie möglicherweise vernachlässigbar ist.

2. Einleitung

2.1 Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz betrifft Millionen Menschen und ist eine der häufigsten Todesursachen in Industrienationen. Eine Herzinsuffizienz ist die krankhafte Unfähigkeit des Herzens, die vom Körper benötigte Blutmenge zu transportieren. Die Diagnose Herzinsuffizienz ist mit einer durchschnittlichen verbleibenden Lebenserwartung von lediglich 5 Jahren gekoppelt (Tang and Francis 2010).

Ein Meilenstein bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz ist die Herzhypertrophie, dessen Ursache eine gesteigerte Arbeitsanforderung an das Herz ist (Hunter and Chien 1999). Diese gesteigerte Arbeitsanforderung an die Herzzellen wird über Wachstumsfaktoren vermittelt und führt zum Wachstum der Kardiomyozyten, wodurch eine kompensatorische Steigerung der Arbeitsleistung der Kardiomyozyten erreicht wird. Wachstumsfaktoren können unterschiedliche Formen der Hypertrophie im Herzen auslösen (Frey and Olson 2003).

Bei der physiologischen Hypertrophie wachsen die Kardiomyozyten symmetrisch und die Leistung des Herzens wird nachhaltig gesteigert. Dieser Vorgang wird bei Sportlern und schwangeren Frauen beobachtet und hat keine negativen Auswirkungen auf die Arbeitsleistung des Herzens.

Bei der pathologischen Hypertrophie ist ein asymmetrisches Wachstum der Kardiomyozyten und die erneute Expression von fetalen Genen zu beobachten (Depre et al. 1998). Im Verlauf der pathologischen Herzhypertrophie kommt es beim Erbringen einer gesteigerten Arbeitsleistung in einem unheilvollen Kreislauf zu einer Degeneration des Herzmuskels oder Arrhythmien (Hunter and Chien 1999).

Weltweit werden große Anstrengungen unternommen, diesen Kreislauf der Degeneration des Herzmuskels im Verlauf der pathologischen Herzhypertrophie zu brechen.

Über positiv inotrope Medikamente kann die Kontraktionskraft des Herzens vergrößert und die Symptome eines geschwächten Herzens gelindert werden (Arnold et al. 1980). Dies kann durch das Mobilisieren einer erschöpflichen Energiereserve geschehen und erhöht neben dem Energieverbrauch das Risiko einer Arrhythmie und einem plötzlichen Herzstillstand (Lehnart et al. 2005). Neue Medikamente setzen bei Wachstumsfaktor-vermittelten Signalwegen an, die im Verlauf der Herzinsuffizienz

übermäßig aktiviert sind und verlangsamen so ein Fortschreiten der Erkrankung (Bers and Harris 2011). In einer aktuellen Studie wurden über den Vergleich zwischen physiologischer und pathologischer Herzhypertrophie erste molekulare Unterschiede herausgearbeitet und als mögliche Angriffspunkte für neue Behandlungsoptionen identifiziert (Boström et al. 2010). Alternativ kann das Herz über operative Eingriffe entlastet werden, indem linksventrikuläre Unterstützungssysteme oder künstliche Herzen eingepflanzt werden (Rose et al. 2001). Eine wirkliche Heilung kann gegenwärtig jedoch nur über eine Herztransplantation erreicht werden. Die Kosten und das Risiko solcher Eingriffe sind hoch und die Anzahl von Spenderorganen für eine Transplantation sehr begrenzt (Costanzo et al. 1998). Ein weiterer Ansatz für die erfolgreiche Therapie der Herzinsuffizienz sind Verfahren mit Stammzellen oder induzierten Stammzellen, die für die Anwendung am Menschen allerdings noch nicht ausgereift sind (Laflamme and Murry 2011).

Folglich besteht eine große Notwendigkeit an Optionen für die Behandlung von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz. Eine wichtige Rolle bei der Funktion des Herzens und der Entstehung von Herzhypertrophie nimmt der intrazelluläre pH (pH_i) ein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Protein untersucht, das eine zentrale Rolle bei der Regulation des pH_i im Herzen einnimmt.

2.2 Homöostase und intrazellulärer pH

Prozesse in Lebensformen werden von Enzymen katalysiert. Im Verlauf ihrer Evolution wurden Enzyme für bestimmte Bedingungen optimiert. Eine Abweichung von diesen Bedingungen beeinflusst den reibungslosen Ablauf der Enzymvermittelten Reaktionen und somit das Leben selbst. Daher wurden verschiedene Mechanismen im Verlauf der Evolution selektiert, um konstante Bedingungen in Zellen zu erhalten, damit chemische Reaktionen berechenbar und koordiniert ablaufen. Die Erhaltung dieser Rahmenbedingungen für Leben – die Homöostase – kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen: auf der Ebene der einzelnen Zelle oder im Verbund mehrerer Zellen. Die Beispiele für die Erhaltung der zellulären Homöostase sind zahllos wie die Vielfältigkeit der Wege, die die Evolution beschreiten kann.

Ein Beispiel für die Notwendigkeit der Homöostase ist die Temperatur. Enzyme arbeiten stark temperaturabhängig und innerhalb eines biologischen Optimums, das

an die Umgebung des betreffenden Organismus angepasst ist. Wird dieses Optimum verlassen, laufen Reaktionen langsamer ab. Bei deutlicher Überschreitung des Optimums und des Toleranzbereichs denaturieren die Enzyme, wodurch Reaktionen und Reaktionsketten nicht mehr ablaufen können.

Ein weiterer wichtiger Parameter ist die intrazelluläre Protonenkonzentration in wäßrigen Lösungen oder auch der intrazelluläre pH-Wert (pH_i). Der pH-Wert wird als negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität definiert.

Die Konzentration von Protonen beeinflusst das Verhalten von schwachen Säuren und Basen, wozu sämtliche Proteine und Nukleinsäuren zählen, also auch alle Enzyme zählen. Auch hier existiert ein Optimum und ein Toleranzbereich, der nicht verlassen werden darf. Die Folgen einer Abweichung vom physiologischen pH_i sind schwerwiegend und werden bereits seit langer Zeit erforscht. So führt eine Acidose zum Abnehmen der Kontraktionskraft in isolierten Herzen (Gaskell 1880).

Über den pH_i kann auch die Aktivität von Enzymen reguliert werden. Ein prominentes Beispiel stellt die Phosphofruktokinase dar, deren Aktivität bei milder Steigerung des pH_i erhöht wird (Trivedi and Danforth 1966). Folglich müssen Zellen über verschiedene Mechanismen zur Regulation des pH-Werts verfügen. Ein Mechanismus zur Regulation des pH_i ist der Natrium-Protonen Austausch (engl. *Na⁺/H⁺ exchange*, NHE).

2.3 Na⁺/H⁺-Austausch in Zellen

In nahezu jedem Zelltyp kann Natrium-Protonen Austausch nachgewiesen werden (Aronson 1985). Bei diesem Prozeß wird extrazelluläres Na⁺ in die Zelle und im Gegenzug ein intrazelluläres H⁺ aus der Zelle geschleust. Die treibende Kraft ist der Na⁺ Gradient, der von der Na⁺/K⁺-ATPase unter Energieverbrauch geschaffen wird (Morth et al. 2011).

In Experimenten zur pH-Regulation in Zellen konnte Na⁺/H⁺-Austausch unter Verwendung von Mikroelektroden nachgewiesen werden. In einer dieser Studien war eine Acidose nach Depolarisation von Froschmuskelzellen schneller reversibel, wenn Na⁺ im Extrazellulärmedium vorhanden war (Abercrombie and Roos 1983). Diese Na⁺-abhängige Erholung von einer erhöhten Protonenkonzentration stellte einen Hinweis für einen Na⁺-vermittelten Protonentransport aus der Zelle dar.

Vor der Klonierung des verantwortlichen Proteins wurden die Eigenschaften des Na^+/H^+ -Austauschers weiter untersucht und genauer charakterisiert. Durch enzymkinetische Untersuchungen konnte die Stöchiometrie des Na^+/H^+ -Austauschers auf 1:1 festgelegt werden (Boron and Boulpaep 1983). Ein elektroneutraler Transport wurde abgeleitet, da keine Änderungen im Membranpotential über Na^+/H^+ -Austausch verursacht werden und umgekehrt Veränderungen des Membranpotentials keinen Einfluss auf die Transportrate haben (Knickerbein et al. 1983). Ein Hinweis auf die besondere Rolle des Na^+/H^+ -Austauschers für die Regulation des pH_i wurde durch die allosterische Wirkungsweise der intrazellulären Protonen deutlich. So führt eine Erhöhung der intrazellulären Protonenkonzentration zu einer Erhöhung der Transportrate, während bei physiologischen pH-Werten nahezu keine Transportaktivität zu beobachten ist (Lacroix et al. 2004). Ein Hinweis dafür, dass der Na^+/H^+ -Austauscher unter physiologischen Bedingungen den pH_i reguliert, indem Protonen aus der Zelle transportiert werden ist der Natriumgradient zwischen intra- und extrazellulärem Milieu. Da Na^+ -Ionen über die Na^+/K^+ -ATPase unter Energieverbrauch aus der Zelle geschleust werden, erscheint der Transport von Protonen aus der Zelle als der einzig sinnvolle Transportmodus des Na^+/H^+ -Austauschers. Außerdem wird durch den Na^+/H^+ -Austauscher immer ein Proton transportiert, während im Antiport andere Ionen transportiert werden können (Na^+/H^+ , Li^+/H^+ und NH_4^+/H^+). Die Substratspezifität hebt die Relevanz des Protonentransports somit hervor (Aronson 1985). Des Weiteren wurde beobachtet, dass verschiedene zelluläre Wachstumsstimuli die Sensitivität des Na^+/H^+ -Austauschers für Protonen erhöhen, also die Transportrate steigern (Sardet, Fafournoux and Pouyssegur 1991). Über Versuche mit pharmakologischen Substanzen konnte eine Inhibition des Na^+/H^+ -Austauschers über Amilorid und seine Derivate nachgewiesen werden (Counillon, Franchi and Pouyssegur 1993).

Bei der Suche nach der molekularen Identität des Wachstumsfaktor-aktivierten Na^+/H^+ -Austauschers stand folglich eine Vielzahl von Charakteristika parat, die für die Suche nutzbar gemacht werden konnten und von putativen Kandidatengen-/proteinen erfüllt werden mussten. Die Bedeutung des Na^+/H^+ -Austauschers ist neben der Regulation des pH_i auch für andere biologische Prozesse relevant. Bislang konnte eine Rolle für den Na^+/H^+ -Austausch bei der Regulation des Zellvolumens, für transepithelialen Natriumtransport, das Zellwachstum und die Proliferation nachgewiesen werden (Wakabayashi, Shigekawa and Pouyssegur 1997).

2.4 Die Klonierung von NHE1

Die Suche nach der molekularen Identität des Na^+/H^+ -Austauschers wurde von einem französischen Forscherteam um Jacques Pouyssegur beendet (Sardet, Franchi and Pouyssegur 1989). Die angewandte Klonierungsstrategie beruhte auf der Verwendung einer mutanten Mausfibroblastenlinie ohne endogene NHE-Aktivität, die mit einer humanen genomischen DNA-Bibliothek komplementiert wurde. Nach Identifikation eines Klons der zu einem Amilorid-sensitiven Na^+ -Influx führt (Franchi, Perucca-Lostanlen and Pouyssegur 1986), wurde eine Sonde gegen den codierenden Teil des Na^+/H^+ -Austauschers erzeugt, ein „Screening“ einer humanen cDNA Bibliothek durchgeführt und positive Klone schrittweise sequenziert. Das auf diesem Weg identifizierte Gen wies ein Produkt von 894 Aminosäuren und 10-12 transmembranen Domänen auf (Abb. 1). In einer späteren Studie wurde festgestellt, dass NHE1 eine Länge von 815 Aminosäuren anstatt 894 Aminosäuren aufweist (Tse et al. 1991).

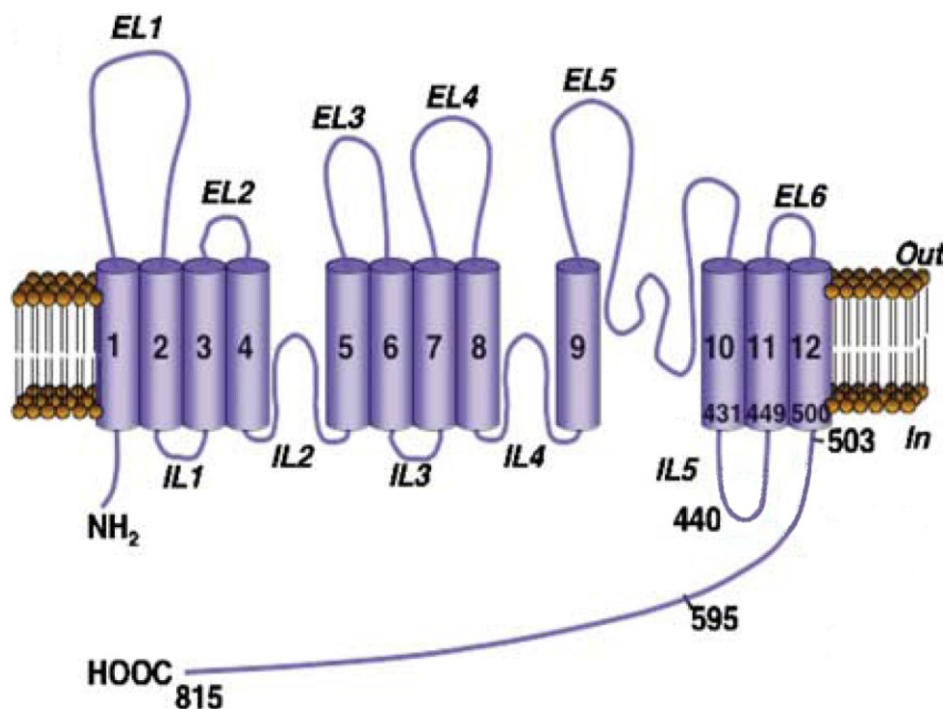


Abb. 1: *Topologie von NHE1*. Schematische Darstellung der Struktur von humanem NHE1. Das Protein verfügt über 12 transmembrane Domänen und eine lange C-terminale cytoplasmatische Domäne. Es existieren sechs extrazelluläre (EL) und fünf intrazelluläre (IL). Abbildung mit geringfügigen Änderungen übernommen ((Ammar et al. 2006).

Als endgültiger Beweis wurde die mutante Mausfibroblastenlinie ohne endogene NHE-Aktivität mit der isolierten cDNA komplementiert und ein Amilorid-sensitiver

Na⁺-Influx nachgewiesen, wodurch der Na⁺/H⁺-Austauscher molekular identifiziert war. In einer nachfolgenden Untersuchung konnte die molekulare Grundlage für die gesteigerte NHE-Aktivität nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren aufgeklärt werden. Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers wurde eine Phosphorylierung von NHE nachgewiesen, die mit ansteigender Transportrate korreliert (Sardet et al. 1990). Die durch Wachstumsfaktoren erhöhte NHE-Aktivität mit einhergehender Alkalose wurde zeitweise als permissives Signal zur Zellproliferation gedeutet. Diese Deutung der auftretenden Alkalose ist möglicherweise ein Artefakt der vorherrschenden Meßbedingungen in nicht-physiologischen Puffern. Parallel zur Klonierung von NHE1 wurde gezeigt, dass unter physiologischen Bedingungen in Gegenwart von Bicarbonat die Stimulation mit Wachstumsfaktoren keine Änderungen im pH_i bewirken, da neben Na⁺/H⁺-Austausch auch Na⁺-abhängige und Na⁺-unabhängige Cl⁻/HCO₃⁻ Austauscher aktiviert werden, welche die Effekte von Na⁺/H⁺-Austauschern auf den pH_i ausgleichen können (Ganz et al. 1989). Die wachstumsvermittelte Steigerung vom Na⁺/H⁺-Austausch sollte damit als Schutzmechanismus der Zelle vor einer Acidose verstanden werden.

2.5 Die NHE-Genfamilie

Die Verfügbarkeit einer Sonde gegen NHE1 ermöglichte innerhalb kurzer Zeit die Entdeckung weiterer Na⁺/H⁺-Austauscher, wodurch fünf neue Mitglieder der NHE-Genfamilie kloniert werden konnten. Mit der Verfügbarkeit von Genomanalysen wurden vier weitere Mitglieder der NHE-Genfamilie entdeckt, womit bis zum heutigen Zeitpunkt neun NHE-Gene in Säugetieren entdeckt wurden. Die Isoformen zeigen erhebliche Unterschiede in Expression, subzellulärer Lokalisation, Ionentransport, Regulationsmechanismen und eine unterschiedlich ausgeprägte Sensitivität gegenüber Amilorid (Orlowski and Grinstein 2004). Die Isoformen NHE1-NHE5 zeigen eine Lokalisation an der Plasmamembran, während die Isoformen NHE6-NHE9 vorwiegend in den Membranen intrazellulärer Organellen gefunden werden. Die Isoformen NHE1-NHE5 transportieren Na⁺ und nicht K⁺, während die Isoformen NHE6-NHE9 Na⁺ und K⁺ transportieren können (Ohgaki et al. 2011). Die Unterschiede in der Lokalisation und Ionenselektivität reflektieren die phylogenetische Verwandtschaft innerhalb der NHE-Genfamilie wie in Abb. 2 ersichtlich ist.

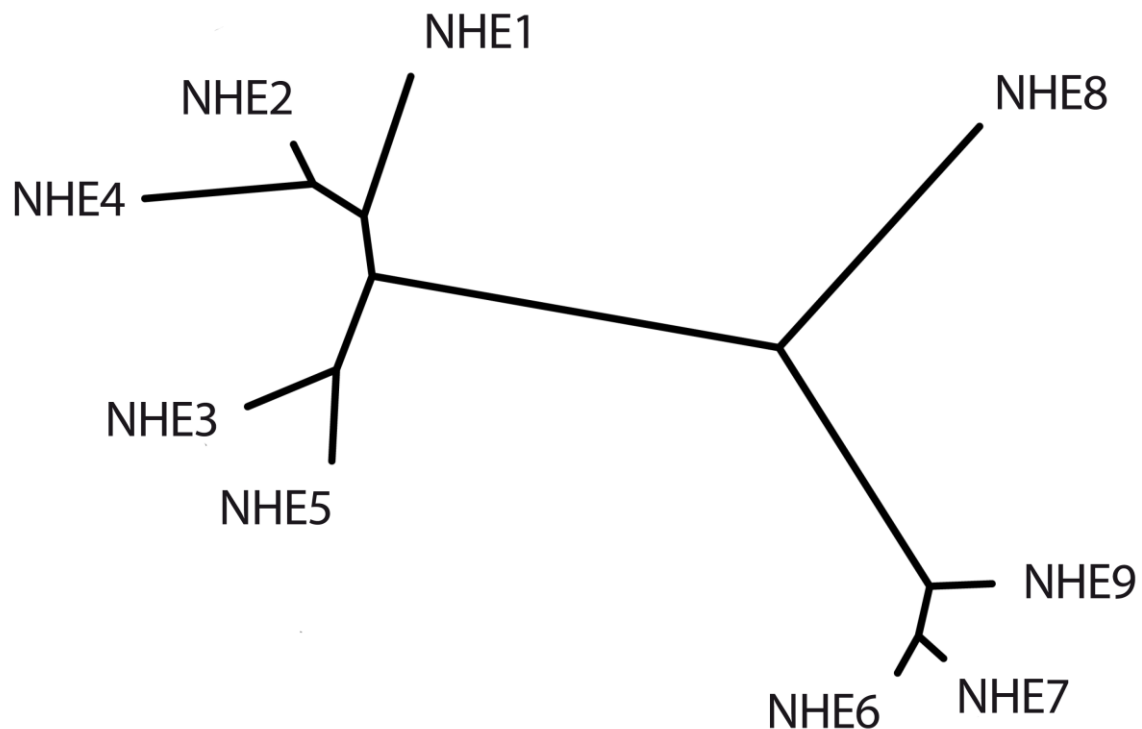


Abb. 2: *Phylogenetische Verwandtschaft der Na⁺/H⁺-Austauscher.* Phylogenetische Verwandtschaft der Na⁺/H⁺-Austauscher von *Mus musculus*. Die Proteinsequenzen für NHE1-NHE9 wurden über einen BLAST-basierten Algorithmus miteinander verglichen (Dereeper et al. 2008). Hierbei zeigte sich die Aufspaltung der NHE-Genfamilie zwischen Plasmamembran-lokalisierten Na⁺/H⁺-Austauschern (NHE1-NHE5) und Organellenmembran-lokalisierten Na⁺/H⁺-Austauschern (NHE6-NHE9).

Die Expressionsmuster der verschiedenen Na⁺/H⁺-Austauscher sind komplex und werden im folgenden Abschnitt kurz beschrieben. In den verschiedenen Zelltypen eines Organs kann ein unterschiedliches Repertoire an Na⁺/H⁺-Austauschern vorliegen.

Für NHE1 ist eine ubiquitäre Expression und eine Funktion bei der Aufrechterhaltung des physiologischen pH_i nachgewiesen worden. Die Isoformen NHE2, NHE3 und NHE4 sind auf die Niere und den Gastrointestinaltrakt beschränkt. NHE2 und NHE3 führen eine Funktion bei der Na⁺- und H₂O-Reabsorption in der Niere aus, wobei die Inaktivierung von *Nhe3* (Schultheis et al. 1998b) schwerwiegendere Konsequenzen als die Inaktivierung von *Nhe2* (Schultheis et al. 1998a) zur Folge hat. So führt die homozygote Inaktivierung von *Nhe3* zu Diarrhö und einer milden Acidose im Blut, während die homozygote Inaktivierung von *Nhe2* scheinbar keine Konsequenzen für die Säuresekretion hat, jedoch das Überleben von Parietalzellen der Magenschleimhaut beeinflusst. Für NHE4 wurde in der Niere eine Funktion im

Ammonium-Haushalt beschrieben (Bourgeois et al. 2010). Die Isoform NHE5 wird im zentralen Nervensystem gefunden und spielt eine Rolle bei der Regulation des Dendritenwachstum in Neuronen (Diering et al. 2011).

Die Isoformen NHE6, NHE7 und NHE8 können transkriptionell in vielen Geweben nachgewiesen werden. Für NHE9 wird eine ubiquitäre Expression angenommen. Eine stark ausgeprägte Expression der Isoformen NHE6, NHE7 und NHE9 ist im Gehirn in verschiedenen intrazellulären Organellen zu beobachten. Übereinstimmend mit dem Expressionsmuster wurden Mutationen beim *Angelman like syndrome* in NHE6 (Gilfillan et al. 2008) oder bei Patienten mit Autismus in NHE9 (Morrow et al. 2008) identifiziert. Eine beschriebene Funktion für diese Na^+/H^+ -Austauscher Isoformen ist die pH-Regulation in intrazellulären Kompartimenten und Vesikeln (Ohgaki et al. 2011).

Passend zu den Funktionen von NHE5, NHE6 und NHE9 im Nervensystem wurde auch für NHE1 eine wichtige Funktion im Nervensystem beschrieben. Im spontan auftretenden sogenannten *slow-wave epilepsy* (swe) Mausmodell wurde ein schwerwiegender neurologischer Phänotyp nachgewiesen. Die molekulare Grundlage für das *slow-wave epilepsy* Mausmodell ist eine trunkierende Stopmutation im *Nhe1* Gen. Neben einer Neurodegeneration im Kleinhirn und Hirnstamm weisen *Nhe1^{swe/swe}* Mäuse einen komplexen Ataxiephänotyp und Epilepsie auf. Die Epilepsie führt in der Regel zum Versterben der *Nhe1^{swe/swe}* Mäuse in einem Alter von 4-8 Wochen. Dies belegt die wichtige Funktion von Na^+/H^+ -Austausch im Nervensystem (Cox et al. 1997).

Neben der Funktion von *Nhe1* bei der Ionentranslokation konnte eine Funktion für *Nhe1* als Strukturprotein in der Zelle nachgewiesen werden. Hierbei stellt NHE1 einen Anker zwischen Plasmamembran und Cytoskelett dar (Denker et al. 2000). Folglich ist bei Gen-Funktionsstudien zu beachten, dass beobachtete Effekte sowohl über Ionentransport und/oder strukturelle Effekte in der Zelle zustande kommen können. Interessanterweise sind duale Funktionen bei vielen Proteinen zu beobachten. Ein weiteres Beispiel dafür ist die Phosphoinositid-3-Kinase γ , die neben einer enzymatischen Aktivität auch eine strukturelle Funktion ausübt (Patrucco et al. 2004).

2.6 Na⁺/H⁺-Austausch und Herzerkrankungen

Vor Kenntnis des Amilorid-sensitiven Na⁺/H⁺-Austausches in Zellen wurde das Pyrazinderivat Amilorid als diuretisches Medikament verwendet. Ein Hinweis auf eine kardioprotektive Wirkung konnte in einem experimentellen Modell mit induzierter Arrhythmie gefunden werden, wobei eine Behandlung mit Amilorid das Auftreten von Arrhythmien unterbinden konnte (Seller et al. 1975). Bereits zu diesem Zeitpunkt wurde eine herzspezifische Wirkung von Amilorid unabhängig von der diuretischen Wirkung vermutet. Mit Beginn der Messung von Na⁺/H⁺-Austausch in verschiedenen Zelltypen wurde in isolierten Kardiomyozyten eine entsprechende Aktivität nachgewiesen und die Basis für die Erkenntnis gelegt, dass Amilorid in Kardiomyozyten über Inhibition des Na⁺/H⁺-Austausches wirkt (Frelin, Vigne and Lazdunski 1984). In einem Ischämie- und Reperfusionsexperiment (I/R) wurde eine verbesserte Herzleistung nach Behandlung mit Amilorid nachgewiesen (Karmazyn 1988). Mit der Klonierung von NHE1 konnte die Funktion des Na⁺/H⁺-Austauschs im Herzen weitergehend untersucht werden. Im Herz gilt NHE1 als der dominante Na⁺/H⁺-Austauscher in der Plasmamembran (Cingolani and Ennis 2007).

Neben der bereits erwähnten Rolle von NHE1 im Verlauf von Ischämie- und Reperusionsperioden wurde eine Vielzahl von Studien zur Rolle von NHE1 bei der Entstehung von Herzhypertrophie durchgeführt. Als Grundlage für diese Untersuchungen gilt, dass eine Herzhypertrophie mit einer erhöhten Na⁺/H⁺-Austauschrate einhergeht (Takewaki et al. 1995). Diese Erhöhung der Na⁺/H⁺-Austauschrate wurde auch in I/R nachgewiesen (Karmazyn 1988). Nach einem Modell führt die exzessive Aktivität von NHE1 im Verlauf einer Acidose zu einer Steigerung der intrazellulären Na⁺-Konzentration ([Na⁺]_i). Liegt ein ATP-Mangel vor kann die gesteigerte [Na⁺]_i durch die Na⁺/K⁺-ATPase nicht ausgeglichen werden und ein alternativer Mechanismus zur Normalisierung von [Na⁺]_i wird aktiviert. Dabei wird der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) im reversen Modus aktiviert und transportiert somit Na⁺ im Austausch gegen Ca²⁺ aus der Zelle. Die sekundäre Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) stört die Kontraktionskraft der Herzmuskelzellen und senkt die Arbeitsleistung des Herzens, die erneut durch hypertrophes Wachstum ausgeglichen werden soll (Abbildung 3) (Karmazyn, Kilić and Javadov 2008). Obwohl dieses Modell für Ischämie- und Reperfusionsexperimente postuliert wurde, kann es auch auf Hypertrophie angewendet werden, da eine pathologische Hypertrophie zu lokalen

Ischämieperioden im Herzmuskel führt (Sano et al. 2007). Die Arbeitsleistung des Herzens sinkt im Verlauf einer Herzhypertrophie immer weiter, bis ein weiteres Wachstum der Kardiomyozyten nicht mehr möglich ist oder die Kardiomyozyten durch die erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration irreparabel geschädigt werden (Gottlieb et al. 1994).

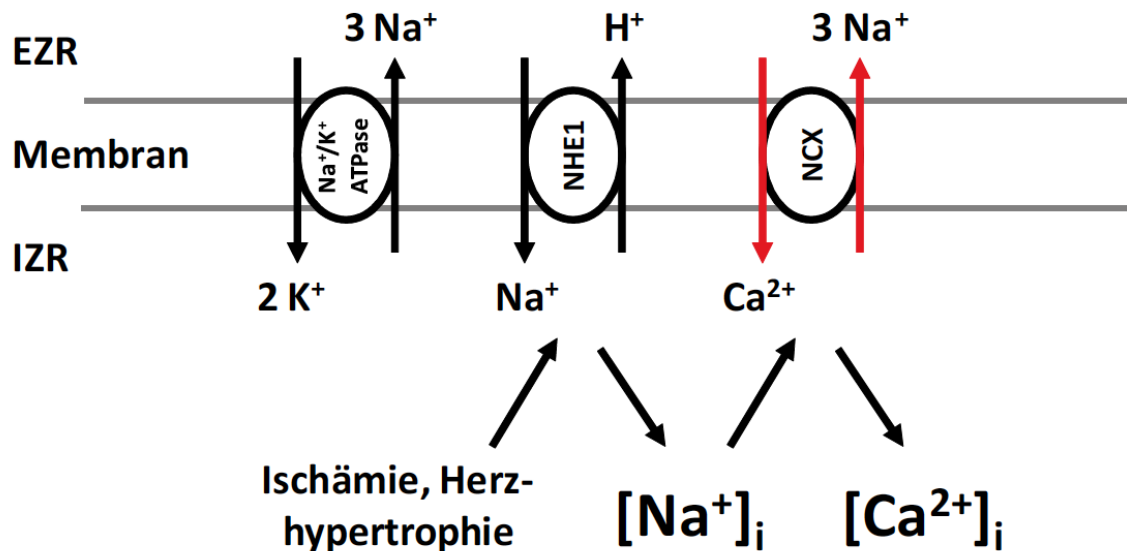


Abb. 3: Schematische Darstellung der Konsequenzen einer erhöhten NHE1 Aktivität. Ischämie und Herzhypertrophie steigern die Aktivität von NHE1 und führen zu einer Erhöhung von $[Na^+]_i$. Kann diese Erhöhung von Na^+_i nicht über die Na^+/K^+ -ATPase ausgeglichen werden, tritt NCX in den reversen Modus und transportiert Na^+ im Austausch gegen Ca^{2+} aus der Zelle. Diese sekundäre Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ hat negative Auswirkungen auf die Herzmuskelkontraktion. Abkürzungen: EZR = extrazellulärer Raum, IZR = intrazellulärer Raum.

In weiteren experimentellen Studien konnte durch pharmakologische NHE1-Inhibition die Ausbildung einer Herzhypertrophie reduziert bzw. unterbunden werden. Dies gilt sowohl für genetisch induzierte Hypertrophien (Engelhardt et al. 2002) als auch für pharmakologisch induzierte Hypertrophien (Ennis et al. 2003). Diese Studien führten zu der Annahme, dass durch NHE1-Inhibitoren eine neue Behandlungsoption für Herzinsuffizienz bestehen würde. Leider konnten die überzeugenden Ergebnisse nicht in der Klinik erzielt werden und eine Zulassung von NHE1-Inhibitoren als Herzmedikament wurde verweigert (Théroux et al. 2000). Es gibt jedoch Hinweise, dass NHE1-Inhibitoren eine vorteilhafte Wirkung unter bestimmten Bedingungen haben können, solange NHE1-Inhibitoren vor oder spätestens mit Beginn einer ischämischen Periode verabreicht werden (Avkiran and Marber 2002).

Somit erscheinen NHE1-Inhibitoren als geeignet, mögliche I/R-Schäden bei Operationen am Herzen zu reduzieren. Aufgrund dieser offenen Fragen ist die weitere Erforschung der Rolle von NHE1 bei der Entstehung von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz sinnvoll.

3. Ziele der Arbeit

Wie einleitend beschrieben ist die Entstehung einer Herzhypertrophie mit einer Aktivierung von NHE1 verbunden. In einer Vielzahl an Publikationen wurde beschrieben, dass die Hemmung von NHE1 mit pharmakologischen Inhibitoren die Entstehung von Herzhypertrophie in experimentellen Tiermodellen unterbinden kann und damit eine interessante Option zur Behandlung der Herzinsuffizienz aufgezeigt.

In klinischen Studien hingegen zeigten NHE1-Inhibitoren keine schützende Wirkung, sodass die Zulassung als Herzmedikament verweigert wurde. Eine Ursache für das Versagen von NHE1-Inhibitoren in der Klinik ist nicht bekannt und wird kontrovers diskutiert. Folglich besteht eine große Notwendigkeit dafür, dass die Rolle von NHE1 bei der Entstehung von Herzhypertrophie weiter erforscht wird.

In dieser Arbeit soll die Funktion von *Nhe1* in Kardiomyozyten unabhängig von pharmakologischen Inhibitoren analysiert werden.

Zu diesem Zweck sollte:

1. Ein konditionales Mausmodell für *Nhe1* erzeugt werden.
2. Mit Hilfe dieses konditionalen Mausmodells *Nhe1* selektiv in Kardiomyozyten inaktiviert werden.
3. Eine mögliche physiologische Rolle von *Nhe1* unter Ruhebedingungen überprüft werden.
4. Die Rolle von *Nhe1* in einem experimentellen Herzhypertrophiemodell untersucht werden.

4. Material und Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Herstellung von chemokompetenten Bakterien

Zur Herstellung von chemokompetenten Bakterien wurden *E. coli* XL1 blue in einer Vorkultur in 2 ml ψ -broth Medium (LB-broth Medium, 4 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 3 μ g/ml Tetrazyklin) über Nacht bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Am nächsten Morgen wurden 500 ml ψ -broth Medium mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 angezogen. Die Bakterien wurden auf Eis abgekühlt und mit einer präparativen Zentrifuge (Beckman) in 5 Minuten bei 3000 rpm bei 4 °C pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 150 ml eiskalten TFB1 Puffer (15 % Glycerin, 10 mM CaCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, pH 5,8 vorsichtig mit CH₃COOH einstellen) resuspendiert und 60-90 Minuten auf Eis in TFB1 inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 5 Minuten bei 3000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in steril gefilterten, eiskalten TFB2 Puffer (15 % Glycerin, 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl) durch Pipettieren resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis in Aliquots (270 μ l) aufgeteilt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.1.2 Transformation von chemokompetenten Bakterien

Zur Transformation wurden 50 μ l der auf Eis aufgetauten chemokompetenten Bakterien mit der entsprechenden DNA auf Eis für 30 Minuten inkubiert und einem Hitzeschock bei 37 °C für 2 Minuten unterzogen. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden 250 μ l SOC-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, pH 7,0) zugesetzt und die Bakterien für 45 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugieren bei 4000 rpm, 5 Minuten pelletiert, 250 μ l Überstand abgenommen, die Bakterien in den verbliebenen 50 μ l resuspendiert und auf einer LB-Platte (10 g/l Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar) mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.1.3 Screening einer Lambda-Bibliothek

Für die Klonierung von Vektoren zur Erzeugung von transgenen Mäusen über homologe Rekombination wurden genomische DNA-Fragmente von 15-25 kb der Maus benötigt. Um an entsprechende DNA-Fragmente zu gelangen wurde eine Lambda-Bibliothek gescreent. In einer Lambda-Bibliothek ist die genomische DNA der Maus in das Phagen genom integriert worden. Dabei ist die genomische DNA beiderseits von sogenannten Phagenarmen flankiert. Um ein relevantes Fragment zu isolieren, wurde die Phagenbibliothek (Lambda FIX II, Stratagene) mit radioaktiv markierten Sonden auf die entsprechenden Sequenzen durchsucht (engl. *screening*). Dieses Screening beruht auf einem Stempelprinzip, d.h. die in Bakterien angezogenen Phagen werden von Platten mit Nährmedium auf Membranen gestempelt und diese auf eine bestimmte DNA-Sequenz über DNA-Hybridisierung mit einer Sonde überprüft. Nach Identifikation eines Phagen mit der gesuchten DNA-Sequenz kann über Abgleich mit der Membran kann dann auf zurückgebliebene vermehrungsfähige Phagen auf der Platte zugegriffen werden. Im Verlauf des Screenings wurden Phagenklone angereichert und der DNA-Abschnitt von Interesse isoliert und in Bakterien kloniert werden.

Zur Vermehrung der Phagen wurden E. coli XL-1 blue MRA Bakterien in 100 ml LB-Medium mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen. Die Verwendung von Maltose im Medium ist notwendig, da E. coli über den Maltoserezeptor vom Lambda-Phagen transduziert wird. Die MRA Bakterien wurden dann bei 3000 rpm, 4 °C für 15 Minuten pelletiert in 20 ml MgSO₄ (10 mM) gewaschen und erneut pelletiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Bakterien in 20 ml MgSO₄ (10 mM) resuspendiert und bei 4 °C bis zu 2 Wochen gelagert.

Die Transduktion von MRA Zellen mit Lambda-Phagen wurde in 2 Varianten im Verlauf des Screenings durchgeführt. Auf 150 mm Platten für das Ausplattieren der Phagenbibliothek, sowie für die präparative Isolation eines Phagenklons und auf 90 mm Platten für die Anreicherung von Klonen mit dem gesuchten Fragment genomischer Maus-DNA. Für 150 mm Platten wurden 450 µl, für 90 mm Platten 150 µl MRA Bakteriensuspension mit Phagen bei 37 °C im Schüttler für 20 Minuten inkubiert. Dieser Phagen-Bakterien Transduktionsmix wurde in 9 ml (150 mm Platte) bzw. 3 ml (90 mm Platte) Agarose (1 %) in LB-Medium bei 47 °C ins Wasserbad gegeben und gleichmässig auf einer LB-Platte der entsprechenden Größe verteilt. Die

erhaltenen Platten wurden ungefähr 15 Minuten getrocknet und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Bevor Stempel gezogen werden konnten, wurden die Platten auf 4 °C gekühlt. Zum Stempeln wurden die Membranen (Biodyne A0.45 µm, 82 bzw. 132 mm, Pall Life Sciences) für 1 Minute auf der Platte inkubiert und drei Markierungen zur Orientierung in die Membranen gestochen. Nach der Inkubation auf der LB-Platte wurde die Membran mit der DNA-Seite nach oben liegend auf Filterpapier (Whatman) mit Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) für 2 Minuten gelegt. Danach wurden die Membranen auf Filterpapier mit Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 8,0) für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Membranen für mindestens 1 Minute in Waschpuffer (0,2 M Tris, 2x SSC) inkubiert. Nach Lufttrocknung der Membranen wurde die DNA durch Backen bei 80 °C für 2 Stunden fixiert.

Die Membranen wurden mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert (siehe Abschnitt Molekularbiologie) und Phagen mit einem Signal durch Ausstechen aus der LB-Platte möglichst vereinzelt isoliert. Hierfür wurde ein Röntgenfilm (BioMax MR Kodak) mit den Signalen der radioaktiv markierten Sonde in korrekter Orientierung unter die Platten gelegt und möglichst einzelne Klone mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze ausgestochen und in 1 ml SM-Puffer (5,8 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O, 50 ml Tris-HCl pH 7,5, 5 ml 2 % Gelatine in 1 l H₂O) mit 20 µl Chloroform überführt und nach Vortexen über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Zur Herstellung einer Phagenverdünnung zur Vereinzelung eines Phagenklons wurde eine Verdünnung (1/1000) vom Phagenüberstand hergestellt. Von dieser Verdünnung wurden 1 µl, 10 µl und 100µl mit 150 µl MRA-Bakterien für 20 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und zu 3 ml (90 mm Platte) Agarose (1 %) in LB-Medium bei 47 °C ins Wasserbad gegeben und gleichmässig auf einer LB-Platte verteilt. Die erhaltenen Platten wurden ungefähr 15 Minuten getrocknet und dann bei 37 °C über Nacht inkubiert. Mit diesen Platten konnten erneut Membranen gestempelt werden, wobei während der Isolation von einzelnen Phagenklonen möglichst Platten gestempelt wurden, die nur eine geringe Anzahl Phagenplaques enthielten. Sobald einzelne Phagenklone vorlagen, wurde der Titer der Phagensuspension bestimmt und von 150 mm Platten eine Phagenpräparation durchgeführt (siehe DNA-Präparation von Lambda-Phagen).

Zur Klonierung der genomischen Maus-DNA in einen bakteriellen Vektor wurden die Phagenarme über einen Restriktionsverdau und präparative Gelelektrophorese abgetrennt. Hierfür wurde nach der DNA-Präparation aus Phagen die DNA mit *NotI* oder *Sall* geschnitten und auf einem langen 0,8 %igem Agarosegel aufgetragen und über Nacht bei 40V aufgetrennt. Da die Phagenarme und genomische DNA der Maus hochmolekulare DNA-Spezies sind, ist eine lange Laufstrecke zur ausreichenden Auftrennung der DNA notwendig. Nach Ausschneiden der genomischen Maus-DNA wurde diese in einen bakteriellen Vektor kloniert.

4.2 Klonierungsmethoden

4.2.1 Restriktionsverdau

Zur Restriktion von Plasmid bzw. genomischer DNA wurden Restriktionsenzyme mit den zugehörigen Puffern (Fermentas, New England Biolabs) verwendet. Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden 1-2 µg Vektor und 5 µg Insert mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und mit Ausnahme von *EcoRI* mit 10 units Enzym über Nacht verdaut, um einen vollständigen Verdau zu erreichen. Ein Restriktionsverdau mit *EcoRI* wurde nicht über Nacht inkubiert, sondern nach 1-2 Stunden beendet. Für Southern Blots wurden 5-10 µg genomische DNA mit 20-30 units Restriktionsenzym bei entsprechender Temperatur über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen erneut 10 units Enzym zugesetzt und für eine weitere Stunde inkubiert.

4.2.2 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden, Dephosphorylierung

Zum Auffüllen von überhängenden DNA-Enden wurde eine T4 DNA-Polymerase verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Restriktionsenzyme im Restriktionsmix durch Erhitzen bei 65 °C oder 80 °C für 20 Minuten inaktiviert und nach Abkühlen auf Eis 1 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl T4 DNA-Polymerase (Fermentas) pipettiert und der Reaktionsansatz bei 11 °C für 20 Minuten inkubiert. Abschließend wurde die T4 DNA-Polymerase bei 75 °C für 20 Minuten inaktiviert.

Zur Dephosphorylierung von Vektoren wurde eine alkalische Phosphatase verwendet. Hierfür wurden zunächst Restriktionsenzyme über Erhitzen inaktiviert

und 1 µl alkalische Phosphatase (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, Roche) pipettiert und 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Inaktivierung der alkalischen Phosphatase bei 75 °C wurde die dephosphorylierte DNA über eine Agarosegelelektrophorese aufgereinigt.

4.2.3 Gelelektrophorese und DNA-Isolation aus Gelen

Zur Analyse und Aufreinigung von DNA-Präparationen, PCR-Produkten oder Restriktionsansätzen wurden Gelelektrophoresen durchgeführt. Dazu wurden 0,8-2,0 % Agarose in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA) aufgekocht und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach Gießen und Aushärten des Agarosegels wurden die Proben in 1x DNA-Ladepuffer (6x DNA-Ladepuffer: 30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) aufgenommen und das Gel beladen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde bei 30-150 V vorgenommen und nach Auftrennung das Ergebnis unter UV-Licht dokumentiert. Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde das entsprechende Gelfragment unter UV-Licht geringerer Intensität mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten und weiter verarbeitet.

4.2.4 Ligation

Zur Vermehrung eines relevanten DNA-Abschnitts in Bakterien wurde eine Ligation in einem bakteriellen Vektor durchgeführt. Die Ligationseffizienz hängt vom Verhältnis Vektor zu Insert ab, wobei ungefähr 1 Teil Vektor zu 3 Teilen Insert vorteilhaft ist. Aufgrund technischer Probleme bei der Bestimmung von sehr niedriger DNA-Konzentration wurden drei verschiedene Mengen Insert für eine Ligation verwendet und keine DNA-Konzentration gemessen, um dem optimalen Vektor-Insert Verhältnis in einem Ligationsansatz auch ohne Messung möglichst nahe zu kommen. Hierfür wurde ein mit Restriktionsendonukleasen geschnittener, dephosphorylierter Vektor mit unterschiedlichen Mengen kompatibel geschnittenen Insert über Nacht bei 4 °C ligiert. Ein typischer Ligationsansatz bestand dabei aus: 1,0 µl Vektor, 1-12 µl Insert, 2 µl Ligationspuffer (10x) und 1 µl T4-DNA Ligase (New England Biolabs) in einem Volumen von 20 µl. Von diesem Ansatz wurden 3 µl in chemokompetente Bakterien transformiert.

4.3 Isolation von Nukleinsäuren

4.3.1 Isolation von DNA aus Bakterien

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Plasmid Mini oder Midi Kit der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben verwendet.

4.3.2 Slot-Lysis Methode

Zur Überprüfung der Ligation eines Inserts mit einer Größe von ≥ 500 bp in einen bakteriellen Vektor bietet die Slot-Lysis Methode eine schnelle und kostengünstige Möglichkeit, eine große Anzahl Klone zu überprüfen und eine Vorauswahl an Klonen zu treffen, deren weitere Untersuchung sinnvoll erscheint. Das Prinzip ist, dass durch den Einbau eines Inserts die Größe des Vektors zunimmt und somit die Mobilität im Agarosegel abnimmt. Für diese Beobachtung wird keine hohe DNA-Reinheit benötigt. Die DNA-Extraktion aus Bakterien findet bei dieser Technik in der Tasche des Agarosegels statt. Wird ein Klon identifiziert, dessen Laufverhalten auf eine erfolgreiche Ligation deutet, kann mit dem verbliebenen Volumen der Mini-Bakterienkultur eine DNA-Extraktion durchgeführt werden und der Klon mittels analytischer Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung weitergehend untersucht werden.

Für eine Slot-Lysis wurden auf einer 96-well Platte 100 μ l Mini-Bakterienkultur pipettiert und die Bakterien durch Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Die Bakterienpellets wurden in 20 μ l Protoplastenpuffer (30 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 20 % Sucrose, 50 μ g/ml RNase I, 50 μ g/ml Lysozyme) resuspendiert und ein Gel beladen. In der Geltasche wurden die Bakterien durch Zugabe von 14 μ l Lysispuffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, 2 % SDS, 5 % Sucrose, 0,04 % Bromophenol Blau) lysiert und die Bakterien- und Plasmid-DNA im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Eine Verschiebung zu langsamerem Laufverhalten der Plasmid-DNA deutet auf Ligation des Inserts in den bakteriellen Vektor hin.

4.3.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde ein Gel DNA Recovery Kit (Zymoclean) verwendet. Die Arbeitsanweisung ist den Herstellerangaben zu entnehmen.

4.3.4 Isolation von DNA aus Phagen

Für die Klonierung der genomischen Maus-DNA aus einem Lambda-Phagenklon werden drei vollständig lysierte Platten (150 mm) mit 1-2 mm großen Plaques benötigt. Nach Abkühlen der Platten auf Raumtemperatur (RT) wurde jede Platte mit jeweils 12 ml SM-Puffer überschichtet und bei 4 °C unter vorsichtigem Schütteln über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, in einem 50 ml Reaktionsgefäß vereinigt und 1 ml Chloroform zugesetzt. Nach kräftigen Vortexen wurden bakterielle Zelltrümmer bei 4000 g, 10 Minuten bei 4 °C pelletiert und 25 ml Überstand in ein Zentrifugengefäß (Ultra-Clear 25x89 mm, Beckman) pipettiert. Anschließend wurde mit 3 ml CsCl-Lösung (3 M in SM-Puffer) und dann mit 5 ml CsCl-Lösung (5 M in SM-Puffer) unterschichtet. Für das Unterschichten wurde stets etwas mehr CsCl-Lösung als notwendig aufgezoogen, damit die Pipette nicht vollständig entleert werden musste und durch das Ausstoßen von Luftblasen aus der Pipette die Gradienten nicht vermischt wurden. Die Zentrifugengefäße wurden bis zum Rand mit phagenhaltigem Überstand bis zum Rand aufgefüllt und genau tariert. Nach Zentrifugation bei 25000 rpm, 2 Stunden bei 20 °C mit einem SW28 Rotor in einer Ultrazentrifuge (Beckman) wurde die untere Bande mit den Lambda-Phagen zwischen der 3 M und 5 M CsCl-Lösung mit einer Spritze mit möglichst geringen Volumen abgezogen und auf 2,5 ml mit 5 M CsCl in SM-Puffer aufgefüllt. Nach Zugabe von 2,5 ml gesättigter CsCl-Lösung in SM-Puffer wurde die Probe gemischt und in ein Zentrifugengefäß (Ultra-Clear 14x89 mm, Beckman) überführt. Nach Überschichten mit 3,5 ml CsCl-Lösung (5 M in SM-Puffer) und 4,5 ml CsCl-Lösung (3 M in SM-Puffer) wurde die Probe bei 35000 rpm, 90 Minuten bei 20 °C in einem SW41 Rotor in einer Ultrazentrifuge (Beckman) zentrifugiert. Die untere Bande mit den Lambda-Phagen wurde mit einem möglichst geringen Volumen (600-900 µl) abgenommen und in Aliquots zu jeweils 150 µl aufgeteilt. Zu 150 µl der Phagensuspension in CsCl wurden jeweils 15 µl 2 M Tris-HCl, 0,2 M EDTA, pH 8,5 und 150 µl deionisiertes Formamid pipettiert, gemischt und bei RT für mindestens 30 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl H₂O und 900 µl

Ethanol (EtOH) wurde die Phagen-DNA gefällt. Mit Hilfe einer Glaskapillare wurde die Phagen-DNA von allen Aliquots aus den Reaktionsgefäßen gefischt, in 70 % EtOH gewaschen und in insgesamt 150 µl low TE über Nacht bei 4 °C gelöst.

4.3.5 Aufreinigung von DNA für die ES-Zellkultur

Für die Elektroporation von Konstrukten in embryonale Stammzellen (ES) zur homologen Rekombination wurde linearisierte DNA in höchster Reinheit benötigt. Hierfür wurden 100 µg Plasmid-DNA mit 80 units Restriktionsenzym in 200 µl Volumen bei entsprechender Temperatur über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 20 *units* Enzym pipettiert und weitere 2 Stunden inkubiert. Ein 2 µl Aliquot wurde durch Gelelektrophorese auf eine vollständige Restriktion analysiert und das verbliebene Volumen auf 500 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Dann wurde 1 Volumenanteil TE-gepuffertes Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholgemisch (25:24:1, Roth) zugesetzt und durch Vortexen gemischt. Zur Phasentrennung wurde die Probe bei 13000 rpm, 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und die wässrige (obere) Phase in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach zweimaliger Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) wurde eine DNA-Fällung mit 1 Volumenanteil Isopropanol und 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat pH 5,2 vorgenommen. Die gefällte DNA wurde mit 70 % EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in HPLC-H₂O aufgenommen. Nach photometrischer Messung der DNA-Konzentration wurde 1 µg linearisierte DNA über eine Gelelektrophorese mit langer Laufzeit überprüft.

4.3.6 DNA-Extraktion aus 96-well Platten

Konfluent gewachsene ES-Zellen in 96-well Platten wurden mit 1x PBS gewaschen und mit 100 µl Lysispuffer (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 % SDS, 14 mg/ml Proteinase K, pH 8.0) versetzt und bei 55 °C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl LiCl (8 M) und 100 µl Isopropanol wurde unter Schütteln bei RT über Nacht inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 3500 rpm, 20 °C für 30 Minuten wurde der Überstand dekantiert, die gefällte DNA mit 70 % EtOH gewaschen und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands wurde die DNA bei 37 °C für 10 Minuten getrocknet und in 100 µl low TE Puffer über Nacht bei 55 °C gelöst. 20-30 µl der erhaltenen DNA wurde für eine Southern Blot Analyse verwendet.

4.3.7 Phenol-Chloroform Extraktion von genomischer DNA der Maus

Zur Isolation von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Hierfür wurde eine Schwanzbiopsie (0,2-0,3 cm) über Nacht in 500 µl Lysispuffer (50 mM Tris, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS, pH 8.0) mit 10 µl Proteinase K (14 mg/ml) bei 55 °C im Inkubator über Nacht verdaut. Nach Abkühlen des Lysates wurde 1 Volumenanteil TE-gepuffertes Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholgemisch (25:24:1, Roth) zugesetzt, durch Schütteln gemischt und die Probe für mindestens 5 Minuten bei RT zur Extraktion rotiert. Zur Phasentrennung wurde die Probe bei 13000 rpm, 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und die wässrige (obere) Phase in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) wurde eine DNA-Fällung mit 1 Volumenanteil Isopropanol und 1/10 Volumenanteil 8 M LiCl vorgenommen. Die gefällte DNA wurde mit 70 % EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 160 µl low TE Puffer über Nacht bei 55 °C im Inkubator gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die erhaltene DNA kann für eine PCR sowie einen Southern Blot verwendet werden.

4.3.8 HotSHOT DNA-Extraktion

Eine alternative DNA-Extraktionsmethode aus Schwanzbiopsien für genomische DNA zur Analyse mit der Polymerase Kettenreaktion ist die HotSHOT DNA-Extraktion. Hierfür wurde eine Schwanzbiopsie (0,2-0,3 cm) in 75 µl alkalischem Lysispuffer (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA, pH 12.0 ohne Einstellen) für 60 Minuten bei 95 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit 75 µl Neutralisationspuffer (40 mM Tris-HCl, pH 5.0 ohne Einstellen) versetzt und bei 4 °C oder -20 °C gelagert. Für eine PCR zur Genotypisierung wurden 1-2 µl HotSHOT DNA pipettiert.

4.3.9 Isolation von RNA

Zur Isolation von RNA aus Mausgewebe wurde eine Trizolextraktion durchgeführt. Dazu wurde das entnommene Gewebe in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zerkleinert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff überführt. Nach Abdampfen des Stickstoffs wurden pro 100 mg Gewebe 1 ml Trizol (Invitrogen) zugesetzt. Nach Vortexen wurde die Probe 5 Minuten bei RT inkubiert und durch Zentrifugieren unlösliche Zelltrümmer pelletiert und der Überstand in ein neues

Reaktionsgefäß überführt. Pro 1 ml Trizol wurden 200 µl Chloroform zugesetzt und kräftig per Hand für 15 Sekunden geschüttelt. Nach Inkubation für 2 Minuten wurde die Mischung bei 13000 rpm, 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und die wässrige (obere) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 Volumenanteil Isopropanol wurde die Probe 10 Minuten bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 10 Minuten). Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 75 % EtOH gewaschen, vorsichtig luftgetrocknet und in 1x TE Puffer aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die erhaltene Total-RNA bei -80 °C gelagert.

4.4 Isolation von Proteinen

4.4.1 Extraktion von Membranproteinen

Zur Extraktion von Membranproteinen wurde das entsprechende Gewebe mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff zerkleinert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Das zerkleinerte Gewebe wurde in 1 ml eiskalten Homogenisierungspuffer (0,25 % Sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7,4, 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) pro 200 mg Gewebe aufgenommen. Mit einem Potter (Potter S, Sartorius) wurde durch fünf mal fünf Stöße bei jeweils 30 Sekunden Pause auf Eis homogenisiert. Zum Abtrennen von Zelltrümmern wurde zweimalig bei 800 g, 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand jeweils in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Der erhaltene Überstand wurde zum Sedimentieren von Mitochondrien bei 10000 g bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Zur Sedimentation von Membranproteinen wurde der Überstand in Polycarbonat Zentrifugengefäß (Beckman) überführt und bei 110000 g bei 4 °C für 1 Stunde zentrifugiert. Das resultierende Membranproteinpellet wurde mit Probenpuffer (50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,75 % Triton, 1 % Chaps, 10 % Glycerol, pH 7,5, 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) überschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Pellet ohne Aufschäumen des Puffers resuspendiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (800 g, 10 Minuten, 4 °C) entfernt. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde über 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (Smith et al. 1985) bestimmt und Aliquots der isolierten Membranproteine in 1x Laemmli Puffer eingefroren (1-2 µg/µl bei -80 °C).

4.4.2 Extraktion von cytosolischen Proteinen

Zur Extraktion von cytosolischen Proteinen wurde die Probe unter flüssigem Stickstoff im Mörser pulverisiert und im 10-fachen Volumenanteil Lysispuffer (3 % SDS, 30 mM Tris, 5 mM EDTA, 30 mM NaF, 10 % Glycerol, pH 7,4, 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) aufgenommen. Die erhaltene Suspension wurde im Potter homogenisiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C pelletiert. Der Überstand mit cytosolischen Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde über 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (Smith et al. 1985) bestimmt und Aliquots der isolierten Membranproteine in 1x Laemmli Puffer eingefroren (1-2 µg/µl bei -80 °C).

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten bei der Klonierung oder Genotypisierung von transgenen Mäusen kam eine Polymerase Kettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction* = PCR) zum Einsatz. Für die Amplifikation von kurzen DNA-Fragmenten wurde eine Taq-Polymerase (Invitrogen) verwendet. Für längere Fragmente zur DNA-Klonierung >1000 bp wurde eine Phusion-Polymerase (Finnzymes) mit Korrekturlesefunktion verwendet.

4.5.2 Southern Blot

Für eine Southern Blot Analyse von genomischer DNA der Maus wurden 5-10 µg DNA mit 20-30 *units* eines entsprechenden Restriktionsenzym (Fermentas) über Nacht bei entsprechender Temperatur geschnitten. Die erhaltenen Fragmente wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Kamera dokumentiert. Um einen DNA-Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-XL, GE Healthcare) zu erleichtern, wurde das Gel mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen und eine saure Lyse mit 0,25 M HCl für 15 Minuten durchgeführt. Nach erneutem Waschen mit destilliertem Wasser wurde das Gel in 0,4 M NaOH für 15 Minuten äquilibriert und einem

Kapillarblot (Molecular Cloning Handbook, Zweite Version, Abschnitt 9.34) mit 0,4 M NaOH über Nacht unterzogen. Zur irreversiblen Immobilisierung der DNA auf der Nylonmembran wurde die Membran bei 80 °C für 2 Stunden gebacken und danach mit 2x SSC gewaschen. Die erhaltene Membran wurde anschließend mit einer radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert.

4.5.3 Hinweise zum Arbeiten mit RNA

Aufgrund allgegenwärtiger RNasen müssen bestimmte Maßnahmen vor dem Arbeiten mit RNA getroffen werden. Glas- und Metallgegenstände wurden bei 180-220 °C über Nacht gebacken um RNasen zu zerstören. Hitzeunbeständige Gegenstände wurden mit 0,1 M NaOH über Nacht inkubiert und anschließend gründlich mit RNase-freiem Wasser gespült. Sämtliche Puffer wurden – sofern möglich – mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat über Nacht gerührt und dann autoklaviert. Es wurden zertifiziert RNase-freie Plastikwaren verwendet. Zum Pipettieren wurden gestopfte Spitzen benutzt. Chemikalien wurden gesondert gelagert und möglichst ohne Verwendung von Spateln abgewogen.

4.5.4 Northern Blot

Zur Analyse der mRNA Expression wurde ein Northern Blot durchgeführt. Hierfür wurden 10-20 µg Total-RNA in 1x RNA-Ladepuffer (5x RNA-Ladepuffer: 0,25 % Bromophenolblau, 4 mM EDTA, 0,9 M Formaldehyd, 20 % Glycerol, 30,1 % Formamid, 4x MOPS) bei 65 °C für 10 Minuten denaturiert. Nach Abkühlen auf Eis wurde die denaturierte RNA auf ein 1 %iges Agarosegel (1 % Agarose, 7 % Formaldehyd, 1x MOPS) aufgetragen. 10x MOPS Stocklösung (200 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7.0)

Die Elektrophorese wurde in RNA-Laufpuffer (1x MOPS, 3,5 % Formaldehyde in DEPC-Wasser) bei 120 V durchgeführt. Nach ausreichender Auftrennung der RNA wurde das Gel zweimal mit 10x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-Citrat, pH 7.0) für jeweils 10 Minuten gewaschen und die RNA auf eine Nylonmembran (Hybond-XL, GE Healthcare) über einen Kapillarblot mit 10x SSC über Nacht transferiert. Nach Fixierung der RNA auf der Nylonmembran durch Backen bei 80 °C für 2 Stunden wurde die RNA-Integrität mit einer unspezifischen Methylenblaufärbung überprüft. Hierfür wurde die Membran in 5 % Essigsäure für 5 Minuten äquilibriert und dann in

0,01 % Methylenblau in 5 % Essigsäure für 30 Minuten geschüttelt. Nach Entfärben mit Wasser wurden die 28S- und 18S-rRNA sichtbar, wodurch ein erster Rückschluß auf intakte RNA und vergleichbare Mengen geladener RNA in den verschiedenen Spuren möglich war. Die Membran wurde in 2x SSC äquilibriert und bis zur Hybridisierung mit einer radioaktiv-markierten Sonde bei 4 °C gelagert.

4.5.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit ³²P

Zum Nachweis bestimmter DNA- oder RNA-Spezies wurden Sonden mit inkorporierten ³²P-dCTP synthetisiert und mit Southern oder Northern Blot Membranen hybridisiert.

Als Sondenvorlage diente ein kurzes DNA-Fragment, welches mit einem Restriktionsenzym aus einem Plasmid geschnitten worden war. 25-50 ng dieser DNA wurden in 45 µl 1x TE Puffer aufgenommen und bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Nach Abkühlen auf Eis und kurzem Zentrifugieren wurde die denaturierte Sondenvorlage in ein Rediprime II Reaktionsgefäß (GE Healthcare) mit lyophilisiertem dATP, dTTP, dGTP und DNA-Polymerase pipettiert. Nach Zugabe von 5 µl ³²P-dCTP (Hartmann Analytik) wurde der Reaktionsansatz gemischt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Abtrennung von nicht eingebauten Nukleotiden wurde der Sondenansatz über eine G50 Säule (GE Healthcare) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Ein Aliquot von 1 µl der radioaktiv-markierten Sonde wurde mit einem Szintillationszähler gemessen. Mit diesem Meßergebnis wurde die Sonde auf eine Aktivität von 500 000 cpm/ml im Hybridisierungsmix (7 % SDS, 10 % PEG, 1,5x SSPE, 0,1 mg/ml Fischspermien-DNA (Roche)) eingestellt. Vor der Hybridisierung der radioaktiv-markierten Sonde wurde die Membran mit Prähybridisierungsmix (7 % SDS, 10 % PEG, 1,5x SSPE, 0,1 mg/ml Fischspermien-DNA (Roche)) bei 68 °C für 2 Stunden im Hybridisierungsofen blockiert, um unspezifische Bindungen der Sonde an die Membran zu unterbinden. Die radioaktiv-markierte Sonde wurde über Nacht bei 68 °C hybridisiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit vorgewärmtem Waschpuffer (2x SSC, 0,1 % SDS) bei 68 °C für 20 Minuten wurde die Radioaktivität auf der Membran mit einem Geigerzähler gemessen. Bei Messungen über 100 cpm wurde die Membran erneut gewaschen. Nach Beendigung des Waschvorgangs wurde die Membran in Klarsichtfolie gehüllt

und ein Röntgenfilm (BioMax MS, Kodak) auf die Membran gelegt. Dies erfolgte in einer Filmkassette.

4.5.6 Western Blot

Zur Analyse der Expression von Proteinen wurden Western Blots durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 20-30 µg Protein in 1x Laemmli Puffer bei 60 °C für 10 Minuten denaturiert, auf Eis gekühlt und umgehend auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen (Molecular Cloning Handbook, Zweite Version, Abschnitt 18.52). Die Proteine wurden ihrer Größe nach in Tris-Glycin Elektrophorese Puffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine über einen Nass-Blot in Transferpuffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037 % SDS, pH 8.3) auf eine Nitrocellulosemembran (Protran Whatman) bei 400 mA über 70 Minuten geblottet. Der Transfer von Proteinen wurde durch den gefärbten Größenstandard überprüft.

Zum Nachweis ausgewählter Proteine durch Antikörper wurde teilweise die Verwendung eines Signalverstärker Kits (SuperSignal Western Blot Enhancer, Thermo Scientific) notwendig. In diesem Fall wurde nach dem Blotten der Proteine ein alternatives Arbeitsprotokoll gemäß den Herstellerangaben verfolgt.

Ansonsten wurde die Membran mit Ponceau S zum Nachweis von Proteinen gefärbt und die gleichmäßige Beladung sowie der erfolgreiche Transfer von Proteinen überprüft. Nach kurzem Waschen der Membran in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit 1x TBST auf Rollmischern wurde die Membran mit 3 % BSA oder 5 % Milchpulver in 1x TBST für eine Stunde bei RT blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST für jeweils 20 Minuten wurde die Membran mit dem primären Antikörper in 1x TBST über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde erneut dreimalig mit 1x TBST für jeweils 20 Minuten gewaschen und mit einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper für 2 Stunden inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde in 3 % BSA oder 5 % Milchpulver in 1x TBST verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST für jeweils 20 Minuten wurde eine Chemilumineszenz-basierte Detektion des sekundären Antikörpers im 50 ml Reaktionsgefäß auf einem Rollmischer vorgenommen. Zur Detektion der ECL-vermittelten Signale am sekundären Antikörper wurden Röntgenfilme (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) verwendet.

4.5.7 Strippen von Western Blot Membranen

Um eine mehrfache Verwendung der Western Blot Membranen zu ermöglichen, wurden die gebundenen Antikörper wieder abgelöst (engl. *stripping*). Hierfür wurde die Membran mit vorgewärmtem Stripping Puffer (2 % SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol, 50 mM Tris, pH 6,8) für 30 Minuten bei 50 °C unter Schütteln im Inkubator behandelt. Anschließend wurde die Membran in 1x TBST mehrfach gewaschen und vor Inkubation mit einem primären Antikörper erneut mit 3 % BSA oder 5 % Milchpulver für 60 Minuten bei RT blockiert.

4.6 Histologische Methoden

4.6.1 PAS-Reaktion und Fibrosebestimmung

(Hideo Baba, Pathologisches Institut, Universität Essen)

Isolierte Herzen der Maus wurden über Nacht in 4 % Paraformaldehyd in 1x PBS fixiert, in Paraffin eingebettet und anschliessend mit einem Mikrotom 5 μ m Schnitte angefertigt.

Über eine PAS-Reaktion (vom engl. *Periodic acid-Schiff*) wurden die Zellgrenzen gefärbt. An einem Axio Observer.Z1 Mikroskop (Zeiss) wurden Bilder der Gewebeschnitte aufgenommen und die Kardiomyozytendurchmesser im Bereich des Zellkerns von mindestens 100 Zellen/Herz bestimmt.

Zur Bestimmung des Kollagengehaltes (Fibrose) wurden die Gewebeschnitte mit 0,1 % Picrosirius Rot gefärbt. Durch Aufnahmen des Gewebeschnittes im Hellfeld und Verwendung eines Polarisationsfilters wurde durch Verwendung einer analytischen Software (KS 300, Zeiss) der Kollagengehalt bestimmt.

4.7 Zellbiologische Methoden

4.7.1 ES-Zellkultur und Blastocysteninjektion

(A. Hübner und K. Schorr, Core Unit Transgene Tiere, Universität Jena)

Die ES-Zellkultur zur Erzeugung von homolog rekombinierten Stammzellen und die Blastocysteninjektion sind aus Platzgründen nicht beschrieben. Alle Arbeitsschritte

wurden in der Core Unit Transgene Mäuse des Universitätsklinikums Jena durchgeführt.

4.7.2 pH_i Messung in isolierten Kardiomyozyten

Zur Messung des pH_i wurden akut dissoziierte Kardiomyozyten mit dem fluorimetrischen Farbstoff BCECF beladen.

Hierfür wurden Kardiomyozyten in Kraftbrühe-Lösung auf mit $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Laminin-beschichtete (Roche) Objektträger pipettiert. Nach 10 Minuten wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Kardiomyozyten mit 2 ml Kraftbrühe-Lösung (30 mM KCl, 30 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 10 mM Glucose, 3 mM MgSO_4 , 0,5 mM EGTA, 50 mM Glutamin, 20 mM Taurin, pH 7,3 mit KOH einstellen) mit $1 \mu\text{M}$ BCECF (Invitrogen) und 0,002 % Pluronic F127 für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Kardiomyozyten dreimal mit Kraftbrühe-Lösung gewaschen. Der Objektträger mit den Kardiomyozyten wurde dann mit einer Pinzette in eine Messkammer (Live Cell Instrument, Chamlide) überführt und mit Kraftbrühe-Lösung überschichtet. Die Messkammer wurde in ein Mikroskop (Axio Observer.Z1, Zeiss) eingesetzt und an eine peristaltische Pumpe (Peri-Star Pro, World Precision Instruments) zur Perfusion mit Tyrode (140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,2 mM CaCl, 0,5 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, pH 7,4, Flussrate 2 ml/Minute) angeschlossen. Unter Verwendung des 10-fach Objektivs wurden gestreifte, nicht schlagende Myozyten gesucht, die eine minimale Fluoreszenz (>500 units) aufwiesen und für die Messung bei 495 und 440 nm markiert. Nach Aufnahme einer Basislinie für den Gleichgewichts-pH wurden die Kardiomyozyten einer Alkalose ausgesetzt. Zu diesem Zweck wurde eine NH_4Cl -haltige Tyrode (120 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,2 mM CaCl, 0,5 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 20 mM NH_4Cl , pH 7,4) für einen Zeitraum von 5 Minuten für die Perfusion verwendet. Danach wurde wieder mit Tyrode über einen Zeitraum von 15-20 Minuten perfundiert und die Erholung des pH_i vom Überschießen nach plötzlichem Absetzen der NH_4Cl -haltigen Tyrode gemessen. Zum Kalibrieren des pH_i wurde die Perfusion gestoppt und die Kardiomyozyten mit einem Kalibrierungspuffer (105 mM KCl, 50 mM NMDG, 30 mM HEPES, 10 mM Glucose, 5 mM MgSO_4 , 0,01 mM Nigericin, verschiedene pH Werte) überschichtet und die Fluoreszenzsignale detektiert.

4.7.3 Messung der Calcium Transienten (cytoplasmatisches Calcium)

(M. Kuhn und M. Klaiber, Physiologisches Institut, Universität Würzburg)

Die Messung der Amplitude der Calcium Transienten wurde im physiologischen Institut der Universität Würzburg vorgenommen. Die Durchführung ist der folgenden Publikation zu entnehmen (Klaiber et al. 2010).

4.8 Eingriffe an Mäusen

Alle Eingriffe an Mäusen wurden vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz im Tierversuchsvorhaben: „Herzhypertrophie- und Bicarbonattransportergene“ (Reg.-Nr. 02-044/08) genehmigt. Teile dieser Arbeit wurden in Bayern durchgeführt und dort separat beantragt und genehmigt.

4.8.1 Akute Kardiomyozytenisolation

(K. Benndorf und S. Bernhardt, Physiologisches Institut II, Universität Jena)

Die Isolation adulter Kardiomyozyten der Maus wurde 5 Minuten nach Injektion von 500 *units* Heparin zur Hemmung der Blutgerinnung vorgenommen. Die Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet, das Herz entnommen und an eine Langendorff-Apparatur angeschlossen. Alle Perfusionsschritte wurden bei 37 °C durchgeführt. Nach 5 Minuten Perfusion in Ca²⁺-freier Tyrode (140 mM NaCl, 5,8 mM KCl, 0,5 mM KH₂PO₄, 0,4 mM Na₂HPO₄, 0,4 mM MgSO₄, 0,9 mM Glucose, 11,1 mM HEPES, pH 7,1 mit NaOH) zum Entfernen von Blut wurde das Herz mit Ca²⁺-haltiger Tyrode (zusätzlich 10 µM CaCl₂) mit Kollagenase Typ I (Worthington) für 30 Minuten perfundiert. Im Verlauf dieser Perfusion wurde die Ca²⁺-Konzentration schrittweise gesteigert: Nach 5 Minuten auf 20 µM CaCl₂, nach 10 Minuten auf 40 µM CaCl₂ und dann alle 5 Minuten eine Steigerung um weitere 20 µM CaCl₂ bis 100 µM CaCl₂ nach 25 Minuten. Der Kollagenaseverdau wurde durch 3 minütige Perfusion mit Kraftbrühe-Lösung (30 mM KCl, 30 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 10 mM Glucose, 3 mM MgSO₄, 0,5 mM EGTA, 50 mM Glutamin, 20 mM Taurin, pH 7,3 mit KOH einstellen) beendet. Nach Abtrennen der Vorhöfe wurden die Herzkammern mit Schere und Pinzette dissoziiert und größere Zelltrümmer durch Gaze abgetrennt. Vereinzelt Kardiomyozyten wurden in Kraftbrühe-Lösung bei RT aufbewahrt.

4.8.2 Implantieren osmotischer Minipumpen

(M. Kuhn und K. Völker, Physiologisches Institut, Universität Würzburg)

Die osmotischen Minipumpen (Modell 1002, Alzet) wurden mit Angiotensin (Calbiochem) in Trägerlösung (0,9 % NaCl, 0,01 M Essigsäure) befüllt. Die Pumpen wurden bei 37 °C über Nacht in isotonischer Kochsalzlösung zum Äquilibrieren der Pumpleistung inkubiert. Zu diesem Zweck wurde die Maus mit Isofluran betäubt und über eine Gesichtsmaske mit einem Isofluran-Luftgemisch unter Narkose gehalten. Nach Rasieren und Desinfektion des Rückens wurde die Pumpe über einen kleinen Einschnitt subkutan eingesetzt und die Wunde mit einer chirurgischen Naht geschlossen. Die Nähte wurden täglich überprüft und gegebenenfalls erneuert. Die osmotische Minipumpe setzte über einen Zeitraum von 14 Tagen Angiotensin (Dosis 1000 ng/kg/min) zur experimentellen Auslösung der Herzhypertrophie frei.

4.8.3 Blutdruckmessung

Die Messung des Blutdrucks erfolgte an der Schwanzvene an wachen Mäusen mit einem Blutdruckmessgerät (Softron). Nach einer Gewöhnungsphase von 2-3 Tagen wurden Messwerte jeder Maus aufgezeichnet. Im Verlauf der experimentellen Auslösung von Herzhypertrophie mit Angiotensin II wurden pro Maus zwei Blutdruckmessungen vorgenommen: Eine Messung vor und eine Messung nach Einsetzen der Minipumpe. Im Verlauf einer Messung wurde pro Minute ein Messwert aufgezeichnet und maximal 10 Minuten lang gemessen.

4.8.4 Invasive Hämodynamik

(K. Schuh und M. Abesser, Physiologisches Institut, Universität Würzburg)

Die finale Messung des linksventrikulären Drucks wurde 2 Wochen nach Implantieren der osmotischen Minipumpe vorgenommen. Isofluran-betäubte Mäuse wurden mit einem 1,4F Druck-Volumen Katheter Ultra-Miniature SPR-839 (Millar Instruments) verbunden mit einem MPVS Ultra (Millar Instruments) und PowerLab 16/30 (ADInstruments) linksventrikulär katheterisiert. Nach Stabilisierung der Messkurven wurden Daten (Herzrate, systolischer und diastolischer linksventrikulärer Druck und entsprechende Ableitungen) aufgenommen. Die Messwerte wurden mit Hilfe der PVAN Ultra 1.1 Software (Millar Instruments) berechnet.

4.8.5 Bestimmung der linksventrikulären Masse

(M. Kuhn und K. Völker, Physiologisches Institut, Universität Würzburg)

Zur Bestimmung der linksventrikulären Masse wurde nach Töten der Maus das Herz entnommen und nach Wiegen des gesamten Herzens der linke Ventrikel mit Hilfe einer Schere abgetrennt und gewogen. Das entnommene Gewebe wurde anschließend in 4 % Formaldehyd in 1x PBS aufgenommen und über Nacht bei 4 °C fixiert oder in flüssigen Stickstoff eingefroren.

4.9 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung kamen Microsoft Excel und GraphPad Prism zur Anwendung. Dabei wurden Mittelwerte, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet. Für statistische Analysen wurde bei zwei zu vergleichenden Gruppen ein t-Test herangezogen oder bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen ein ANOVA-Test in Verbindung mit einem Tukey-Test durchgeführt.

5. Ergebnisse

Für die Analyse der Funktion von *Nhe1* im Verlauf der Herzhypertrophie wurde ein konditionales Mausmodell erzeugt. Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils wird die Herstellung und initiale Charakterisierung dieses Mausmodells beschrieben. Im zweiten Abschnitt ist die funktionelle Charakterisierung von Kardiomyozyten-spezifischen *Nhe1*-KO (cm *Nhe1*-KO) Mäusen in einem pharmakologischen Hypertrophiemodell aufgeführt.

5.1 Herstellung des konditionalen *Nhe1* Mausmodells

5.1.1 Klonierung des Konstrukts und embryonale Stammzellkultur

Das konditionale Mausmodell für *Nhe1* wurde durch homologe Rekombination eines modifizierten genomischen Fragments des *Nhe1* Locus in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) generiert (Smithies et al. 1985, Kuehn et al. 1987, Thomas and Capecchi 1987). Dabei wurde eine tri-loxP Strategie genutzt, wobei nach Identifizierung von rekombinanten Klonen eine transiente cre-Expression zum Entfernen des Selektionsmarkers durchgeführt wurde (Branda and Dymecki 2004).

Exon 2 wurde mit loxP sites flankiert. Exon 2 besteht aus 461 bp und codiert für 4 von 12 transmembranen Domänen. Ein Verlust von Exon 2 führt aufgrund einer Leserahmenverschiebung zu einem vorzeitigen Stopcodon, wodurch ein Protein von 127 anstatt 820 Aminosäuren resultiert und daher nur noch eine transmembrane Domäne aufweist. Da vorzeitige Stoppsignale jedoch das *nonsense-mediated RNA decay* System auslösen können, ist zu erwarten, dass die aberrante *Nhe1* mRNA abgebaut wird und im Northern Blot nicht nachweisbar ist (Doma and Parker 2007).

Zur Herstellung eines Konstruktes wurde eine Lambda-Bibliothek genomischer Maus-DNA mit einer Sonde gegen einen intronischen Bereich nahe Exon 2 von *Nhe1* gescreent und ein 14 kb Fragment isoliert. Nach Aufreinigung dieses 14 kb Fragments aus Phagen über einen CsCl-Gradienten und Klonierung in den pKO-DTA Scrambler Vektor (Lexicon Genetics) wurden die notwendigen genetischen Veränderungen für ein konditionales Mausmodell vorgenommen. Im 5' Bereich von Exon 2 wurde eine *EcoRI* Schnittstelle und eine loxP site eingesetzt. Die *EcoRI* Schnittstelle ermöglicht ein Southern Blot Screening für Klone, in denen das Konstrukt über homologe

Rekombination eingebaut wurde. In den 3' Bereich von Exon 2 wurde eine gefloخته Neomycinresistenzkassette kloniert (Abb. 4 A).

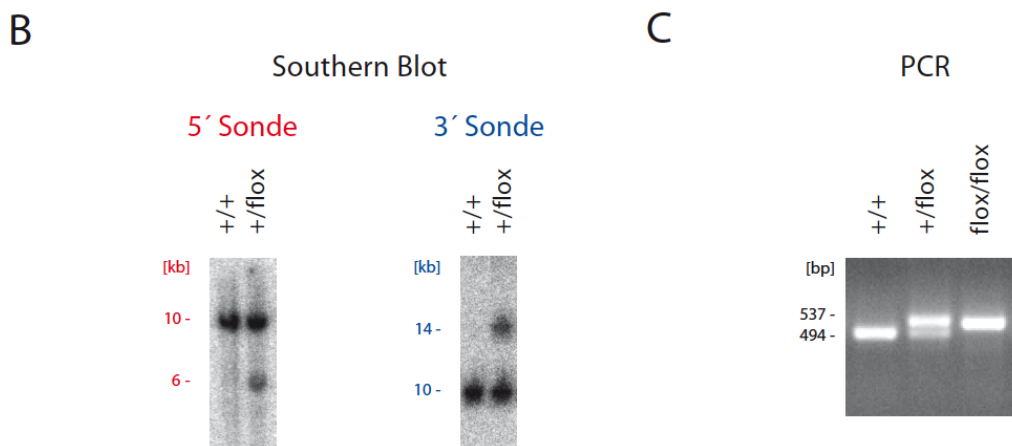
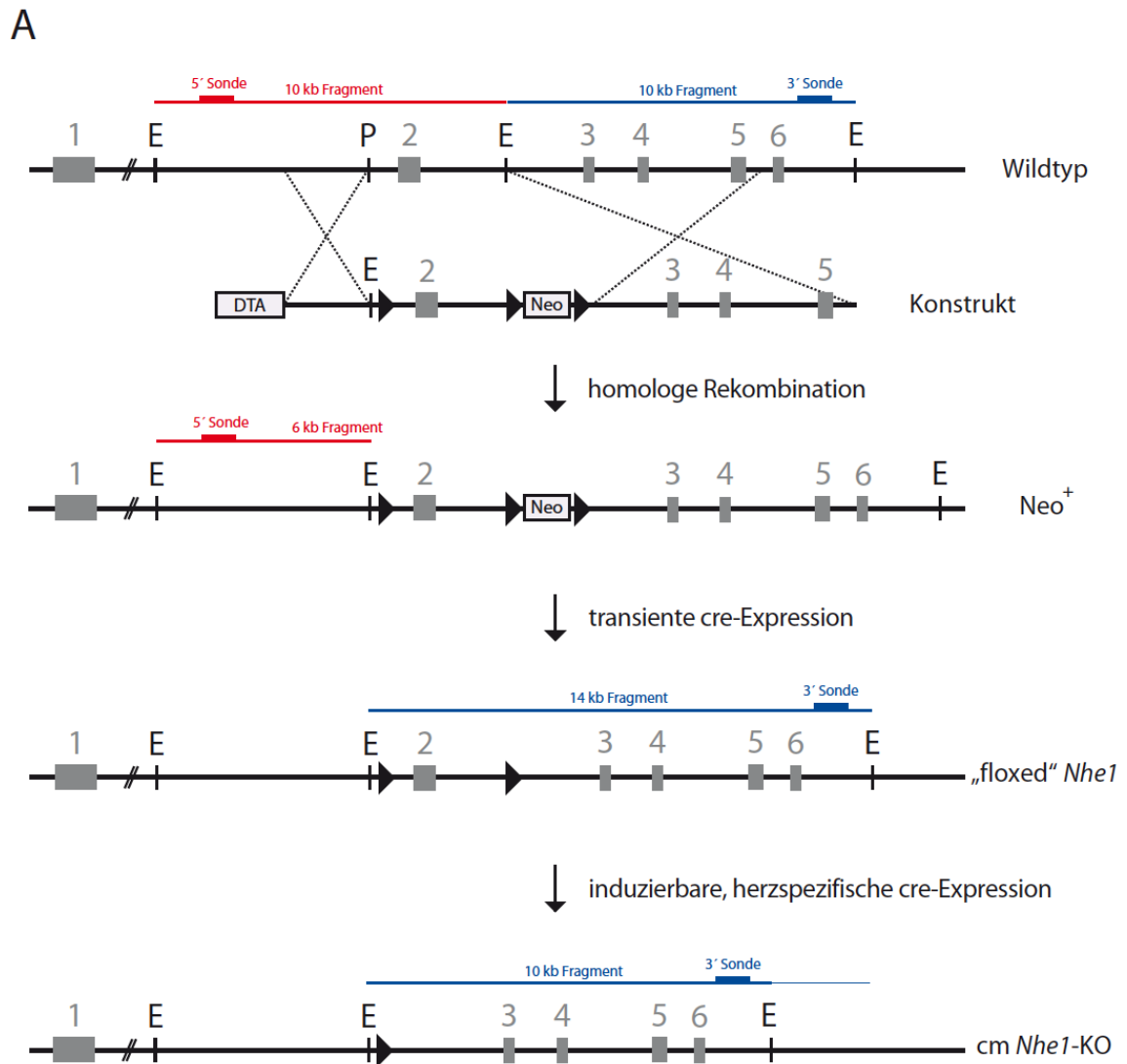


Abb. 4: Strategie zur konditionalen Inaktivierung von *Nhe1*. **(A)** Schematische Darstellung des *Nhe1* Locus. Zur konditionalen Inaktivierung wurde ein Konstrukt mit gefloxtem Exon 2 und einer Neomycinresistenzkassette (Neo) über homologe Rekombination in das Genom von

embryonalen Stammzellen integriert. Die Neomycinresistenzkassette wurde durch eine transiente cre-Elektroporation in einer zweiten Zellkulturrunde entfernt. Der resultierende Stammzellklon mit einem mit loxP sites flankierten („floxed“ aus dem engl. flanked by loxP) Exon 2 von *Nhe1* wurde in Blastocysten injiziert und von Ammentieren ausgetragen. Das gefloخته *Nhe1* Allel wird *in vivo* über eine induzierbare, herzspezifische cre-Rekombinase inaktiviert (cm *Nhe1*-KO). E = *EcoRI*, P = *PsiI* **(B)** Southern Blot Analyse zur Bestätigung der Integration des Konstruktes über homologe Rekombination mit einer 5' und 3' bindenden Sonde in der geflochten Mauslinie. Die erwarteten Größen der nachgewiesenen DNA-Fragmente wurden im oberen Teil farbig skizziert. **(C)** Genotypisierung von Wildtyp, heterozygot und homozygot geflochten Mäusen über PCR-Analyse auf einem Agarosegel (2 %). Ein gefloxtes Allel resultiert in einem PCR-Produkt von 537 bp, das Wildtypallel in einem PCR-Produkt von 494 bp.

Nach Beendigung dieser genetischen Manipulationen wurden relevante Abschnitte des Konstruktes sequenziert, das Konstrukt über *NotI* linearisiert und für die ES-Zellkultur aufgereinigt.

Zur Erzeugung genetisch modifizierter Mäuse wurden nach Elektroporation des Konstruktes 200 Neomycin-resistente Klone vereinzelt und expandiert und von Replica-Platten dieser Klone DNA isoliert. Durch einen Southern Blot mit einer 5' bindenden Sonde wurden vier Klone identifiziert, die das Konstrukt über homologe Rekombination in ihr Genom integriert hatten. Drei dieser Klone wurden in einer zweiten Zellkulturrunde einer transienten cre-Elektroporation unterzogen. Auf diese Weise sollte die gefloخته Neokassette entfernt werden, aber nicht das gefloخته Exon 2. Für die Analyse korrekt rekombinierter Klone wurde ein Test auf Neomycinresistenz und ein Southern Blot mit einer 3' bindenden Sonde durchgeführt. Hierbei mussten die Kandidatenklone Sensitivität gegenüber Neomycin besitzen, ein Wildtypallel von 10 kb sowie ein gefloxtes Allel von 14 kb im Southern Blot aufweisen (Abb. 4 B). Ein Klon der diesen Erwartungen entsprach, wurde in Blastozysten injiziert und von Ammentieren ausgetragen. Zwei hieraus hervorgegangene männliche Chimären wurden mit C57BL/6 Weibchen verpaart und der Nachwuchs mittels PCR genotypisiert (Abb. 4 C).

Heterozygot gefloخته Nachkommen der Chimären wurden mit C57BL/6 Mäusen zurückgekreuzt und parallel homozygot gefloخته Mäuse gezüchtet. In heterozygot und homozygot geflochten Mäusen wurde mit einem Northern Blot (Abb. 5) überprüft, ob die Exon 2 flankierenden loxP sites die *Nhe1* Transkription stören. Der durchgeführte Northern Blot belegte eindeutig, das *Nhe1*^{+/flox} und *Nhe1*^{flox/flox} Mäuse keine Veränderungen in der Expression von *Nhe1* mRNA im Vergleich zu Wildtypmäusen

zeigen. Die generierte *Nhe1*-floxed Mauslinie konnte somit zur Erzeugung von konditionalen Mausmodellen verwendet werden.

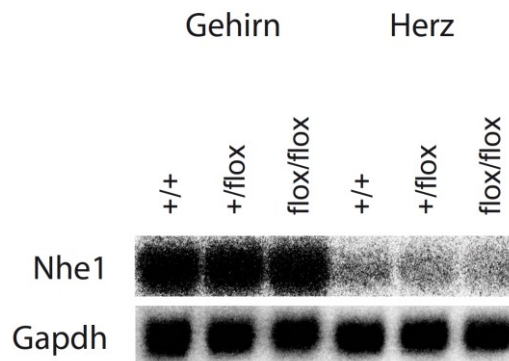


Abb. 5: Northern Blot Analyse zum Überprüfen der *Nhe1* Transkription in *Nhe1*-floxed Mäusen. Ausschnitt einer Northern Blot Membran, die nacheinander mit einer Sonde gegen *Nhe1* mRNA und *Gapdh* mRNA hybridisiert wurde. Es wurden jeweils 15 µg Gehirn- bzw. Herz-RNA von Wildtyp-, heterozygot geflochten und homozygot geflochten Mäusen pro Spur geladen. Innerhalb eines Gewebes wurden keine Unterschiede in der *Nhe1* Expression festgestellt. *Gapdh* mRNA fungiert als Ladekontrolle und bestätigt, dass vergleichbare Mengen RNA pro Spur geladen wurden.

5.1.2 Generierung von cm *Nhe1*-KO Mäusen

Zur Erzeugung von cm *Nhe1*-KO Mäusen wurde eine cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Kardiomyozyten-spezifischen Promotors benötigt. Die transgenen *Myh6*-MerCreMer (*Myh6*-MCM) Mäuse exprimieren eine induzierbare cre-Rekombinase in adulten Kardiomyozyten (Sohal et al. 2001). Die im Rahmen dieser Dissertation erzeugten geflochten *Nhe1* Mäuse wurden mit transgenen *Myh6*-MCM Mäusen verpaart und in einer weiteren Verpaarungsrunde wurden *Nhe1*^{flox/flox}; *Myh6*-MCM⁺ gezüchtet. Alle Experimente wurden mit männlichen Mäusen durchgeführt. Im Alter von 2 Monaten wurden die *Nhe1*^{flox/flox}; *Myh6*-MCM⁺ Mäuse über einen Zeitraum von 5 Wochen mit Tamoxifen-haltigem Futter (TAM400, LASvendi) behandelt und danach 3 Wochen mit Standardfutter gehalten. Diese Pause war notwendig, um zu gewährleisten, dass kein Tamoxifen mehr im Organismus vor dem eigentlichen Experiment vorhanden war.

Die Tamoxifen-behandelten Tiere werden im folgenden als cm *Nhe1*-KO Mäuse bezeichnet, da Tamoxifen in Kardiomyozyten die induzierbare cre-Rekombinase aktiviert und somit *Nhe1* inaktiviert wird. Als Kontrolltiere dienten Geschwistertiere mit identischem Genotyp, die auf Standardfutter gehalten wurden. Die Behandlung mit TAM400 Futter und einhergehende Inaktivierung von *Nhe1* in Kardiomyozyten hatte keine offensichtlichen Konsequenzen.

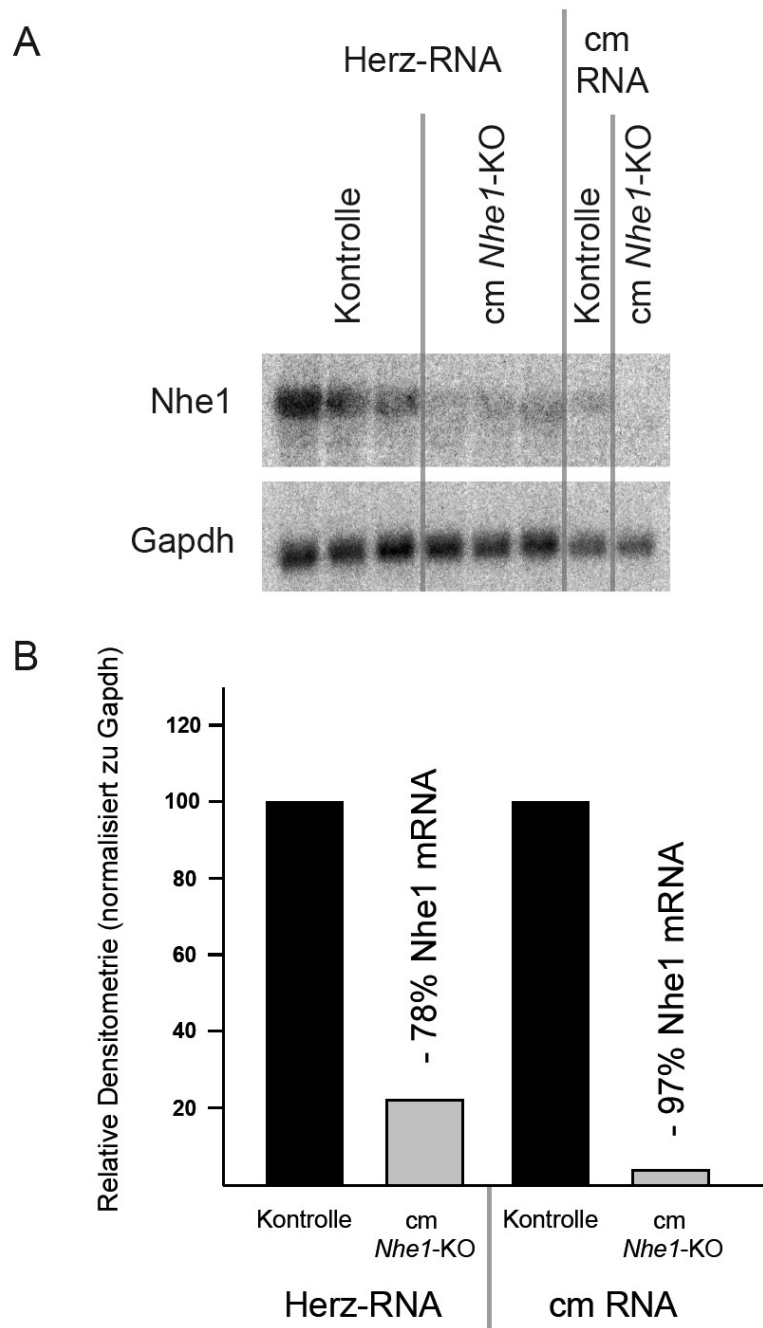


Abb. 6: Nachweis von *Nhe1* mRNA in Herz- und Kardiomyozyten-RNA durch Northern Blot Analyse. **(A)** Ausschnitt einer Northern Blot Membran, die nacheinander mit einer Sonde gegen *Nhe1* mRNA und *Gapdh* mRNA hybridisiert wurde. Es wurden jeweils 15 μ g Herz-RNA aus drei unterschiedlichen Präparationen von Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen aufgetragen. Für 8 μ g Kardiomyozyten (cm)-RNA in einer Spur wurden drei Präparationen von unterschiedlichen Mäusen vereinigt. In Herz-RNA aus cm *Nhe1*-KO Mäusen wurde eine geringere Menge an *Nhe1* mRNA detektiert als in Kontrollmäusen. In Kardiomyozyten-RNA von cm *Nhe1*-KO Mäusen war keine *Nhe1* mRNA mehr nachweisbar. *Gapdh* mRNA fungiert als Ladekontrolle und bestätigt, dass vergleichbare Mengen RNA pro Spur geladen wurden. **(B)** Die densitometrische Analyse der Bandenintensität belegte eine Abnahme der *Nhe1* mRNA in Herz-RNA von cm *Nhe1*-KO Mäusen um 78 % im Vergleich zu Kontrollmäusen. In Kardiomyozyten-RNA von cm *Nhe1*-KO Mäusen war keine *Nhe1* mRNA mehr nachweisbar.

Zwar wurde im Verlauf der Fütterung mit TAM400 Futter in den ersten beiden Wochen ein leichter Gewichtsverlust beobachtet, dieser Gewichtsverlust wurde aber bereits vor Beendigung der Tamoxifenbehandlung wieder ausgeglichen (ohne Abb.). Eine erhöhte Sterblichkeit wurde nicht beobachtet. Zum Überprüfen der induzierbaren cre-vermittelten Rekombination wurde Gesamt-Herz-RNA und Kardiomyozyten-RNA (cm-RNA) aus Kontrolltieren sowie aus cm *Nhe1*-KO Tieren isoliert und durch einen Northern Blot analysiert. Mit einer Sonde gegen *Nhe1* mRNA und *Gapdh* mRNA als Ladekontrolle wurde festgestellt, dass in cm *Nhe1*-KO Herz-RNA eine deutlich verminderte Expression von *Nhe1* nachweisbar war. Da *Nhe1* kein Kardiomyozyten-spezifisches Transkript ist und ubiquitär exprimiert wird, musste davon ausgegangen werden, dass andere Zelltypen im Herzen wie kardiale Fibroblasten zumindest für einen Teil des verbliebenen Signals in Herz-RNA ausschlaggebend sind. Entsprechend dieser Vermutung ist in Kardiomyozyten-RNA von cm *Nhe1*-KO Mäusen keine *Nhe1* mRNA mehr nachweisbar (Abb. 6).

Zur Kontrolle der Spezifität der gewebespezifischen induzierbaren cre-Rekombinase wurde die Expression von *Nhe1* in einem anderen Gewebe überprüft. Im Gehirn ist eine starke *Nhe1* Expression zu beobachten und die Detektion von NHE1 ist mit einem polyklonalen α -NHE1 Antikörper (α -NHE1, sc-28758, Santa Cruz Biotechnologies) im Western Blot möglich. Erwartungsgemäß zeigte die Expression von *Nhe1* in Membranfraktionen aus Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen keine Unterschiede, da *Nhe1* nur in Kardiomyozyten von cm *Nhe1*-KO Mäusen inaktiviert sein sollte (Abb. 7 A). Ein immunologischer Nachweis über einen Western Blot in Herzgewebe gelang mit dem polyklonalen α -NHE1 Antikörper nicht (Abb. 7 B).

Funktionell äußerte sich die Inaktivierung von *Nhe1* durch einen veränderten pH_i in isolierten Kardiomyozyten. In hypertonischen Lösungen kontrahieren intakte Kardiomyozyten nicht und weisen einen ca. 0.2 Einheiten höheren pH -Wert als unter isotonischen Bedingungen auf (Abercrombie and Roos 1983). Wie in Abb. 8 ersichtlich, wurde in Kardiomyozyten von Kontrollmäusen unter Ruhebedingungen ein pH_i von $7,36 \pm 0,01$ ($n = 6$) gemessen. In Kardiomyozyten von cm *Nhe1*-KO Mäusen wurde unter gleichen Bedingungen ein signifikant erniedrigter pH_i von $7,04 \pm 0,09$ ($n = 7$) gemessen. Der erniedrigte pH_i in cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten liefert einen weiteren Hinweis für die Inaktivierung von *Nhe1*, da dieser Transporter Protonen aus der Zelle transportiert und die Inaktivierung eine Reduzierung des pH_i

zur Folge hat. Die Messungen nach einer NH₄Cl-induzierten Alkalose konnten nur in Ausnahmefällen kalibriert werden und sind daher nicht aussagekräftig.

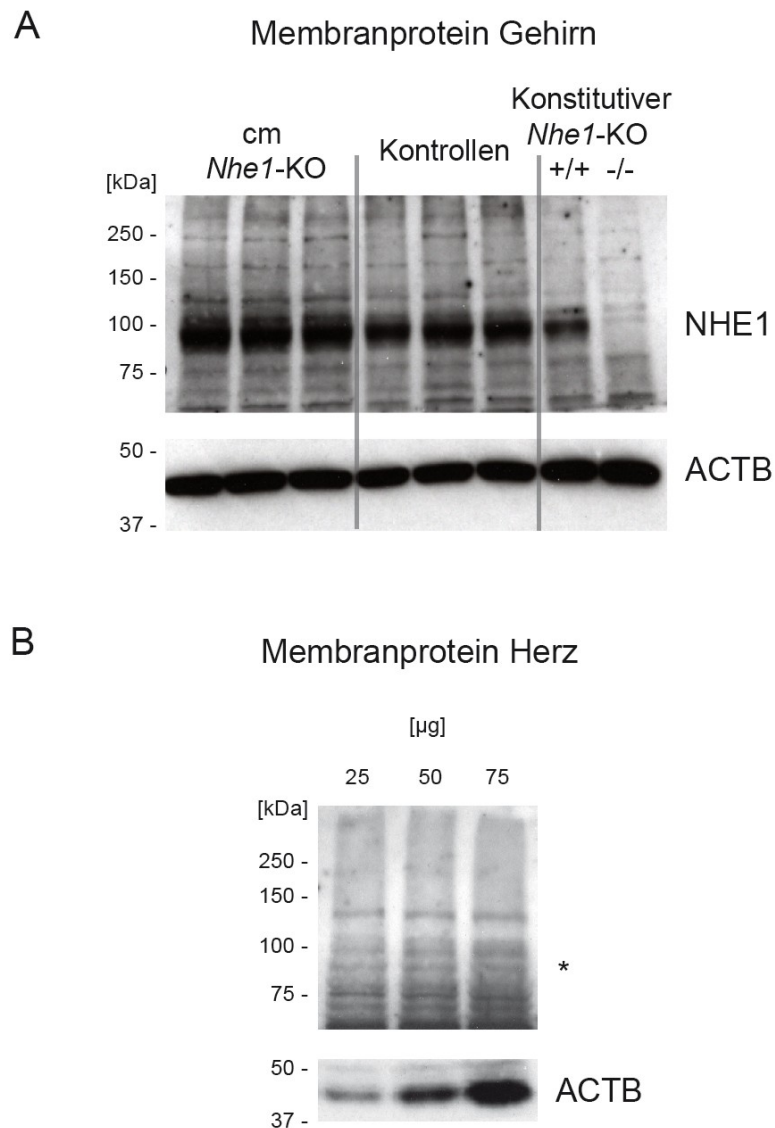


Abb. 7: Nachweis von NHE1 Protein im Gehirn und Herz über Western Blot. Western Blot mit einem α -NHE1 (Mensch) und α -ACTB (Maus) Antikörper (Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäuse 2 Monate alt, Konstitutive *Nhe1*-KO Mäuse 6 Wochen alt). **(A)** Western Blot auf Membranprotein aus Mausgehirn isoliert. Der α -NHE1 Antikörper detektierte mehrere unspezifische Banden und eine spezifische Bande unterhalb von 100 kDa. In homozygoten konstitutiven *Nhe1*-KO Mausgehirn war diese Bande nicht mehr nachweisbar. Mit dem α -ACTB Antikörper wurde eine Bande bei ungefähr 40 kDa detektiert. In jeder Spur wurden 20 μ g Membranprotein von jeweils drei unterschiedlichen Kontroll-, cm *Nhe1*-KO und konstitutiven *Nhe1*-KO Mäusen geladen. Die Signalintensität von auf Actin normalisiertes NHE1 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen bzw. Wildtyp und *-/-* konstitutiven *Nhe1*-KO Mäusen. **(B)** Western Blot auf Membranprotein aus Mausherz isoliert. Die Menge geladenes Membranprotein wurde von 25 μ g auf 75 μ g schrittweise erhöht um einen Nachweis von NHE1 im Herz zu erreichen. Eine spezifische Bande für NHE1 wurde nicht in der erwarteten Größe nachgewiesen (*). ACTB wurde als Ladekontrolle verwendet.

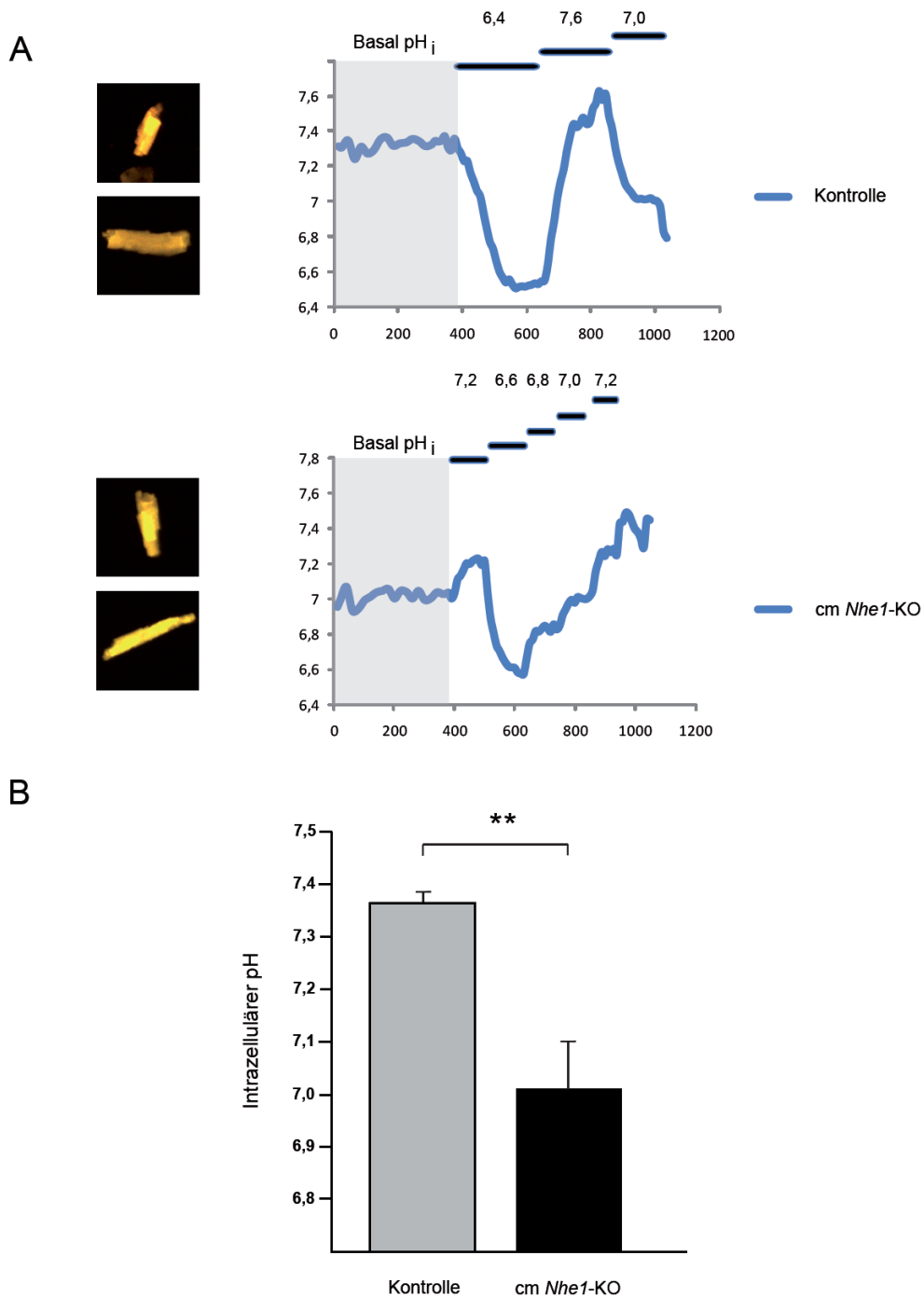


Abb. 8: Messung des pH_i in Kardiomyozyten. Über den ratiometrischen Farbstoff BCECF wurde der pH_i in isolierten Kardiomyozyten unter Ruhebedingungen gemessen. **(A)** Die Beladung von Kontroll- bzw. cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten mit BCECF wurde unter dem Mikroskop überprüft und ausreichend beladene Kardiomyozyten ausgewählt (siehe Foto). Nach Messung des pH_i unter Ruhebedingungen (grau unterlegt) wurde über Nigericin-haltige Lösungen mit definiertem pH kalibriert (schwarze Balken). **(B)** Ergebnisse der pH_i Messung. In Kardiomyozyten aus Kontrollmäusen wurde ein pH_i von $7,36 \pm 0,02$ ($n = 6$) nachgewiesen. In Kardiomyozyten aus cm *Nhe1*-KO Mäusen wurde ein signifikant niedrigerer pH_i von $7,04 \pm 0,09$ ($n = 7$) gemessen (t-Test $p < 0,01$). Die gemessenen Kardiomyozyten wurden in mindestens drei unabhängigen Präparationen isoliert.

Neben direkten Messungen der konditionalen Inaktivierung von *Nhe1* in Kardiomyozyten über mRNA Expression und Messung der NHE1 Aktivität wurde eine

indirekte Messung der NHE1 Aktivität über Calcium Transienten in isolierten Kardiomyozyten in Kollaboration mit Prof. Dr. Michaela Kuhn (Physiologisches Institut, Universität Würzburg) vorgenommen. Calcium Transienten auch cytoplasmatisches Calcium steuern die Kontraktion des Herzmuskels und sind stark abhängig vom pH_i in Kardiomyozyten.

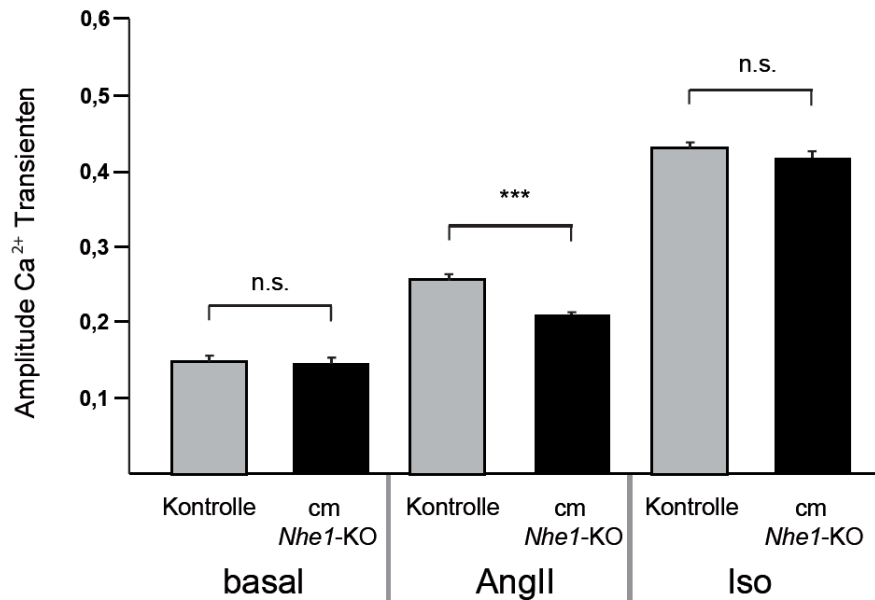


Abb. 9: Amplitude von Calciumtransienten unter Ruhebedingungen und nach Stimulation mit Angiotensin II bzw. Isoproterenol. Über den Calciumindikator Indo-1 wurde die Amplitude der intrazellulären Calciumkonzentration in isolierten Kardiomyozyten von Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen unter Ruhebedingungen und nach Stimulation gemessen. Unter Ruhebedingungen (Kontrollen $0,145 \pm 0,004$ (n = 7), cm *Nhe1*-KO $0,141 \pm 0,003$ (n = 13)) und nach Stimulation mit Isoproterenol (Kontrollen $0,434 \pm 0,014$ (n = 7), cm *Nhe1*-KO $0,418 \pm 0,007$ (n = 11)) wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten gemessen. Nach Stimulation mit Angiotensin II wurde eine signifikant verminderte Amplitude der Calciumtransienten (Kontrollen $0,269 \pm 0,007$ (n = 7), cm *Nhe1*-KO $0,231 \pm 0,004$ (n = 13)) festgestellt (t-Test < 0,001).

Diese Messung der Calcium Transienten wurde unter Ruhebedingungen und nach Stimulation der Kardiomyozyten mit Angiotensin II und Isoproterenol vorgenommen. Unter Ruhebedingungen und nach Stimulation mit Isoproterenol wurden keine signifikanten Unterschiede in der Amplitude der Calcium Transiente zwischen Kontrollen und cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten festgestellt (Ruhebedingungen: Kontrollen $0,145 \pm 0,004$ (n = 7) und cm *Nhe1*-KO $0,141 \pm 0,003$ (n = 13) bzw. Isoproterenolstimulation: Kontrollen $0,434 \pm 0,014$ (n = 7) und cm *Nhe1*-KO $0,418 \pm 0,007$ (n = 11)). Jedoch wurde nach Stimulation mit Angiotensin II ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen $0,269 \pm 0,007$ (n = 7) und cm *Nhe1*-KO $0,231 \pm$

0,004 (n = 13) Kardiomyozyten detektiert. Die Calcium Transienten in cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten zeigten eine kleinere Amplitude als Kardiomyozyten aus Kontrolltieren (Abb. 9).

5.2 Funktionelle Charakterisierung von cm *Nhe1*-KO Mäusen in einem pharmakologischen Hypertrophiemodell

5.2.1 *Nhe1* und Herzhypertrophie

Nach Bestätigung der Kardiomyozyten-spezifischen Inaktivierung von *Nhe1* sollte die Rolle von *Nhe1* im Verlauf einer Bluthochdruck-induzierten Herzhypertrophie überprüft werden. Hierfür wurden cm *Nhe1*-KO und Kontrollmäuse gezüchtet, gegebenenfalls mit Tamoxifen behandelt und im Alter von 4 Monaten eine osmotische Minipumpe zur Infusion von Angiotensin II (1000 ng/kg/min) implantiert (Abb. 10). Zusätzlich zu diesen beiden Kohorten wurden weitere Geschwistertiere als unbehandelte Kontrollen mit leerer Pumpe (= sham) verwendet. Vor Einsetzen der Minipumpe wurde eine Blutdruckmessung in allen Kohorten durchgeführt, die keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten ergab (Mittelwerte systolischer Blutdruck: sham = $121,1 \pm 1,82$ mmHg (n = 19), Kontrollen = $121,31 \pm 1,57$ mmHg (n = 19) und cm *Nhe1*-KO = $118,59 \pm 1,52$ mmHg (n = 18)). Eine Woche nach Einsetzen der Minipumpe wurde eine weitere Blutdruckmessung durchgeführt und auf diese Weise überprüft, ob die Infusion mit Angiotensin II die erwartete Steigerung des Blutdrucks auslöst. Die Infusion mit Angiotensin II führte zu einer signifikanten Erhöhung des Blutdrucks. Das Einsetzen einer leeren Pumpe hatte keinen Einfluss auf den Blutdruck (Mittelwerte systolischer Blutdruck: sham = $120,99 \pm 1,81$ mmHg, Kontrolle $173,71 \pm 2,81$ mmHg und cm *Nhe1*-KO $177,70 \pm 2,69$ mmHg). In Abb. 11 sind die Ergebnisse der Blutdruckmessungen dargestellt.

Nach zwei Wochen Angiotensin II Infusion wurden die drei Kohorten in jeweils zwei Untergruppen unterteilt. Eine Untergruppe wurde einer invasiven Hämodynamik mit einem Herzkatheter vor der Organentnahme, die andere direkt einer Organentnahme unterzogen. Die direkte Organentnahme ist für die Analyse von Stressproteinen notwendig, die im Verlauf einer Herzkatheterisierung bereits beeinflusst werden kann. Nach Feststellung der Körpermasse wurde die Masse des linken Ventrikels und der Lunge gemessen.

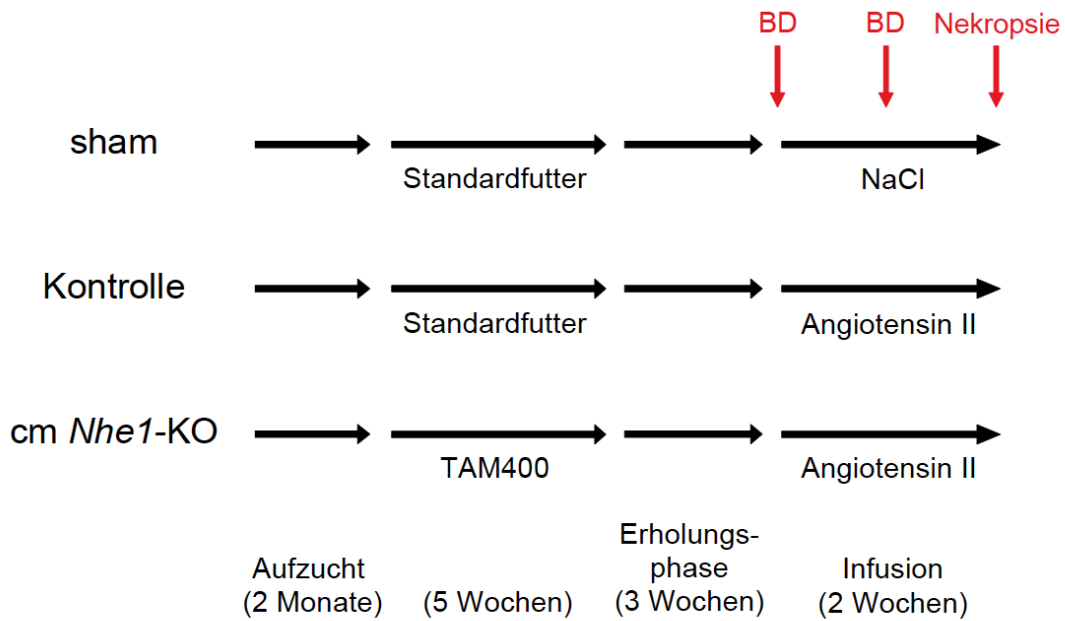


Abb. 10: Verlauf des pharmakologischen Hypertrophiemodells. Zur experimentellen Auslösung einer Herzhypertrophie wurden männliche *Nhe1*^{flox/flox}; *Myh6*-MCM⁺ Mäuse gezüchtet und willkürlich in drei Gruppen (sham, Kontrolle und cm *Nhe1*-KO) aufgeteilt. Im Alter von 2 Monaten wurden die cm *Nhe1*-KO Mäuse für 5 Wochen mit Tamoxifen-haltigen Futter (TAM400) gefüttert, um *Nhe1* zu inaktivieren. In dieser Zeit wurden sham und Kontrollmäuse mit Standardfutter versorgt. Nach einer Erholungsphase auf Standardfutter von 3 Wochen wurde der Blutdruck gemessen und osmotische Minipumpen implantiert. Eine Woche nach Einsetzen der Pumpe wurde der Blutdruck erneut gemessen. Zwei Wochen nach Einsetzen der Pumpe wurden die Mäuse getötet und die Organe zur weiteren Untersuchung entnommen.

Über diese Parameter wurde das Verhältnis der linksventrikulären Masse zur Körpermasse (LV/BW) bestimmt, wodurch eine erste Aussage über die Ausprägung der Herzhypertrophie nach Angiotensin II Infusion getroffen werden konnte. Ein Vergleich der unbehandelten sham Mäuse ($3,73 \pm 0,06$) mit den Angiotensin II behandelten Kontroll- ($4,44 \pm 0,12$) sowie cm *Nhe1*-KO Mäusen ($4,71 \pm 0,09$) zeigte die Wirkung von Angiotensin II in Form einer ausgeprägten Herzhypertrophie. Das LV/BW Verhältnis zeigte im Vergleich zwischen Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 12). Ein Vergleich der Lungenmasse zwischen den Kohorten ergab keine signifikanten Differenzen.

Die ermittelten Kardiomyozytendurchmesser an histologischen Gewebeschnitten bestätigen die Ergebnisse der LV/BW Messungen. Hierbei ergaben sich folgende Durchmesser: sham $16,15 \pm 0,32 \mu\text{m}$ für normale Kardiomyozytendurchmesser und für Angiotensin II behandelte Kontrollen $18,61 \pm 0,37 \mu\text{m}$ bzw. cm *Nhe1*-KO $18,22 \pm 0,30 \mu\text{m}$ eine Hypertrophie. Es war kein Unterschied zwischen Kontrollen und cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten nachweisbar (Abb. 13).

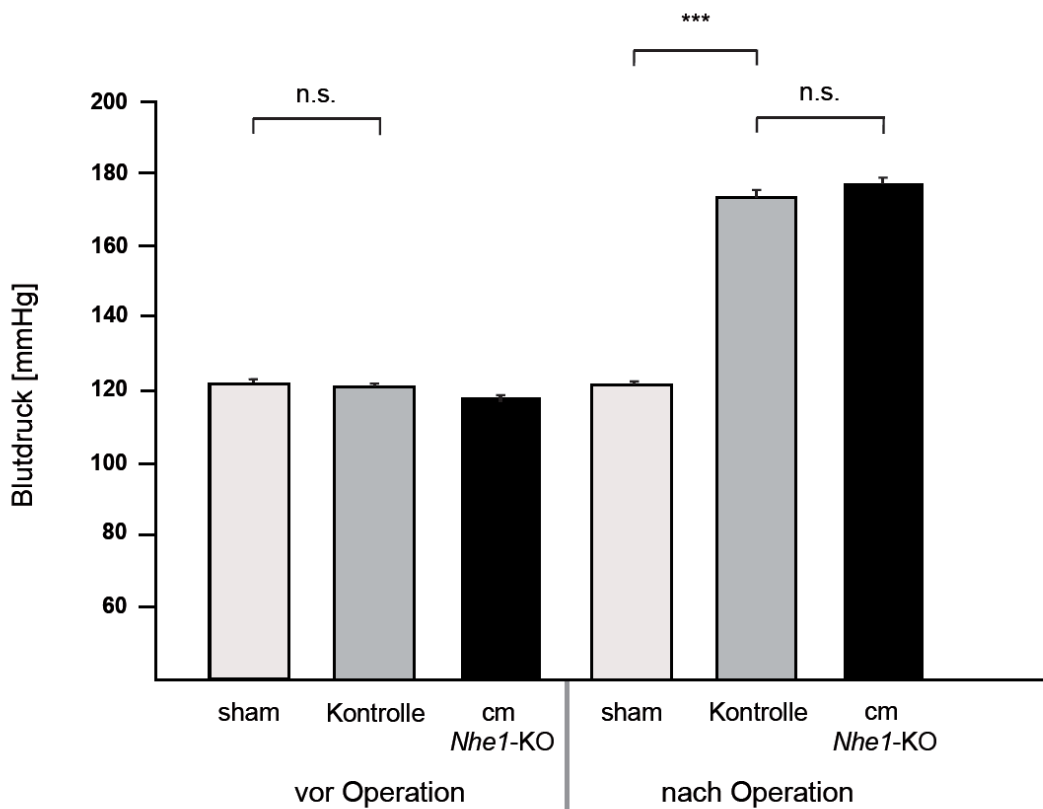


Abb. 11: Systolischer Blutdruck vor und eine Woche nach Einsetzen der osmotischen Minipumpen. Vor Implantieren der Minipumpe wurden keine signifikanten Unterschiede im Blutdruck für die untersuchten Kohorten (sham = $121,1 \pm 1,82 \text{ mmHg}$ (n = 19), Kontrollen = $121,31 \pm 1,57 \text{ mmHg}$ (n = 19) und cm *Nhe1*-KO = $118,59 \pm 1,52 \text{ mmHg}$ (n = 18)) gemessen. Nach Implantieren einer leeren Pumpe (sham) wurde ein Blutdruck von $120,99 \pm 1,81 \text{ mmHg}$ (n = 19) gemessen. In Mäusen, die mit Angiotensin II behandelt wurden, wurde ein signifikant erhöhter Blutdruck (Kontrolle $173,71 \pm 2,81 \text{ mmHg}$ und cm *Nhe1*-KO $177,70 \pm 2,69 \text{ mmHg}$) im Vergleich zu den sham Mäusen gemessen (one-way ANOVA, F = 165,6; p < 0,0001). Zwischen Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Im Verlauf einer pathologischen Herzhypertrophie kommt es zu Kollageneinlagerungen im Herzmuskel. Zur Bestimmung der Ausprägung dieser Fibrosen wurde in Kollaboration mit Prof. Dr. Hideo Baba (Pathologisches Institut, Universität Essen) eine Picosirius-Rot Färbung durchgeführt und die Signale

quantitativ analysiert. Die Ergebnisse liefern eine weitere Bestätigung der bis dahin gewonnenen Erkenntnisse durch eine gesteigerte Fibrose nach Infusion mit Angiotensin II, aber keinen Unterschied zwischen Kontroll- und *cm Nhe1*-KO Mäusen (sham $0,187 \pm 0,02$, Kontrolle $0,270 \pm 0,05$, *cm Nhe1*-KO $0,298 \pm 0,06$).

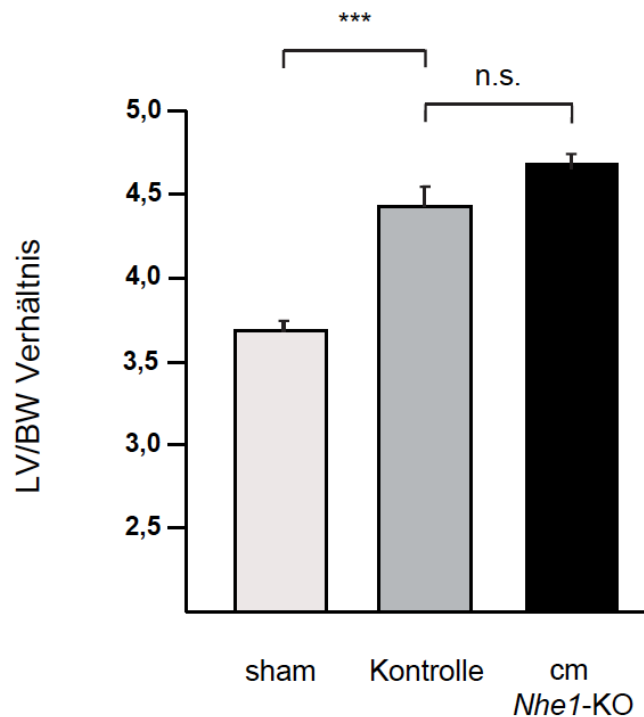
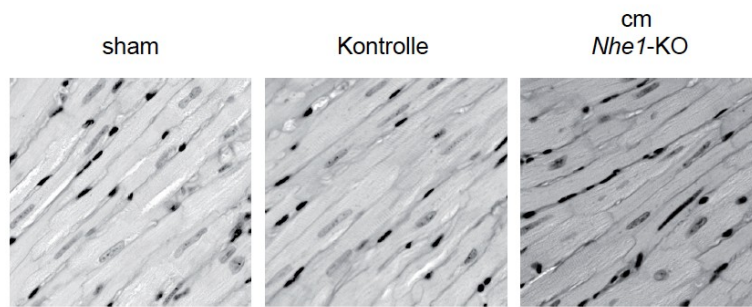


Abb. 12: Messung des LV/BW Verhältnisses nach Angiotensin II Infusion. Zwei Wochen nach Implantieren der Minipumpen wurde das LV/BW Verhältnis bestimmt. In unbehandelten sham Mäusen wurde ein LV/BW Verhältnis von $3,73 \pm 0,06$ ermittelt, während in Angiotensin II behandelten Kontroll- ($4,44 \pm 0,12$) sowie *cm Nhe1*-KO Mäusen ($4,71 \pm 0,09$) eine signifikante Erhöhung im LV/BW Verhältnis beobachtet werden konnte (one-way ANOVA, $F = 28,08$; $p < 0,0001$). Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und *cm Nhe1*-KO Mäusen wurde nicht festgestellt.

Über die invasive Hämodynamik mit einem Herzkatheter wurden keine Unterschiede zwischen Kontroll- und *cm Nhe1*-KO Mäusen gemessen, wodurch eine einsetzende Dekompensation der Herzinsuffizienz ausgeschlossen werden konnte (Studie noch nicht abgeschlossen).

Überraschenderweise konnten keine Unterschiede zwischen Kontroll- und *cm Nhe1*-KO Mäusen in diesem Bluthochdruck-induzierten Herzhypertrophiemodell festgestellt werden. Da pharmakologische NHE1-Inhibitoren die Entstehung von Herzhypertrophien in experimentellen Studien unterbinden, eröffnet dieses Ergebnis eine Reihe neuer Fragestellungen für die Rolle von *Nhe1* bei dieser Erkrankung, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

A



B

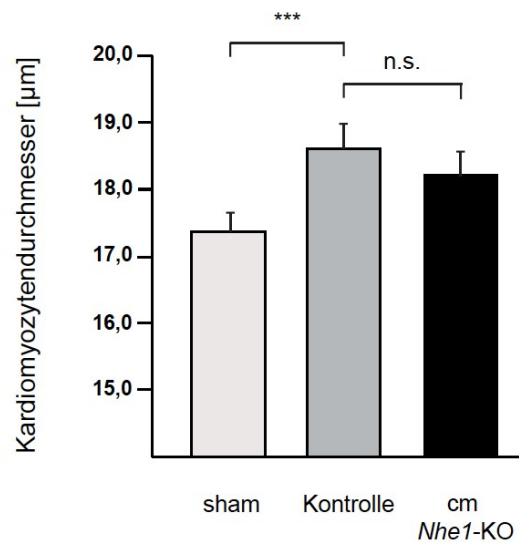


Abb. 13: Messung des Kardiomyozytendurchmessers nach Angiotensin II Infusion. **(A)** Fotos von histologischen Gewebeschnitten des Herzens der jeweiligen Kohorten nach der PAS-Reaktion. Erkennbar sind Kardiomyozyten mit typischer Sarcomerstruktur und dazwischen kardiale Fibroblasten mit stark kondensierten Zellkernen. **(Unten)** Ergebnisse der Bestimmung der Kardiomyozytendurchmesser zwei Wochen nach Implantieren der Minipumpen: sham $16,15 \pm 0,32 \mu\text{m}$, Kontrollen $18,61 \pm 0,37 \mu\text{m}$ und cm *Nhe1-KO* $18,22 \pm 0,30 \mu\text{m}$. Im Vergleich zwischen sham und Kontroll- bzw. cm *Nhe1-KO* wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt (one-way ANOVA, $F = 16,07$; $p < 0,001$).

6. Diskussion

Die Diskussion ist – wie der Ergebnisteil – in zwei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wird die Herstellung und initiale Charakterisierung von cm *Nhe1*-KO Mäusen diskutiert. Im zweiten Abschnitt wird die funktionelle Charakterisierung dieses Mausmodells unter Zuhilfenahme eines pharmakologischen Hypertrophie-modells diskutiert.

6.1 Herstellung des konditionalen *Nhe1* Mausmodells

6.1.1 Klonierung des Konstrukts und embryonale Stammzellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde über homologe Rekombination ein konditionales Mausmodell für *Nhe1* erzeugt und eine Untersuchung der Funktion von *Nhe1* in bestimmten Zelltypen adulter Mäuse möglich.

Bisherige Studien zu *Nhe1* wurden vornehmlich unter Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren durchgeführt. Eine geringe Anzahl genetischer Studien mit konstitutiven *Nhe1*-KO Mäusen ergänzt dieses Bild. Studien mit pharmakologischen Inhibitoren sowie konstitutive KO Mausmodelle besitzen Vor- und Nachteile und beeinflussen die Aussagekraft der erzielten Ergebnisse. Pharmakologische Inhibitoren können durch Interaktion mit anderen Proteinen unspezifische Nebenwirkungen auslösen, die eine Gen-Funktionsuntersuchung erschweren (Marton et al. 1998). Außerdem wirken pharmakologische Inhibitoren zelltypübergreifend, sofern das Zielprotein in anderen Zelltypen exprimiert wird. *Nhe1* ist ubiquitär exprimiert, wodurch sekundäre Effekte von pharmakologischen Inhibitoren über andere Zelltypen ausgelöst werden können. Im Fall von *Nhe1* zeigt die konstitutive *Nhe1*-KO Maus einen schwerwiegenden Phänotyp mit früher Sterblichkeit, wodurch eine Untersuchung der Funktion von *Nhe1* im adulten Herzen unmöglich ist (Cox et al. 1997, Bell et al. 1999). Die Erzeugung einer konditionalen *Nhe1*-KO Maus ist ein bedeutender technischer Fortschritt und eröffnet neue Möglichkeiten, die Funktion von *Nhe1* im Herzen zu charakterisieren.

Die homologe Rekombination des Konstrukts im *Nhe1* Locus wurde mit Hilfe von 5' und 3' bindenden Sonden eindeutig belegt. In diesem Mausmodell wurde Exon 2 mit loxP sites flankiert und somit zur Zerstörung markiert. Der Verlust von Exon 2 führt zu einer Leserahmenverschiebung und einem vorzeitigen Stopcodon. Das resultierende trunkierte Protein weist 1 von ursprünglich 12 transmembranären Domänen auf. Dadurch sollte ein Verlust der Funktion von *Nhe1* eintreten. Mit dieser Vermutung stimmt überein, dass im *slow-wave epilepsy* Mausmodell für *Nhe1* eine weiter in 3' Richtung gelegene Punktmutation mit vorzeitigem Stopcodon zu einem völligen Funktionsverlust von *Nhe1* führt. Dieser Funktionsverlust geht in *Nhe1^{swe/swe}* Mäusen mit einem Verlust der mRNA- und der Proteinexpression einher (Cox et al. 1997).

Zum Überprüfen der Inaktivierung von *Nhe1* durch Deletion von Exon 2 wurde die gefloxt Mauslinie mit einer cre-Deleter Mauslinie verpaart und ein mutantes *Nhe1* Allel (konstitutiver *Nhe1*-KO) erzeugt. Durch die Verpaarung von heterozygot mutanten *Nhe1* Mäusen (*Nhe1^{+/-}*) wurden homozygot mutante *Nhe1* Mäuse (*Nhe1^{-/-}*) gezüchtet. Die *Nhe1^{-/-}* Mäuse zeigten einen mit dem *slow-wave epilepsy* Mausmodell übereinstimmenden Phänotyp mit Wachstumsretardierung, Ataxie und erhöhter postnataler Sterblichkeit durch epileptische Aktivität. Die Deletion von Exon 2 im erzeugten Mausmodell ist daher eine geeignete Strategie zur Inaktivierung des *Nhe1* Gens.

Unter bestimmten Gegebenheiten können genetische Manipulationen die Transkription des Zielgens stören. Um nachzuweisen, dass ein ausreichender Abstand der loxP sites zu den codierenden Exons und Spleißsites besteht und keine *Nhe1*-regulatorischen intronischen Elemente gestört werden, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Hierbei wurde die *Nhe1* mRNA Expression in Wildtyp, heterozygot und homozygot geflochten Mäusen verglichen und festgestellt, dass die eingeführten Veränderungen keinen Einfluß auf die Transkription von *Nhe1* ausübten. Damit erfüllt die erzeugte *Nhe1*-flox Mauslinie wichtige Eigenschaften einer konditionalen Mauslinie und wurde mit einer transgenen Mauslinie mit induzierbarer herzspezifischer cre-Rekombinase (Myh6-MerCreMer) verpaart (Sohal et al. 2001). Auf diese Weise konnte *Nhe1* selektiv in Kardiomyozyten inaktiviert werden.

6.1.2 Generation von cm *Nhe1*-KO Mäusen

Eine induzierbare cre-Rekombinase ist für Studien in Kardiomyozyten geeignet, da Kardiomyozyten gegenüber genetischen Manipulationen überaus sensitiv reagieren können. Die Überexpression von Proteinen kann in Kardiomyozyten schwerwiegende Konsequenzen haben. In einer Studie mit transgenen Mäusen zur Unterscheidung von spezifischen zu nicht-spezifischen Effekten eines überexprimierten Transgens wurde festgestellt, dass allein GFP bereits in Kardiomyozyten eine Hypertrophie auslösen kann. Da GFP als biologisch inert gilt, müssen die beobachteten Effekte allein durch die Überexpression des Proteins begründet sein (Huang et al. 2000). Werden transgene Mäuse mit Wildtypmäusen als Kontrollen verglichen, ist es unmöglich zwischen spezifischen und nicht-spezifischen Effekten zu unterscheiden und daher eine sinnvolle Deutung der Daten unmöglich.

Für *Nhe1* wurden transgene Mausmodelle hergestellt, um die Rolle von *Nhe1* im Verlauf von Herzerkrankungen durch Überexpression zu untersuchen (Coccharo et al. 2007, Nakamura et al. 2008, Cook et al. 2009). In diesen Studien wurde humanes NHE1 für die Generierung von transgenen Mäusen verwendet. Es wurde erwartet, dass eine Überexpression von NHE1 unter physiologischen Bedingungen keine schädlichen Auswirkungen hat, während bei einer I/R die Schädigung des Herzens vergrößert wird. Die Grundlage dieser Annahme ist, dass unter Ruhebedingungen NHE1 als *house keeping* Na⁺/H⁺-Austauscher weitgehend inaktiv ist und im Verlauf einer I/R exzessiv aktiviert und die Ionenhomöostase gestört wird (Orlowski 1999).

In zwei dieser voneinander unabhängigen Publikationen wurde eine humane NHE1 cDNA über den Kardiomyozyten-spezifischen *Myh6* Promotor in transgenen Mäusen überexprimiert. Entgegen den Erwartungen zeigten die transgenen Mausmodelle eine Herzhypertrophie und eine erhöhte Mortalität bereits unter Ruhebedingungen (Coccharo et al. 2007), (Cook et al. 2009). In einem I/R-Modell wurde paradoxerweise eine schützende Wirkung vor zellulären Schäden in NHE1-überexprimierenden Mäusen nachgewiesen, die gegenüber dem NHE1-Inhibitor Zoniporid unempfindlich ist (Cook et al. 2009). Die fehlende Sensitivität gegenüber Zoniporid belegt, dass der beobachtete Effekt unabhängig vom Na⁺/H⁺-Austausch ist. Letztlich wurde nachgewiesen, dass der schützende Effekt im I/R-Modell auf eine verbesserte zelluläre Stressantwort über das endoplasmatische Reticulum zurückzuführen ist und nicht über Na⁺/H⁺-Austausch vermittelt wird. Die verbesserte Stressantwort beruht darauf, dass in transgenen Herzen ein grundlegend höherer Stresslevel vorliegt und

zelluläre Komponenten gegen Stress bereits vor Durchführung der I/R heraufreguliert sind. Die verwendeten Transgene führen also zu einer unspezifischen Stressreaktion im Herzen, die im I/R-Modell zu einem besseren Endergebnis führt und geben keine Hinweise auf die zelluläre Funktion von *Nhe1*. Das zugrundeliegende Prinzip der Präkonditionierung für I/R-Perioden wird bereits seit einiger Zeit erforscht (Schott et al. 1990).

In einer dritten Publikation wurde in einem transgenen Mausmodell mit einer überaktiven NHE1 Mutante unter dem Kardiomyozyten-spezifischen *Myh6* Promotor eine Rolle von NHE1 bei der Entstehung einer Herzhypertrophie durch Kombination mit NHE1-Inhibitoren nachgewiesen (Nakamura et al. 2008). Hierbei wurde durch das überaktive NHE1 Transgen eine starke Herzhypertrophie und erhöhte Sterblichkeit ausgelöst, die über die Applikation von Cariporid teilweise unterbunden werden konnte. Diese Studie zeigt eindrucksvoll wie begrenzt die Vergleichbarkeit zwischen transgenen und Wildtypmäusen ist. Erst die Verwendung des Hemmstoffes Cariporid verdeutlicht, in welchem Maße NHE1 über Ionenaustausch die Entstehung von Herzhypertrophie fördert. Wäre diese Studie ohne eine Cariporid-behandelte Kohorte transgener Mäuse durchgeführt worden, würde die Bedeutung von NHE1 bei der Entstehung von Herzhypertrophie falsch gedeutet. Dementsprechend ist die Überexpression von Proteinen im Herzen für Gen-Funktionsstudien problembehaftet und die Ergebnisse mit Vorsicht zu deuten.

Für ein konditionales Mausmodell bietet eine induzierbare cre-Rekombinase den Vorteil in allen Versuchsgruppen exprimiert zu sein, da lediglich die Aktivität und nicht die Expression reguliert wird. Sollte durch die Anwesenheit der induzierbaren cre-Rekombinase ein hypertropher Stimulus für Kardiomyozyten bestehen, so wird dieser in Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen zu beobachten sein und nicht auf die Inaktivierung von *Nhe1* zurückgeführt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit besitzen dadurch eine höhere Qualität.

Ein weiterer Vorteil der induzierbaren cre-Rekombinase besteht darin, dass eine mögliche embryonale oder postnatale Sterblichkeit vermieden wird, wenn das gefloxtete Gen eine kritische Rolle im Verlauf der Organogenese spielt. So führt die Inaktivierung des Chromatin-modifizierenden Proteins *Brg1* in embryonalen Kardiomyozyten zum Sterben des Embryos bereits am Embryonaltag 11.5 (Hang et al. 2010). In *Nhe1^{swe/swe}* Mäusen sind jedoch keine Herzdefekte beschrieben worden,

wodurch eine kritische Funktion im Verlauf der Organogenese des Herzens unwahrscheinlich ist (Cox et al. 1997).

Ein möglicher Nachteil der Verwendung einer induzierbaren cre-Rekombinase ist die notwendige Aktivierung des Enzyms, welche die Gabe von Tamoxifen erfordert (Brocard et al. 1997). Für Tamoxifen gibt es verschiedene Applikationsmöglichkeiten. Neben einer intraperitonealen Injektion besteht die Möglichkeit, Tamoxifen über das Futter zu verabreichen. Eine intraperitoneale Injektion ist mit erheblichem Stress und Schmerzen für die Maus verbunden, da jede Maus mehrfach intraperitoneal injiziert werden muss. Die Applikation von Tamoxifen über das Trinkwasser ist aufgrund der geringen Löslichkeit von Tamoxifen in Wasser (0,5 mg/ml) eine ungeeignete Methode. Das Verabreichen von Tamoxifen mit dem Futtermittel hingegen ist eine elegante Alternative und ermöglicht über die Futtermischung eine variable Dosierung.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Tamoxifen-haltiges Futtermittel eingesetzt. Die Dauer und Dosierung der Tamoxifenbehandlung von 5 Wochen wurde einer methodischen Publikation entnommen, die ebenfalls das *Myh6-MerCreMer* Transgen zur induzierbaren herzspezifischen Inaktivierung eines Gens verwendete (Kiermayer et al. 2007). Kontrollmäuse wurden mit Standardfutter versorgt.

Die Inaktivierung von *Nhe1* in Kardiomyozyten blieb ohne offensichtliche Folgen. Die cm *Nhe1*-KO Mäuse waren nicht von Kontrollmäusen zu unterscheiden. *Nhe1* ist als *house keeping* Na⁺/H⁺-Austauscher unter Ruhebedingungen weitgehend inaktiv, wodurch diese Beobachtung nicht ungewöhnlich ist (Karmazyn et al. 2008). Unter physiologischen Bedingungen erscheint die Funktion von *Nhe1* im Herzen demnach als vernachlässigbar.

Zum Nachweis der cre-vermittelten *Nhe1* Inaktivierung in Kardiomyozyten wurde ein Northern Blot durchgeführt. Im Northern Blot konnte in Herz-RNA von cm *Nhe1*-KO Mäusen eine deutliche Verminderung von *Nhe1* mRNA im Vergleich zu Kontrollmäusen nachgewiesen werden. In Kardiomyozyten-RNA von cm *Nhe1*-KO Mäusen war keine *Nhe1* mRNA nachweisbar. Aufgrund der ubiquitären Expression von *Nhe1* entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen, da die verwendete induzierbare cre-Rekombinase in Kardiomyozyten exprimiert wird und Herz-RNA neben Kardiomyozyten auch andere Zelltypen enthält. Ein prominenter Zelltyp neben Kardiomyozyten im Herzen sind kardiale Fibroblasten und wahrscheinlich für das

verbliebene *Nhe1* mRNA Signal relevant (Eghbali et al. 1988). Die Inaktivierung von *Nhe1* in Kardiomyozyten erscheint auf mRNA Ebene nahezu vollständig.

Ein immunologischer Nachweis von *Nhe1* im Herzen gelang trotz Verwendung verschiedener Antikörper nicht, weil die Expression hier wahrscheinlich zu gering ist. Deshalb konnte nicht über einen Western Blot geprüft werden, ob residuales NHE1 in cm *Nhe1*-KO Mäusen im Herz vorhanden ist.

Da die Expression von NHE1 im Gehirn stärker ausgeprägt ist, wurde auf Membranproteinen ein immunologischer Nachweis mit einem Antikörper durchgeführt. Um die Spezifität der verwendeten cre-Rekombinase zu überprüfen, wurde ein Western Blot für Membranproteine aus Gehirn von Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen durchgeführt. Aufgrund der spezifischen Expression der cre-Rekombinase in Kardiomyozyten wurden im Gehirn keine Unterschiede in der *Nhe1* Expression erwartet. Ein Unterschied zwischen Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen wurde nicht festgestellt und damit die Spezifität der Expression der induzierbaren cre-Rekombinase nachgewiesen. Der Vergleich zwischen Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Membranproteinen mit dem verwendeten Antikörper ist valide, da der polyklonale Antikörper einen Abschnitt der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne bindet, in dem keine direkten genetischen Manipulationen vorgenommen wurden.

Um die Inaktivierung von *Nhe1* in Kardiomyozyten in cm *Nhe1*-KO Mäusen mit einer funktionellen Methode zu bestätigen, wurden pH_i Messungen in isolierten Kardiomyozyten aus Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen durchgeführt. In Kardiomyozyten gilt *Nhe1* als der dominante Na^+/H^+ -Austauscher (Cingolani and Ennis 2007). Dementsprechend besitzt eine Inaktivierung von *Nhe1* Auswirkungen auf den pH_i . In cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten wurde ein signifikant verringerter pH_i unter Ruhebedingungen in HEPES-gepufferten Lösungen im Vergleich zu Kardiomyozyten aus Kontrollmäusen gemessen. Durch HEPES wird Bicarbonat in den verwendeten Lösungen ersetzt und dadurch die pH-Regulation auf Bicarbonat-unabhängige Mechanismen reduziert. Unter physiologischen Messbedingungen transportiert *Nhe1* Protonen aus der Zelle und die gemessene Verringerung des pH_i in cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten bestätigte die Inaktivierung von *Nhe1*.

Die konditionale Inaktivierung von *Nhe1* in Kardiomyozyten ist bislang einzigartig, wodurch ein Vergleich mit der Literatur bezüglich des Ausmaßes der Änderung des gemessenen pH_i unter Ruhebedingungen nicht möglich ist. Die gemessene

Veränderung des pH_i bestätigt, dass *Nhe1* ein dominanter Na^+/H^+ -Austauscher im Herzen ist.

Für pharmakologische NHE1-Inhibitoren sind pH-Messungen an isolierten Kardiomyozyten durchgeführt worden. Der NHE1-Inhibitor Cariporid führt in HEPES-gepufferten Lösungen zu keinen (Russ et al. 1996, Kilic et al. 2005) oder geringfügigen Änderungen des pH_i (Ennis et al. 2003). Da hier der Einfluß von Cariporid in isolierten Kardiomyozyten in deutlich kürzeren Zeitfenstern bestimmt wurde, ist vorstellbar, dass eine längere Inhibition oder Inaktivierung den basalen pH_i verändern kann. Die Vergleichbarkeit der Untersuchung mit NHE1-Inhibitoren und der konditionalen Inaktivierung von *Nhe1* ist daher begrenzt.

Für das konstitutive *Nhe1*-KO Mausmodell wurde kein pH_i in Kardiomyozyten bestimmt, wodurch ein direkter Vergleich der genetischen Modelle nicht möglich ist (Wang et al. 2003). Unter diesen Gesichtspunkten ist der reduzierte pH_i unter Ruhebedingungen ein wichtiger Befund, der in dieser Form noch nicht in Kardiomyozyten beschrieben wurde. Die Ergebnisse in Kardiomyozyten werden durch Ergebnisse in isolierten Neuronen aus konstitutiven *Nhe1*-KO Mäusen gestützt. Hier führt die Inaktivierung von *Nhe1* zu einer Verringerung des basalen pH_i (Luo et al. 2005).

Der unauffällige Phänotyp der cm *Nhe1*-KO Mäuse ist mit dem verringerten pH_i vereinbar, da in Abwesenheit von Bicarbonat gemessen wurde. Unter physiologischen Bedingungen ist Bicarbonat vorhanden und Na^+ -abhängige und Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher können die Effekte von Na^+/H^+ -Austauschern größtenteils oder vollständig ausgleichen (Ganz et al. 1989). Die Messung in HEPES-haltigen Puffern ist eine Methode, die Unterschiede im pH_i sichtbar macht. Eine pH_i Messung in Bicarbonat-haltigen Lösungen wurde nicht durchgeführt.

Eine indirekte Methode, die Funktion von *Nhe1* zu überprüfen, ist die Messung von Calcium Transienten (cytoplasmatisches Calcium). In der Literatur sind überwiegend Ergebnisse publiziert, nach denen eine intrazelluläre Acidose die Amplitude von Calcium Transienten erhöht. Dies geschieht als eine adaptive Antwort auf die verminderte Funktion des kontraktile Apparats im Herzen. Umgekehrt führt eine Alkalose zu einer Verminderung der Amplitude von Calcium Transienten (Allen and Orchard 1983), (Balnave and Vaughan-Jones 2000). In dieser Arbeit wurden die Messungen des pH_i und der Amplitude von Calcium Transienten in vergleichbaren HEPES-gepufferten Lösungen vorgenommen. Unter Ruhebedingungen wurde in cm

Nhe1-KO Kardiomyozyten eine Acidose festgestellt, die mit einer größeren Amplitude der Calcium Transienten in cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten einhergehen sollte. Eine unveränderte oder verringerte Amplitude der Calcium Transiente wird prinzipiell in einer initialen Anpassungsphase nach Auftreten einer Acidose beobachtet. Nach einer teilweisen Erholung der Kontraktionskraft sind erhöhte Calcium Transienten zu beobachten (Choi et al. 2000, Crampin et al. 2006).

Dies konnte nicht beobachtet werden. Unter Ruhebedingungen und nach Stimulation mit Isoproterenol wurden keine signifikanten Änderungen der Amplitude der Calcium Transienten gemessen. Nach Stimulation mit Angiotensin II wurde in cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten eine niedrigere Amplitude der Calcium Transienten gemessen.

Diese Abweichung von der Literatur wurde bereits zuvor gemacht. In einer Publikation zur Regulation von *Nhe1* über einen cGMP-regulierten Mechanismus wurde bei gesteigerter NHE1-Aktivität eine Erhöhung der Amplitude der Calcium Transienten festgestellt (Kilic et al. 2005). Eine gesteigerte NHE1 Aktivität in HEPES-gepufferten Lösungen resultiert in einer Alkalose und es wäre zu erwarten, dass eine Abnahme der Amplitude der Calcium Transienten zu beobachten ist, wenn eine Änderung im pH_i vorliegt (Allen and Orchard 1983). Die Studie von Kilic et al. mit den erhöhten Calcium Transienten dieser Arbeit weist jedoch Unterschiede auf, die eine direkte Vergleichbarkeit erschweren. So zeigen Guanylcyclase-A Rezeptor-defiziente Kardiomyozyten mit fehlender cGMP-Inhibition von NHE1 ein starkes hypertrophes Wachstum, wodurch eine lokale Ischämie im Herzen und Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase auftreten kann. Tatsächlich wurde in hypertrophen Kardiomyozyten eine gestörte Funktion der Na^+/K^+ -ATPase nachgewiesen (Nakanishi et al. 1989). Eine Störung der Na^+/K^+ -ATPase führt in Kombination mit gesteigerter NHE1 Aktivität zu einer $[Na^+]_i$ Überladung und reverser NCX Aktivität, die eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt.

Kardiomyozyten aus cm *Nhe1*-KO Mäusen wiesen kein hypertrophes Wachstum auf, wodurch eine Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase unwahrscheinlich ist. Dementsprechend sind unveränderte bzw. erniedrigte Calcium Transienten im Kontext mit der adaptiven Antwort auf eine Acidose durch eine verminderte Funktion des kontraktilen Apparats nicht möglich. Die Möglichkeit, dass die gemessene Acidose in cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten nicht stark genug ausgeprägt ist, ist ebenfalls

unwahrscheinlich, da vergleichbare Veränderungen des pH_i bereits Calcium Transienten beeinflussen (Choi et al. 2000, Balnave and Vaughan-Jones 2000).

Werden die Daten unter dem Gesichtspunkt der Ionenhomöostase betrachtet und die Wechselwirkung zwischen pH_i und dem kontraktilen Apparat von Kardiomyozyten ausgeklammert, können die gemessenen Daten folgendermaßen erklärt werden. Unter Ruhebedingungen ist *Nhe1* weitgehend inaktiv. Daher sind keine Änderungen in der Amplitude der Calcium Transienten in cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten zu erwarten. Angiotensin II hingegen stimuliert die Aktivität von NHE1 (Matsui et al. 1995) in Verbindung mit erhöhter metabolischer Aktivität (Skolnick et al. 1998). Die Aktivierung von NHE1 führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration, die über reverse NCX Aktivität die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht (Pérez, de Hurtado and Cingolani 2001). In cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten wurde eine signifikant erniedrigte Amplitude der Calcium Transienten gemessen, da die Stimulation mit Angiotensin II die intrazelluläre Na^+ -Konzentration über NHE1 nicht erhöhen kann und keine vermehrte NCX Aktivität möglich ist. Diese verringerte Amplitude der Calcium Transienten in cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten belegt die Inaktivierung von *Nhe1*. Nach Stimulation mit Isoproterenol wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten festgestellt. Für Isoproterenol sind keine Studien publiziert, die eine klare Stimulation von NHE1 Aktivität durch Isoproterenol in Kardiomyozyten belegen. Übereinstimmend hiermit wurde in isolierten Acinuszellen der Speicheldrüse nachgewiesen, dass die konstitutive Inaktivierung von *Nhe1* keinen Einfluss auf Zellwachstum über chronische β -adrenerge Stimulation hat (Melvin et al. 2001). Ein Unterschied in der Amplitude der Calcium Transienten zwischen Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten ist demnach nur zu beobachten, wenn eine Stimulation der NHE1 Aktivität vorliegt.

Bei experimenteller Auslösung von Herzhypertrophie durch Isoproterenol wurde *in vivo* eine Wirkung von NHE1-Inhibitoren nachgewiesen (Ennis et al. 2003). Das Fehlen dieses Effekts in isolierten cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten deutet möglicherweise auf einen autokrinen oder parakrinen Signalweg hin, der *in vitro* unter Perfusion nicht wirksam ist (Blagovic, Kim and Voldman 2011).

Zusammengefasst bestätigten der Northern Blot für Herz- und Kardiomyozyten-RNA, die pH-Messungen, sowie mit Einschränkungen die verringerte Amplitude der Calcium Transienten nach Angiotensin II Stimulation in cm *Nhe1*-KO

Kardiomyozyten, dass das verwendete konditionale Mausmodell brauchbar und für *in vivo* Studien am Herzen geeignet ist.

6.2 Funktionelle Charakterisierung von Kardiomyozyten-spezifischen *Nhe1*-KO Mäusen in einem pharmakologischen Hypertrophiemodell

6.2.1 *Nhe1* und Herzhypertrophie

Durch die Infusion von Angiotensin II wurde in den Mäusen eine Bluthochdruck-induzierte Herzhypertrophie experimentell ausgelöst. Das Octapeptid Angiotensin II (Bumpus, Schwarz and Page 1957) wirkt auf das Herz über zwei Mechanismen.

Erstens führt Angiotensin II über eine gesteigerte Vasokonstriktion und eine erhöhte Natrium Reabsorption in der Niere zu einem erhöhten Blutdruck (MacGregor et al. 1981). Ein erhöhter Blutdruck führt im Verlauf der Systole zu einer Zunahme des Drucks auf die Herzwand. Zur Kompensation des erhöhten mechanischen Stresses auf die Kardiomyozyten kommt es zur parallelen Replikation von Sarcomeren und die Kardiomyozyten werden breiter. Es entsteht eine konzentrische Herzhypertrophie, um die gesteigerten Anforderungen an das Herz auszugleichen (Grossman, Jones and McLaurin 1975).

Zweitens wirkt Angiotensin II lokal am Herzen über einen Protein Kinase C (PKC)-abhängigen Mechanismus positiv auf das Zellwachstum. Eine Beurteilung eines lokalen Angiotensin II Effekts unter erhöhtem Blutdruck ist schwierig, weil mechanischer Stress stimulierend auf die PKC wirkt, wodurch die eigentliche Ursache der PKC Aktivierung in Bluthochdruckmodellen schwierig zu identifizieren ist (Yamazaki et al. 1995). Die Bedeutung der lokalen Wirkung von Angiotensin II ist in der Literatur zudem umstritten. Eine Studie zur direkten Stimulation von Zellwachstum über lokales Angiotensin II im Verlauf einer durch Bluthochdruck-induzierten Herzhypertrophie in Hunden ergab, dass die Konzentration von lokalem Angiotensin II im Atrium reduziert und der entscheidende Hypertrophiestimulus der erhöhte Blutdruck war (Hart et al. 2001).

Für *Nhe1* wurde eine wichtige Funktion bei der Entstehung von Herzhypertrophie nachgewiesen. Aufgrund der Vielzahl experimenteller Studien mit pharmakologischen NHE1-Inhibitoren und reduzierter bzw. unterbundener Herzhypertrophie (Engelhardt et al. 2002, Ennis et al. 2003) wurde erwartet, dass die

genetische Inaktivierung von *Nhe1* in Kardiomyozyten eine Herzhypertrophie zumindest teilweise unterbinden sollte. Überraschenderweise konnte in dieser Arbeit keine schützende Wirkung der *Nhe1* Inaktivierung in Kardiomyozyten nachgewiesen werden.

Die Infusion von Angiotensin II erhöhte in Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen den Bluthochdruck in gleicher Weise, wodurch beide Gruppen miteinander verglichen werden können. In sham Mäusen wurden erwartungsgemäß keine Veränderungen des Blutdrucks im Verlauf des Experiments festgestellt.

Durch den erhöhten Blutdruck wurde eine konzentrische Hypertrophie in Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen ausgelöst. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen für das LV/BW Verhältnis gemessen.

Dieses Ergebnis wurde an Gewebeschnitten vom Herzen bestätigt. Die Durchmesser von Kardiomyozyten aus Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen zeigten keine Unterschiede. Im Gegensatz zu Kardiomyozyten aus sham Mäusen konnte für Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäuse eine konzentrische Hypertrophie nachgewiesen werden, wodurch die experimentelle Auslösung der Herzhypertrophie eindeutig belegt wurde. Übereinstimmend ergab die Bestimmung der Kollageneinlagerungen im Herzmuskel von Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen keine Unterschiede, aber eine signifikante Steigerung zu den sham Mäusen.

Die invasive Hämodynamik mit einem Herzkatheter erlaubte Rückschlüsse auf die linksventrikuläre Funktion im Herzen. Im Vergleich zwischen Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen wurden keine Unterschiede oder Anzeichen für eine fortgeschrittene Herzinsuffizienz festgestellt (Studie noch nicht abgeschlossen). Dieses Ergebnis bestätigt die Resultate der histologischen Analyse. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass möglicherweise eine unterschiedlich schnelle Degeneration des Herzmuskels in den untersuchten Kohorten auftritt.

Der überraschende Befund, dass cm *Nhe1*-KO Mäuse nicht vor der Entwicklung einer Herzhypertrophie geschützt sind, steht im klaren Gegensatz zu Studien mit NHE1-Inhibitoren und kann verschiedene Gründe haben. Im folgenden Abschnitt werden vier verschiedene Möglichkeiten diskutiert.

Eine Möglichkeit für den fehlenden Schutz von cm *Nhe1*-KO Mäusen vor der Entwicklung einer Herzhypertrophie ist eine ungenügende Rekombination des geflochtenen *Nhe1* Allels über die induzierbare cre-Rekombinase. Gegen diese Vermutung sprechen verschiedene Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit vorab

als wichtige Kontrollen durchgeführt wurden. Als direkte Nachweise für die Inaktivierung von *Nhe1* in Kardiomyozyten wurde eine Northern Blot Analyse und eine Messung des pH_i vorgenommen. Eine indirekte Methode für den Nachweis der Inaktivierung von *Nhe1* ist die Messung der Calcium Transienten deren Ergebnisse unter Ruhebedingungen zwar schwierig mit der Literatur in Einklang zu bringen sind, aber einen Unterschied zwischen Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Mäusen nach Stimulation mit Angiotensin II zeigen. Im Falle einer nicht ausreichenden Rekombination wäre keine Änderung in den Calcium Transienten zu erwarten. Diese Experimente belegen, dass *Nhe1* in Kardiomyozyten inaktiviert wurde.

Eine zweite Möglichkeit für einen fehlenden Phänotyp der cm *Nhe1*-KO Mäuse wäre die Wahl eines nicht geeigneten Hypertrophie-modells. Das angewendete Hypertrophie-modell wurde ausgewählt, da NHE1-Inhibitoren in durch Blutdruck-vermittelter Hypertrophie im Tiermodell überaus wirksam waren (Kilic et al. 2005, Ennis et al. 2007). In der Literatur gibt es keine Hinweise dafür, dass in Blutdruck-vermittelten Hypertrophie-modellen NHE1-Inhibitoren selektiv versagen.

Die gemessenen Calcium Transienten zeigten unter Angiotensin II Stimulation zwischen Kontroll- und cm *Nhe1*-KO Kardiomyozyten signifikante Unterschiede und einen Unterschied in der lokalen Wirkung von Angiotensin II. Dieser Befund ist ein weiteres Argument für die Wahl des pharmakologischen Hypertrophie-modells.

Zur Absicherung der gewonnenen Erkenntnisse sollte ein weiteres Hypertrophie-modell herangezogen werden. Die vorteilhafteste Methode ist ein mechanisches Hypertrophie-modell, die *transverse aortic constriction* (TAC). Dabei wird über einen operativen Eingriff die Aorta künstlich verengt und eine Druck-vermittelte konzentrische Herzhypertrophie ausgelöst. Dagegen ist die Anwendung eines genetischen Herzhypertrophie-modells aufgrund des hohen Zucht- und Kostenaufwands nicht vorgesehen. Für ein solches Hypertrophie-modell müssten zusätzlich zur herzspezifischen induzieren cre-Rekombinase und den geflochtenen *Nhe1* Allelen noch ein Transgen zum Auslösen von Herzhypertrophie eingekreuzt werden (Engelhardt et al. 2002, Arber et al. 1997).

Der fehlende Schutz vor Herzhypertrophie in cm *Nhe1*-KO Mäusen könnte in einem unspezifischen Effekt der NHE1-Inhibitoren begründet sein. Myokardiale Infarktexperimente mit dem genetischen konstitutiven *Nhe1*-KO Mausmodell geben keine Hinweise, dass NHE1-Inhibitoren über andere Proteine ihre Wirkung vermitteln (Wang et al. 2003). Daher ist ein unspezifischer Effekt von NHE1-

Inhibitoren unwahrscheinlich. Inwiefern die genetische Inaktivierung von *Nhe1* in Kardiomyozyten Einfluß auf den Ausgang eines myokardialen Infarktes hat, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die letzte Erklärung für den fehlenden Schutz vor Herzhypertrophie wäre, dass die Rolle von *Nhe1* in Kardiomyozyten bei der Entstehung einer Herzhypertrophie vernachlässigbar ist. In der Literatur finden sich Beispiele dafür, dass andere Zelltypen im Herzen das Wachstum von Kardiomyozyten beeinflussen können. Einer dieser Zelltypen sind Blutgefäße, die Nährstoffe und Sauerstoff für Kardiomyozyten bereitstellen und das Wachstum von Kardiomyozyten limitieren. In einer umfangreichen Publikation zur Rolle von Blutgefäßen bei Herzhypertrophie wurde nach einer TAC gezeigt, dass für die Entstehung einer Herzhypertrophie die Neubildung von Blutgefäßen unerlässlich ist (Sano et al. 2007). Für kardiale Fibroblasten wurde eine vergleichbare Bedeutung bei der Entstehung von Herzhypertrophie festgestellt. In einer wegweisenden Publikation wurde gezeigt, dass mit einsetzender Herzinsuffizienz durch miRNA-21 in kardialen Fibroblasten die Ausbildung einer Fibrose im Herzen ausgelöst wird (Thum et al. 2008). Übereinstimmend können Mäuse mit einer Inaktivierung des Transkriptionsfaktors *Krüppel-like factor 5 (Klf5)* in kardialen Fibroblasten keine Herzhypertrophie in Kardiomyozyten ausbilden und zeigen direkt nach einer starken TAC Anzeichen von Herzinsuffizienz (Takeda et al. 2010). Diese Publikationen belegen, dass kardiale Fibroblasten eine essentielle Rolle bei der Entstehung von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz spielen. Die Expression von *Nhe1* ist in Blutgefäßen (Cutaia et al. 1998) und Fibroblasten (Tominaga et al. 1998) gegeben, womit eine erste Voraussetzung für eine Funktion von NHE1 in diesen Zelltypen vorhanden ist. Bei der Ausbildung neuer Blutgefäße sowie beim „*Remodeling*“ im Herzen über kardiale Fibroblasten ist Zellmigration eine entscheidende Komponente. Faszinierenderweise konnte für NHE1 eine Rolle bei Wundheilungsprozessen die auf Zellmigration beruhen nachgewiesen werden (Zhao et al. 2006). Die Funktion von *Nhe1* in Fibroblasten ist eine interessante Hypothese, die mit dem konditionalen *Nhe1* Mausmodell in Verbindung mit einer für kardiale Fibroblasten spezifischen cre-Rekombinase in einem Folgeprojekt überprüft werden könnte. Eine für kardiale Fibroblasten spezifische cre-Rekombinase wurde bereits beschrieben (Takeda et al. 2010).

Die Hypothese, dass ein anderer Zelltyp unter NHE1-Inhibition die schützende Wirkung begründet, kann überprüft werden, indem eine Unterteilung der in dieser Arbeit untersuchten Kohorten in mit einem NHE1-Inhibitor behandelte und unbehandelte Mäuse vorgenommen wird. Es wäre zu erwarten, dass die mit NHE1-Inhibitoren behandelten Mäuse vor der Entstehung einer Herzhypertrophie geschützt sind, da pharmakologische Substanzen alle Zelltypen im Herzen erreichen können. Welcher Zelltyp die schützende Wirkung vor der Entwicklung einer Herzhypertrophie vermittelt, kann auf diese Weise nicht geklärt werden.

Abschließend betrachtet eröffnen die Ergebnisse dieser Arbeit für *Nhe1* weitere Fragestellungen bezüglich der Funktion von *Nhe1* bei der Entstehung von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz (Abb. 14).

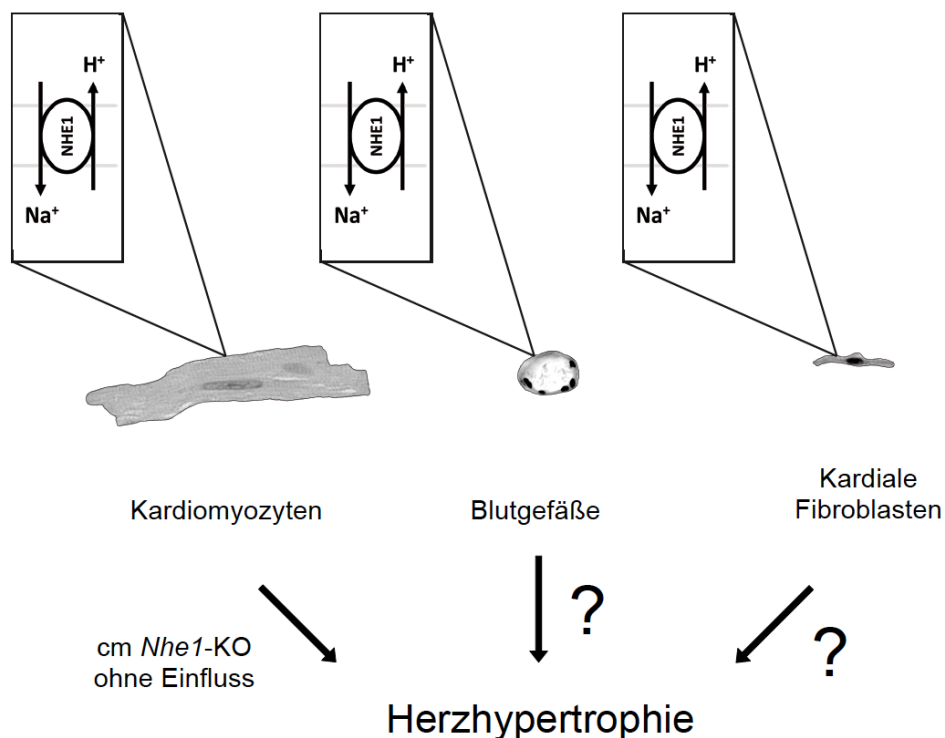


Abb. 14: Rolle von NHE1 bei der Entstehung von Herzhypertrophie in unterschiedlichen Zelltypen. Kardiomyozyten, Blutgefäße und kardiome Fibroblasten spielen eine Rolle bei der Entstehung von Herzhypertrophie und exprimieren NHE1. In dieser Arbeit wurde *Nhe1* selektiv in Kardiomyozyten inaktiviert und keine Auswirkungen auf die Entstehung einer Herzhypertrophie beobachtet. Möglicherweise vermitteln Blutgefäße und/oder kardiome Fibroblasten nach NHE1-Inhibition den Schutz vor der Entstehung von Herzhypertrophie.

Insbesondere für Untersuchungen, die sich mit der Kopplung von NHE1 Aktivität mit Anionenaustauschern befassen, haben die Ergebnisse dieser Arbeit eine hohe Relevanz. Eine Aktivierung von NHE1 ist ein Merkmal bei der Entstehung einer Herzhypertrophie. Die Aktivierung von NHE1 führt zur Alkalose und automatischen

Inaktivierung von NHE1, sofern keine anderen Mechanismen der Alkalose entgegenwirken. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die Aktivierung von NHE1 im Verlauf der Entstehung einer Herzhypertrophie eine Kopplung an einen anderen Transporter erfordert. Ein Hinweis für diese Kopplung lieferte die Erkenntnis, dass in hypertrophen Kardiomyozyten zwar eine gesteigerte NHE1 Aktivität, aber ein stabiler pH_i gemessen wurde (Pérez et al. 1995). Die Klonierung dieses gekoppelten Transporters besitzt eine hohe Relevanz, da auf diese Weise ein indirekter Inhibitor für NHE1 und somit ein Angriffspunkt bei der Behandlung der Herzhypertrophie identifiziert wäre. In der Theorie würde die Inhibition des gekoppelten Transporters eine automatische Inaktivierung von NHE1 zur Folge haben.

Die Untersuchung eines Kandidaten, dem Anionenaustauscher 3 (*Ae3*), für diese Kopplung lieferte in einem transgenen Mausmodell für Herzinsuffizienz keine Hinweise für einen Einfluss von *Ae3* auf die Ausbildung einer Herzhypertrophie (Al Moamen et al. 2011). Ein weiterer Kandidat für den NHE1-gekoppelten Transporter ist der *Solute carrier 26a6* (*Slc26a6*), der über einen PKC-abhängigen Mechanismus aktiviert wird und dessen mRNA Expression höher als für *Ae3* mRNA ist (Alvarez et al. 2004). Die Relevanz eines Transporters über die Ausprägung der Expression abzuschätzen ist schwierig, da Transporter in ihrer Aktivität reguliert werden. Die Inaktivierung von *Slc26a6* im Mausmodell führt zu keinem offensichtlichen Phänotyp am Herz (Wang et al. 2005) und eine Untersuchung in Verbindung mit einem transgenen Mausmodell für Herzinsuffizienz wurde bislang nicht durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen allerdings die Funktion von *Nhe1* bei der Entstehung von Herzhypertrophie in Kardiomyozyten und somit die Grundlage für die Suche nach einem gekoppelten Transporter in Frage.

Eine verlockende Deutung der vorliegenden Ergebnisse ist, dass *Nhe1* in kardialen Fibroblasten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Herzhypertrophie einnimmt, während *Nhe1* in Kardiomyozyten vernachlässigbar erscheint. In Einklang mit dieser Vermutung steht, dass die Entstehung von Herzhypertrophie auf der Ebene von kardialen Fibroblasten reguliert werden kann (Thum et al. 2008, Takeda et al. 2010). Ein Versagen von NHE1-Inhibitoren in klinischen Studien kann auf diese Weise nicht erklärt werden. Unterschiede zwischen genetischen und pharmakologischen Studien sind keine Seltenheit und die Auflösung dieser Diskrepanzen ist ein langwieriger Prozess (Patrick et al. 2010).

Eine zentrale Frage, die in der Literatur bislang nicht ausreichend geklärt wurde lautet, ob das Repertoire an Na^+/H^+ -Austauschern zwischen Nagetieren und Menschen wirklich vergleichbar und im Menschen NHE1 der dominante Na^+/H^+ -Austauscher ist. Obwohl diese Annahme unwahrscheinlich erscheint, besteht mittlerweile die Möglichkeit der Erzeugung humaner Kardiomyozyten aus induzierten Stammzellen (Efe et al. 2011). Durch diese Methode zur Herstellung von Kardiomyozyten könnte die begrenzte Verfügbarkeit an humanen Kardiomyozyten behoben werden und dieses wichtige Kontrollexperiment durchgeführt werden.

Gegenwärtig wird der Befund, dass die Inaktivierung von *Nhe1* in Kardiomyozyten keine Auswirkungen auf die Entstehung einer Herzhypertrophie besitzt, an einem anderem experimentellen Herzhypertrophiemodell überprüft. Auf diese Weise soll der überraschende Befund dieser Arbeit bestätigt werden. Zusammengefasst wurden zwingende Hinweise dafür geliefert, dass die Funktion von *Nhe1* bei der Entstehung von Herzhypertrophie weitaus komplexer als bislang angenommen ist.

7. Schlußfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein konditionales Mausmodell für *Nhe1* generiert. Aufgrund der hohen Relevanz von Na^+/H^+ -Austausch und der ubiquitären Expression von *Nhe1* stellt dieses konditionale Mausmodell ein wertvolles Werkzeug zur Erforschung der Funktion von *Nhe1* für verschiedene Fragestellungen dar.

Mit Hilfe des konditionalen Mausmodells konnte erstmalig die Rolle von *Nhe1* in Kardiomyozyten bei der Entstehung einer Herzhypertrophie unabhängig von pharmakologischen Inhibitoren oder dem sehr schweren früh letalen Phänotyp in konstitutiven *Nhe1*-KO Mäusen untersucht werden. Die Kardiomyozyten-spezifische Inaktivierung von *Nhe1* wurde über verschiedene molekularbiologische und funktionelle Methoden vorab in Kontrollexperimenten bestätigt. Diese Vorarbeiten belegten, dass *Nhe1* der dominante Na^+/H^+ -Austauscher in Kardiomyozyten der Maus ist.

Im Verlauf einer experimentellen Herzhypertrophie ergab sich der überraschende Befund, dass die Inaktivierung von *Nhe1* in Kardiomyozyten nicht vor der Entstehung einer Herzhypertrophie schützt. Aus dieser Beobachtung ergeben sich eine Reihe interessanter Fragen, wie *Nhe1* die Entstehung von Herzhypertrophie beeinflussen kann. Eine Möglichkeit wäre, dass *Nhe1* in Kardiomyozyten bei der Entstehung einer Herzhypertrophie vernachlässigbar ist und andere Zelltypen, wie Blutgefäße und kardiale Fibroblasten, eine entscheidende Rolle spielen.

8. Literatur

- Abercrombie, R. F. & A. Roos (1983) The intracellular pH of frog skeletal muscle: its regulation in hypertonic solutions. *J Physiol*, 345, 189-204.
- Al Moamen, N. J., V. Prasad, I. Bodi, M. L. Miller, M. L. Neiman, V. M. Lasko, S. L. Alper, D. F. Wieczorek, J. N. Lorenz & G. E. Shull (2011) Loss of the AE3 anion exchanger in a hypertrophic cardiomyopathy model causes rapid decompensation and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 50, 137-46.
- Allen, D. G. & C. H. Orchard (1983) The effects of changes of pH on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J Physiol*, 335, 555-67.
- Alvarez, B., D. Kieller, A. Quon, D. Markovich & J. Casey (2004) Slc26a6: a cardiac chloride-hydroxyl exchanger and predominant chloride-bicarbonate exchanger of the mouse heart. *J Physiol*, 561, 721-34.
- Ammar, Y. B., S. Takeda, T. Hisamitsu, H. Mori & S. Wakabayashi (2006) Crystal structure of CHP2 complexed with NHE1-cytosolic region and an implication for pH regulation. *EMBO J*, 25, 2315-25.
- Arber, S., J. J. Hunter, J. Ross, M. Hongo, G. Sansig, J. Borg, J. C. Perriard, K. R. Chien & P. Caroni (1997) MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*, 88, 393-403.
- Arnold, S. B., R. C. Byrd, W. Meister, K. Melmon, M. D. Cheitlin, J. D. Bristow, W. W. Parmley & K. Chatterjee (1980) Long-term digitalis therapy improves left ventricular function in heart failure. *N Engl J Med*, 303, 1443-8.
- Aronson, P. S. (1985) Kinetic properties of the plasma membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *Annu Rev Physiol*, 47, 545-60.
- Avkiran, M. & M. S. Marber (2002) Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol*, 39, 747-53.
- Balnave, C. D. & R. D. Vaughan-Jones (2000) Effect of intracellular pH on spontaneous Ca²⁺ sparks in rat ventricular myocytes. *J Physiol*, 528 Pt 1, 25-37.
- Bell, S., C. Schreiner, P. Schultheis, M. Miller, R. Evans, C. Vorhees, G. Shull & W. Scott (1999) Targeted disruption of the murine Nhe1 locus induces ataxia, growth retardation, and seizures. *Am J Physiol*, 276, C788-95.
- Bers, D. M. & S. P. Harris (2011) Translational medicine: to the rescue of the failing heart. *Nature*, 473, 36-9.
- Blagovic, K., L. Y. Kim & J. Voldman (2011) Microfluidic perfusion for regulating diffusible signaling in stem cells. *PLoS One*, 6, e22892.
- Boron, W. F. & E. L. Boulpaep (1983) Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Na-H exchange. *J Gen Physiol*, 81, 29-52.
- Boström, P., N. Mann, J. Wu, P. A. Quintero, E. R. Plovie, D. Panáková, R. K. Gupta, C. Xiao, C. A. MacRae, A. Rosenzweig & B. M. Spiegelman (2010) C/EBPβ controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell*, 143, 1072-83.
- Bourgeois, S., L. V. Meer, B. Wootla, M. Bloch-Faure, R. Chambrey, G. E. Shull, L. R. Gawenis & P. Houillier (2010) NHE4 is critical for the renal handling of ammonia in rodents. *J Clin Invest*, 120, 1895-904.
- Branda, C. S. & S. M. Dymecki (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell*, 6, 7-28.

- Brocard, J., X. Warot, O. Wendling, N. Messaddeq, J. L. Vonesch, P. Chambon & D. Metzger (1997) Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 14559-63.
- Bumpus, F. M., H. Schwarz & I. H. Page (1957) Synthesis and pharmacology of the octapeptide angiotonin. *Science*, 125, 886-7.
- Choi, H. S., A. W. Trafford, C. H. Orchard & D. A. Eisner (2000) The effect of acidosis on systolic Ca²⁺ and sarcoplasmic reticulum calcium content in isolated rat ventricular myocytes. *J Physiol*, 529 Pt 3, 661-8.
- Cingolani, H. E. & I. L. Ennis (2007) Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy. *Circulation*, 115, 1090-100.
- Coccaro, E., F. Mraiche, M. Malo, H. Vandertol-Vanier, B. Bullis, M. Robertson & L. Fliegel (2007) Expression and characterization of the Na⁺/H⁺ exchanger in the mammalian myocardium. *Mol Cell Biochem*, 302, 145-55.
- Cook, A., S. Bardswell, S. Pretheshan, K. Dighe, G. Kanaganayagam, R. Jabr, S. Merkle, M. Marber, S. Engelhardt & M. Avkiran (2009) Paradoxical resistance to myocardial ischemia and age-related cardiomyopathy in NHE1 transgenic mice: a role for ER stress? *J Mol Cell Cardiol*, 46, 225-33.
- Costanzo, M. R., D. C. Naftel, M. R. Pritzker, J. K. Heilman, J. P. Boehmer, S. C. Brozena, G. W. Dec, H. O. Ventura, J. K. Kirklin, R. C. Bourge & L. W. Miller (1998) Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. Cardiac Transplant Research Database. *J Heart Lung Transplant*, 17, 744-53.
- Counillon, L., A. Franchi & J. Pouyssegur (1993) A point mutation of the Na⁺/H⁺ exchanger gene (NHE1) and amplification of the mutated allele confer amiloride resistance upon chronic acidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 4508-12.
- Cox, G., C. Lutz, C. Yang, D. Biemesderfer, R. Bronson, A. Fu, P. Aronson, J. Noebels & W. Frankel (1997) Sodium/hydrogen exchanger gene defect in slow-wave epilepsy mutant mice. *Cell*, 91, 139-48.
- Crampin, E. J., N. P. Smith, A. E. Langham, R. H. Clayton & C. H. Orchard (2006) Acidosis in models of cardiac ventricular myocytes. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, 364, 1171-86.
- Cutaia, M. V., N. Parks, J. Centracchio, S. Rounds, K. P. Yip & A. M. Sun (1998) Effect of hypoxic exposure on Na⁺/H⁺ antiport activity, isoform expression, and localization in endothelial cells. *Am J Physiol*, 275, L442-51.
- Denker, S. P., D. C. Huang, J. Orłowski, H. Furthmayr & D. L. Barber (2000) Direct binding of the Na⁺-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H⁺ translocation. *Mol Cell*, 6, 1425-36.
- Depre, C., G. L. Shipley, W. Chen, Q. Han, T. Doenst, M. L. Moore, S. Stepkowski, P. J. Davies & H. Taegtmeyer (1998) Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 4, 1269-75.
- Dereeper, A., V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J. F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J. M. Claverie & O. Gascuel (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*, 36, W465-9.
- Diering, G. H., F. Mills, S. X. Bamji & M. Numata (2011) Regulation of dendritic spine growth through activity-dependent recruitment of the brain-enriched Na⁺/H⁺ exchanger NHE5. *Mol Biol Cell*, 22, 2246-57.
- Doma, M. K. & R. Parker (2007) RNA quality control in eukaryotes. *Cell*, 131, 660-8.

- Efe, J. A., S. Hilcove, J. Kim, H. Zhou, K. Ouyang, G. Wang, J. Chen & S. Ding (2011) Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol*, 13, 215-22.
- Eghbali, M., M. J. Czaja, M. Zeydel, F. R. Weiner, M. A. Zern, S. Seifter & O. O. Blumenfeld (1988) Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. *J Mol Cell Cardiol*, 20, 267-76.
- Engelhardt, S., L. Hein, U. Keller, K. Klämbt & M. J. Lohse (2002) Inhibition of Na⁺-H⁺ exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res*, 90, 814-9.
- Ennis, I., E. Escudero, G. Console, G. Camihort, C. Dumm, R. Seidler, M. Camilión de Hurtado & H. Cingolani (2003) Regression of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by Na⁺/H⁺ exchanger inhibition. *Hypertension*, 41, 1324-9.
- Ennis, I. L., C. D. Garcarena, E. M. Escudero, N. G. Pérez, R. A. Dulce, M. C. Camilión de Hurtado & H. E. Cingolani (2007) Normalization of the calcineurin pathway underlies the regression of hypertensive hypertrophy induced by Na⁺/H⁺ exchanger-1 (NHE-1) inhibition. *Can J Physiol Pharmacol*, 85, 301-10.
- Franchi, A., D. Perucca-Lostanlen & J. Pouyssegur (1986) Functional expression of a human Na⁺/H⁺ antiporter gene transfected into antiporter-deficient mouse L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 9388-92.
- Frelin, C., P. Vigne & M. Lazdunski (1984) The role of the Na⁺/H⁺ exchange system in cardiac cells in relation to the control of the internal Na⁺ concentration. A molecular basis for the antagonistic effect of ouabain and amiloride on the heart. *J Biol Chem*, 259, 8880-5.
- Frey, N. & E. N. Olson (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*, 65, 45-79.
- Ganz, M. B., G. Boyarsky, R. B. Sterzel & W. F. Boron (1989) Arginine vasopressin enhances pHi regulation in the presence of HCO₃⁻ by stimulating three acid-base transport systems. *Nature*, 337, 648-51.
- Gaskell, W. H. (1880) On the Tonicity of the Heart and Blood Vessels. *J Physiol*, 3, 48-92.16.
- Gilfillan, G. D., K. K. Selmer, I. Roxrud, R. Smith, M. Kyllerman, K. Eiklid, M. Kroken, M. Mattingsdal, T. Egeland, H. Stenmark, H. Sjøholm, A. Server, L. Samuelsson, A. Christianson, P. Tarpey, A. Whibley, M. R. Stratton, P. A. Futreal, J. Teague, S. Edkins, J. Gecz, G. Turner, F. L. Raymond, C. Schwartz, R. E. Stevenson, D. E. Undlien & P. Strømme (2008) SLC9A6 mutations cause X-linked mental retardation, microcephaly, epilepsy, and ataxia, a phenotype mimicking Angelman syndrome. *Am J Hum Genet*, 82, 1003-10.
- Gottlieb, R. A., K. O. Bureson, R. A. Kloner, B. M. Babior & R. L. Engler (1994) Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 94, 1621-8.
- Grossman, W., D. Jones & L. P. McLaurin (1975) Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*, 56, 56-64.
- Hang, C. T., J. Yang, P. Han, H. L. Cheng, C. Shang, E. Ashley, B. Zhou & C. P. Chang (2010) Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature*, 466, 62-7.
- Hart, C. Y., D. M. Meyer, H. D. Tazelaar, J. P. Grande, J. C. Burnett, P. R. Housmans & M. M. Redfield (2001) Load versus humoral activation in the genesis of early hypertensive heart disease. *Circulation*, 104, 215-20.
- Huang, W., J. Aramburu, P. Douglas & S. Izumo (2000) Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat Med*, 6, 482-3.

- Hunter, J. J. & K. R. Chien (1999) Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*, 341, 1276-83.
- Karmazyn, M. (1988) Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na⁺-H⁺ exchange. *Am J Physiol*, 255, H608-15.
- Karmazyn, M., A. Kilić & S. Javadov (2008) The role of NHE-1 in myocardial hypertrophy and remodelling. *J Mol Cell Cardiol*, 44, 647-53.
- Kiermayer, C., M. Conrad, M. Schneider, J. Schmidt & M. Brielmeier (2007) Optimization of spatiotemporal gene inactivation in mouse heart by oral application of tamoxifen citrate. *Genesis*, 45, 11-6.
- Kilic, A., A. Velic, L. De Windt, L. Fabritz, M. Voss, D. Mitko, M. Zwiener, H. Baba, M. van Eickels, E. Schlatter & M. Kuhn (2005) Enhanced activity of the myocardial Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice. *Circulation*, 112, 2307-17.
- Klaiber, M., M. Kruse, K. Völker, J. Schröter, R. Feil, M. Freichel, A. Gerling, S. Feil, A. Dietrich, J. E. Londoño, H. A. Baba, J. Abramowitz, L. Birnbaumer, J. M. Penninger, O. Pongs & M. Kuhn (2010) Novel insights into the mechanisms mediating the local antihypertrophic effects of cardiac atrial natriuretic peptide: role of cGMP-dependent protein kinase and RGS2. *Basic Res Cardiol*, 105, 583-95.
- Knickelbein, R., P. S. Aronson, W. Atherton & J. W. Dobbins (1983) Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange. *Am J Physiol*, 245, G504-10.
- Kuehn, M. R., A. Bradley, E. J. Robertson & M. J. Evans (1987) A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*, 326, 295-8.
- Lacroix, J., M. Poët, C. Maehrel & L. Counillon (2004) A mechanism for the activation of the Na/H exchanger NHE-1 by cytoplasmic acidification and mitogens. *EMBO Rep*, 5, 91-6.
- Laflamme, M. A. & C. E. Murry (2011) Heart regeneration. *Nature*, 473, 326-35.
- Lehnart, S. E., X. H. Wehrens, S. Reiken, S. Warriar, A. E. Belevych, R. D. Harvey, W. Richter, S. L. Jin, M. Conti & A. R. Marks (2005) Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell*, 123, 25-35.
- Luo, J., H. Chen, D. B. Kintner, G. E. Shull & D. Sun (2005) Decreased neuronal death in Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1-null mice after in vitro and in vivo ischemia. *J Neurosci*, 25, 11256-68.
- MacGregor, G. A., N. D. Markandu, J. E. Roulston, J. C. Jones & J. J. Morton (1981) Maintenance of blood pressure by the renin-angiotensin system in normal man. *Nature*, 291, 329-31.
- Marton, M. J., J. L. DeRisi, H. A. Bennett, V. R. Iyer, M. R. Meyer, C. J. Roberts, R. Stoughton, J. Burchard, D. Slade, H. Dai, D. E. Bassett, L. H. Hartwell, P. O. Brown & S. H. Friend (1998) Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat Med*, 4, 1293-301.
- Matsui, H., W. H. Barry, C. Livsey & K. W. Spitzer (1995) Angiotensin II stimulates sodium-hydrogen exchange in adult rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, 29, 215-21.
- Melvin, J. E., H. V. Nguyen, K. Nehrke, C. M. Schreiner, K. G. Ten Hagen & W. Scott (2001) Targeted disruption of the *Nhe1* gene fails to inhibit beta(1)-adrenergic receptor-induced parotid gland hypertrophy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280, G694-700.

- Morrow, E. M., S. Y. Yoo, S. W. Flavell, T. K. Kim, Y. Lin, R. S. Hill, N. M. Mukaddes, S. Balkhy, G. Gascon, A. Hashmi, S. Al-Saad, J. Ware, R. M. Joseph, R. Greenblatt, D. Gleason, J. A. Ertelt, K. A. Apse, A. Bodell, J. N. Partlow, B. Barry, H. Yao, K. Markianos, R. J. Ferland, M. E. Greenberg & C. A. Walsh (2008) Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science*, 321, 218-23.
- Morth, J. P., B. P. Pedersen, M. J. Buch-Pedersen, J. P. Andersen, B. Vilsen, M. G. Palmgren & P. Nissen (2011) A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 60-70.
- Nakamura, T. Y., Y. Iwata, Y. Arai, K. Komamura & S. Wakabayashi (2008) Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*, 103, 891-9.
- Nakanishi, H., N. Makino, T. Hata, H. Matsui, K. Yano & T. Yanaga (1989) Sarcolemmal Ca²⁺ transport activities in cardiac hypertrophy caused by pressure overload. *Am J Physiol*, 257, H349-56.
- Ohgaki, R., S. C. van IJzendoorn, M. Matsushita, D. Hoekstra & H. Kanazawa (2011) Organellar Na⁺/H⁺ exchangers: novel players in organelle pH regulation and their emerging functions. *Biochemistry*, 50, 443-50.
- Orlowski, J. (1999) Na⁺/H⁺ exchangers. Molecular diversity and relevance to heart. *Ann NY Acad Sci*, 874, 346-53.
- Orlowski, J. & S. Grinstein (2004) Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch*, 447, 549-65.
- Patrick, D. M., R. L. Montgomery, X. Qi, S. Obad, S. Kauppinen, J. A. Hill, E. van Rooij & E. N. Olson (2010) Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J Clin Invest*, 120, 3912-6.
- Patrucco, E., A. Notte, L. Barberis, G. Selvetella, A. Maffei, M. Brancaccio, S. Marengo, G. Russo, O. Azzolino, S. D. Rybalkin, L. Silengo, F. Altruda, R. Wetzker, M. P. Wymann, G. Lembo & E. Hirsch (2004) PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*, 118, 375-87.
- Pérez, N. G., B. V. Alvarez, M. C. Camilión de Hurtado & H. E. Cingolani (1995) pHi regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na(+)-H⁺ exchanger. *Circ Res*, 77, 1192-200.
- Pérez, N. G., M. C. de Hurtado & H. E. Cingolani (2001) Reverse mode of the Na⁺-Ca²⁺ exchange after myocardial stretch: underlying mechanism of the slow force response. *Circ Res*, 88, 376-82.
- Rose, E. A., A. C. Gelijns, A. J. Moskowitz, D. F. Heitjan, L. W. Stevenson, W. Dembitsky, J. W. Long, D. D. Ascheim, A. R. Tierney, R. G. Levitan, J. T. Watson, P. Meier, N. S. Ronan, P. A. Shapiro, R. M. Lazar, L. W. Miller, L. Gupta, O. H. Frazier, P. Desvigne-Nickens, M. C. Oz, V. L. Poirier & R. E. o. M. A. f. t. o. C. H. F. R. S. Group (2001) Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N Engl J Med*, 345, 1435-43.
- Russ, U., C. Balsler, W. Scholz, U. Albus, H. J. Lang, A. Weichert, B. A. Schölkens & H. Gögelein (1996) Effects of the Na⁺/H⁺-exchange inhibitor Hoe 642 on intracellular pH, calcium and sodium in isolated rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch*, 433, 26-34.
- Sano, M., T. Minamino, H. Toko, H. Miyauchi, M. Orimo, Y. Qin, H. Akazawa, K. Tateno, Y. Kayama, M. Harada, I. Shimizu, T. Asahara, H. Hamada, S. Tomita, J. D. Molkentin, Y. Zou & I. Komuro (2007) p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*, 446, 444-8.

- Sardet, C., L. Counillon, A. Franchi & J. Pouyssegur (1990) Growth factors induce phosphorylation of the Na⁺/H⁺ antiporter, glycoprotein of 110 kD. *Science*, 247, 723-6.
- Sardet, C., P. Fournoux & J. Pouyssegur (1991) Alpha-thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE-1, by phosphorylating a set of common sites. *J Biol Chem*, 266, 19166-71.
- Sardet, C., A. Franchi & J. Pouyssegur (1989) Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell*, 56, 271-80.
- Schott, R. J., S. Rohmann, E. R. Braun & W. Schaper (1990) Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res*, 66, 1133-42.
- Schultheis, P. J., L. L. Clarke, P. Meneton, M. Harline, G. P. Boivin, G. Stemmermann, J. J. Duffy, T. Doetschman, M. L. Miller & G. E. Shull (1998a) Targeted disruption of the murine Na⁺/H⁺ exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion. *J Clin Invest*, 101, 1243-53.
- Schultheis, P. J., L. L. Clarke, P. Meneton, M. L. Miller, M. Soleimani, L. R. Gawenis, T. M. Riddle, J. J. Duffy, T. Doetschman, T. Wang, G. Giebisch, P. S. Aronson, J. N. Lorenz & G. E. Shull (1998b) Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet*, 19, 282-5.
- Seller, R. H., S. Banach, T. Namey, M. Neff & C. Swartz (1975) Cardiac effect of diuretic drugs. *Am Heart J*, 89, 493-500.
- Skolnick, R. L., S. E. Litwin, W. H. Barry & K. W. Spitzer (1998) Effect of ANG II on pHi, [Ca²⁺]_i, and contraction in rabbit ventricular myocytes from infarcted hearts. *Am J Physiol*, 275, H1788-97.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson & D. C. Klenk (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- Smithies, O., R. G. Gregg, S. S. Boggs, M. A. Koralewski & R. S. Kucherlapati (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 317, 230-4.
- Sohal, D., M. Nghiem, M. Crackower, S. Witt, T. Kimball, K. Tymitz, J. Penninger & J. Molkentin (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.
- Takeda, N., I. Manabe, Y. Uchino, K. Eguchi, S. Matsumoto, S. Nishimura, T. Shindo, M. Sano, K. Otsu, P. Snider, S. J. Conway & R. Nagai (2010) Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest*, 120, 254-65.
- Takewaki, S., M. Kuro-o, Y. Hiroi, T. Yamazaki, T. Noguchi, A. Miyagishi, K. Nakahara, M. Aikawa, I. Manabe & Y. Yazaki (1995) Activation of Na⁽⁺⁾-H⁺ antiporter (NHE-1) gene expression during growth, hypertrophy and proliferation of the rabbit cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol*, 27, 729-42.
- Tang, W. H. & G. S. Francis (2010) The year in heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 55, 688-96.
- Thomas, K. R. & M. R. Capecchi (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51, 503-12.
- Thum, T., C. Gross, J. Fiedler, T. Fischer, S. Kissler, M. Bussen, P. Galuppo, S. Just, W. Rottbauer, S. Frantz, M. Castoldi, J. Soutschek, V. Koteliansky, A. Rosenwald, M. A. Basson, J. D. Licht, J. T. Pena, S. H. Rouhanifard, M. U. Muckenthaler, T. Tuschl, G. R. Martin, J. Bauersachs & S. Engelhardt (2008) MicroRNA-21

- contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 456, 980-4.
- Th  roux, P., B. Chaitman, N. Danchin, L. Erhardt, T. Meinertz, J. Schroeder, G. Tognoni, H. White, J. Willerson & A. Jessel (2000) Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators. *Circulation*, 102, 3032-8.
- Tominaga, T., T. Ishizaki, S. Narumiya & D. L. Barber (1998) p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *EMBO J*, 17, 4712-22.
- Trivedi, B. & W. H. Danforth (1966) Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. *J Biol Chem*, 241, 4110-2.
- Tse, C. M., A. I. Ma, V. W. Yang, A. J. Watson, S. Levine, M. H. Montrose, J. Potter, C. Sardet, J. Pouyssegur & M. Donowitz (1991) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the rabbit ileal villus cell basolateral membrane Na⁺/H⁺ exchanger. *EMBO J*, 10, 1957-67.
- Wakabayashi, S., M. Shigekawa & J. Pouyssegur (1997) Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev*, 77, 51-74.
- Wang, Y., J. W. Meyer, M. Ashraf & G. E. Shull (2003) Mice with a null mutation in the NHE1 Na⁺-H⁺ exchanger are resistant to cardiac ischemia-reperfusion injury. *Circ Res*, 93, 776-82.
- Wang, Z., T. Wang, S. Petrovic, B. Tuo, B. Riederer, S. Barone, J. N. Lorenz, U. Seidler, P. S. Aronson & M. Soleimani (2005) Renal and intestinal transport defects in Slc26a6-null mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288, C957-65.
- Yamazaki, T., I. Komuro, S. Kudoh, Y. Zou, I. Shiojima, T. Mizuno, H. Takano, Y. Hiroi, K. Ueki & K. Tobe (1995) Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*, 96, 438-46.
- Zhao, M., B. Song, J. Pu, T. Wada, B. Reid, G. Tai, F. Wang, A. Guo, P. Walczysko, Y. Gu, T. Sasaki, A. Suzuki, J. V. Forrester, H. R. Bourne, P. N. Devreotes, C. D. McCaig & J. M. Penninger (2006) Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature*, 442, 457-60.

9. Anhang

Oligonucleotide

Nhe1 lambda screening Sonde

Nhe1_coKO2F AGGTTGCTTTGAGATTTCTTCCTA

Nhe1_coKO2R ATCCACTGTGACATCTGTCAACCC

5'-Nhe1 ES-Zellen screening Sonde

5pNheCoKO1F TGGCAGCTAGGAGCCCTAGACTG

5pNheCoKO1R CCAGGACAGCCATGGTTACACAG

3'-Nhe1 ES-Zellen screening Sonde

3pNheCoKO1F GGCACGCACCGAGCTACTTTAGA

3pNheCoKO1R TGTGGGTGGCCAGCACACTCTCA

Genotypisierungsprimer Nhe1-flox

Nhe1_for TTAGGAGCTGGGAAGGAGAGT

Nhe1_revIMP CTTCTTGTGCTGAAAAGCTGCC

(Wildtyp Allel 494 bp, floxed Allel 537 bp)

Sonden

Humanes GAPDH: 700 bp Sondenvorlage (Nucleotide ~300-1000 von NM_00204.3)

Murines *Nhe1*: 4000 bp Sondenvorlage (codierende Sequenz von NM_016981.2)

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jean Christopher Hennings
Anschrift: Sankt-Jakob Str. 5
07743 Jena
e-Mail: christopher.hennings@med.uni-jena.de
Geburtsdatum: 03.07.1978 in Hamburg

Schulische Ausbildung

1989 –1998
Grundschule Bekassinenau und Erich-Kästner
Gesamtschule
Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife (2,1)

Grundwehrdienst

09/1998 – 10/1998
Grundwehrdienst
3. ABC Abwehrbattalion, beurlaubt

Zivildienst

10/1998 – 09/1999
Zivildienst, Klinikum Nord
Tätigkeiten in OP-Schleuse, Klinikfahrdienst und
klinischer Chemie

Hochschulausbildung

09/1999 – 08/2004
Universität Hamburg
Studium der Biochemie/Molekularbiologie
Abschluß als Diplom-Biochemiker (sehr gut)

10/2003 – 12/2004
University of California, Irvine
Anfertigung der Diplomarbeit und Jr. Specialist bei
Prof. Dr. Maïke Sander

04/2005 – 07/2005
Genzentrum, Ludwig-Maximilians Universität
München
Doktorand bei Dr. Katja Sträßer

11/2005 – 02/2009	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Humangenetik Doktorand bei Prof. Dr. Christian Hübner
02/2009 – 06/2011	Universitätsklinikum Jena, Institut für klinische Chemie und später Institut für Humangenetik Doktorand bei Prof. Dr. Christian Hübner

Preise/Stipendien

10/2003 – 01/2004	Stipendium Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) Forschungsaufenthalt an der Universität Kalifornien, Irvine, USA
08/2005	Reisekostenstipendium Western Region Islet Study Group (WRISG) Vortrag auf WRISG Konferenz auf Catalina Island, USA
12/2007	Zertifikat Zentrum für molekulare Neurobiologie Aufbaustudiengang Molekularbiologie
06/2008	Vortragspreis 2. Platz Tag der Nachwuchswissenschaftler des Forschungszentrums Lobeda

Publikationen

Elsing, C., I. Gosch, **J. Hennings**, C. Hübner & T. Herrmann (2007) Mechanisms of hypotonic inhibition of the sodium, proton exchanger type 1 (NHE1) in a biliary epithelial cell line (Mz-Cha-1). *Acta Physiol (Oxf)*, 190, 199-208.

Henseleit, K., S. Nelson, K. Kuhlbrodt, **J. Hennings**, J. Ericson & M. Sander (2005) NKX6 transcription factor activity is required for alpha- and beta-cell development in the pancreas. *Development*, 132, 3139-49.

Kurth, I., T. Pamminger, **J. Hennings**, D. Soehendra, A. Huebner, A. Rotthier, J. Baets, J. Senderek, H. Topaloglu, S. Farrell, G. Nürnberg, P. Nürnberg, P. De Jonghe, A. Gal, C. Kaether, V. Timmerman & C. Hübner (2009) Mutations in FAM134B,

encoding a newly identified Golgi protein, cause severe sensory and autonomic neuropathy. *Nat Genet*, 41, 1179-81.

- Rudolph, V., T. Rudolph, **J. Hennings**, S. Blankenberg, R. Schnabel, D. Steven, M. Haddad, K. Knittel, S. Wende, J. Wenzel, T. Münzel, T. Heitzer, T. Meinertz, C. Hübner & S. Baldus (2007) Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radic Biol Med*, 43, 1189-96.
- Schultz, J., T. Volk, P. Bassaláy, **J. Hennings**, C. Hübner & H. Ehmke (2007) Molecular and functional characterization of Kv4.2 and KChIP2 expressed in the porcine left ventricle. *Pflugers Arch*, 454, 195-207.
- Svichar, N., A. Waheed, W. Sly, **J. Hennings**, C. Hübner & M. Chesler (2009) Carbonic anhydrases CA4 and CA14 both enhance AE3-mediated Cl⁻-HCO₃⁻ exchange in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 29, 3252-8.

Jena, 29.02.2012

J. Christopher Hennings

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Christian Hübner gilt mein besonderer Dank für die Überlassung und ständige Weiterentwicklung eines interessanten Themas, seine engagierte Betreuung während der gesamten Dissertation, seine ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft in allen Fragen sowie sein Interesse am Gelingen dieser Arbeit.

Für die Bereitschaft als Gutachter aufzutreten, danke ich Herrn Prof. Dr. Aria Baniahmad, Prof. Dr. Thomas Zimmer, Frau Prof. Dr. Michaela Kuhn und Herrn Prof. Dr. Ali El-Armouche. Für Ihre unbezahlbare Unterstützung bei der Erzeugung des konditionalen *Nhe1* Mausmodells danke ich Antje Hübner und Katrin Schorr. Für Ihre umsichtige Betreuung meiner Mäuse danke ich Maria Zimmermann, Petra Schroth, Sabine Dolke und Volker Dix in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Jena.

Für die freundliche Aufnahme und unkomplizierte Durchführung der Hypertrophieexperimente in Würzburg möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Michaela Kuhn, Herrn Prof. Dr. Kai Schuh, Katharina Völker und Marco Abesser bedanken. Für die Bereitstellung von Kardiomyozyten danke ich Herrn Prof. Dr. Benndorf und Sandra Bernhardt. Den Mitgliedern der Forschergruppe FOR604 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bin ich für Ihre hilfreichen Anmerkungen im frühen Verlauf dieser Dissertation dankbar.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern für Ihre große Unterstützung im Verlauf der gesamten Promotion – Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

Zu guter Letzt danke ich allen Freunden und Laborkollegen die sich während der gesamten Dissertation meiner Laborsorgen angenommen haben. Insbesondere Ingo Kurth, Torsten Pamminger, Lutz Liebmann und besonders Anne Sinning möchte ich an dieser Stelle hervorheben.

Leider konnte unsere Nationalmannschaft keine Titel im Verlauf dieser Dissertation erringen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Christian Hüber, PD Dr. Ingo Kurth, Dr. Lutz Liebmann und Anne Sinning,
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 29.02.2012

J. Christopher Hennings