# Der kardiozytäre EP4-Prostaglandin-Rezeptor: Signaltransduktion und Zytoprotektion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der



vorgelegt von

Marcel Treml

aus Solingen

Düsseldorf, Januar 2009

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: PD Dr. Jutta Meyer-Kirchrath Koreferent: Prof. Dr. Ulrich Rüther

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2009

The word "cause" is an altar to an unknown god.

—— William James

## Inhaltsverzeichnis

| Abkürzungsverzeichnisv                             |   |  |  |
|--|---|--|--|
| 1 Ei   | nleitung1   |  |  |
| 1.1  | Kardiovaskuläre Erkrankungen1   |  |  |
| 1.2  | Prostaglandine2   |  |  |
| 1.2.1<br>1.2.2                                     | Prostaglandine im nicht ischämischen Herzen3<br>Prostaglandine im ischämischen Herzen4  |  |  |
| 1.3  | Prostaglandin-Rezeptoren5   |  |  |
| 1.3.1  | EP-Rezeptoren5  |  |  |
| 1.4  | Der EP <sub>4</sub> -Rezeptor8  |  |  |
| 1.4.1<br>1.4.2<br>1.4.3                            | Struktur des EP <sub>4</sub> -Rezeptors   |  |  |
| 1.4.4  | weitere zeitphysiologische wirkungen des $EP_4$ -Rezeptors  |  |  |
| 1.5  | Mechanische Zerstörung von Kardiomvozyten bei eintretender Reperfusion  |  |  |
| 1.5.2  | Die Rolle der Mitochondrien bei der Entstehung von Ischämie/Reperfusion-Schäden   |  |  |
| 1.5.3  | Klinisch relevante Ansätze zur Reduzierung von Reperfusionsschäden und beteiligte<br>Signalwege20   |  |  |
| 1.6  | Zielsetzung22   |  |  |
| 2 M  | aterial und Methoden23  |  |  |
| 2.1  | Chemikalien, Substanzen, Antikörper, Enzyme und Kits23  |  |  |
| 2.2  | Puffer und Lösungen25   |  |  |
| 2.3  | Oligonukleotide und (RT-)PCR-Parameter29  |  |  |
| 2.4  | Zellkultur  |  |  |
| 2.5  | Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie30  |  |  |
| 2.6  | Präparation und Analyse von DNA31   |  |  |
| 2.6.1<br>2.6.2<br>2.6.3<br>2.6.4<br>2.6.5<br>2.6.5 | Transformation chemokompetenter E. coli31Kultivierung von E. coli31Plasmid-DNA-Präparation31Restriktionsverdau von Plasmid-DNA33Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen und DNA-Gelextraktion33Ligation von DNA-Fragmenten33 |  |  |
| 2.6.7<br>2.6.8                                     | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   |  |  |
| 2.7  | Präparation und Analyse von RNA35   |  |  |
| 2.7.1<br>2.7.2<br>2.7.3                            | RNA-Extraktion aus Gewebe und Zellen  |  |  |
| 2.8  | Klonierung von Plasmiden zur kardiospezifischen Überexpression des humanen<br>EP₄-Rezeptors in Mäusen   |  |  |

| 2.8.1<br>2.8.2   | EP <sub>4</sub> -Rezeptor ohne YFP-Markierung: pNC1 hEP <sub>4</sub><br>Konditionelle Überexpression des EP <sub>4</sub> -Rezeptors: pNC1 hEP <sub>4</sub> -YFP neoflox  | .39<br>.40   |
|--|--|--|
| 2.9  | Erzeugung und Analyse transgener Mäuse   | 44   |
| 2.9.1  | Präparation genomischer DNA aus Maus-Schwanzspitzen  | .45  |
| 2.10   | Lentivirale Expression des humanen EP4-Rezeptors in Kardiomyoblasten   | 46   |
| 2.10.1   | Erzeugung lentiviraler Vektoren und Infektion von H9c2-Zellen  | .50  |
| 2.10.2   | Konstruktion eines EP4 enthaltenden-Plasmids für die lentivirale Transfektion  | .51  |
| 2.11   | Analyse von Proteinen  | 53   |
| 2.11.1<br>2.11.2   | Proteinkonzentrationsbestimmung.<br>Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und<br>Proteintransfer (Western-Blot).   | .53<br>.53   |
| 2.11.3   | Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine  | .53  |
| 2.11.4   | Nachweis von aktiviertem Rap1 in H9c2 hEP4-YFP-Zellen  | .54  |
| 2.11.5   | Nachweis von EGFR-Aktivierung und Identifikation von Interaktionspartnern in H90<br>hEP4-YFP-Zellen  | :2-<br>.55   |
| 2.11.6   | Präparation von Kernextrakten aus H9c2-Zellen und Nachweis der NFκB-<br>Translokation  | .55  |
| 2.11.7   | Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellüberstand   | .56  |
| 2.12   | Bestimmung des intrazellulären cAMP-Gehalts  | 56   |
| 2.13   | Zellviabilitäts-Assay mit SYTOX® Green   | 57   |
| 2.14   | EP₄-Rezeptor-Stimulation am isoliert perfundierten Mäuseherzen   | 57   |
| 2.15   | Statistik  | 58   |
|  |  |  |
| 3 Er   | rgebnisse  | 59   |
| 3 Er<br>3.1  | rgebnisse<br>Einfluss des EP₄-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert<br>perfundierter Mäuseherzen   | 59<br>59   |
| 3 Er<br>3.1<br>3.2   | rgebnisse<br>Einfluss des EP₄-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert<br>perfundierter Mäuseherzen<br>Einfluss des EP₄-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Funktion isoliert<br>perfundierter Mäuseherzen bei Ischämie/Reperfusion  | 59<br>59<br>60   |
| <ol> <li>3 Er</li> <li>3.1</li> <li>3.2</li> <li>3.3</li> </ol>  | gebnisse.<br>Einfluss des EP₄-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert<br>perfundierter Mäuseherzen.<br>Einfluss des EP₄-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Funktion isoliert<br>perfundierter Mäuseherzen bei Ischämie/Reperfusion.<br>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors im Mausmodell.   | 59<br>59<br>60<br>62   |
| <ul> <li>3 Er</li> <li>3.1</li> <li>3.2</li> <li>3.3</li> <li>3.3.1</li> <li>3.3.2</li> </ul>  | <ul> <li>gebnisse.</li> <li>Einfluss des EP₄-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert perfundierter Mäuseherzen.</li> <li>Einfluss des EP₄-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Funktion isoliert perfundierter Mäuseherzen bei Ischämie/Reperfusion.</li> <li>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors im Mausmodell.</li> <li>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors mit YFP-Markierung Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors ohne YFP-Markierung</li> </ul>   | <b>59</b><br><b>59</b><br><b>60</b><br><b>62</b><br>62<br>19.  |
| <ul> <li>3 Er</li> <li>3.1</li> <li>3.2</li> <li>3.3</li> <li>3.3.1</li> <li>3.3.2</li> <li>3.3.3</li> </ul>   | <ul> <li>gebnisse.</li> <li>Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert perfundierter Mäuseherzen.</li> <li>Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Funktion isoliert perfundierter Mäuseherzen bei Ischämie/Reperfusion.</li> <li>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors im Mausmodell</li> <li>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung Konditionelle kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung</li> </ul>   | <b>59</b><br><b>59</b><br><b>60</b><br><b>62</b><br>62<br>.63<br>-P-<br>.64  |
| <ul> <li>3 Er</li> <li>3.1</li> <li>3.2</li> <li>3.3</li> <li>3.3.1</li> <li>3.3.2</li> <li>3.3.3</li> <li>3.4</li> </ul>  | <ul> <li>gebnisse.</li> <li>Einfluss des EP₄-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert perfundierter Mäuseherzen.</li> <li>Einfluss des EP₄-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Funktion isoliert perfundierter Mäuseherzen bei Ischämie/Reperfusion.</li> <li>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors im Mausmodell<br/>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors mit YFP-Markierung Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors ohne YFP-Markierung Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors ohne YFP-Markierung.</li> <li>Analyse EP₄-Rezeptor-vermittelter Signalwege in H9c2 Kardiomyoblasten.</li> </ul>   | <b>59</b><br><b>59</b><br><b>60</b><br><b>62</b><br><b>62</b><br><b>19</b><br><b>.</b><br><b>63</b><br><b>-</b><br><b>P</b> -<br><b>.</b><br><b>.</b><br><b>64</b><br><b>65</b>  |
| <ul> <li>3 Er</li> <li>3.1</li> <li>3.2</li> <li>3.3</li> <li>3.3.3</li> <li>3.4</li> <li>3.4.1</li> </ul>   | <ul> <li>rgebnisse</li> <li>Einfluss des EP₄-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert perfundierter Mäuseherzen</li> <li>Einfluss des EP₄-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Funktion isoliert perfundierter Mäuseherzen bei Ischämie/Reperfusion</li> <li>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors im Mausmodell.</li> <li>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors mit YFP-Markierung Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors ohne YFP-Markierun</li> <li>Konditionelle kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors ohne YFP-Markierun</li> <li>Konditionelle kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors ohne YFP-Markierun</li> <li>Lentivirale Transfektion von H9c2-Zellen.</li> </ul>   | <b>59</b><br><b>59</b><br><b>60</b><br><b>62</b><br>62<br>.63<br>.63<br>.64<br><b>65</b><br>.65  |
| <ul> <li>3 Er</li> <li>3.1</li> <li>3.2</li> <li>3.3</li> <li>3.3.3</li> <li>3.4</li> <li>3.4.1</li> <li>3.4.2</li> </ul>  | <ul> <li>rgebnisse.</li> <li>Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert perfundierter Mäuseherzen.</li> <li>Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Funktion isoliert perfundierter Mäuseherzen bei Ischämie/Reperfusion.</li> <li>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors im Mausmodell<br/>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung</li> <li>Konditionelle kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung.</li> <li>Analyse EP<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelter Signalwege in H9c2 Kardiomyoblasten.</li> <li>Lentivirale Transfektion von H9c2-Zellen.</li> <li>Funktionelle Kopplung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors an G<sub>5</sub>.</li> </ul>   | <b>59</b><br><b>60</b><br><b>62</b><br>62<br>.63<br><b>67</b><br><b>65</b><br>.65  |
| <ul> <li>3 Er</li> <li>3.1</li> <li>3.2</li> <li>3.3</li> <li>3.3.1</li> <li>3.3.2</li> <li>3.3.3</li> <li>3.4</li> <li>3.4.1</li> <li>3.4.2</li> <li>3.4.3</li> <li>3.4.3</li> <li>3.4.4</li> </ul>                             | <ul> <li>Fgebnisse</li> <li>Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert perfundierter Mäuseherzen</li> <li>Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Funktion isoliert perfundierter Mäuseherzen bei Ischämie/Reperfusion</li> <li>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors im Mausmodell.</li> <li>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung</li> <li>Konditionelle kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung</li> <li>Kandispezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung</li> <li>Kanditionelle kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung</li> <li>Konditionelle kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung</li> <li>Konditionelle kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung</li> <li>Konditionelle kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung</li> <li>Konditionelle kardiospezifische Zipalwege in H9c2 Kardiomyoblasten</li> <li>Lentivirale Transfektion von H9c2-Zellen</li> <li>Funktionelle Kopplung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors an G<sub>5</sub></li> <li>Einfluss von EP<sub>4</sub> auf Proteinkinase A (PKA)</li> <li>Einfluss von EP<sub>4</sub> auf Proteinkinase A (PKA)</li> </ul> | <b>59</b><br><b>60</b><br><b>62</b><br>62<br>63<br>  |
| <ul> <li>3 Er</li> <li>3.1</li> <li>3.2</li> <li>3.3</li> <li>3.3</li> <li>3.4</li> <li>3.4.1</li> <li>3.4.2</li> <li>3.4.3</li> <li>3.4.4</li> <li>3.4.5</li> </ul>   | <b>rgebnisse</b> . <b>Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert</b> perfundierter Mäuseherzen. <b>Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Funktion isoliert</b> perfundierter Mäuseherzen bei Ischämie/Reperfusion. <b>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors im Mausmodell.</b> Kardiospezifische Überexpression des humanen EP <sub>4</sub> -Rezeptors mit YFP-Markierung Kardiospezifische Überexpression des humanen EP <sub>4</sub> -Rezeptors ohne YFP-Markierung. <b>Konditionelle kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung. <b>Analyse EP<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelter Signalwege in H9c2 Kardiomyoblasten.</b> Lentivirale Transfektion von H9c2-Zellen. Funktionelle Kopplung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors an G<sub>5</sub>. Einfluss von EP<sub>4</sub> auf Proteinkinase A (PKA). Einfluss von EP<sub>4</sub> auf Exchange protein directly activated by cAMP (Epac).</b>  | <b>59</b><br><b>60</b><br><b>62</b><br>62<br>.63<br><b>65</b><br>.64<br><b>65</b><br>.67<br>.67<br>.68<br>.70  |
| <ul> <li>3 Er</li> <li>3.1</li> <li>3.2</li> <li>3.3</li> <li>3.3</li> <li>3.4</li> <li>3.4.1</li> <li>3.4.2</li> <li>3.4.3</li> <li>3.4.4</li> <li>3.4.5</li> <li>3.4.6</li> </ul>  | <ul> <li>rgebnisse.</li> <li>Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert perfundierter Mäuseherzen.</li> <li>Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Funktion isoliert perfundierter Mäuseherzen bei Ischämie/Reperfusion.</li> <li>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors im Mausmodell<br/>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung.</li> <li>Analyse EP<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelter Signalwege in H9c2 Kardiomyoblasten.</li> <li>Lentivirale Transfektion von H9c2-Zellen.</li> <li>Funktionelle Kopplung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors an G<sub>5</sub>.</li> <li>Einfluss von EP<sub>4</sub> auf Proteinkinase A (PKA).</li> <li>Einfluss von EP<sub>4</sub> auf MAP-Kinase ERK1/2.</li> <li>Einfluss von EP<sub>4</sub> auf Proteinkinase B (AKT) und Glykogen-Synthase-Kinase3B (GSK3)</li> </ul>   | <b>59</b><br><b>60</b><br><b>62</b><br><b>62</b><br><b>63</b><br><b>65</b><br><b>65</b><br><b>67</b><br><b>65</b><br><b>67</b><br><b>67</b><br><b>67</b><br><b>68</b><br><b>70</b><br><b>B</b>   |
| <ul> <li>3 Er</li> <li>3.1</li> <li>3.2</li> <li>3.3</li> <li>3.4</li> <li>3.4.1</li> <li>3.4.2</li> <li>3.4.3</li> <li>3.4.4</li> <li>3.4.5</li> <li>3.4.6</li> <li>3.4.7</li> </ul>  | <b>rgebnisse</b>   | <b>59</b><br><b>60</b><br><b>62</b><br><b>62</b><br><b>63</b><br><b>65</b><br><b>65</b><br><b>65</b><br><b>67</b><br><b>65</b><br><b>67</b><br><b>67</b><br><b>67</b><br><b>67</b><br><b>67</b><br><b>67</b><br><b>67</b><br><b>67</b>   |
| <ul> <li>3 Er</li> <li>3.1</li> <li>3.2</li> <li>3.3</li> <li>3.3</li> <li>3.4</li> <li>3.4.1</li> <li>3.4.2</li> <li>3.4.3</li> <li>3.4.4</li> <li>3.4.5</li> <li>3.4.6</li> <li>3.4.7</li> <li>3.4.8</li> </ul>                | <ul> <li>rgebnisse.</li> <li>Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert perfundierter Mäuseherzen.</li> <li>Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Funktion isoliert perfundierter Mäuseherzen bei Ischämie/Reperfusion.</li> <li>Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors im Mausmodell Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung Konditionelle kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung.</li> <li>Analyse EP<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelter Signalwege in H9c2 Kardiomyoblasten.</li> <li>Lentivirale Transfektion von H9c2-Zellen.</li> <li>Funktionelle Kopplung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors an G<sub>5</sub>.</li> <li>Einfluss von EP<sub>4</sub> auf Proteinkinase A (PKA).</li> <li>Einfluss von EP<sub>4</sub> auf Proteinkinase B (AKT) und Glykogen-Synthase-Kinase3B (GSK3)</li> <li>Einfluss von EP<sub>4</sub> auf die Translokation von NFKB.</li> <li>Einfluss von EP<sub>4</sub> auf die Translokation von NFKB.</li> </ul>   | <b>59</b><br><b>60</b><br><b>62</b><br><b>62</b><br><b>62</b><br><b>63</b><br><b>65</b><br><b>65</b><br><b>65</b><br><b>67</b><br><b>68</b><br><b>67</b><br><b>68</b><br><b>.67</b><br><b>.67</b><br><b>.68</b><br><b>.71</b><br><b>.71</b>  |
| <ul> <li>3 Er</li> <li>3.1</li> <li>3.2</li> <li>3.3</li> <li>3.3</li> <li>3.4</li> <li>3.4.1</li> <li>3.4.2</li> <li>3.4.3</li> <li>3.4.4</li> <li>3.4.5</li> <li>3.4.6</li> <li>3.4.7</li> <li>3.4.8</li> <li>3.4.9</li> </ul> | <b>rgebnisse</b>   | <b>59</b><br><b>60</b><br><b>62</b><br><b>62</b><br><b>63</b><br><b>63</b><br><b>65</b><br><b>65</b><br><b>67</b><br><b>65</b><br><b>67</b><br><b>65</b><br><b>67</b><br><b>65</b><br><b>67</b><br><b>67</b><br><b>67</b><br><b>67</b><br><b>68</b><br><b>70</b><br><b>8</b> ]<br><b>71</b><br><b>71</b><br><b>72</b><br><b>73</b> |

| 3.5.1          | Einfluss der EP4-Rezeptor-Stimulation auf die Viabilität von H9c2-Zellen unter  |
|----------------|---|
| 352            | Normoxie  |
| J.J.2          |   |
| 3.5.3          | Beteiligung möglicher Signalwege an EP <sub>4</sub> -vermittelter Überlebensfähigkeit: PKA77                            |
| 3.5.4          | Beteiligung möglicher Signalwege an EP <sub>4</sub> -vermittelter Überlebensfähigkeit:                                  |
|                | Epac/Rap1   |
| 3.5.5          | 5 Beteiligung möglicher Signalwege an EP <sub>4</sub> -vermittelter Überlebensfähigkeit: PI3-                           |
| 3 5 A          | Nillase   |
| 5.5.0          |   |
| 3.5.7          | 7 Beteiligung möglicher Signalwege an EP4-vermittelter Überlebensfähigkeit: MMPs  |
|                | und EGFR  |
| 3.5.8          | Beteiligung der Rezeptorinternalisierung an EP <sub>4</sub> -vermittelter Uberlebensfähigkeit:                          |
|                | Inhibierung mittels hypertonischer Saccharose bzw. Concanavalin A   |
| 3.6            | Genexpressions analyse in H9c2 hEP <sub>4</sub> -YFP nach EP <sub>4</sub> -Rezeptor-Stimulation85                       |
| 3.6.1          | Analyse der Amphiregulin-Expression in H9c2-Zellen  |
| 4              | Diskussion90  |
|                | Findling den FD. Desentes Stimulation am indiante aufun dienten Mäuschensen - 00  |
| 4.1            | Einfluss der EP4-Rezeptor-Stimulation am isoliert perfundierten Mausenerzen90   |
| 4.2            | Kardiospezifische Uberexpression des humanen EP <sub>4</sub> -Rezeptors im Mausmodell93                                 |
| 4.3            | EP₄-Rezeptor-vermittelte Signalwege in H9c2-Kardiomyoblasten94  |
| 4.3.1          | Zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP)94   |
| 4.3.2          | Proteinkinase A (PKA)   |
| 4.3.3          | Exchange Protein directly activated by cAMP (Epac)  |
| 4.3.4<br>4 3 F | EXIT a zellular regulier le Killase 1/2 (EKK1/2)90<br>Deroteinkingse B (AKT) und Glykogen-Synthase-Kingse 3B (GSK3B) 99 |
| 4.3.6          | 6 Caspasen  |
| 4.3.7          | 7 Nukleärer Faktor Kappa B (ΝFκB)102  |
| 4.3.8          | B Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und Amphiregulin (AR)102  |
| 4.3.9          | P EP₄-regulierte Gene: Amphiregulin und weitere Gene104   |
| 4.4            | Zytoprotektive EP4-vermittelte Signalwege in H9c2-Zellen106   |
| 4.4.1          | Proteinkinase A (PKA)107  |
| 4.4.2          | Exchange Protein directly activated by cAMP (Epac)  |
| 4.4.3          | Extrazellular regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2)108   |
| 4.4.4          | F Epidermater wachstumstaktor-kezeptor (EGFK) und Amphilegutin (AK)   |
| 4.4.6          | 6 Rezeptorinternalisierung  |
| 4.4.7          | Zusammenfassung und weitere in Frage kommende Signalwege  |
| 5              | Ausblick  |
| -              |   |
| 6              | Zusammenfassung118  |
|                |   |
| 7              | Summary119  |
| -              |   |
| 8              | Literaturverzeichnis120   |
| 0              | Veräffentlichungen (227   |
| 9              | verorrentlicnungen  |

| 9.1 | Kongressbeiträge           | 137 |
|-----|----------------------------|-----|
| 10  | Danksagung1                | 38  |
| 11  | Eidesstattliche Erklärung1 | 39  |
| 12  | Lebenslauf1                | 40  |

# Abkürzungsverzeichnis

| $\pm dP/dt_{max}$ | Maximale Kontraktions- bzw. Relaxationsgeschwindigkeit  |
|-------------------|---|
| AHVEC             | Adult Human Vascular Endothelial Cells                  |
| AIF               | Apoptose induzierender Faktor                           |
| AKT od. PKB       | Proteinkinase B   |
| AP1 / AP2         | Activator Protein 1 / 2                                 |
| AR                | Amphiregulin  |
| ATE               | Ameisensäure/Trichloressigsäure/Essigsäure              |
| ATF1              | Aktivierender Transkriptionsfaktor 1                    |
| ATP               | Adenosintriphosphat                                     |
| bGH pA            | Polyadenylierungssignal d. bovinen Wachstumshormon-Gens |
| bla               | β-Lactamase   |
| bp                | Basenpaar(e)  |
| BSA               | Bovines Serumalbumin                                    |
| c-Src             | Cellular Sarcoma  |
| cAMP              | Zyklisches Adenosinmonophosphat                         |
| CMV               | Cytomegalovirus   |
| ColE1 ori         | Replikationsursprung d. ColE1-Plasmids                  |
| ConA              | Concanavalin A  |
| сох               | Zyklooxygenase  |
| cPPT              | Central Polypurine Tract                                |
| CRE               | cAMP Response Element                                   |
| CREB              | cAMP Response Element Binding Protein                   |
| DA                | Ductus Arteriosus                                       |
| DMEM              | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                      |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid  |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                                  |

| DTT              | 1,4-Dithiothreitol                          |
|------------------|---|
| EDTA             | Ethylendiamintetraacetat                    |
| EDV              | Enddiastolisches Volumen                    |
| EGF              | Epidermal Growth Factor                     |
| EGFP             | Enhanced Green Fluorescent Protein          |
| EGFR             | EGF-Rezeptor                                |
| EGR-1            | Early Growth Response-1                     |
| EGTA             | Ethylenglycoltetraacetat                    |
| EndoG            | Endonuklease G                              |
| eNOS             | Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase     |
| env              | Envelope                                    |
| Epac             | Exchange Protein Directly Activated By cAMP |
| ERK              | Extracellular Regulated Kinase              |
| f1 ori           | Replikationsursprung d. Bakteriophagen f1   |
| FKS              | Fetales Kälberserum                         |
| gag              | Group Antigens                              |
| GAPDH            | Glycerolaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase    |
| Gbr2             | Growth Factor Receptor-Bound Protein 2      |
| gfp              | Green Fluorescent Protein                   |
| gp130            | Glykoprotein 130                            |
| GSK-3B           | Glykogen-Synthase-Kinase 3B                 |
| H <sub>2</sub> O | Wasser                                      |
| HAPF-1           | Hepatocyte Acute Phase Factor 1             |
| HBSS             | Hanks gepufferte Salzlösung                 |
| HCl              | Salzsäure                                   |
| HEK              | Human Embryonal Kidney                      |
| hEP <sub>4</sub> | Humaner EP4-Rezeptor                        |
| HEPES            | Hydroxethylpiperazinethansulfonsäure        |

- Hgh-Poly(A) Polyadenylierungssignal d. menschl. Wachstumshormon-Gens
- HPRT Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
- HSP70 Hitzeshock-Protein 70
- IBMX Isobutylmethylxanthin
- IFN-γ Interferon Gamma
- IGFR Insulin-like Growth Factor Receptor
- IL-6 Interleukin-6
- IMDM Iscove's Modified Dulbecco's Medium
- JAK Janus-Kinase
- kDa Kilodalton
- LDH Laktatdehydrogenase
- LiCl Lithiumchlorid
- LTR Long Terminal Repeat
- LVEDP Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
- MAPK Mitogen Activated Protein Kinase
- MCP-1 Monocyte Chemoattractant Protein-1
- mmHg Millimeter Quecksilbersäule
- MMP Matrix-Metalloproteinase
- MP Metalloproteinase
- MnSOD Mangan-Superoxid-Dismutase
- mPGES Mikrosomale Prostaglandin E-Synthase
- MPTP Mitochondriale Permeabilität-Transition-Pore
- MT-1/2 Metallothioenin-1/2
- NF-IL6 Nukleärer Faktor Interleukin 6
- NFκB Nukleärer Faktor Kappa-B
- NO Stickstoffmonoxid
- p70s6K 70 kDa ribosomale Protein S6 Kinase
- PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- PBS Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
- PCR Polymerase-Kettenreaktion
- PEI Polyethylenimin
- PGE<sub>x</sub> Prostaglandin E x
- $PGF_{2\alpha} \qquad \qquad Prostaglandin \ F \ 2\alpha$
- PGHS Prostaglandin H-Synthase
- PGI<sub>2</sub> Prostazyklin
- PI3K Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
- PKA Proteinkinase A
- PMID PubMed-Identifikationsnummer
- PMSF Phenylmethylsulphonylfluorid
- pol Polymerase (Reverse Transkriptase, Integrase und RNaseH-Funktion)
- PTX Pertussis-Toxin
- PVDF Polyvinylidendifluorid
- Raf Rapidly Growing Fibrosarcoma od. Rat Fibrosarcoma
- Ras Rat Sarcoma
- RNA Ribonukleinsäure
- RNAi RNA-Interferenz
- ROS Reaktive Sauerstoff-Spezies
- rpm Umdrehungen pro Minute
- RRE Rev Responsive Element
- RT Raumtemperatur
- SA Splice Acceptor Site
- Sac Saccharose
- SD Splice Donor Site
- SDS Natriumdodecylsulfat
- SEM Standardfehler des Mittelwertes
- SFFV U3 Spleen Focus-forming Virus U3 Promoter

| SH2              | Src Homology 2  |
|------------------|---|
| SHC2             | Src Homology 2 Domain Containing Transforming Protein 2 |
| Sos              | Son Of Sevenless  |
| SP1              | Specificity Protein 1                                   |
| SR               | Sarkoplasmatisches Retikulum                            |
| STAT             | Signal Transducer and Activator of Transcription        |
| t <sub>1/2</sub> | Halbwertszeit   |
| T <sub>a</sub>   | Annealing-Temperatur                                    |
| TBS              | Tris-gepufferte Kochsalzlösung                          |
| TE               | Tris/EDTA   |
| Tris             | Tris(Hydroxymethyl)amidomethan                          |
| U                | Unit (Einheit von Enzymaktivität)                       |
| ÜN               | über Nacht  |
| YFP              | Yellow Fluorescent Protein                              |
| ZNS              | Zentrales Nervensystem                                  |
| α-MHC            | Alpha-Myosin schwere Kette                              |
| ΔLVP             | Änderung des linksventrikulären Drucks                  |

## 1 Einleitung

## 1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen mit Abstand die häufigste Todesursache in Deutschland und weiteren westlichen Industrienationen dar und haben in den letzten Jahrzehnten an Häufigkeit zugenommen (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden; Center for Disease Control, Antlanta, GA, USA). Dies ist z. T. auf die stetig steigende Lebenserwartung zurückzuführen. Unter den in diesem Zusammenhang auftretenden Krankheitsbildern ist die ischämische Herzkrankheit, insbesondere der Myokardinfarkt, von großer Bedeutung. Myokardischämien waren 2006 in Deutschland in etwa 18 % aller Todesfälle die zugrunde liegende Ursache (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden). Neben den hohen Kosten im Gesundheitssystem und den volkswirtschaftlichen Schäden, die hierdurch verursacht werden, sind natürlich die Auswirkungen auf die Betroffenen äußerst schwerwiegend. Patienten, welche einen Herzinfarkt überleben, sind oftmals nachfolgend von Herzinsuffizienz und Arrhytmien betroffen und damit in ihrer Lebensqualität und -erwartung deutlich eingeschränkt (Kannel et al., 1979). Insofern ist die Notwendigkeit, Therapiemethoden zu entwickeln oder zu verbessern und auch - insbesondere bei Risikogruppen - prophylaktisch aktiv zu werden, sehr groß. Dazu ist ein Ausbau des Verständnisses von molekularen Grundlagen kardioprotektiver Mechanismen unabdingbar.

Das Herz verfügt über endogene Schutzmechanismen, welche potenziellen Schäden durch Ischämie/Reperfusion (I/R) entgegenwirken können. Solche Mechanismen beinhalten die Freisetzung von Gewebshormonen bzw. Agonisten (z. B. Adenosin, Opioide und Bradykinin), die an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden und so zellprotektive Signalkaskaden initiieren (Murphy, 2004). Insbesondere die Freisetzung von Lipidmediatoren, wie den Prostaglandinen, ist in diesem Zusammenhang von zentraler Bedeutung.

### 1.2 Prostaglandine

Prostaglandine (PG) sind vielseitig wirkende Gewebshormone, welche der Verbindungsklasse der Eicosanoide angehören. Diese leiten sich von der mehrfach ungesättigten C20-Fettsäure Arachindonsäure (Eicosa-5, 8, 11, 14-tetraensäure) ab. Durch die Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub>, teils in Verbindung mit der Zerstörung von Zellmembranen, wird die mehrfach ungesättigte C-20-Fettsäure Arachidonsäure aus Membran-Lipiden freigesetzt. Diese wird dann durch das Enzym Zyklooxygenase (COX, auch: Prostaglandin H-Synthase, PGHS) zunächst in das instabile Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) umgewandelt, welches durch eine Peroxidase-Reaktion im zweiten COXkatalysierten Schritt umgehend zu Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) umgesetzt wird. Für die Zyklooxygenase sind mindestens zwei Isoformen beschrieben. Neben der konstitutiv exprimierten COX-1 existiert auch eine induzierbare Form, die COX-2 (Simmons et. al, 2004). Unterschiede zwischen beiden prinzipiell ähnlichen Isoformen bestehen z. B. hinsichtlich ihrer Affinität für verschiedene COX-Inhibitoren, zudem verfügt die COX-2 über ein breiteres Substratspektrum (Vane et al., 1998). Verschiedene Stimuli, vor allem pro-inflammatorische Zytokine oder Wachstumsfaktoren, führen zur Induktion der COX-2. Durch COX gebildetes PGH<sub>2</sub> wird anschließend abhängig vom Gewebe- bzw. Zelltyp durch spezifische Synthasen in die biologisch aktiven Prostaglandine PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$ </sub>, PGI<sub>2</sub> (Prostazyklin) und das Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) umgewandelt (Abb. 1). Prostaglandine spielen eine maßgebliche Rolle bei der Vermittlung inflammatorischer Wirkungen (Kuehl & Egan, 1980), können Zellproliferation und -migration (MacManus & Whitfield, 1974; Fischer, 1997) oder auch die Aggregation von Thrombozyten beeinflussen (Mustard et al., 1980). Zudem sind sie als vasoaktive Mediatoren mit Wirkung auf glatte Muskelzellen maßgeblich an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt (Schrör, 2004).



Abbildung 1: Biosynthese von Prostaglandinen. Nach Narumiya et al., 1999.

## 1.2.1 Prostaglandine im nicht ischämischen Herzen

Limas und Cohn (1973) beschrieben erstmals eine myokardiale Synthese von Prostaglandinen. Die Syntheseorte umfassen Endothel- und glatte Muskelzellen der Gefäßwand (Chaudhari et al., 1990) und auch Kardiomyozyten (Oudot et al., 1995). Unter physiologischen Bedingungen, ohne inflammatorischen Stimulus, erfolgt die PG-Bildung in erster Linie durch die zytosolische Phospholipase A2 und die konstitutive COX-1. Der Basalspiegel von Prostaglandinen variiert in weiten Grenzen und liegt in Kardiomyozyten im Bereich von 0,1 bis 2 ng/mg Protein. Deutlich höhere Konzentra-Fibroblasten tionen wurden in mit 1 bis 5 ng/mg Protein beschrieben (Mendez & LaPointe, 2002). Unter physiologischen Bedingungen macht  $PGI_2$  den Hauptteil an Prostaglandinen in Kardiomyozyten aus, gefolgt von  $PGE_2$  und  $PGF_{2\alpha}$ (Adderley & Fitzgerald, 1999). Auch in den Endothelzellen der Koronargefäße ist  $PGI_2$ der Hauptmetabolit. In den glatten Muskelzellen ist dagegen die PG-Synthese unter basalen Bedingungen wahrscheinlich aufgrund der geringen COX-Aktivität nur schwach ausgeprägt (Schrör, 2004). Jedenfalls haben haben Prostaglandine oder TXA<sub>2</sub> unter diesen Bedingungen auf Herzrate und Kontraktilität nur einen geringen oder keinen Einfluss.

#### 1.2.2 Prostaglandine im ischämischen Herzen

Während im gesunden Herzen die PG-Bildung wahrscheinlich durch die Aktivität der COX-1 erfolgt, kommt es durch Ischämie mit nachfolgender Reperfusion (I/R) zu einer Expressionssteigerung der COX-2. Dies konnte z. B. an isoliert perfundierten Kaninchenherzen gezeigt werden und ging mit einer deutlich gesteigerten PGI<sub>2</sub>-Freisetzung einher (Schrör et al., 1998). Eine Zunahme der Prostaglandin-Konzentration ist auch für den Myokardinfarkt des Menschen beschrieben, wobei überwiegend PGI<sub>2</sub>, gefolgt von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2 $\alpha$ </sub> freigesetzt wurde (Rasmanis *et al.*, 1991). Die Bedeutung der PG-Synthese für die Kardioprotektion bei I/R wurde u. a. durch Analysen von COX-1- und COX-2-Knockout-Mäusen belegt. Deren Herzen zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren einen ausgeprägteren ischämischen Schaden (Camitta et al., 2001). Umgekehrt vermittelten exogen zugeführte Prostaglandine bzw. eine Steigerungen der PG-Konzentration in verschieden Modellen eine kardioprotektive Wirkung. So führte eine Gabe von PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>1</sub> im Hundeherzen zu einer Reduktion der Infarktgröße nach Koronarverschluss (Jugdutt et al., 1981). Zudem zeigen Befunde am Schwein eine nach Ischämie verbesserte kontraktile Funktion durch PGI<sub>2</sub>, dessen Produktion durch Stimulation mit Defibrotid vermutlich durch erhöhte PG-Synthese gesteigert wurde (Hohlfeld et al., 1991). Neben PGI<sub>2</sub> kann auch PGE<sub>2</sub> im Myokard insgesamt dazu beitragen, Schädigungen durch I/R abzuschwächen (Hohlfeld et al., 1993; Shinmura et al., 2000; Xiao et al., 2004, Martin et al., 2005). Eine vermehrte Bildung von PGE<sub>2</sub> wird dabei mit einer gesteigerten Expression der - im Gegensatz zur konstitutiven zytosolischen PGE-Synthase - induzierbaren membrangebundenen bzw. mikrosomalen PGE-Synthase (mPGES) in Verbindung gebracht. Die mPGES zeigt zudem eine Kolokalisation mit der COX-2 (Murakami et al., 2000), so dass die

Synthese von  $PGE_2$  effektiv im direkten Zusammenwirken beider Enzyme erfolgen kann.

## 1.3 Prostaglandin-Rezeptoren

Die vielseitigen Effekte der unterschiedlichen Prostaglandine, Prostazyklin und TXA<sub>2</sub> werden durch spezifische Membran-Rezeptoren der Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) des Rhodopsin-Typs vermittelt. Aufgrund ihrer Ligandenspezifität können neun verschiedene Rezeptortypen unterschieden werden. Diese umfassen zwei PGD<sub>2</sub>-Rezeptoren (DP<sub>1</sub> und DP<sub>2</sub>), vier PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren (EP<sub>1</sub> - EP<sub>4</sub>), den PGF<sub>2a</sub>- (FP), PGI<sub>2</sub>- (IP) und TXA<sub>2</sub>-Rezeptor (TP). Als GPCR weisen diese Rezeptoren sieben Transmembran-Domänen auf und koppeln an verschiedene G-Proteine (Narumiya *et al.*, 1999; Sugimoto & Narumiya, 2007). Letztere sind heterotrimere Proteine mit intrinsischer GTPase-Aktivität, deren Untereinheiten mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet werden. Die unterschiedlichen Formen der  $\alpha$ -Untereinheit in den G-Protein-Subtypen bedingen dabei die Aktivierung verschiedener Signalwege (McCudden *et al.*, 2005).

## 1.3.1 EP-Rezeptoren

Unter den EP-Rezeptoren sind bislang vier verschiedene Subtypen beschrieben  $(EP_1 - EP_4)$ , die an verschiedene G-Proteine koppeln und sich daher hinsichtlich ihrer Signalweiterleitung unterscheiden (Tab. 1).

| EP-Rezeptor-<br>Subtyp | lsoform<br>(Auszug)     | G-Protein-<br>Familie              | Signalmoleküle                             |
|------------------------|-------------------------|------------------------------------|--|
| EP <sub>1</sub>        | _                       | G <sub>q</sub> /G <sub>?</sub>     | Ca²⁺↑                                      |
| EP <sub>2</sub>        | _                       | Gs                                 | cAMP↑                                      |
| EP <sub>3</sub>        | EP <sub>3A</sub> (Rind) | Gi                                 | cAMP↓                                      |
|                        | EP <sub>3B</sub> (Rind) | Gs                                 | cAMP↑                                      |
|                        | EP <sub>3D</sub> (Rind) | $G_i, G_s, G_q$                    | $cAMP\downarrow$ , $cAMP\uparrow$ , $IP_3$ |
|                        | EP <sub>3y</sub> (Maus) | G <sub>i</sub> , G <sub>s</sub>    | cAMP↓, cAMP↑,<br>IP₃/Ca²+↑                 |
| EP <sub>4</sub>        | _                       | G <sub>s</sub> , (G <sub>i</sub> ) | cAMP↑, PI3K                                |

**Tabelle 1:** Signaltransduktionswege von EP-Rezeptoren und ausgewählten EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Isoformen (Nach Narumiya et al., 1999 u. Sugimoto & Narumiya, 2007).

Der EP<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt eine Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Freisetzung von Ca2+ aus intrazellulären Speichern. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine Kopplung an G<sub>a</sub>-Protein zurückzuführen, wodurch es nach Rezeptorstimulation zu einer Aktivierung der Phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) kommt. Durch deren Aktivität wird membranständiges Diazylglyzerol (DAG) und zytosolisches Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) gebildet. Diese sekundären Botenstoffe wiederum führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) sowie einer Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Zusätzlich besitzt der EP1-Rezeptor das Potenzial, unabhängig von der PLC einen deutlich ausgeprägteren Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über rezeptoraktivierte Calciumkanäle auszulösen. Ob hieran ebenfalls eine Kopplung an G<sub>q</sub> verantwortlich ist, oder eine bislang nicht identifizierte G-Protein-Variante, welche direkt auf Ca<sup>2+</sup>-Kanäle einwirkt, ist bislang nicht eindeutig geklärt (Tabata et al., 2002; Katoh et al., 1995). Die Verteilung der EP<sub>1</sub>-Expression beschränkt sich im Wesentlichen auf Lunge, Magen und Niere. Eine der als erstes beschriebenen physiologischen Eigenschaften des EP1-Rezeptors ist die konstringierende Wirkung auf die glatte Muskulatur. So hat er einen Anteil an der Bronchokonstriktion, ein wichtiger Faktor bei der Symptomatik des Asthma bronchiale. In der Niere erfüllt der EP<sub>1</sub>-Rezeptor in den papillären Sammelgängen eine wichtige Funktion, indem er die Aufnahme von Wasser und NaCl reduziert, also die Natri- und Diurese begünstigt (Breyer & Breyer, 2001). Darüber hinaus ist der EP<sub>1</sub>-Rezeptor neben weiteren Effekten z. B. in 3T3-Fibroblasten durch Induktion von c-myc, c-fos und Egr-1 wahrscheinlich an der Wachstumsregulation beteiligt (Danesch et al., 1994).

Der EP<sub>2</sub>-Rezeptor ist mit stimulatorischem G-Protein (G<sub>s</sub>) assoziiert. Dieses bewirkt eine Aktivitätssteigerung der Adenylatzyklase (AC) und damit einen Anstieg der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Je nach Spezies wurde für den EP<sub>2</sub>-Rezeptor eine mehr oder weniger verbreitete Gewebelokalisation festgestellt. Relativ stark ausgeprägt ist die Expression in Uterus und Darm, konnte aber auch in Herz, Lunge und Leber sowie im Gehirn nachgewiesen werden (Guan *et al.*, 2002; Narumiya *et al.*, 2007). Wie andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die einen cAMP-Anstieg vermitteln, kann auch der EP<sub>2</sub>-Rezeptor eine Relaxation von glatten Muskelzellen bewirken. Beispielsweise ist er neben  $\beta_2$ -,  $A_2$ und H<sub>2</sub>-Rezeptoren an der Tonus-Regulation der pulmonalen Gefäßmuskulatur beteiligt (Fullerton *et al.*, 1996). Anhand von EP<sub>2</sub>-Knockout-Mäusen konnten mit der Beteiligung an Ovulation und Befruchtungsfähigkeit weitere wichtige Wirkungen des Rezeptors aufgezeigt werden (Hizaki *et al.*, 1999). Der EP<sub>2</sub>-Rezeptor kann aber auch - z. T. unabhängig von inflammatorischen Effekten - pro-kanzerogene Wirkungen vermitteln, wie z. B. bei der Entwicklung von Lungen- und Hauttumoren (Keith *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2005).

Für den humanen EP<sub>3</sub>-Rezeptor sind mindestens acht verschiedene Varianten beschrieben, die sich aus dem alternativen Spleißen der zugrunde liegenden PrämRNA ergeben und sich in ihren C-Termini unterscheiden (Kotani et al., 1997). In Maus und Ratte sind bislang drei entsprechende Varianten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ; Neuschäfer-Rube et al., 1994; Takeuchi et al., 1996), im Rind vier (A, B, C, D; Namba et al., 1993) bekannt. EP<sub>3</sub>-Rezeptoren zeigen aufgrund der mehreren unterschiedlichen C-Termini vielfältigere Arten der G-Protein-Kopplung, wobei jedoch eine Kopplung an inhibitorisches G-Protein (G<sub>i</sub>) vorherrschend ist, woraus eine Inhibierung der AC folgen kann. Daraus ergibt sich eine Verringerung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Unter den Spleißvarianten des EP<sub>3</sub>-Rezeptors finden sich auch solche, die an G<sub>q</sub> und z. T. auch an G<sub>s</sub> koppeln (Kotani *et al.*, 1995; Narumiya *et al.*, 1999; Tab. 1), wodurch auch eine Signaltransduktion über IP<sub>3</sub> bzw. eine cAMP-Erhöhung vermittelt werden kann. Die Expression des EP<sub>3</sub>-Rezeptors ist im menschlichen Körper am stärksten in Niere, Pankreas und Uterus ausgeprägt. Weitere Gewebe mit erheblicher EP<sub>3</sub>-Expression umfassen Herz, Leber, Darm, Prostata und die Gonaden (Kotani et al., 1995). Auch in Thrombozyten der Maus konnte neben einer Expression von EP<sub>2</sub> und EP<sub>4</sub> die EP<sub>3</sub>-mRNA nachgewiesen werden. Hier ist der Rezeptor an einer PGE<sub>2</sub>-vermittelten Verstärkung einer induzierten Plättchenaggregation beteiligt (Ma et al., 2001). Im ZNS vermittelt der EP<sub>3</sub>-Rezeptor die Entstehung von Fieber in Reaktion auf Pyrogene, wobei in diesem Fall der EP<sub>4</sub>-Rezeptor offenbar als direkter Gegenspieler in Aktion tritt (Ushikubi et al., 1998; Oka, 2004; Lazarus, 2006). Im Herz-Kreislaufsystem, insbesondere im Herzen, ist der EP<sub>3</sub>-Rezeptor maßgeblich an der Vermittlung protektiver Effekte beteiligt. So konnte am Schweineherzen durch gezielte Stimulation dieses Rezeptors die Infarktgröße und das Ausmaß der Zellschädigung nach I/R deutlich reduziert werden (Hohlfeld et al., 2000). Eine kardiospezifische EP<sub>3</sub>-Überexpression in Mäusen vermag isoliert perfundierte Herzen ebenfalls vor Myokardschäden durch I/R zu schützen (Martin et al., 2005).

#### **1.4** Der EP<sub>4</sub>-Rezeptor

Der EP<sub>4</sub>-Rezeptor wurde zum ersten Mal aus einer Maus-cDNA-Sammlung von Honda *et al.* (1993) kloniert und zunächst als EP<sub>2</sub>-Rezeptor-Subtyp identifiziert, da er ebenso wie dieser einen cAMP-Anstieg vermittelt. Wenig später wurde jedoch durch pharmakologische Untersuchungen - v. a. anhand der fehlenden Affinität für das EP<sub>2</sub>spezifische Butaprost - deutlich, dass es sich um einen neuen EP-Rezeptor-Typ handeln musste, der im Folgenden als EP<sub>4</sub> bezeichnet wurde (Coleman *et al.*, 1994; Nishigaki *et al.*, 1995). Er wird zusammen mit den Rezeptortypen EP<sub>2</sub>, DP und IP einem phylogenetischem "Cluster" zugerechnet, hat sich aber innerhalb dieses "Clusters" wahrscheinlich bereits in einem relativ frühen evolutionärem Stadium von einem gemeinsamen Vorgänger-Rezeptor abgezweigt (Toh *et al.*, 1995).

Das humane EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Gen (Ptger4) liegt auf Chromosom 5, umfasst einen Bereich von etwa 22 kb und besteht aus drei Exons und zwei Introns. In der Promotor-Region findet sich - anders als im murinen EP<sub>4</sub>-Gen - keine konventionelle TATA-Box, jedoch zwei CCAAT-Boxen, mehrere SP1-Bindungsstellen, AP1- und AP2-Konsensus-Sequenzen sowie Bindungsmotive, welche eine Regulation durch proinflammatorische Stimuli (via NF-IL6, NF $\kappa$ B und HAPF-1) ermöglichen (Foord *et al.*, 1996). Mehrere Untersuchungen machen deutlich, dass die Regulation der EP<sub>4</sub>-Expression je nach Zelltyp unterschiedlich erfolgt, jedoch oft inflammatorische Stimuli die Expression erhöhen. So steigert z. B. eine Gabe von Lipopolysacchariden (LPS) in Makrophagen die EP<sub>4</sub>-Expression (Arakawa et al., 1996; Akaogi et al., 2004). Kaninchen-Chondrozyten zeigen eine Aufregulation von  $EP_4$  in Abhängigkeit von IL-1 $\beta$ , jedoch nicht von TNF $\alpha$  (Alvarez-Soria *et al.*, 2007). Einige Untersuchungen haben für die Expressionsregulation von EP4 eine Extrazellulär Regulierte Kinase- (ERK-)Abhängigkeit festgestellt (Kambe et al., 2008; Han et al., 2007). Eine gesteigerte EP<sub>4</sub>-Expression tritt oft zusammen mit einer Hochregulation der COX-2 auf. Dies geschieht z. B. in Makrophagen durch Expressionsverstärkung bzw. Induzierung beider Gene in Reaktion auf inflammatorische Stimuli (Akaogi et al., 2004; Alvarez-Soria et al., 2007). Das gemeinsame Auftreten einer erhöhten Expression von  $EP_4$  und COX-2 ist auch mehrfach für Tumorzellen beschrieben (Marnett & DuBois, 2002; Ma et al., 2006; Han et al., 2007). In diesem Fall kommt u. a. offenbar ein AP2-Bindeprotein mit direkter Wirkung auf den EP4- und COX-2-Promotor als Vermittler in Frage. Allerdings ist auch eine Aufregulation von COX-2 durch die Wirkung des EP<sub>4</sub>-

Rezeptors denkbar, da dessen cAMP-erhöhender Effekt letztendlich auf ein *cAMP response element* (CRE) des COX-2-Promotors wirken kann (Wang *et al.*, 2002; Kirti-kara *et al.*, 2000).

Bei Untersuchungen verschiedener Maus-Gewebe zeigte der EP<sub>4</sub>-Rezeptor neben dem EP<sub>3</sub>-Rezeptor die vielfältigste Gewebsverteilung. Die Expression von EP<sub>4</sub> konnte in Herz, Lunge, Magen, Milz und Niere nachgewiesen werden und war zudem im Thymus, dem Darm und dem Uterus sehr stark ausgeprägt (Narumiya et al., 1999). Auch im ZNS fand sich eine EP<sub>4</sub>-Expression in Neuronen des Hypothalamus und Hirnstammes. Das Expressionsprofil von EP4 im menschlichen Organismus ist weitgehend identisch. Gewebe mit deutlicher EP<sub>4</sub>-Expression sind hier Herz, Lunge, Niere, Pankreas, Milz, Thymus, Darm und periphere Leukozyten (An et al., 1993). Zudem zeigt sich im Ductus arteriosus - einem kleinen Verbindungsgefäß zwischen Aorta und Pulmonal-Arterie im fetalen Kreislauf - eine im Vergleich zu anderen Prostaglandin-Rezeptoren stark ausgeprägte Expression von EP<sub>4</sub> (Leonhardt *et al.*, 2003). Innerhalb einzelner Geweben kann eine distinkte zelluläre Verteilung der verschiedenen EP-Rezeptor-Subtypen vorliegen. So findet sich beispielsweise in der Niere die hauptsächliche EP<sub>4</sub>-Expression in den Glomeruli, während die Expression von EP<sub>1</sub> in den papillären Sammelgängen und die von EP<sub>3</sub> in tubulärem Epithel und den kortikalen Sammelgängen des äußeren Nierenmarks auftritt (Narumiya et al., 1999). Neben einer spezifischen zellulären Verteilung innerhalb eines bestimmten Gewebes wurde für den EP<sub>4</sub>-Rezeptor - wie auch für andere EP-Rezeptoren und weitere GPCR - für bestimmte Zelltypen und bei Überexpression kürzlich eine Lokalisation in der Kernmembran beschrieben (Bhattacharya et al., 1999; Übersicht: Zhu et al., 2006). In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass die verschiedentlich subzellulär lokalisierten Rezeptoren eines Typs distinkte Effekte in der Zelle vermitteln und nukleäre GPCR z. B. direkten Einfluss auf die Genexpression haben können. Allerdings sind im Fall des EP<sub>4</sub>-Rezeptors neben einer möglichen perinukleären Lokalisation keine Details bezüglich der dort vermittelten Effekte bekannt.

## 1.4.1 Struktur des EP<sub>4</sub>-Rezeptors

Das reife humane EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Protein umfasst 488 Aminosäuren und weist strukturelle Charakteristika auf, welche es deutlich von den anderen EP-Rezeptoren unterscheidet. Dazu gehören eine ausgeprägte dritte intrazelluläre Schleife und der sehr C-Terminus, welcher etwa ein Drittel des lange Rezeptors ausmacht (Bastepe & Ashby, 1999) (Abb. 2). Dieser lange C-Terminus führt nach Ligandenbindung zu einer schnellen 
ß-Arrestin-vermittelten Internalisierung und damit Desensibilisierung des Rezeptors, was ihn auch deutlich vom EP<sub>2</sub>-Rezeptor unterscheidet. Hierfür ist der Serin-Threonin-Cluster von S389 bis S392 essenziell, welcher die Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin1 bewirkt. Der Hauptbereich der Rezeptorphosphorylierung erstreckt sich von S370 bis S382 und stabilisiert im phosphorylierten Zustand (nach Rezeptorstimulation) den Rezeptor-β-Arrestin-Komplex. Der distale C-Terminus-Bereich von T428 bis S484 - wenn auch nicht essenziell - erhöht zudem die Effektivität der letztendlichen Rezeptor-Internalisierung (Neuschäfer-Rube et al., 2004). Die Interaktion mit  $\beta$ -Arrestin ist für die Modulation der Rezeptoraktivität, möglicherweise aber auch für einen zusätzlichen, G-Protein-unabhängigen Teil der Signaltransduktion verantwortlich. Ein Beispiel für einen derartigen Signal-Mechanismus bietet der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor. Für ihn wurde eine ERK-Aktivierung nachgewiesen, die nach Arrestin-vermittelter Dynamin-abhängiger Internalisierung und damit nach der Entkopplung vom G-Protein stattfindet (Daaka et al., 1998).

Für die Kopplung an spezifische G-Protein-Varianten scheint der C-Terminus alleine keine essenzielle Rolle zu spielen. Ein Hybrid-Rezeptor auf der Basis von EP<sub>3</sub>, dessen C-Terminus gegen denjenigen von EP<sub>4</sub> ausgetauscht wurde, wies eine Signaltransduktion auf, die sich nicht von dem verwendeten Wildtyp-EP<sub>3</sub>-Rezeptor unterschied. In Bezug auf Desensibilisierung und Internalisierung hingegen verhielt sich der Hybrid-Rezeptor wie ein reiner EP<sub>4</sub>-Rezeptor (Neuschäfer-Rube *et al.*, 1997). Demnach ist der lange intrazelluläre C-Terminus von EP<sub>4</sub> für die letzteren beiden Aspekte verantwortlich.



Abbildung 2: Schematische Darstellung des humanen  $EP_4$ -Rezeptors mit Aminosäurenabfolge. Der rot markierte Bereich von S389 bis S392 ist essenziell für die Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin1, Phosphorylierung der Serin/Threonin-reichen Region von S370 bis S382 stabilisiert den Rezeptor- $\beta$ -Arrestin1-Komplex, der distale C-Terminus-Bereich von T428 bis S484 erhöht die Effektivität der Rezeptor-Internalisierung (nach Bastepe & Ashby, 1999).

## 1.4.2 EP<sub>4</sub>-vermittelte Signaltransduktion

In den meisten nativen Zellsystemen zeigt sich die Signaltransduktion des  $EP_4$ -Rezeptors in erster Linie als  $G_s$ -vermittelt und damit durch den Anstieg von intrazellulärem cAMP. Verglichen mit dem ebenfalls  $G_s$ -gekoppeltem  $EP_2$ -Rezeptor fällt die cAMP-Antwort bei Expression in HEK-Zellen jedoch deutlich schwächer aus (Fujino *et al.*, 2002), die Bindungsaffinität für PGE<sub>2</sub> hingegen ist mit einer  $EC_{50}$  von 1,9 bis 2,8 nM etwa sieben mal höher (Kiriyama *et al.*, 1997; Fujino *et al.*, 2002). Mehrere Untersuchungen unterstützen die Annahme, dass die Kopplung von  $EP_4$  an  $G_s$  gegenüber  $EP_2$ nicht sehr effizient ausfällt (Bastepe & Ashby, 1997; Nishigaki, 1995; Honda *et al.*, 1993). Dennoch lässt sich nach Aktivierung von  $EP_4$  in der Regel ein deutlicher cAMP-Anstieg verzeichnen, was in der weiteren Signalkaskade zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt. Diese wirkt u. a. wiederum inhibitorisch auf die - im Herzen konstitutive - Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) oder aktiviert auch das cAMP *response element binding* (CREB)-Protein. Damit ergibt sich z. B. ein möglicher Einfluss auf den Energiestoffwechsel und die Proteinsynthese der Zelle.



Abbildung 3: Zusammenstellung  $EP_4$ -vermittelter Signalkaskaden, welche prinzipiell an der Vermittlung kardioprotektiver Wirkungen beteiligt sein könnten.  $EP_4$ :  $EP_4$ -Rezeptor,  $PGE_2$ : Prostaglandin  $E_2$ , AC: Adenylatzyklase, MP: Metalloproteinase, EGFR-L: EGF-Rezeptor-Ligand, EGF-R: Epidermal Growth Factor-Rezeptor, Epac: Exchange Protein directly Activated by cAMP, PKA: Proteinkinase A, PI3K: Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase, Ras/Rap: Kleine GTPasen, (c-)Raf: Rapidly Growing Fibrosarcoma-Kinase, CREB: cAMP response element binding-Protein, AKT: Proteinkinase B, ERK1/2: Extracellular regulated-Kinase, GSK3 $\beta$ : Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$ 

Des Weiteren könnte als cAMP-regulierte Signalkomponente das Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) prinzipiell einen Anteil an der EP<sub>4</sub>-vermittelten Signaltransduktion haben. Von Epac existieren zwei Isoformen, Epac1 und Epac2, wovon erstere die Hauptform im Herzen darstellt. Eine Bindung von cAMP an die regulatorische Domäne von Epac führt zur Aufhebung der Auto-Inhibierung und damit zur Aktivierung von Epac (Bos, 2006). Epac aktiviert daraufhin seinerseits Rap, eine kleine GTPase der Ras-Familie. Neben einer Aktivierung von ERK1/2 durch Rap1 (Wang et al., 2006) stellt eine weitere konkrete Rap1-Wirkung im Fall von Kardiomyozyten die Ausbildung von Zellverbindungskanälen (sog. Gap Junctions) dar, die essenziell für eine effiziente räumlich und zeitlich geregelte Weiterleitung von Aktionspotenzialen im Myokard sind (Kooistra et al., 2007). Bei akuten ischämischen Ereignissen tragen sie zudem zur Vermeidung von Arrhythmien bei (Lerner et al., 2000). Wichtig scheint jedoch auch eine relativ schnelle Anpassung der Zahl an funktionalen Gap Junctions nach solchen Ereignissen zu sein, um unbetroffene Gebiete des Herzen möglichst umgehend von Ischämie-geschädigten Zonen abzukoppeln (Saffiz et al., 2007). Gap Junctions tragen nämlich zur Verbreitung der I/R-induzierten Hyperkontraktion und damit zu einer Ausbreitung der Nekrose von Kardiomyozyten bei (Garcia-Dorado et al., 1997). Weitere Funktionen von Epac im Herzen beinhalten eine Beteiligung an der Wachstumsregulation von Kardiozyten (Morel *et al.*, 2005) und eine Steigerung der  $\beta$ -Adrenozeptor-abhängigen Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung in Kardiomyozyten und damit deren Kontraktilität (Oestreich *et al.*, 2007).

Zunächst wurde der EP<sub>4</sub>-Rezeptor als ausschließlich an G<sub>s</sub> gekoppelt beschrieben, bis Fujino und Regan (2006) bei heterologer Expression in HEK293-Zellen auch die Möglichkeit einer Assoziation mit G<sub>i</sub> aufzeigten. Zu diesem Zeitpunkt gab es schon einige Befunde, die eine G<sub>s</sub>-unabhängige, nicht cAMP-vermittelte EP<sub>4</sub>-Signaltransduktion belegten (s. u.), aber auch nicht mit einer cAMP-Abnahme einhergingen. Mehrfach beschrieben ist eine (G<sub>s</sub>-unabhängige) Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) durch den EP<sub>4</sub>-Rezeptor (Fujino *et al.*, 2003 & 2005; George *et al.*, 2007). Diese Signalweiterleitung kann durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen ausgelöst werden (Stoyanov et al., 1995). Die Aktivierung der PI3K führt zur Bildung von membranständigem Phosphatidyl-inositol-3-phosphat (PIP<sub>3</sub>), wodurch wiederum mit Hilfe der Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1) die Aktivität der AKT-Kinase (oder auch Proteinkinase B, PKB) positiv reguliert wird. Dies wird im Allgemeinen - besonders auch im Myokard - als ein Signalweg angesehen, welcher über die Inhibierung der Apoptose zur Überlebensfähigkeit von Zellen beiträgt und zudem Zellproliferation und -wachstum steigern kann (Engelman et al., 2006; Cantley, 2002). AKT beteiligt sich in diesem Zusammenhang - wie auch PKA - an der negativen Regulation von GSK-3 $\beta$ .

Mehrfach wurde auch eine PI3K-abhängige Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 (= p44/42-MAPK) nach EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Stimulation beschrieben. Auf diese Weise kann EP<sub>4</sub> zur Proliferation und Überlebensfähigkeit von Zellen beitragen, was z. B. für einige Krebszelllinien nachgewiesen wurde (Sheng *et al.*, 2001; Fujino *et al.*, 2003; Pozzi *et al.*, 2004). Sollte dieses Prinzip auch auf Kardiozyten übertragbar sein, könnte dies auch - zumindest anteilig - einen kardioprotektiven Mechanismus darstellen.

Eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung sowohl des ERK- als auch des PI3K-AKT-Signalweges durch den EP<sub>4</sub>-Rezeptor könnte eine ( $G_{\alpha q}$ -unabhängige) Aktivierung der PLC bieten. Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass isolierte  $\beta\gamma$ -Untereinheiten verschiedener G-Proteine – darunter auch G<sub>i</sub> – in der Lage sind, PLC- $\beta$  zu aktivieren (Camps *et al.*, 1992; Boyer *et al.*, 1992; Blank *et al.*, 1992). Das durch deren Aktivität gebildete DAG rekrutiert und aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (Nishizuka, 1995). Letztere wiederum ist prinzipiell in der Lage, den MEK-ERK- und den PI3K-AKT-Signalweg zu aktivieren und so zur Proliferation und zum Überleben von Zellen beizutragen (Sung *et al.*, 2007). Insbesondere für Tumorzellen ist eine ERK-Aktivierung durch PKC und eine dadurch erfolgende Steigerung der Zellproliferation mehrfach beschrieben (Chantara *et al.*, 2006; He *et al.*, 2004).

Die Aktivierung von ERK1/2 ausgehend vom EP<sub>4</sub>-Rezeptor könnte in Kardiomyozyten den Untersuchungen von Mendez & LaPointe (2005) zufolge (anteilig) auch über eine Transaktivierung des *Epidermal Growth Factor* (EGF-)Rezeptors geschehen. In diesem Fall aktiviert der Rezeptor zunächst membranständige Metalloproteinasen, die wiederum membrangebundene EGF-Rezeptor-Agonisten freisetzen. Diese Art der Signalweiterleitung ist für Krebszellen vielfach beschrieben (Fischer *et al.*, 2003). Es wurde für GPCRs von Tumorzellen zudem die Möglichkeit einer direkten Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne des EGFR ohne die Beteiligung von MPs beschrieben (Bohla *et al.*, 2008). Eine Aktivierung von EGFR kann letztendlich am Wachstum und der Proliferation von Zellen beteiligt sein.

### 1.4.3 Wirkungen des EP4-Rezeptors im kardiovaskulären System

In der jüngeren Vergangenheit wurden einige Untersuchungen publiziert, welche sich mit der Rolle des EP<sub>4</sub>-Rezeptors im kardiovaskulären System befassten. Dabei wurden sowohl negative als auch positive Wirkungen von EP<sub>4</sub> aufgezeigt.

Untersuchungen von Cipollone *et al.* (2005) zeigten, dass in symptomatischen (instabilen) atherosklerotischen Plaques die Expression von  $EP_4$  sowie COX-2 und mPGES-1 im Vergleich zu asymptomatischen Plaques deutlich erhöht ist. Dabei bewirkt  $EP_4$ offenbar eine gesteigerte Synthese und Aktvität von Metalloproteinasen, was zur Instabilität von Plaques beitragen kann.

Eine lebensnotwendige EP<sub>4</sub>-vermittelte Wirkung im Herz-Kreislaufsystem tritt während der Embryonalentwicklung sowie unmittelbar nach der Geburt zu Tage. Im fetalen Blutkreislauf besteht eine direkte Verbindung zwischen der Pulmonal-Arterie und dem Aortenbogen, die als Ductus arteriosus (DA) bezeichnet wird. Nach der Geburt verschließt sich in gesunden Individuen dieses kurze Verbindungsgefäß vollständig, so dass sauerstoffarmes Blut über die Pulmonal-Arterie ausschließlich zur Lunge gelangt. Der EP<sub>4</sub>-Rezeptor ist maßgeblich an der Regulation des Zustands des DA beteiligt und spielt dabei eine duale Rolle. Zum einen begünstigt er im Fetus über eine Vasodilatation das Offenhalten des DA. Andererseits bereitet EP<sub>4</sub> über eine indirekte Beeinflussung der Migration glatter Gefäßmuskelzellen das Gefäß für ein schnelles und letztendlich lebensnotwendiges Verschließen vor (Yokoyama *et al.*, 2006 & 2008).

Effekte des EP<sub>4</sub>-Rezeptors am Herzen selbst sind bislang nur unzureichend untersucht. Der erste starke Hinweis auf kardioprotektive Wirkungen des Rezeptors konnte anhand einer EP<sub>4</sub>-Knockout-Maus gezeigt werden. Die durch I/R hervorgerufene Schädigung in solchen Tieren war *in vivo* und *ex vivo* deutlich stärker ausgeprägt als in Wildtyp-Mäusen (Xiao *et al.*, 2004). Allerdings handelte es sich hierbei um Mäuse mit nicht gewebsspezifischem EP<sub>4</sub>-Knockout, was möglicherweise systemische Effekte mit sich brachte, die nicht erfasst werden konnten. Zudem bleibt somit ungeklärt, welcher Zelltyp an der Vermittlung protektiver EP<sub>4</sub>-Wirkungen beteiligt ist.

Qian *et al.* (2008) fanden kürzlich für Mäuse mit rein kardiomyozytärem Knock-Out von  $EP_4$  nach Myokardinfarkt eine reduzierte Größe von Kardiomyozyten und geringere Fibrose. Allerdings war die Ejektionsfraktion dieser Herzen im Vergleich zu

Kontrolltieren signifikant verringert. Dies wurde mit einer geringeren STAT-3-Aktivierung erklärt, die in Kardiomyozyten offenbar anteilig EP<sub>4</sub>-abhängig erfolgt und für die mehrfach protektive Eigenschaften beschrieben ist (Übersicht: Boengler *et al.*, 2008). Eine solche EP<sub>4</sub>-vermittelte Aktivierung von STAT-3, welche eine essenzielle Rolle bei der Zellvergrößerung und Proteinsynthese spielt und damit nicht nur protektiv sondern auch hypertrophierend wirkt, wurde zuvor schon von Frias *et al.* (2007) beschrieben.

Eine pharmakologische Aktivierung des  $EP_4$ -Rezeptors verbessert Hishikari *et al.* (2008) zufolge nach I/R die Herzfunktion. Hieran sollen Effekte von  $EP_4$  in Makrophagen entscheidend beteiligt sein, die zu einer Inhibierung von *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1), MMP-2 und -9 sowie TNF $\alpha$  führen. Dies vermindert zum einen die Infiltration von Monozyten bzw. Makrophagen in das betroffene Herzgewebe und zum anderen die Ausbildung einer Fibrose sowie TNF $\alpha$ -induzierte Hypertrophie und Apoptose. Damit fällt die inflammatorische Myokard-Schädigung nach I/R und ein nachteiliges Remodeling geringer aus. Zuvor wurde dem  $EP_4$ -Rezeptor bei Untersuchungen isolierter Kardiomyozyten wiederum eine Hypertrophie fördernde Wirkung zugeschrieben (Mendez & LaPointe, 2005). Es zeigen sich also je nach Zelltyp z. T. gegenteilige Wirkungen von  $EP_4$ , die man letztlich in ihrer Gesamtheit betrachten sollte.

Arbeiten des hiesigen Institutes an einem Mausmodell mit kardiospezifischer Überexpression des EP<sub>3</sub>-Rezeptors zeigten eine deutlich ausgeprägte Kardioprotektion nach I/R, die sich aus dieser Überexpression ergab (Martin *et al.*, 2005). Die Herzen der entsprechenden Tiere zeigten eine Aufregulation auch des EP<sub>4</sub>-Rezeptors (Martin, 2006, Dissertation), was evtl. in Zusammenhang mit der Kardioprotektion steht.

Letztendlich muss festgehalten werden, dass konkrete kardioprotektive EP<sub>4</sub>-Wirkungen und deren molekulare Grundlagen - insbesondere die essenziellen Signaltransduktionswege - wenig untersucht sind. Diese Arbeit soll dazu beitragen, diese Situation zu verbessern.

### 1.4.4 Weitere zellphysiologische Wirkungen des EP<sub>4</sub>-Rezeptors

Physiologische Wirkungen, die durch EP₄-vermittelte Effekte hervorgerufen werden können, umfassen oftmals eine gesteigerte Proliferation und eine erhöhte Überle-

bensfähigkeit von Zellen. Das zeigt sich teilweise als unerwünschte Wirkung in Zusammenhang mit Krebszellen verschiedenen Typs. Mehrfach konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibierung bzw. Ausschaltung des Rezeptors der Tumorentwicklung bzw. -progression entgegen wirkt. So inhibiert z. B. der EP<sub>4</sub>-Antagonist L-161,982 die PGE<sub>2</sub>-induzierte Proliferation von HCA-7 Kolonkarzinom-Zellen (Cherukuri et al., 2007). Zudem zeigen sich EP<sub>4</sub>-Knockout-Mäuse weniger suszeptibel für die Induzierung von Darmkrebs (Mutoh et al., 2002).

Genauso treten aber auch weitere EP<sub>4</sub>-vermittelte zellprotektive Effekte auf, die positiv bewertet werden. So trägt die Aktivität des Rezeptors zu neuronaler Ischämie-Toleranz nach Präkonditionierung bei (Choi *et al.*, 2006) und kann Neuronen nach  $\beta$ -Amyloid-Exposition vor oxidativem Stress und Zelltod schützen (Echeverria *et al.*, 2005). In dendritischen Zellen wurde eine EP<sub>4</sub>-vermittelte Steigerung der Apoptose-Toleranz über PI3K festgestellt (Baratelli *et al.*, 2005).

### 1.5 Schäden durch Ischämie/Reperfusion im Herzen und ihre Ursachen

Eine Ischämie des Herzens ist die Unterversorgung (von Teilen) des Myokards mit Sauerstoff und Nährstoffen und tritt infolge eines Koronargefäßverschlusses auf. Die Zellen des betroffenen Gewebebereichs drohen bei längerem Bestehen der Unterversorgung abzusterben, es kommt zu einem Infarkt. Insofern ist es erstrebenswert, die Durchblutung z. B. durch Thrombolyse möglichst schnell wiederherzustellen, d. h. eine Reperfusion herbeizuführen. Aber auch bzw. gerade diese Reperfusion trägt paradoxerweise maßgeblich zur Zellschädigung bei. Bei der Schädigung von Herzgewebe durch I/R spielen nekrotische und apoptotische Prozesse eine Rolle. Die letztendliche Form des Zelltods hängt dabei wesentlich von den konkreten Bedingungen ab und ergibt sich aus dem Zusammenwirken unterschiedlicher Prozesse (Halestrap *et al.*, 2004).

### 1.5.1 Mechanische Zerstörung von Kardiomyozyten bei eintretender Reperfusion

Es gilt als allgemein anerkannt, dass ein wesentlicher Anteil des Kardiomyozytenuntergangs mit einer Ruptur des Sarkolemms einhergeht und in den ersten Minuten der Reperfusion auftritt (Piper *et al.*, 1998). Dies geschieht durch den Ablauf folgender Ereignisse: Bereits während der Ischämie kommt der Großteil der ATP-Produktion infolge des O<sub>2</sub>-Mangels rasch zum Erliegen. Zudem läuft die Glykolyse anaerob ab und führt zur Ansäuerung des Zytosols. Dies wiederum hat u. a. zur Folge, dass einerseits die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nicht länger aktiv ist und andererseits der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher wegen der hohen intrazellulären H<sup>+</sup>-Konzentration viel Na<sup>+</sup> in die Zelle transportiert. Aufgrund der stark ansteigenden zytosolischen Na<sup>+</sup>-Konzentration operiert der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher im reversen Modus und überführt Ca<sup>2+</sup> in die Zelle (Schäfer et al., 2001). Während der Ischämie findet zudem eine rigorartige Kontraktion der Kardiomyozyten statt, da die Kopf-Domäne des Myosins ohne ATP im kontrahierten Zustand am Aktinfilament gebunden bleibt. Diese Kontraktion ist im Prinzip reversibel, verursacht jedoch bereits Schäden am Zytoskelett. Dies macht die Kardiomyozyten auch empfänglicher für weiteren mechanischen Schaden. (Schlüter et al., 1996). Die Schädigung in Form einer Ruptur des Sarkolemms und der Disintegration der Myozyten tritt nun unmittelbar nach Beginn der Reperfusion ein. Die hohe intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt dann, wenn die ATP-Produktion relativ schnell wiederhergestellt wird, zu einer Überaktivierung des kontraktilen Apparates der Zelle (Siegmund et al., 1991). Außerdem nimmt das sarkoplasmatische Retikulum (SR) bei Erholung des Energiestoffwechsels schnell aktiv Ca<sup>2+</sup> aus dem Zvtosol auf. gerät dabei jedoch an seine Kapazitätsgrenzen und stößt Ca<sup>2+</sup> ebenso schnell wieder aus. Dadurch tritt eine starke Oszillation des zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Spiegels mit hohen Spitzenwerten auf, was zusätzlich verstärkend auf die sich ausbildende Hyperkontraktur wirkt und die Zellen mechanisch zerstören kann (Siegmund et al., 1997). Des Weiteren steigt in jenem Moment auch wegen der Wiederherstellung des pH-Wertes die Aktvität von proteolytischen Enzymen wie Calpain, welches die Disintegration des Zytoskeletts vorantreibt (Tsuji et al., 2001; Yoshikawa et al., 2005). Diese Prozesse führen zur Nekrose - man spricht dabei auch von einer Kontraktionsbandennekrose - der betroffenen Zellen, die sich über einen gewissen Bereich ausbreitet. Die Ausbreitung ergibt sich aus der untereinander bestehenden Verbindung der Zellen durch Gap Junctions und trägt zur Vergrößerung des Infarkts bei (Garcia-Dorado et al., 1997 & 1989).

## 1.5.2 Die Rolle der Mitochondrien bei der Entstehung von Ischämie/Reperfusion-Schäden

Ein weiterer Mechanismus, der maßgeblich zur Schädigung von Kardiomyozyten durch I/R beiträgt, stellt die Öffnung mitochondrialer Permeabilität-Transition-Poren (MPTP) dar. Bei den MPTP handelt es sich um unselektive Multiproteinkanäle, welche sich über innere und äußere Mitochondrienmembran erstrecken. Der konkrete Aufbau dieser Kanäle ist nicht zweifelsfrei geklärt. Fest steht, dass sie in geöffnetem Zustand eine Verbindung zwischen Mitochondrien-Matrix, dem Intermembranraum und dem Zytosol darstellen und für Moleküle bis 1,5 kDa permeabel sind (Halestrap *et al.*, 2004 & 2002).

Wie zuvor erwähnt, kommt es während der Ischämie zu einem starken Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und damit auch einer gesteigerten Ca<sup>2+</sup>-Anreicherung in den Mitochondrien. Zudem kommt es vor allem durch die Aktivität von Xanthin-Oxidase und im geringeren Umfang den Komplexen 1 und 3 der Atmungskette (NADH-Dehydrogenase und Cytochrom c-Reduktase) bei länger andauernder Ischämie zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) und damit zu oxidativem Stress (Kevin et al., 2003). Mit dem Einsetzen der Reperfusion tritt eine noch viel stärker ausgeprägte ROS-Bildung auf, welche im Wesentlichen durch die Komplexe 1 und 3 der Atmungskette sowie Xanthin- und NADPH-Oxidase verursacht wird (Becker, 2004; Zweier & Talukder, 2006; Borchi et al., 2008). ROS können eine Reihe von Proteinen zerstören und richten dabei gerade am Ort ihrer Entstehung in den Mitochondrien Schäden an. Beispielsweise sind besonders die Komplexe 1 und 3 der Atmungskette unter den betroffenen Kompenenten zu finden, es kommt zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Atmungskette (Halestrap et al., 2007). Auch die Peroxidbildung an mitochondrialen Membran-Lipiden wie Cardiolipin führt zu einer Verschlimmerung der Situation. Die Öffnung der MPTP geschieht in Reaktion auf eine hohe Ca2+-Konzentration, wird aber während der Ischämie durch den niedrigen pH-Wert inhibiert (Suleiman et al., 2001; Halestrap et al., 2004). Mit der Reperfusion führt der ausgeprägte oxidative Stress zu einer gesteigerten Sensitivität der MPTP gegenüber Ca<sup>2+</sup>. Zudem ermöglicht die Wiederherstellung des pH-Wertes die Öffnung der MPTP. In der Folge kommt es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotenzials und damit auch zur Öffnung weiterer MPTP. Als weiteres Resultat schwellen die Mitochondrien stark an und rupturieren (Bernadi, 1999), womit letztendlich ein vollständiger Verlust der Mitochondrien-Funktion einhergeht. Damit hat die Schädigung der Zelle einen irreversiblen Zustand erreicht und sie wird nekrotisch. Es konnten jedoch auch Zellen beobachtet werden, in welchen der überwiegende Anteil der Mitochondrien eine reversible MPTP-Öffnung erfährt (Kerr *et al.*, 1999). Durch die Freisetzung von Cytochrom C und Pro-Caspasen, die auch bei temporärer Öffnung der MPTP bzw. davon unabhängig geschieht, kann es zur Initiierung der Caspase-Kaskade kommen und die Zelle apoptotisch werden (Correa *et al.*, 2007).

Ein pro-apoptotisches Ereignis, welches ebenfalls zu einer Permeabilisierung von Mitochondrien führen kann, ist die Translokation von Bax, einem Protein der Bcl-2-Familie, aus dem Zytosol in die äußere Mitochondrienmembran (Wolter *et al.*, 1997). Möglicherweise stellt die Bax-Translokation ein der MPTP-Öffnung nachgeschaltetes Ereignis dar, welches maßgeblich zur Disintegration der äußeren Mitochondrienmembran und damit auch zur Cytochrom C-Freisetzung und anschließender Apoptose beiträgt (Correa *et al.*, 2007; Oka *et al.*, 2008).

### 1.5.3 Klinisch relevante Ansätze zur Reduzierung von Reperfusionsschäden und beteiligte Signalwege

Ein mittlerweile seit längerem bekannter Mechanismus, der das Herz wirksam vor Schäden durch I/R schützen kann, ist die Präkonditionierung. Hierbei wird das Myokard bereits vor Beginn der Ischämie mehreren kurzen Ischämieperioden von wenigen Minuten mit intermittierender Reperfusion unterzogen (Murry *et al.*, 1986). Da diese protektiv wirkende Intervention vor einer Ischämie erfolgen muss, stellt sie keine klinisch relevante Therapie dar. Der Präkonditionierung entlehnt ist das analog bezeichnete Verfahren der Postkonditionierung (Zhao *et al.*, 2003). Hierbei wird dem Prinzip nach identisch vorgegangen, die Reperfusion wird durch mehrere Ischämieperioden einer Dauer von mehreren Sekunden bis hin zu einer Minute unterbrochen. Die protektiven Effekte sind mit der Präkonditionierung vergleichbar und das Verfahren kam bereits in klinischen Studien zur Anwendung (Staat *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2006). Zudem wurden anhand dieser Technik protektive Signalwege identifiziert. Daran beteiligte Proteinkinasen wurden als *Reperfusion Injury Salvage Kinases* (RISK) bezeichnet (Hausenloy & Yellon, 2004). Die Proteinkinase G (PKG) sowie die in vorangegenen Kapiteln erwähnten Kinasen PI3K, AKT, GSK3 $\beta$  sowie ERK1/2 werden als Teil des RISK-Systems angesehen (Gomez *et al.*, 2008; Hausenloy & Yellon, 2007; Burley *et al.*, 2007; Piper *et al.*, 2004). Die dabei letztendlich protektiven Effekte der Post-konditionierung sind u. a. eine Begünstigung der mitochondrialen Membranintegrität (v. a. durch verminderte MPTP-Öffnung) und eine erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme-Kapazität des SR.

Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten zu Beginn der Reperfusion, welche die beteiligten Signalwege auf geeignete Art und Weise beeinflussen und somit die protektiven Effekte der Postkonditionierung imitieren, sind Gegenstand aktueller Untersuchungen. Mittlerweile wurden einige derart wirksame Substanzen identifiziert, darunter Insulin, Statine, Fluran-Anästhetika und Erythropoietin (Mudalagiri *et al.*, 2008; Baxter & Burley, 2008).

Insgesamt bestehen viele potenzielle Ansatzpunkte zur Aktivierung kardioprotektiver Signaltransduktion bzw. Inhibierung schädigender Signalwege, die teilweise mit der Signaltransduktion des EP<sub>4</sub>-Rezeptors überlappen.

## 1.6 Zielsetzung

EP<sub>4</sub>-vermittelte Signaltransduktionswege und deren Effekte wurden bereits in verschiedenen Zelllinien und nativen Zellsystemen untersucht. Jedoch ist die Rolle des EP<sub>4</sub>-Rezeptors im Herzen, insbesondere in Kardiomyozyten noch unklar. Vor allem die den Wirkungen bei ischämischen Ereignissen zugrunde liegenden Signalwege sind keinesfalls umfassend und eindeutig geklärt. Es stellt sich die Frage, ob bestimmte Mechanismen, und wenn ja, welche, auf die Situation in Kardiomyozyten übertragen werden können. Das Ziel dieser Arbeit ist es, eben jene Aspekte zu untersuchen und die bisherigen Erkenntnisse zu erweitern. Der Fokus wird daher auf folgende Fragestellungen gelegt:

- Bietet eine gezielte Stimulation des EP<sub>4</sub>-Rezeptors in isoliert perfundierten WT-Mäuseherzen einen Schutz vor Schäden durch Ischämie/Reperfusion?
- Führt die kardiomyozytäre Überexpression des EP<sub>4</sub>-Rezeptors zu kardio-/zytoprotektiven Effekten?
- Sind bekannte Signalwege distal vom EP<sub>4</sub>-Rezeptor in Kardiomyozyten an protektiven Wirkungen beteiligt? Für entsprechende Untersuchungen wird die EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Überexpression in einem kultivierbaren Kardiomyozyten-Modellsystem angestrebt.
- Welche Gene, die in Zusammenhang mit zellprotektiven Wirkungen stehen können, werden in Kardiomyozyten EP4-abhängig reguliert?

Insgesamt sollen mit der vorliegenden Arbeit die noch unvollständigen Kenntnisse über kardiozytäre EP<sub>4</sub>-vermittelte Effekte, die in Zusammenhang mit einer Kardioprotektion stehen, erweitert werden. Dazu soll ein Maus- sowie ein Zellkulturmodell zum Einsatz kommen.

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Chemikalien, Substanzen, Antikörper, Enzyme und Kits

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Jegliche verwendeten Restriktionsenzyme stammten von Fermentas Life Sciences (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (Frankfurt).

| Substanzbezeichnung   | Hersteller   |
|---|--|
| 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (Epac-Aktivator)                                    | Biolog Life Science Institute, Bremen                          |
| Acrylamid-Mix Rotiphorese® Gel 30                                       | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                                      |
| Concanavalin A  | Sigma, München   |
| Diclofenac, Na-Salz   | Sigma, München   |
| Glutathione Sepharose™ 4B   | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg                            |
| GM6001 (MP-Inhibitor)   | Calbiochem, Darmstadt  |
| Heparin-Natrium 25.000  | ratiopharm GmbH, Ulm   |
| L-000902688 (EP₄-Rezeptor-Agonist)                                      | Merck Frosst, Kirkland, Canada<br>(Young <i>et al</i> ., 2004) |
| Luminol, Na-Salz  | Sigma, München   |
| LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor)   | Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA                            |
| Natriumbutyrat  | Sigma, München   |
| p-Hydroxycumarinsäure   | Sigma, München   |
| PD153035, Hydrochlorid (EGFR-Inhibitor)                                 | Tocris Bioscience, Bristol, UK                                 |
| PD98059 (MEK1-Inhibitor)  | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA                    |
| Polyethylenimine (PEI)  | Sigma, München   |
| Prostaglandin $E_1$ bzw. $E_2$  | Biomol GmbH, Hamburg   |
| Protaminsulfat  | Sigma, München   |
| Proteaseinhibitor-Cocktail (For Mammalian<br>Cells and Tissue Extracts) | Sigma, München   |
| Rp-cAMPS, TEA-Salz (PKA-Inhibitor)                                      | Calbiochem, Darmstadt  |
| TRI Reagent®  | Sigma, München   |

Tabelle 2: Chemikalien und Substanzen

| Enzym bzw. Enzym-Kit                                | Hersteller                               |
|---|--|
| AccuSure™ Polymerase                                | Bioline GmbH, Luckenwalde                |
| Alkaline Phosphatase, from calf intestine           | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim         |
| BioArray™ HighYield™ RNA Transcript Labeling<br>Kit | Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA |
| EGFR Tyrosine Phosphorylation Array Kit             | Panomics, Fremont, CA, USA               |
| GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit           | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg      |
| GoTaq® Polymerase                                   | Promega GmbH, Mannheim                   |
| OneStep RT-PCR Kit                                  | QIAGEN GmbH, Hilden                      |
| Plasmid Midi Kit                                    | QIAGEN GmbH, Hilden                      |
| Proteinase K  | QIAGEN GmbH, Hilden                      |
| RNase A   | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim         |
| RNeasy® Mini Kit                                    | QIAGEN GmbH, Hilden                      |
| SuperScript™ Double-Stranded cDNA<br>Synthesis Kit  | Invitrogen GmbH, Karlsruhe               |
| T4 DNA-Ligase                                       | Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot    |
| T4 DNA-Polymerase                                   | Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot    |
| <i>Taq</i> PCR Core Kit                             | QIAGEN GmbH, Hilden                      |

Tabelle 3: Enzyme und Kits

Tabelle 4: Antikörper und verwendete Verdünnungen

| Antikörper   | Hersteller                                     | Verdünnung |
|--|--|------------|
| Caspase-3, #9662                                     | Cell Signaling Technology, Danvers,<br>MA, USA | 1:800      |
| EP₄ Receptor (C-Term) Polyclonal,<br>Cat. No. 101775 | Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA            | 1:200      |
| Epac (H-70), sc-25632                                | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg           | 1:200      |
| NFκB p65 (C-20), sc-372                              | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg           | 1:200      |
| PathScan® Multiplex Western Cocktail<br>I, #7100     | Cell Signaling Technology, Danvers,<br>MA, USA | 1:200      |
| Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrate,<br>#9621            | Cell Signaling Technology, Danvers,<br>MA, USA | 1:1000     |
| Phospho-GSK3β (Ser9), #9336                          | Cell Signaling Technology, Danvers,<br>MA, USA | 1:1000     |
| Phospho-p44/42 Map Kinase<br>(Thr202/Tyr204), #9101  | Cell Signaling Technology, Danvers,<br>MA, USA | 1:1000     |
| Rap 1 (121), sc-65                                   | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg           | 1:200      |
# 2.2 Puffer und Lösungen

| Tabelle 5: Puffer, | Lösungen und de | ren Zusammensetzung |
|--------------------|-----------------|---------------------|
|--------------------|-----------------|---------------------|

| Amidoschwarz-Fä    | rbelösung                                 |
|--------------------|---|
| 25 %               | Isopropanol                               |
| 10 %               | Essigsäure                                |
| 0,1 %              | Amidoschwarz 10B                          |
| ATE-Lösung         |   |
| 80 %               | Ameisensäure                              |
| 10 %               | Trichloressigsäure                        |
| 10 %               | Essigsäure                                |
| DNA-Ladepuffer (   | 5 ×)                                      |
| 15 %               | Glyzerol                                  |
| 0,02 %             | Bromphenolblau                            |
| 0,02 %             | Xylencyanol                               |
| Fisch-Puffer (2 ×) |   |
| 2 %                | NP-40                                     |
| 4 mM               | MgCl <sub>2</sub>                         |
| 100 mM             | Tris/HCl pH 7,5                           |
| 400 mM             | NaCl                                      |
| 20 %               | Glyzerol                                  |
| 2 %                | Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma, P8340) |
| HBSS-Puffer (10 ×  | x)  |
| 1,35 M             | NaCl                                      |
| 50 mM              | KCl                                       |
| 4 mM               | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>          |
| 4,5 mM             | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>           |
| 40 mM              | NaHCO <sub>3</sub>                        |
|                    | pH 7,0 (NaOH)                             |
| HBSS-Puffer (1 ×)  |   |
| 10 × HBSS-Pu       | ffer 1:10 verdünnen und Zugabe von:       |
| 1 mM               | CaCl <sub>2</sub>                         |
| 5,5 mM             | Glukose                                   |
| 10 mM              | HEPES, pH 7,8                             |
| 1 %                | BSA                                       |
| 0,8 mM             | MgSO₄                                     |

| Krebs-Henseleit-F | Puffer   |
|-------------------|--|
| 118 mM            | NaCl   |
| 25 mM             | NaHCO <sub>3</sub>   |
| 8 mM              | Glukose  |
| 2 mM              | Pyruvat  |
| 1,2 mM            | MgSO₄  |
| 1,2 mM            | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |
| 4,7 mM            | KCl  |
| 2 mM              | CaCl <sub>2</sub>  |
|                   | 95 % O <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> , pH 7,4                                 |
| Lämmli-Puffer (4  | ×)   |
| 25 mM             | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer, pH 7,0 |
| 40 %              | Glyzerol   |
| 8 %               | SDS  |
| 0,02 %            | Bromphenolblau   |
| LB-Medium         |  |
| 10 g/l            | Trypton  |
| 5 g/l             | NaCl   |
| 5 g/l             | Hefeextrakt  |
| (1,2 %            | Agar, für Festmedium)  |
|                   | pH 7,5   |
| Lösung 1 (Plasmic | dpräparation)  |
| 25 mM             | Tris/HCl pH 8,0  |
| 10 mM             | EDTA   |
| Lösung 2 (Plasmic | dpräparation)  |
| 0,2 M             | NaOH   |
| 1 %               | SDS  |
| Lösung 3 (Plasmic | dpräparation)  |
| 3 M               | Kaliumacetat   |
| 1,9 M             | Essigsäure   |
|                   | рН 4,8   |
| Luminol-Lösung A  |  |
| 1,25 mM           | Luminol, Na-Salz   |
| 100 mM            | Tris/HCl pH 8,6  |
| Luminol-Lösung B  |  |
| 6,8 mM            | p-Hydroxycumarinsäure  |
|                   | in DMSO  |

| PBS               |   |
|-------------------|---|
| 2,7 mM            | KCI                                       |
| 1,5 mM            | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>           |
| 137 mM            | NaCl                                      |
| 8,3 mM            | Na₂HPO₄                                   |
|                   | pH 7,4                                    |
| Proteinase K-Puff | er  |
| 50 mM             | Tris/HCl pH 8,0                           |
| 100 mM            | EDTA                                      |
| 0,5 %             | SDS                                       |
| Puffer A (Kernext | raktion)                                  |
| 10 mM             | HEPES (pH 7,9)                            |
| 10 mM             | KCI                                       |
| 0,1 mM            | EDTA                                      |
| 0,1 mM            | EGTA                                      |
| 1 %               | Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma, P8340) |
| 1 mM              | DTT (frisch dazugeben)                    |
| 1 %               | PMSF (frisch dazugen)                     |
| Puffer C (Kernext | raktion)                                  |
| 20 mM             | HEPES (pH 7,9)                            |
| 25 %              | Glyzerol                                  |
| 0,4 M             | NaCl                                      |
| 1 mM              | EDTA                                      |
| 1 mM              | EGTA                                      |
| 1 %               | Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma, P8340) |
| 1 mM              | DTT (frisch dazugeben)                    |
| 1 %               | PMSF (frisch dazugen)                     |
| RIA-Puffer        |   |
| 50 mM             | Tris/HCl pH 7,5                           |
| 4 mM              | EDTA                                      |
| Sammelgelpuffer   | (8 ×)                                     |
| 1 M               | Tris/HCl pH 6,8                           |
| 0,8 %             | SDS                                       |
| TAE-Puffer        |   |
| 40 mM             | Tris                                      |
| 1 mM              | EDTA                                      |
| 20 mM             | Essigsäure                                |
| TBS               |   |
| 10 mM             | Tris/HCl pH 7,4                           |
| 150 mM            | NaCl                                      |

| TBS-T             |   |
|-------------------|---|
|                   | TBS + 0,1 % Tween 20                              |
| TE-Puffer         |   |
| 10 mM             | Tris/HCl pH 8,0                                   |
| 1 mM              | EDTA  |
| Transferpuffer    |   |
| 24,7 mM           | Tris  |
| 192 mM            | Glyzin  |
| 20 %              | Methanol  |
| Trenngelpuffer (4 | ! ×)  |
| 1,5 M             | Tris/HCl pH 8,8                                   |
| 0,4 %             | SDS   |
| Trypsin/EDTA      |   |
| 0,5 g/l           | Trypsin   |
| 0,22 g/l          | EDTA  |
|                   | in PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> |

# 2.3 Oligonukleotide und (RT-)PCR-Parameter

| Bezeichnung           | Sequ       | Jenz       | (5'-3     | ')  |     |     |     |     | Produkt-<br>größe (bp) | T <sub>a</sub><br>(°C) | Zyklen-<br>zahl |
|-----------------------|------------|------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|------------------------|------------------------|-----------------|
| αMHCPromUp            | GGC        | TAC        | GGT       | GTA | AAA | GAG | GCA | GG  | 742                    | 60                     | 35              |
| αMHChEPDown           | CGG        | ACG        | AAT       | TGA | CCC | CGG | GAG |     | 743                    |                        |                 |
| hEP4Up                | TCA        | TCG        | ACT       | GGA | CCA | CCA | ACG |     | 405                    | <b>F</b> 4             | 20 25           |
| hEP4Down              | CTT        | CTC        | GCT       | CCA | AAC | TTG | GCT | G   | 405                    | 54                     | 20 - 22         |
| αMHCPromUp            | GGC        | TAC        | GGT       | GTA | AAA | GAG | GCA | GG  | 557                    | 60                     | 35              |
| αMHCNeoDown           | GCA        | TCA        | GAG       | CAG | CCG | ATT | GTC |     | 227                    | 60                     |                 |
| NCEP3Up               | ACT        | GTG        | GTG       | CCT | CGT | TCC | AG  |     | 797 (DNA)              | 58                     | 40              |
| αMHCNeoDown           | GCA        | TCA        | GAG       | CAG | CCG | ATT | GTC |     | 506 (RNA)              |                        |                 |
| NEWneofloxSal<br>Up   | ATT<br>GCA | AGT<br>TAC | CGA<br>AT | CGA | TAA | CTT | CGT | ATA | 4257                   | 56                     | 40              |
| NEWneofloxSal<br>Down | ATT<br>ATG | AGT<br>TAT | CGA<br>GC | CGA | TAA | CTT | CGT | ATA | 1200                   |                        |                 |
| rAmphiUp              | CTG        | TCG        | TGT       | TGC | CGC | AGA | GAC |     | E24                    | 60                     | 25              |
| rAmphiDown            | AAT        | GGC        | AGG       | TCA | CCA | CCT | CCA | G   | 554                    | 00                     | 20              |
| GAPDHUp               | TGA        | TGA        | CAT       | CAA | GAA | GGT | GGT | GAA | 220                    | 50 -                   | 25 40           |
| GAPDHDown             | TCC        | TTG        | GAG       | GCC | ATG | TGG | GCC | AT  | 230                    | 62                     | 23 - 40         |
| HPRT1Up               | CAG        | TCT        | AGT       | GTA | GTA | CCA | TTA | G   | 276                    | 60                     | 35              |
| HPRT1Down             | TGG        | ATT        | ATT       | GCC | AGA | GCT | TGG | С   | 270                    |                        |                 |

Tabelle 6: Zur PCR bzw. RT-PCR eingesetzte Oligonukleotide

# 2.4 Zellkultur

H9c2-Rattenkardiomyoblasten wurden in DMEM Nährmedium bei 37 °C und 5 %  $CO_2$  kultiviert und maximal bis Passage 30 verwendet. Bei Erreichen einer Zelldichte von ca. 90 % Konfluenz wurden die Zellen nach Waschen mit PBS durch 5-minütiges Einwirken von Trypsin/EDTA (0,5 mg/ml, 0,22 mg/ml) abgelöst und in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 subkultiviert.

HEK 293T-Zellen zur Produktion von Lentiviren (s. 2.10.1) wurden in einer Dichte von ca. 100.000/cm<sup>2</sup> in zuvor mit Gelatine (1g/l, 60 min Einwirkzeit) beschichtete 10 cm-Kulturschalen ausgesät. Das Medium und die Kulturbedingungen waren zu den oben für die H9c2-Zellen beschriebenen identisch. Während der Produktion der lenti-

viralen Partikel wurden die Zellen in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) inkubiert. Details zu den Zelllinien und Kulturmedien sind Tabelle 7 zu entnehmen.

| Zelllinie   | Beschre  | ibung                         | Kulturmedium   |  |
|---|--|-------------------------------|--|--|
| HEK 293T/17,  | <i>Human Embryonal Kidney-</i><br>Zelllinie mit SV40 T-Antigen;<br>optimiert zur Produktion<br>lentiviraler Partikel |                               | a) DMEM Nährmedium   |  |
| AICC <sup>®</sup> -Nr. CRL-11268,<br>LGC Promochem, Wesel |  |                               | b) während der Produktion<br>lentiviraler Partikel:<br>IMDM Nährmedium |  |
| H9c2(2-1),<br>ATCC®-Nr. CRL-1446,<br>LGC Promochem, Wesel | Kardiomyoblasten, abgeleitet<br>aus embryonalem Rattenherz-<br>Gewebe  |                               | DMEM Nähr- bzw.<br>Hungermedium  |  |
| Zus   | ammensetzung d   | ler Zellkulturn               | nedien   |  |
| <b>DMEM:</b> Dulbecco's Modifi<br>BestNr. 11885-084       | ed Eagle's Medium  | n, low glucose,               | Invitrogen GmbH,   |  |
| 1) Nährmedium   |  | + 10 % FKS, + 3,5 g/l Glukose |  |  |
|   |  | + 100 U/ml Penicillin         |  |  |
| 2) Hungermedium   |  | + 100 U/ml Penicillin         |  |  |
|   |  | + 100 µg/ml Streptomycin      |  |  |
| IMDM: Iscove's Modified I                                 | IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma, BestNr. 13390  |                               |  |  |
| 1) Nährmedium   |  | + 10 % FKS (hitzeinaktiviert) |  |  |
|   |  | + 100 U/ml Penicillin         |  |  |
|   |  | + 100 μg/ml Streptomycin      |  |  |

Tabelle 7: Zelllinien und Kulturmedien

# 2.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Konfokale Mikroskopie-Aufnahmen von lebenden H9c2-Zellen wurden mittels eines Zeiss LSM510-Systems angefertigt. Hierfür wurden auf 22 mm-Deckgläschen gewachsene Zellen zuvor ÜN in Hungermedium mit 1 µM Diclofenac inkubiert. Zum Nachweis des YFP-markierten EP<sub>4</sub>-Rezeptors wurde die Argonlaser-Linie von 488 nm zur Anregung und eine Filtereinstellung von 505 bis 530 nm zur Detektion verwendet (Anregungsmaximum YFP: 514 nm, Emissionsmaximum YFP: 527 nm). Es wurden Z-Stapel-Aufnahmen mit einer Auflösung von 1 µm generiert, um darunter auch einen Querschnitt durch die exakte Mitte der Z-Achse der Zelle zu erzielen.

# 2.6 Präparation und Analyse von DNA

# 2.6.1 Transformation chemokompetenter E. coli

Die Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode sowie die Transformation der Bakterien erfolgte auf Grundlage der Methoden von Hanahan (1985). Im Zuge von Plasmidkonstruktionen wurden zur Transformation jeweils 150 µl der kompetenten *E. coli*-Zellen mit einem halben Ligationsansatz (10 µl, s. 2.6.6) versetzt und 30 min unter gelegentlichem Schütteln auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock für 60 s bei 37 °C und die Zugabe von 800 µl LB-Medium (Tab. 5). Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C unter Schütteln wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (6.000 rpm, 2 min, Eppendorf 5415 C, Eppendorf, Hamburg) und das Pellet in ca. 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf Ampicillin-haltigem (100 µg/ml) LB-Festmedium ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Einige Kolonien resistenter Bakterien wurden am nächsten Tag zum Animpfen von je 3 ml LB-Medium mit Ampicillin verwendet. Die entsprechenden Kulturen wurden 8 bis 18 h bei 37 °C inkubiert und zur Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab verwendet (s. 2.6.3).

### 2.6.2 Kultivierung von E. coli

Genotyp des verwendeten E. coli-Stammes DH5aF':

F'  $\phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-*arg*F)U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17( $r_k^-, m_k^+$ ) *sup*E44 *thi*-1 *gyrA rel*A1 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Medium (Tab. 5) unter Schütteln bei 37 °C für ca. 16 bis 18 h. Für die Herstellung von festen Nährböden wurde 1,2 % Agar (Gibco BRL) hinzugefügt. Zur Selektion von Bakterien mit Plasmid-vermittelter Ampicillin-Resistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

### 2.6.3 Plasmid-DNA-Präparation

Zur Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA ("Mini-Maßstab") wurde diese aus je 2 ml *E. coli*-Kultur nach der Methode von Birnboim & Doly (1979) unter Verwendung der Lösungen 1 bis 3 (Tab. 5) gewonnen. Zur Präparation größerer Plasmid-DNA-Mengen wurde das "Plasmid Midi Kit" von QIAGEN (Hilden) nach Herstellerangaben benutzt oder die nachfolgend beschriebene Methode der Lithiumchlorid-Präparation angewandt. Hierzu wurden die mittels Zentrifugation (8.000 rpm, 15 min, 4 °C; Beckman J2-HS, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) aus 30 ml Kultur sedimentierten Bakterien in 2 ml Lösung 1 resuspendiert, durch Zugabe von 2,4 ml Lösung 2 lysiert und die daraufhin in Komplexen vorliegenden Proteine, genomische DNA sowie Zellmembran-Bruchstücke durch Zugabe von 3 ml Lösung 3 ausgefällt. Die Neutralisierung des pH-Werts durch Lösung 3 führte zudem zur Wiederherstellung der Basenpaar-Bindung der katenierten Plasmid-DNA-Ringe. In einer anschließenden Zentrifugation (12.000 rpm, 30 min, 4 °C; Beckman J2-HS) wurde die Lösung vom Präzipitat befreit. Aus dem Überstand erfolgte die Präzipitation der enthaltenen Nukleinsäuren (Plasmid-DNA und RNA) durch Zugabe von 1 Volumen kaltem 100% igem Ethanol und anschließender Zentrifugation (10.000 rpm, 30 min, 4 °C; Beckman J2-HS). Nach Rücklösen des Pellets in 200 µl H<sub>2</sub>O wurde die RNA durch Zufügen von 345 µl eiskaltem 4 M LiCl und 7 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 gefällt und durch Zentrifugation (13.000 rpm, 30 min, 4 °C; Biofuge 13, Heraeus Sepatech, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) aus der Probe entfernt. Die Plasmid-DNA wurde aus dem wässrigen Überstand durch Zugabe von 3 Volumen kaltem 100% igem Ethanol gefällt und durch Zentrifugation (Parameter wie im vorigen Schritt) pelletiert. Resuspendieren des Pellets in RNase A-haltigem TE-Puffer (0,1 mg/ml RNase A, jeweils frisch aus wässriger Lösung mit 10 mg/ml 1:100 in TE-Puffer verdünnt) und Inkubation für 15 min bei 37 °C diente dem Abbau noch verbliebener RNA-Reste. Durch zweimaliges Ausschütteln der Probe mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) gefolgt von einem Ausschütteln mit Chloroform (je 1 Volumen) wurde die RNase A entfernt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen kaltem Ethanol. Nachfolgend wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (13.000 rpm, 20 min, 4 °C; Biofuge 13) pelletiert. Nach Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol wurde die DNA in H<sub>2</sub>O rückgelöst und bei -20 °C gelagert.

# 2.6.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Sequenzspezifisches Schneiden von Plasmid-DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firmen Fermentas Life Sciences (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt). Puffer und Inkubationstemperatur wurden nach Herstellerangaben gewählt. Für 1 µg Plasmid-DNA wurde 1 U Enzym eingesetzt und die DNA für eine Stunde bei der für das Enzym angegebenen Temperatur inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme zur Inaktivierung bei der durch den Hersteller vorgesehenen Temperatur für 20 min inkubiert.

# 2.6.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen und DNA-Gelextraktion

Zur Auftrennung von Nukleinsäureproben wurden diese mit 1/10 ihres Volumens an DNA-Ladepuffer versetzt und in horizontalen 1 × TAE-Agarosegelen (0,8-1,2 %) bei 70-80 V aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte nach 20-minütiger Inkubation der Gele in 1 × TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid mit Hilfe eines "Gel Doc XR"-Systems (Bio-Rad, München). Zur weiteren Verwendung benötigte DNA-Fragmente aus Restriktionsansätzen wurden mit Hilfe des "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben extrahiert.

### 2.6.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung der angestrebten Plasmidkonstrukte (s. 2.8 und 2.10.2) wurden die Restriktionsansätze (s. 2.6.4) gelelektrophoretisch aufgetrennt und die benötigten DNA-Fragmente extrahiert (s. 2.6.5). Geschnittene Vektoren wurden zwecks Vermeidung ihrer Religation vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben inkubiert (ca. 1 U/3 µg DNA). Aus einem solchen Dephosphorylierungsansatz wurde die Vektor-DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion zurück gewonnen. Bei einer *blunt end*-Ligation wurden die Enden der DNA-Fragment mit T4-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben aufgefüllt. Die Ligation von Vektor und Insert erfolgte anschließend mit T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) in einem 20 µl-Ansatz nach Herstellerangaben, wovon die Hälfte zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet wurde (s. 2.6.1).

#### 2.6.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifikation der loxP-flankierten Neomyzin-Resistenz aus dem Plasmid neoflox-8 (Abb. 10) erfolgte unter Verwendung der AccuSure<sup>™</sup> Polymerase (Bioline GmbH, Luckenwalde) auf Basis der Herstellerangaben. Hierzu wurden die Oligonukleotide NEWneofloxSalUp/Down (Tab. 6) in einer Endkonzentration von 1,6 µM eingesetzt. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

| Zeit (min) | Temper | ratur (°C) |
|------------|--------|------------|
| 10         | 95     |            |
| 1          | 94     | J          |
| 1          | 56     | } 40 ×     |
| 1,5        | 68     | J          |
| 5          | 68     |            |

Zum Transgen-Nachweis in Schwanzspitzen-DNA von Mäusen (s. 2.9.1) wurde entweder die GoTaq<sup>®</sup> Polymerase (Promega GmbH, Mannheim) oder das *Taq* PCR Core Kit von QIAGEN (Hilden) benutzt. In den je 25 µl Gesamtvolumen umfassenden Ansätzen wurden sämtliche Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1,6 µM zugesetzt. Nähere Angaben zu den verwendeten Oligonukleotid-Paaren finden sich in Tabelle 6 sowie in Kapitel 2.9, Tabelle 9. Jeweils 200 bis 400 ng Matrizen-DNA wurden mit folgendem PCR-Programm analysiert:

| Zeit  | Temperatur (°C)          |  |  |  |
|-------|--------------------------|--|--|--|
| 5 min | 94                       |  |  |  |
| 1 min | 94 ]                     |  |  |  |
| 1 min | 58 - 60 <b>&gt;</b> 35 × |  |  |  |
| 50 s  | 72 J                     |  |  |  |
| 5 min | 72                       |  |  |  |

### 2.6.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von wässrigen Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm mit einem Nanodrop-1000-Photometer (Peqlab, Erlangen). Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht dabei 40  $\mu$ g/ml RNA bzw. 50  $\mu$ g/ml DNA. Die Reinheit kann näherungsweise anhand des Quotienten A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> bestimmt werden und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

# 2.7 Präparation und Analyse von RNA

# 2.7.1 RNA-Extraktion aus Gewebe und Zellen

Die Herstellung von RNA-Proben aus verschiedenen Geweben geschah unter Verwendung des "RNeasy<sup>®</sup> Mini"-Kit der Firma QIAGEN (Hilden) nach den jeweils dafür vorgesehenen Herstellerangaben. RNA aus konfluent gewachsenen kultivierten Zellen wurde mit "TRI Reagent<sup>®</sup>" (Sigma, München) nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA von Zellen einer Kammer einer 6-Loch-Platte wurde dabei jeweils in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst und nach der Quantifizierung bei -20 °C gelagert.

# 2.7.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Anfertigung semiquantitativer RT-PCR-Analysen wurde das "OneStep RT-PCR Kit" (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die für die verschiedenen Nachweise eingesetzten Oligonukleotide sowie die verwendeten Bedingungen der *Thermocycler*-Programme sind Tabelle 6 zu entnehmen. Für die Durchführung der RT-PCR kam ein "TRIO-Thermoblock" (Biometra, Göttingen) zum Einsatz. Als interner Standard wurde die Expression der Glyzerolaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen.

### 2.7.3 Genexpressions analyse in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP nach EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Stimulation

Zur Identifikation EP<sub>4</sub>-regulierter Gene im vorliegenden Zellmodell wurden Microarray-Untersuchungen unter Einsatz des "GeneChip<sup>®</sup> Rat Expression Array 230A" (Affymetrix, High Wycombe, UK) durchgeführt. Hierzu fanden RNA-Proben aus H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen Verwendung, welche für 24 h in Hungermedium mit 1  $\mu$ M Diclofenac inkubiert wurden. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist L-000902688 bzw. Vehikel und die weitere Inkubation für 6 h. Zur Durchführung der Microarray-Analyse wurden jeweils 2  $\mu$ g Gesamt-RNA verwendet, welche mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN, Hilden) präpariert wurden. Die Microarray-Analyse erfolgte nach der folgend beschriebenen Vorgehensweise:

Die RNA wird mit Hilfe des "SuperScript<sup>™</sup> Double-Stranded cDNA Synthesis Kit" (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in cDNA umgeschrieben. Dabei kommt ein Poly-Thymidin-Oligonukleotid mit angehängter T7-Promotor-Sequenz zum Einsatz. Die Aufreinigung der cDNA erfolgt mit dem "GeneChip<sup>®</sup> Sample Cleanup Module" (Affymetrix, High Wycombe, UK). Es schließt sich die *in vitro*-Transkription der cDNA in Biotinmarkierte cRNA mit dem "BioArray<sup>™</sup> HighYield<sup>™</sup> RNA Transcript Labeling Kit" (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) an. Zur Aufreinigung der cRNA wird wieder das "GeneChip<sup>®</sup> Sample Cleanup Module" (Affymetrix, High Wycombe, UK) verwendet. Vor der Hybridisierung erfolgt die Fragmentierung der cRNA durch Inkubation mit einem Fragmentierungspuffer (Affymetrix, High Wycombe, UK). Nach Hybridisierung der biotinylierten cRNA-Fragmente und mehreren Waschschritten liegen auf dem DNA-Chip DNA-RNA-Oligonukleotid-Hybride vor, welche mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat angefärbt werden. Schließlich kann das Scannen des Chips und die Datenauswertung erfolgen. Abbildung 4 fast das Vorgehen schematisch zusammen.



**Abbildung 4:** Schema der DNA-Microarray-Analyse zur Identifikation EP<sub>4</sub>-regulierter Gene in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen. ds: doppelsträngig, ss: einzelsträngig

Die Verarbeitung der RNA-Proben erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dr. Röder, Institut für onkologische Chemie, Universitätsklinikum Düsseldorf. Die Auswertung der Scan-Daten erfolgte mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite 5.0. Zusätzlich wurden die Ergebnisse einer eingehenderen Analyse durch Herrn Dr. Hafner im hiesigen Institut unterzogen. Hierbei kam die Open Source Software "R", Version 2.5.0 (R Foundation for Statistical Computing, http://www.r-project.org/) mit den Paketen "SpikelnSubset", "affy", "annaffy" und "limma" zum Einsatz. Die Verwendeten Funktionen bzw. Algorithmen umfassten "rma - standard normalisation" und "lmFit - linear model for series of arrays".

# 2.8 Klonierung von Plasmiden zur kardiospezifischen Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors in Mäusen

Zur angestrebten Erzeugung von Mäusen mit kardiospezifischer Überexpression des EP₄-Rezeptors kamen insgesamt drei verschiedene DNA-Konstrukte zum Einsatz, von denen zunächst zwei im Laufe dieser Arbeit kloniert wurden. Die in diesem Zusammenhang verwendeten Plasmide sind zusammenfassend in Tabelle 8 aufgeführt.

| Plasmid                   | Inhalt/Beschreibung  | Herkunft   |
|---------------------------|--|--|
| pNC1 hEP₄-YFP             | kodierende Sequenz des humanen EP₄-Rezeptors mit C-<br>terminaler YFP-Markierung unter Kontrolle des αMHC-<br>Promotors, zur Generierung transgener Mäuse mit kar-<br>diospezifischer Überexpression   | PD Dr.<br>Jutta Meyer-Kirchrath  |
| pCMV SPORT<br>hEP₄        | kodierende Sequenz des humanen $\text{EP}_4\text{-Rezeptors}$ ohne Markierung unter Kontrolle des CMV-Promotors, zur Konstruktion von pNC1 hEP_4   | PD Dr.<br>Jutta Meyer-Kirchrath  |
| pNC1 hEP₄                 | kodierende Sequenz des humanen EP₄-Rezeptors ohne<br>Markierung unter Kontrolle des αMHC-Promotors, zur<br>Generierung transgener Mäuse mit kardiospezifischer<br>Überexpression   | diese Arbeit   |
| neoflox-8                 | kodierende Sequenz der Aminoglykosid-Phosphotrans-<br>ferase (Neomyzin-Resistenz) flankiert von gleichgerich-<br>teten loxP-Sequenzen, Matrizen-DNA für PCR zur Kon-<br>struktion von pNC1 hEP4-YFP neoflox  | Institut für Entwicklungs-<br>und Molekularbiologie<br>der Tiere,<br>Prof. Dr. Ulrich Rüther |
| pGEM <sup>®</sup> -5Zf(+) | Klonierungsvektor zur Insertion von loxP-flankierter<br>Neomyzin-Resistenz zum Erhalt von pGEM neoflox   | Promega, Mannheim  |
| pGEM neoflox              | Zwischenkonstrukt zur Entfernung von <i>BamHI</i> -Schnitt-<br>stelle aus Insert (vgl. 2.8.2), für anschließende Kon-<br>struktion von pNC1 hEP4-YFP neoflox   | diese Arbeit   |
| pNC1 hEP₄-YFP<br>neoflox  | kodierende Sequenz des humanen EP₄-Rezeptors mit C-<br>terminaler YFP-Markierung und vorgeschalteter loxP-<br>flankierter Neomyzin-Resistenz unter Kontrolle des<br>αMHC-Promotors, zur Generierung transgener Mäuse mit<br>konditioneller kardiospezifischer Überexpression | diese Arbeit   |

**Tabelle 8:** Auflistung und Beschreibung der verwendeten Plasmide zur kardiospezifischen Überexpression von  $EP_4$  in Mäusen

Zu Beginn der Arbeit lag ein DNA-Konstrukt auf Basis des Plasmids pNC1 vor, in welchem die kodierende Sequenz des humanen  $EP_4$ -Rezeptors mit C-terminal fusionierter YFP-Markierung dem  $\alpha$ -MHC-Promotor nachgeschaltet war (pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP,



Abb. 5). Diese Kombination sollte die kardiospezifische Überexpression von  $EP_4$  im Mäuseherzen ermöglichen.

**Abbildung 5:** Plasmid pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP zur Generierung transgener Mäuse mit kardiospezifischer Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung.  $\alpha$ -MHC:  $\alpha$ -Myosin schwere Kette, Hgh-Poly(A): Polyadenylierungssignal des menschl. Wachstumshormon-Gens, ColE1 ori: Replikationsursprung d. ColE1-Plasmids, bla:  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin-Resistenz),  $\alpha$ MHCPromUp/hEPDown: Oligonukleotid-Paar für PCR zur Genotypisierung, hEP4Up/Down: Oligonukleotid-Paar für RT-PCR zum Expressionsnachweis

Als Alternativen gegenüber dem ursprünglich zur Generierung kardial EP<sub>4</sub>-transgener Mäuse vorgesehenen Plasmid "pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP" wurden zwei modifizierte Plasmide konstruiert. Eines enthielt die hEP<sub>4</sub>-Sequenz ohne YFP-Markierung (s. 2.8.1), das andere wurde um eine vor hEP<sub>4</sub>-YFP lokalisierte Aminoglykosid-Phosphotransferase-Sequenz (*neo*, vermittelt Neomyzin-Resistenz), flankiert von zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen, erweitert (s. 2.8.2). Damit sollte einerseits ein möglicher unerwünschter Effekt der C-terminalen YFP-Markierung des Rezeptors umgangen und im anderen Fall die Voraussetzung für eine induzierbare EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Überexpression im adulten Tier geschaffen werden.

# 2.8.1 EP<sub>4</sub>-Rezeptor ohne YFP-Markierung: pNC1 hEP<sub>4</sub>

Ausgehend von einem bereits vorliegenden Konstrukt des humanen  $EP_4$ -Rezeptors ohne YFP-Markierung in dem Plasmid pCMV·SPORT6 ("pCMV SPORT hEP<sub>4</sub>", Abb. 6) wurde die Sequenz des  $EP_4$ -Rezeptors mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Sal*I und *Hind*III ausgeschnitten.



**Abbildung 6**: Plasmid pCMV SPORT hEP<sub>4</sub>. Enthält die kodierende Sequenz des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung. SV40-Poly(A): Polyadenylierungssignal von Simian Virus 40, f1 ori: Replikationsursprung des Bakteriophagen f1, bla:  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin-Resistenz), pUC ori: Replikationsursprung pUC-basierter Plasmide, CMV: Cytomegalovirus

Der Vektor pNC1 wurde nach Schneiden mit Sall und HindIII zwecks Vermeidung seiner Religation mit alkalischer Phosphatase nach Herstellerangaben inkubiert (ca. 1 U/3 µg DNA). Die Restriktionsansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, dann erfolgte die Extraktion der gewünschten DNA-Fragmente (2.177 bp Insert & 9.046 bp Vektor). Nach Ligation der Fragmente mit T4-DNA-Ligase wurde der Ansatz zur Transformation kompetenter *E. coli* verwendet (s. 2.6.1). Daraus gewachsene Ampicillin-resistente Klone wurden zur Gewinnung von Plasmid-DNA (s. 2.6.3) verwendet, die wiederum durch eine *Sall-Hind*III-Testrestriktion auf das Vorhandensein des Inserts überprüft wurde. Nach Präparation der gewünschten Plasmid-DNA im Midi-Maßstab lag das Plasmid pNC1 hEP<sub>4</sub> (Abb. 7) vor.



**Abbildung 7:** Plasmid pNC1 hEP<sub>4</sub> zur Generierung transgener Mäuse mit kardiospezifischer Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors ohne YFP-Markierung.  $\alpha$ -MHC:  $\alpha$ -Myosin schwere Kette, Hgh-Poly(A): Polyadenylierungssignal des menschl. Wachstumshormon-Gens, ColE1 ori: Replikationsursprung d. ColE1-Plasmids, bla:  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin-Resistenz),  $\alpha$ MHCPromUp/hEPDown: Oligonukleotid-Paar für PCR zur Genotypisierung

# 2.8.2 Konditionelle Überexpression des EP<sub>4</sub>-Rezeptors: pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP neoflox

Zur gezielt induzierbaren Expression von hEP<sub>4</sub> in transgenen adulten Mäusen wurde vor der hEP<sub>4</sub>-YFP-Sequenz des bestehenden Plasmids pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP (Abb. 5) eine von loxP-Stellen flankierte Neomyzin-Resistenz (neo) eingefügt, um das Plasmid pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP neoflox zu erhalten (Abb. 8). In dieser Abfolge kommt es zur Expression von neo, nicht jedoch von hEP<sub>4</sub>-YFP, da die Translation am ersten Stopp-Codon abbricht. Werden derart transgene Tiere mit bereits verfügbaren Mäusen gekreuzt, welche eine induzierbare Cre-Rekombinase exprimieren, kann in doppelt transgenem Nachwuchs die Expression von hEP4-YFP durch Induktion der Cre-Rekombinase-Aktivität ermöglicht werden. Letzteres geschieht im angestrebten Modell durch die Gabe des Östrogen-Rezeptor-Antagonisten Tamoxifen. Die in der Maus gebildete Cre-Rekombinase ist ein Fusionsprotein mit flankierenden, mutierten Ligandenbindungs-Domänen des Östrogen-Rezeptors (Dawinder et al., 2001). Die Mutation hierin führt zu einer Unenmpfindlichkeit gegenüber physiologischen Konzentrationen des natürlichen Liganden 17B-Estradiol, während die Sensibilität gegenüber Tamoxifen erhalten bleibt (Danielian et al., 1993). In Abwesenheit von Tamoxifen interagiert das Fusionsprotein mit Hsp90 und wird so an der Translokation in den Nukleus gehindert (Mattioni *et al.*, 1994). Diese Interaktion bleibt mit gebundenem Tamoxifen aus, die Cre-Rekombinase kann somit im Kern die Exzision der von loxP-Stellen flankierten DNA-Region bewirken. Auf diese Weise kann die kardiale Überexpression von hEP<sub>4</sub>-YFP gezielt im Adultstadium erfolgen (Abb. 9).



Abbildung 8: Plasmid pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP neoflox zur Generierung transgener Mäuse mit induzierbarer kardiospezifischer Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung.  $\alpha$ -MHC:  $\alpha$ -Myosin schwere Kette, loxP: Erkennungssequenz für Cre-Rekombinase, neo<sup>R</sup>: Aminoglykosid-Phosphotransferase (Neomyzin-Resistenz), Hgh-Poly(A): Polyadenylierungssignal des menschl. Wachstumshormon-Gens, ColE1 ori: Replikationsursprung d. ColE1-Plasmids, bla:  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin-Resistenz),  $\alpha$ MHCPromUp/NeoDown: Oligonukleotid-Paar für PCR zur Genotypisierung, NCEP3Up/ $\alpha$ MHCDown: Oligonukleotid-Paar zum Expressionsnachweis



Abbildung 9: Vorgehen zur Generierung transgener Mäuse, welche die gezielte Induktion *EP*₄-*Überexpression* Adultstadium der kardialen im ermöglichen. **A**: Das BamHI-Fragment aus pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP neoflox wird zur Generierung transgener Mäuse verwendet, die mit Mäusen gekreuzt werden, welche eine zunächst inaktive Cre-Rekombinase exprimieren. B: Doppel-transgener Nachwuchs exprimiert hEP<sub>4</sub> zunächst nicht, da die Cre-Rekombinase basal inaktiv ist. Deren Aktivität kann durch Gabe von Tamoxifen induziert werden, wodurch es zur Expression des hEP<sub>4</sub>-Transgens kommt. C: Die durch Tamoxifen aktivierte Cre-Rekombinase vermittelt die Exzision der loxP-flankierten neo<sup>R</sup>-Sequenz unter Zurückbleiben einer loxP-Stelle. Dadurch wird die gebildete mRNA des EP<sub>4</sub>-Rezeptorkonstruktes translatiert und es kommt zu dessen Expression.

Das hierfür benötigte Plasmid pNC1 hEP₄-YFP neoflox wurde auf folgende Weise konstruiert: Die Neomyzin-Resistenz-Kassette (*neo*) mit flankierenden loxP-Sequenzen wurde durch eine PCR mit den Oligonukleotiden "NEWneofloxSalUp" und "NEWneofloxSalDown" und der AccuSure<sup>™</sup> Polymerase (Bioline GmbH, Luckenwalde) aus dem Plasmid neoflox-8 (Abb. 10) amplifiziert (s. 2.6.7). Dieses wurde dankenswerterweise vom Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere zur Verfügung gestellt.



Abbildung 10: Plasmid neoflox-8. Die Neomyzin-Resistenz-Kassette mit flankierenden loxP-Sequenzen wurde mittels PCR amplifiziert und zur Konstruktion von pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP neoflox verwendet. loxP: Erkennungssequenz für Cre-Rekombinase, neo<sup>R</sup>: Aminoglykosid-Phosphotransferase (Neomyzin-Resistenz), bla:  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin-Resistenz), pMB1 ori: Replikationsursprung des pMB1-Plasmids

Der PCR-Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und das gewünschte Produkt einer Länge von 1.256 bp mit neu eingeführten *Sal*I-Schnittstellen an den Flanken aus dem Gel extrahiert. Dieses wurde dann in einer "blunt end"-Ligation in den Vektor pGEM®-5Zf(+) (Promega, Mannheim) kloniert, welcher zuvor mit *Eco*RV linearisiert und mit alkalischer Phosphatase behandelt worden war. Im resultierenden Konstrukt (pGEM neoflox) konnte die zwischen *neo* und der dahinter liegenden loxP-Stelle lokalisierte *Bam*HI-Schnittstelle entfernt werden. Hierzu wurde das Plasmid mit *Bam*HI geschnitten, die Enden mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und religiert. Dies war erforderlich, da im finalen Konstrukt (pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP neoflox) *Bam*HI wurde, um die zu injizierende DNA-Sequenz in linearisierter Form zu erhalten. Im Anschluss wurde die loxP-Stellen-flankierte Neomyzin-Resistenz-Kassette mit Sall ausgeschnitten und in das analog geschnittene Plasmid pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP kloniert. Das modifizierte Plasmid mit gewünschter Orientierung des Inserts konnte letztendlich durch eine Xhol-Testrestriktion selektiert werden. Die richtige Orientierung wurde durch ein 3.271 bp großes Fragment angezeigt, welches bei falscher Orientierung 2.120 bp groß gewesen wäre.

# 2.9 Erzeugung und Analyse transgener Mäuse

Die jeweils mittels *Bam*HI aus pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP, pNC1 hEP<sub>4</sub> und pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP neoflox (Abb. 5, 7 und 8) ausgeschnittenen EP<sub>4</sub>-Konstrukte wurden im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere (Prof. Dr. Ulrich Rüther) zur Injektion in Maus-Vorkerne (C57BL/6 × C3H-Hybrid) verwendet. Daraus entstandenen Tieren wurden im Alter von vier Wochen Schwanzspitzen zur Genotypisierung entnommen, um den Erfolg der Transgen-Insertion mittels PCR zu kontrollieren. Informationen zu den verwendeten Oligonukleotiden sowie deren Bindestellen finden sich in den Tabellen 6 und 9 sowie in den Plasmidkarten.

| Mäuse auf Basis von   | Oligonukleotid-Paar für<br>PCR | Produktgröße bei<br>positivem Nachweis |
|-----------------------|--------------------------------|--|
| pNC1 hEP₄             | αMHCPromUp/<br>αMHChEPDown     | 743 bp                                 |
| pNC1 hEP₄-YFP         | αMHCPromUp/<br>αMHChEPDown     | 743 bp                                 |
| pNC1 hEP4-YFP neoflox | αMHCPromUp/<br>αMHCNeoDown     | 557 bp                                 |

**Tabelle 9:** Oligonukleotid-Paare zum Transgen-Nachweis in Schwanzspitzen-DNA und erwartete Produktgrößen. Details zu den Oligonukleotiden finden sich in Tabelle

Transgene Tiere wurden mit C57BL/6-Wildtyp-Mäusen gekreuzt, um heterozygot transgenen Nachwuchs zu erzeugen. Einigen solchen Tieren der F1-Generation wurden neben dem Herzen weitere Organe entnommen und deren RNA nach Extraktion mit dem RNeasy<sup>®</sup>-Kit (QIAGEN, Hilden) laut Herstellerangaben mittels RT-PCR auf die Expression des Transgens hin kontrolliert (s. 2.7.2).

# 2.9.1 Präparation genomischer DNA aus Maus-Schwanzspitzen

Die Schwanzspitzen der zu genotypisierenden Mäuse wurden in je 0,7 ml Proteinase K-Puffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K bei 55 °C ÜN verdaut. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA. Diese wurde nachfolgend aus der wässrigen Phase durch Zugabe eines Zehntel Volumens 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und eines Volumens Ethanol gefällt. Nach ihrer Pelletierung wurde die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, in 100 µl TE-Puffer rückgelöst und für eine anschlie-Bende PCR verwendet (s. 2.6.7).

# 2.10 Lentivirale Expression des humanen EP₄-Rezeptors in Kardiomyoblasten

Zur Generierung eines Zellmodell-Systems mit Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors wurde dessen kodierende Sequenz mit angefügter C-terminaler YFP-Markierung mittels lentiviraler Partikel stabil in das Genom von H9c2-Zellen integriert. Die dafür benötigten Lentiviren wurden durch Co-Transfektion von HEK 293T-Zellen mit drei verschiedenen Plasmiden erzeugt. Tabelle 10 enthält eine Zusammenfassung aller in diesem Kontext verwendeten Plasmide.

**Tabelle 10:** Auflistung und Beschreibung der verwendeten Plasmide zur lentiviralen Expression von  $EP_4$  in H9c2-Rattenmyoblasten

| Plasmid      | Inhalt / Beschreibung  | Herkunft   |
|--------------|--|--|
| pCL1         | kodierende Sequenz von EGFP innerhalb von HIV-1-LTR-<br>Regionen mit Verpackungssignal unter Kontrolle des<br>CMV-Promotors, zur Produktion lentiviraler Partikel in<br>HEK 293T-Zellen für EGFP-Kontrolle, Co-Transfektion mit<br>pczVSV-G und pCD/NL-BH              | Klinik f. Kinder-<br>Onkologie, -Hämatologie<br>u. Klin. Immunologie,<br>Prof. Dr. Helmut<br>Hanenberg |
| pCL1mcs      | Vektor mit LTR-Regionen von HIV-1 und Verpackungssi-<br>gnal unter Kontrolle des CMV-Promotors, nach Insertion<br>von hEP4-YFP zur Produktion lentiviraler Partikel in HEK<br>293T-Zellen  | Klinik f. Kinder-<br>Onkologie, -Hämatologie<br>u. Klin. Immunologie,<br>Prof. Dr. Helmut<br>Hanenberg |
| pCL hEP₄-YFP | pCL1mcs mit eingefügter hEP₄-YFP-Sequenz, zur Produk-<br>tion lentiviraler Partikel in HEK 293T-Zellen, Co-Trans-<br>fektion mit pczVSV-G und pCD/NL-BH  | diese Arbeit   |
| pCD/NL-BH    | enthält einen Teil der Sequenzen von HIV-1-Strukturpro-<br>teinen und reverser Transkriptase unter Kontrolle des<br>CMV-Promotors, zur Produktion lentiviraler Partikel in<br>HEK 293T-Zellen, Co-Transfektion mit pczVSV-G und pCL<br>hEP <sub>4</sub> -YFP bzw. pCL1 | Klinik f. Kinder-<br>Onkologie, -Hämatologie<br>u. Klin. Immunologie,<br>Prof. Dr. Helmut<br>Hanenberg |
| pczVSV-G     | kodiert für Glyko-Protein des Vesikulären Stomatitis-Vi-<br>rus (VSV-G-Hüllprotein) unter Kontrolle des CMV-Promo-<br>tors, zur Produktion lentiviraler Partikel in HEK 293T-<br>Zellen, Co-Transfektion mit pCD/NL und pCL hEP <sub>4</sub> -YFP<br>bzw. pCL1         | Klinik f. Kinder-<br>Onkologie, -Hämatologie<br>u. Klin. Immunologie,<br>Prof. Dr. Helmut<br>Hanenberg |

Zur Lentivirenproduktion in HEK 293T-Zellen fand ein Drei-Plasmid-System der dritten Generation (Dull *et al.*, 1998) Verwendung, welches im Folgenden kurz beschrieben wird.

Das Plasmid pczVSV-G (Abb. 11) kodiert dabei für das Glyko-(G-)Protein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G), welches das Hüllprotein des Virus darstellt. Mit diesem wird das Andocken an ein breites Spektrum von Wirtszellen ermöglicht und nach der Endozytose das Verschmelzen der Virushülle mit der endosomalen Membran vermittelt. Damit wird der Inhalt des Viruspartikels in der Zielzelle freigesetzt.



Abbildung 11: Plasmid pczVSV-G. Dieses Plasmid stellt für die Produktion lentiviraler Partikel die Sequenz für das Hüllprotein des Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV) zur Verfügung. CMV: Cytomegalovirus, VSV-G: kodierende Sequenz für VSV-Glykoprotein, bGH pA: Polyadenylierungssignal d. bovinen Wachstumshormon-Gens, f1 ori: Replikationsursprung d. Bakteriophagen f1, SV40 Prom: Promotor von Simian Virus 40, zeo: Zeocin-Resistenz, SV40 pA: Polyadenylierungssignal von Simian Virus 40, ColE1 ori: Replikationsursprung d. ColE1-Plasmids, bla: β-Lactamase (Ampicillin-Resistenz)

Als zweites Plasmid beinhaltet pCD/NL-BH (Abb. 12) aus Sicherheitsgründen nur den Teil der Sequenzen der Strukturproteine von HIV-1 (Humanes Immundefizienz-Virus-1), die für die Produktion von Viruspartikeln und eine Infektion der Zielzelle unverzichtbar sind. Darunter befindet sich z. B. die reverse Transkriptase, welche die als RNA vorliegende genetische Information des Virus in DNA umschreibt.



Abbildung 12: Plasmid pCD/NL-BH. Dieses Plasmid stellt für die Produktion lentiviraler Partikel nötige Sequenzen für Strukturproteine und reverse Transkriptase von HIV-1 zur Verfügung. CMV: Cytomegalovirus. Der Bereich von Gag bis Nef entspricht einem reduziertem HIV-1-Genom. bGH pA: Polyadenylierungssignal d. bovinen Wachstumshormon-Gens, ColE1 ori: Replikationsursprung d. ColE1-Plasmids, bla: β-Lactamase (Ampicillin-Resistenz)

Das dritte Plasmid pCL1 hEP<sub>4</sub>-YFP (Abb. 15) bzw. pCL1 (Abb. 13) zur Erzeugung von Kontrollzellen enthält die in die Zielzellen zu integrierende Transgen-Sequenz, welche von "Long Terminal Repeat"-(LTR-)Regionen flankiert ist und der ein "Psi"-Verpackungsignal vorangeht. Nur die innerhalb der LTR-Regionen befindliche Transgen-DNA wird in das Genom der Zielzelle integriert. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass diese keine vermehrungsfähigen Lentiviren hervorbringen kann und es nicht zu einem Infektionszyklus kommt. Alle drei Plasmide werden zur Transfektion der daraufhin optimierten Produktionszelllinie HEK 293T verwendet, welche in der Folge vermehrungsdefiziente Lentiviren produziert, die mit dem Zellüberstand geerntet und zur Infektion der Zielzellen benutzt werden können.



Abbildung 13: Plasmid pCL1. Diente der Produktion lentiviraler Partikel, welche die Sequenz von EGFP enthalten (für Kontrollzellen). CMV: Cytomegalovirus, R: HIV-1 Repeat-Region, U5: HIV-1 U5-Region, SD: splice donor site, Gag: unvollständiges HIV-1 gag-Gen, env: unvollständiges HIV-1 env-Gen, RRE: rev response element, SA: splice acceptor site, cPPT: central polypurine tract, SFFV U3: spleen focus-forming virus U3 promoter, EGFP: enhanced green fluorescent protein, dU3: Deletion der U3-Region des 3'-LTR-Bereiches von HIV-1, bGH pA: Polyadenylierungssignal d. bovinen Wachstumshormon-Gens, f1 ori: Replikationsursprung d. Bakteriophagen f1, SV40 Prom: Promotor von Simian Virus 40, zeo: Zeocin-Resistenz, SV40 pA: Polyadenylierungssignal von Simian Virus 40, ColE1 ori: Replikationsursprung d. ColE1-Plasmids, bla:  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin-Resistenz)

Die Klonierung des Plasmids pCL1 hEP<sub>4</sub>-YFP (Abb. 15) mit dem zu integrierenden EP<sub>4</sub>-Konstrukt unter Verwendung des Vektors pCL1mcs (Abb. 14) ist nachfolgend in Kapitel 2.10.2 beschrieben. Zur Transfektion von Zellen, welche als Kontrolle dienen sollten, wurde das Plasmid pCL1 (Abb. 13) benutzt, welches zur Expression von *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) führt.

Die insgesamt vier benötigten Plasmide (pCL1, pCL1mcs, pCD/NL-BH, pczVSV-G) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hanenberg (Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

# 2.10.1 Erzeugung lentiviraler Vektoren und Infektion von H9c2-Zellen

HEK 293T-Zellen in 10 cm-Kulturschalen wurden wie folgt mit den zur Produktion von Lentiviren nötigen Plasmiden transfiziert. Je 10 cm-Schale mit annähernd konfluent gewachsenen Zellen wurden 45  $\mu$ l einer sterilfiltrierten Polyethylenimin-Lösung (1 mg/ml) in 955  $\mu$ l DMEM ohne FKS in einer Polypropylen-Kryoröhre ("CryoPure", 1,6 ml, Sarstedt, Nümbrecht) verdünnt. Des Weiteren wurden je 5  $\mu$ g der drei Plasmide (pczVSV-G, pCD/NL-BH, pCL1 hEP<sub>4</sub>-YFP bzw. pCL1) zusammen in 1 ml DMEM ohne FKS gegeben. Beide Verdünnungen wurden vereinigt, gründlich geschüttelt und 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte ein Mediumwechsel bei den HEK 293T-Zellen mit je 4 ml frischem DMEM + 15 % FKS. Nach 20-minütiger Inkubation des Transfektionsgemisches wurde es zu den Zellen gegeben, woraufhin diese ÜN weiter bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert wurden.

Nach erneutem Mediumwechsel am nächsten Tag mit frischem DMEM + 10 % FKS erfolgte die Induktion des CMV-Promotors der Plasmide durch Zugabe von 200 µl 0,5 M Natriumbutyrat je 10 cm-Schale. Nach 6- bis 8-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Medium gegen frisches IMDM mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS ausgetauscht. IMDM ist HEPES-gepuffert und gewährleistet eine bessere Stabilität der entstehenden Lentiviren. Die Zellen wurden wie zuvor für 19 - 23 h weiter inkubiert. Anschließend fand die Ernte der Lentiviren statt, indem der Zellüberstand durch einen 0,45 µm-Spritzenfilter in Kryoröhren filtriert wurde.

Zu infizierende H9c2-Zellen wurden ein bis zwei Tage zuvor in 6-Loch-Platten in einer Dichte von  $6.000/\text{cm}^2$  ausgesät. Anschließend wurde zur Transduktion des EP<sub>4</sub>-Konstruktes das Medium durch 1 ml des Lentiviren enthaltenden HEK 293T-Zellüberstandes ersetzt. Zur Verbesserung der Fusion der Viruspartikel mit der Zielzellmembran wurden 10 µg/ml sterilfiltriertes Protaminsulfat zugesetzt. Verbleibender Überstand wurde in Kryoröhren bei -80 °C gelagert. Nach 19 - 23 h erfolgte ein erneuter Mediumwechsel mit frischem DMEM + 10 % FKS.

# **2.10.2** Konstruktion eines $\text{EP}_4$ enthaltenden-Plasmids für die lentivirale Transfektion

Zur Durchführung der unter 2.10.1 beschriebenen lentiviralen Transfektion von H9c2-Zellen wurde ein geeignetes Plasmid mit der Sequenz des humanen  $EP_4$ -Rezeptors mit YFP-Markierung generiert. Hierfür wurde die entsprechende Sequenz aus dem Plasmid pNC1 h $EP_4$ -YFP (s. 2.8, Abb. 5), welches zur Erzeugung transgener Mäuse benutzt wurde, in den Vektor pCL1mcs (Abb. 14) kloniert.



Abbildung 14: Plasmid pCL1mcs. Diente nach Insertion der hEP<sub>4</sub>-YFP-Sequenz (hier mittels XhoI & EcoRI, vgl. Text) der Produktion lentiviraler Partikel. CMV: Cytomegalovirus, R: HIV-1 Repeat-Region, U5: HIV-1 U5-Region, SD: splice donor site, Gag: unvollständiges HIV-1 gag-Gen, env: unvollständiges HIV-1 env-Gen, RRE: rev response element, SA: splice acceptor site, cPPT: central polypurine tract, SFFV U3: spleen focus-forming virus U3 promoter, dU3: Deletion der U3-Region des 3'-LTR-Bereiches von HIV-1, bGH pA: Polyadenylierungssignal d. bovinen Wachstumshormon-Gens, f1 ori: Replikationsursprung d. Bakteriophagen f1, SV40 Prom: Promotor von Simian Virus 40, zeo: Zeocin-Resistenz, SV40 pA: Polyadenylierungssignal von Simian Virus 40, ColE1 ori: Replikationsursprung d. ColE1-Plasmids, bla: β-Lactamase (Ampicillin-Resistenz)

Zunächst wurde hierzu pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP mit *Hind*III und pCL1mcs mit *Eco*RI geschnitten und die Enden jeweils mit T4-Polymerase aufgefüllt. Es schloss sich eine Restriktion mit *Sal*I bei pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP bzw. *Xho*I bei pCL1mcs an. Nach einer Gelextraktion der gewünschten DNA-Fragmente (2.792 bp Insert, 7.296 bp Vektor) konnte mittels der kompatiblen Enden der *Sal*I- und *Xho*I-Schnittstellen eine Ligation mit gerichtetem Einbau des Inserts erfolgen. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von kompetenten *E. coli* verwendet (s. 2.6.1). Daraus gewachsene Ampicillin-resistente Klone wurden zur Gewinnung von Plasmid-DNA (s. 2.6.3) verwendet, die wiederum durch eine *Bam*HI-*Xho*I-Testrestriktion auf Richtigkeit überprüft wurde. Nach Präparation der gewünschten Plasmid-DNA im Midi-Maßstab lag das Plasmid pCL hEP<sub>4</sub>-YFP (Abb. 15) vor.



Abbildung 15: Plasmid pCL hEP<sub>4</sub>-YFP. Diente der Produktion lentiviraler Partikel, welche die Sequenz des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung enthalten. CMV: Cytomegalovirus-Promotor, R: HIV-1 Repeat-Region, U5: HIV-1 U5-Region, SD: splice donor site, Gag: unvollständiges HIV-1 gag-Gen, env: unvollständiges HIV-1 env-Gen, RRE: rev response element, SA: splice acceptor site, cPPT: central polypurine tract, SFFV U3: spleen focus-forming virus U3 promoter, hEP<sub>4</sub>-YFP: kodierende Sequenz des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung, dU3: Deletion der U3-Region des 3'-LTR-Bereiches von HIV-1, bGH pA: Polyadenylierungssignal d. bovinen Wachstumshormon-Gens, f1 ori: Replikationsursprung d. Bakteriophagen f1, SV40 Prom: Promotor von Simian Virus 40, zeo: Zeocin-Resistenz, SV40 pA: Polyadenylierungssignal von Simian Virus 40, ColE1 ori: Replikationsursprung d. ColE1-Plasmids, bla: β-Lactamase (Ampicillin-Resistenz)

# 2.11 Analyse von Proteinen

#### 2.11.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinproben in Lämmli-Puffer basierte auf einer von Dieckmann-Schuppert & Schnittler (1997) beschriebenen Methode. Hierbei wurden je 2 µl der Proben sowie unterschiedlich konzentrierter BSA-Standards auf je 1 cm × 1 cm große Felder einer Nitrozellulose-Membran ("Hybond<sup>TM</sup>-C Extra", Amersham Pharmacia Biotech, Freiberg) aufgetragen und diese mit Amidoschwarz-Färbelösung angefärbt. Nach Entfernen des nicht an Protein gebundenen Farbstoffs mit Entfärbelösung wurden die einzelnen Membranfelder in separate Reaktionsgefäße überführt. Die angefärbten Proteinanteile wurden durch Zugabe von je 250 µl ATE-Lösung ausgewaschen. Die Absorption der so erhaltenen Proben wurde in einem "Microplate Reader Model 550" (Bio-Rad, München) bei 630 nm gemessen und die Konzentrationen anhand der linearen Regression der Absorptionen der BSA-Standardreihe bestimmt ("Microplate Manager PC 4.0", Bio-Rad, München).

### 2.11.2 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Proteintransfer (Western-Blot)

Die in Lämmli-Puffer denaturierten Proteine wurden nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Das verwendete Sammelgel hatte stets einen Acrylamidgehalt von 4 %, während der entsprechende Wert der Trenngele je nach Größe der Proteine von Interesse zwischen 10 und 15 % variierte. Die Elektrophorese erfolgte in einer Kammer des Typs "Mini-Protean 3 Cell" (Bio-Rad, München) bei 160 V für 60 - 80 min. Anschließend wurden die Proteine im "Semi-Dry"-Verfahren unter Verwendung von Transferpuffer mit einer SEMI-PHOR<sup>™</sup>-Blot-Apparatur (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) bei 12 V für 30 -60 min auf eine PVDF-Membran ("Immobilon-P", Millipore, Eschborn) transferiert.

### 2.11.3 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde die PVDF-Membran (s. 2.11.2) zunächst zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % Milchpulver in TBS-T (Tab. 5) für 1 - 2 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem gegen das zu detektierende Protein gerichteten Primärantikörper in 5 % Milchpulver bzw. 5 % BSA in TBS-T. Die dabei eingesetzten Verdünnungen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in TBS-T wurde die Membran mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper in TBS-T mit 5 % BSA für 45 min - 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran wie zuvor schloss sich eine 5-minütige Inkubation mit Luminol-Lösung (1 Volumen Lösung A + 1/10 Volumen Lösung B + 1/1000 Volumen 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, s. Tab. 5) an. Nach Entfernen überschüssiger Luminol-Lösung wurde die enstehende Chemilumineszenz mittels Röntgenfilm detektiert.

Zur Beladungskontrolle wurde die mit 0,2 M NaOH-Lösung für 5 min behandelte und anschließend mit Wasser und TBS-T gewaschene (je 5 min) Membran mit einem  $\beta$ -Aktin-Antikörper inkubiert. Nachfolgend wurde bis einschließlich der Detektion wie oben beschrieben verfahren. Alternativ erfolgte die Beladungskontrolle durch Anfärben der Membran mit Amidoschwarz.

#### 2.11.4 Nachweis von aktiviertem Rap1 in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen

Konfluente H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen in 12-Loch-Platten wurden ÜN gehungert und mit 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) bzw. 300 µM des Epac-Aktivators 8-pCPT-2'-O-MecAMP ("007", Biolog Life Science Institute, Bremen) für verschiedene Zeiträume stimuliert. Nach Absaugen des Zellüberstands wurde die Reaktion durch Zugabe von je 250 µl eiskaltem Fisch-Puffer abgestoppt und die Platten für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Das Zelllysat wurde abgekratzt, zentrifugiert ( $8.000 \times g$ ,  $4 \degree C$ , 10 min) und 100 µl wurden für die spätere Analyse des Totallysats abgenommen, während der Rest zu 20 µl einer Suspension von Glutathion-Sepharose-Kügelchen (GE Healthcare, Freiburg) gegeben wurde. An diese Kügelchen war ein GST-Fusionsprotein mit dem Cterminalen Rest des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors Ral-GDS gebunden (Hofer et al., 1994). Dies stellt ein spezifisches Bindemotiv für GTP-gebundenes, also aktiviertes Rap1 dar. Die Ral-GDS-Glutathion-Sepharose-Kügelchen wurden im Institut für Pharmakologie, Uniklinikum Essen, angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es erfolgte eine Inkubation der Suspension für 1 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler und eine anschließende Zentrifugation (2.500 × g, 4 °C, 2 min). Das Pellet wurde drei mal mit je 1 ml kaltem Fisch-Puffer gewaschen und jeweils wie zuvor zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet mit einem Volumen 2 × Lämmli-Puffer lysiert. Nach Inkubation der Proben bei 95 °C für 5 min und analoger Behandlung der Totallysat-Proben erfolgte eine SDS-PAGE mit anschließendem immunologischem Nachweis von Rap1.

#### 2.11.5 Nachweis von EGFR-Aktivierung und Identifikation von Interaktionspartnern in H9c2-hEP4-YFP-Zellen

H9c2-hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen wurden in 10 cm-Schalen ausgesät und bis ca. 90 % Konfluenz inkubiert. Dann wurden sie mit PBS gewaschen und das Medium gegen DMEM ohne FKS mit 1 g/l Glukose und 1 µM Diclofenac (= Hungermedium) ausgetauscht. Nach weiteren 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen z. T. für 5 min mit dem EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 stimuliert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung der Zellen mit dem EGFR Tyrosine Phosphorylation Array Kit (Panomics, Fremont, CA, USA) nach Herstellerangaben. Dies ermöglichte den Nachweis einer auftretenden Aktivierung (= Tyrosin-Phosphorylierung) des EGF-Rezeptors sowie die Identifikation der dadurch angesprochenen direkt mit dem EGF-Rezeptor interagierenden Signalkomponenten. Ermöglicht wird dies durch die spezifischen SH2-Domänen enthaltenden Proteine, die auf den vorgefertigten Membranen immobilisiert sind. Die SH2-Domänen binden an bestimmte Muster phosphorylierter Tyrosinreste, welche im intrazellulären Teil des EGF-Rezeptors nach dessen Aktivierung auftreten können.

#### 2.11.6 Präparation von Kernextrakten aus H9c2-Zellen und Nachweis der NFκB-Translokation

In 10 cm-Schalen konfluent gewachsene H9c2-Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 h in serumfreiem Medium unter Anwesenheit von 1  $\mu$ M Diclofenac inkubiert und anschließend 30 bis 120 min lang mit dem EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 stimuliert. Es folgte ein Waschschritt mit 10 ml PBS und die Zugabe von 2 ml PBS/EDTA (0,1 mM) zum Ablösen der Zellen. Fünf Minuten später wurden die Zellen mit einem Gummischaber vollständig abgelöst und die resultierende Suspension für 2 min bei 5.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5424, Eppendorf, Hamburg). Das Pellet wurde danach in hypotonem Puffer A (300  $\mu$ l) resuspendiert und 50  $\mu$ l dieses Totallysates abgenommen. Während einer 20-minütigen Inkubation auf Eis platzten die Zellen unter den hypotonen Pufferbedingungen auf, wohingegen die stabileren Zell-kern-Membranen intakt blieben. Die Suspension wurde durch 10-maliges Passieren einer 25G-Kanüle geschert, um die Zellkerne zu vereinzeln und den zytosolischen

Anteil zu homogenisieren. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (10.000 × g, 10 min, 4 °C, Eppendorf 5415 R, Eppendorf, Hamburg) zur Trennung von kernreicher und zytosolischer Fraktion (= Überstand). Das Zellkern-Pellet wurde in 50 µl Puffer C aufgenommen und den einzelnen Fraktionen wurde vor Benutzung zur SDS-PAGE je 1/3 Volumen 4 × Lämmli-Puffer zugesetzt. In den entsprechenden immobilisierten Proteinproben wurde NFkB mit Hilfe eines gegen NFkB p65 gerichteten Antikörpers (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) detektiert.

# 2.11.7 Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellüberstand

Der Überstand entsprechend Kapitel 2.13 (jedoch ohne Zugabe von SYTOX<sup>®</sup> Green) behandelter Zellen wurde zur photometrischen Bestimmung der LDH-Aktivität mit dem LDH-Kit der Firma Cypress Diagnostics (Langdorp, Belgien) benutzt. Hierzu wurden jeweils 50 µl Zellüberstand mit 1 ml Substratlösung gemischt und nach 15minütiger Vorinkubation bei RT über einen Zeitraum von 3 min bei 340 nm gemessen. Aus der Absorptionsabnahme, die sich aus der Umsetzung von NADH zu NAD<sup>+</sup> ergibt, konnte nach Herstellerangaben die Enzymaktivität berechnet werden.

# 2.12 Bestimmung des intrazellulären cAMP-Gehalts

In 24-Loch-Platten konfluent gewachsene Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min bei 37 °C mit 1 mM des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX in 1 × HBSS-Puffer inkubiert. Es folgte die Stimulation der Zellen u. a. mit 10 bzw. 100 nM des EP<sub>4</sub>-Agonisten L-000902688 (Young *et al.*, 2004), PGE<sub>1</sub> (10 bzw. 100 nM) sowie 3 µM des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin als Positivkontrolle für weitere 10 min bei 37 °C. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Reaktion durch Zugabe von 250 µl eiskaltem Ethanol pro Loch gestoppt. Dieses wurde nachfolgend bei 60 °C vollständig verdampft und die Löcher mit je 300 µl RIA-Puffer befüllt. Nach einer anschließenden Lagerung der Platten bei -80 °C wurde der Inhalt in separate Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 13.000 rpm (Eppendorf 5415 C, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Es folgte die Bestimmung der cAMP-Konzentration mittels Radioimmunoassay nach Steiner *et al.* (1972). Die hierbei ermittelten Werte wurden auf den jeweils zugrunde liegenden Proteingehalt der Proben bezogen, welcher nach der Methode von Bradford (1976) mit dem "Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent" (Bio-Rad, München) bestimmt wurde. Zur Erstellung einer Standardkurve fand eine BSA-Verdünnungsreihe Verwendung.

### 2.13 Zellviabilitäts-Assay mit SYTOX® Green

H9c2-hEP<sub>4</sub>-YFP- bzw. H9c2-EGFP-Zellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz inkubiert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und das Medium gegen DMEM ohne FKS mit 1 g/l Glukose und 1  $\mu$ M Diclofenac (= Hungermedium) ausgetauscht. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde das Hungermedium erneuert und verschiedene Stimuli gesetzt, wobei teilweise Inhibitorsubstanzen 30 min vorher hinzugefügt wurden. Die Zellen wurden nachfolgend unter unveränderten Bedingungen für weitere 48 h inkubiert oder in einer Hypoxiekammer (Genbox Anaer, Biomérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) mit je 1 "AnaeroPack Anaerobic"-Säckchen (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) für 24 h inkubiert. Laut Herstellerangaben wird unter diesen Bedingungen die O<sub>2</sub>-Konzentration in der Kammer innerhalb von 1 h auf unter 0,1 % gesenkt. Nach dieser Hypoxie-Periode wurden die Zellen anschließend einer 1-stündigen Reoxygenierung unter Standard-Kulturbedingungen unterzogen.

Zur Bestimmung der Zahl toter Zellen wurde diesen 2 µM SYTOX® Green (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zugesetzt. Nach 5-minütiger Inkubation wurden Fluoreszenzaufnahmen der Zellen bei einer Exzitation von 488 nm und 40-facher Vergrößerung angefertigt (IX-50, Olympus GmbH, Hamburg). Das Emissionsmaximum von DNA-gebundenem SYTOX® Green liegt bei 523 nm. Die Zahl SYTOX® Green-positiver Zellen wurde für jedes Gesichtsfeld (1,78 mm × 1,32 mm) mit Hilfe der Software "ImageJ" (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/) über die Funktion "Analyze Particles" bestimmt. Einzelne Werte ergaben sich dabei durch Bildung des Mittelwertes von je vier Replikaten.

### 2.14 EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Stimulation am isoliert perfundierten Mäuseherzen

Für *ex vivo*-Untersuchungen an Mäuseherzen wurden diese nach einer auf der Beschreibung von Langendorff (1895) basierenden Methode perfundiert. Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL/6 (♂) wurden je 1.250 IE Heparin und zur Betäubung 3,2 g/kg Urethan intraperitoneal injiziert. Die Aorten der daraufhin entnommenen Herzen wurden zunächst in eiskaltem Krebs-Henseleit-Puffer (Tab. 5) von umlie-

gendem Gewebe befreit und anschließend an eine 20 G-Kanüle angeschlossen. In den linken Ventrikel wurde über einen zuvor gesetzen Schnitt im linken Atrium ein kleiner wassergefüllter Ballon eingeführt. Dieser war an einen Druckabnehmer angeschlossen und diente der kontinuierlichen Messung des linksventrikulären Drucks. Die Perfusion der Herzen erfolgte mit Carbogen-gesättigtem (95 % O2, 5 % CO2) und auf 37  $^\circ\text{C}$ temperiertem Krebs-Henseleit-Puffer mit einem konstantem Perfusionsdruck von 80 mmHg. Bei einer Gruppe der untersuchten Herzen war dem Perfusat 10 nM des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 (Merck Frosst, Kirkland, Canada; Young et al., 2004) zugesetzt. Die Herzen wurden durch eine am rechten Atrium angebrachte Elektrode (Spannung: 0,8 V, Pulsdauer: 4 ms) auf eine Schlagrate von 500 min<sup>-1</sup> eingestellt. Die koronare Flussrate wurde kontinuierlich mit Hilfe eines Flussmessgerätes (MDL 401, Skalar Medical B. V., Delft, Niederlande) protokolliert. Nach einer Stabilisierungszeit von 15 bis 20 min wurde die Perfusion für 25 min unterbrochen und das Herz während dieser Ischämie-Phase in einem beheizten Pufferreservoir auf einer Temperatur von 37 °C gehalten. Anschließend erfolgte die druckkonstante Reperfusion über einen Zeitraum von 45 min. Als ein Parameter der Zellschädigung wurde die Creatinkinase-Aktivität des koronaren Effluates unter Verwendung des CK-Kit der Firma Cypress Diagnostics (Langdorp, Belgien) bestimmt.

### 2.15 Statistik

Die Messdaten der Versuchsergebnisse sind jeweils als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte bei zwei zu vergleichenden Datenreihene mit einem zweiseitigen ungepaartem t-Test, bei mehreren Datenreihene wurde eine Ein-Weg-Varianzanalyse ("One-Way ANOVA") mit anschließendem Bonferroni-Test angewandt. Das Signifikanzniveau p für  $\alpha$  wurde mit 0,05 festgelegt. Zur computergestützten statistischen Auswertung kam die Software "GraphPad Prism 5" (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) zum Einsatz.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Einfluss des EP₄-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Basalfunktion isoliert perfundierter Mäuseherzen

An isoliert perfundierten Mäuseherzen aus C57BL/6-Mäusen wurde der Einfluss des EP<sub>4</sub>-Agonisten L-000902688 (10 nM) im Perfusat auf die Basalfunktion bestimmt. Abbildung 16 zeigt den linksventrikulären Druck ( $\Delta$ LVP), den koronaren Fluss sowie die maximale Kontraktions- (+dP/dt<sub>max</sub>) u. Relaxationsgeschwindigkeit (-dP/dt<sub>max</sub>).



**Abbildung 16:** Funktionelle Parameter isoliert perfundierter Wildtyp-Mäuseherzen mit und ohne  $EP_4$ -Agonist (10 nM) im Perfusat, gemessen nach 15 - 20 min Einschlagzeit (je n = 6).  $\Delta LVP$ : linksventrikulärer Druck,  $+dP/dt_{max}$ : maximale Kontraktionsgeschwindigkeit,  $-dP/dt_{max}$ : maximale Relaxationsgeschwindigkeit (Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM).

Es zeigte sich, dass der EP<sub>4</sub>-Agonist keinen nennenswerten Einfluss auf die Basalfunktion der Mäuseherzen hatte.

### 3.2 Einfluss des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 auf die Funktion isoliert perfundierter Mäuseherzen bei Ischämie/Reperfusion

Nach Langendorff isoliert perfundierte Mäuseherzen wurden nach 15- bis 20-minütiger Einschlagphase einer 25-minütigen globalen Ischämie unterzogen. Über den gesamten Versuchsverlauf bzw. während der Reperfusionsphase wurden neben den bereits genannten vier Parametern der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) und die Creatinkinase-Aktivität im Effluat als Maß für die Zellschädigung bestimmt. Die entsprechenden Daten zeigen die Abbildungen 17 bis 19.



**Abbildung 17:** Linksventrikulärer Druck ( $\Delta$ LVP) und linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) isoliert perfundierter Wildtyp-Mäuseherzen mit und ohne EP<sub>4</sub>-Agonist (10 nM) im Perfusat (je n = 6). Ischämie: 25 min, Reperfusion: 45 min (Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM).



**Abbildung 18:** Maximale Kontraktions-  $(+dp/dt_{max})$  und Relaxationsgeschwindigkeit  $(-dp/dt_{max})$  isoliert perfundierter Wildtyp-Mäuseherzen mit und ohne EP<sub>4</sub>-Agonist (10 nM) im Perfusat (je n = 6). Messung vor Ischämie (t = 0 min) und während Reperfusionsphase von 45 min (Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM).


**Abbildung 19:** Creatinkinase- (CK-) Aktivität im Herzeffluat und koronare Flussrate isoliert perfundierter Wildtyp-Mäuseherzen mit und ohne  $EP_4$ -Agonist (10 nM) im Perfusat (je n = 6). Messung vor Ischämie (t = 0 min) und während Reperfusionsphase von 45 min (Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM).

Die EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Stimulation führte während der Reperfusionsphase verglichen mit der Kontrolle zu einer leichten Steigerung des linksventrikulären Druckes (Abb. 17) sowie der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 18). Auch die koronare Flussrate war leicht erhöht, während die CK-Freisetzung tendenziell verringert war. Keiner der Parameter war jedoch gegenüber den Kontrollexperimenten ohne EP<sub>4</sub>-Agonist signifikant verändert.

# 3.3 Kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors im Mausmodell

Ein Ziel der Arbeit war die Erzeugung von Mäusen mit kardiospezifischer Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors. Dazu kamen unabhängig voneinander drei DNA-Konstrukte zum Einsatz (vgl. 2.8 und 2.9).

## 3.3.1 Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors mit YFP-Markierung

Zunächst wurde die kardiale Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung angestrebt. Hierfür wurde das *Bam*HI-Fragment aus dem Plasmid pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP mit der Sequenz des humanem EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit C-terminaler YFP-Markierung in Maus-Vorkerne injiziert. Dies führte insgesamt zu 38 potenziell transgenen Tieren, von welchen zwei (Nr. 13, Q und Nr. 14,  $\sigma$ ) das Transgen in ihre DNA integriert hatten. Dies wurde mittels PCR-Analyse der Schwanzspitzen-DNA unter Verwendung der Oligonukleotide  $\alpha$ MHCPromUp/ $\alpha$ MHChEPDown bestimmt (Abb. 20).



**Abbildung 20:** Schwanzspitzen-DNA-Analyse ausgewählter potenziell transgener Mäuse mit hEP<sub>4</sub>-YFP-Konstrukt. PCR-Produkt von 743 bp zeigt vorhandenes EP<sub>4</sub>-Transgen (EP<sub>4</sub>-TG) an. M: DNA-Größenstandard, P: Positivkontrolle mit pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP als Matrizen-DNA. 11-14: Zahl aus fortlaufender Nummerierung der potenziell hEP<sub>4</sub>-YFP-transgenen Mäuse.

Die transgenen Mäuse Nr. 13 und Nr. 14 wurden mit C57BL/6-Wildtyp-Tieren rückgekreuzt und deren Nachwuchs ebenfalls mit Hilfe der PCR auf das Vorhandensein des Transgens kontrolliert. RNA aus Organen des positiv transgenen Nachwuchses wurde zur Expressionskontrolle von hEP<sub>4</sub>-YFP durch RT-PCR verwendet (Oligonukleotide: hEP4Up/hEP4Down). Das EP<sub>4</sub>-Transgen wurde zwar weitergegeben, jedoch konnte in keinem Fall eine Expression nachgewiesen werden (Abb. 21). In mehrfachen Kontrollen der transgenen F1-Tiere wurde das Ergebnis bestätigt und die Zucht der Tiere eingestellt.



Abbildung 21: Repräsentatives Agarosegel zum Expressionsnachweis von hEP<sub>4</sub>-YFP in verschiedenen Organen aus heterozygoten Tieren der F1-Generation mittels RT-PCR. Produkt von 238 bp zeigt GAPDH-Expression an, Produkt von 405 bp (EP<sub>4</sub>-TG) zeigt vorhandene hEP<sub>4</sub>-YFP-Expression. M: DNA-Größenstandard, P: Positivkontrolle mit pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP als Matrizen-DNA.

## 3.3.2 Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors ohne YFP-Markierung

Da die Erzeugung von hEP<sub>4</sub>-YFP-transgenen Mäusen nicht zur gewünschten Expression im Herzen führte, wurde alternativ ein Konstrukt des nicht markierten EP<sub>4</sub>-Rezeptors verwendet. Die hierzu durchgeführte Pronukleus-Injektion linearisierter hEP<sub>4</sub>-DNA aus dem Plasmid pNC1 hEP<sub>4</sub> (s. 2.8.1) führte zu insgesamt 22 potenziellen Trägern des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors. In keinem der potenziellen Gründertiere konnte eine Integration der Transgen-DNA mittels PCR (Oligonukleotide:  $\alpha$ MHCPromUp/ $\alpha$ MHChEP-Down) nachgewiesen werden. Abbildung 22 zeigt eine Auswahl der entsprechenden PCR-Ergebnisse der Tiere Nr. 3 bis Nr. 10. Hierbei wurde der Nachweis der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) als interne Kontrolle der PCR verwendet (Oligonukleotide: HPRT1Up/HPRT1Down).



Abbildung 22: PCR-Ergebnis zum Nachweis von  $hEP_4$  in potenziell transgenen Mäusen (Auswahl). Produkt von 276 bp zeigt HPRT-Gen als interne Kontrolle an, Produkt von 743 bp zeigt  $hEP_4$ -Transgen ( $EP_4$ -TG) an. M: DNA-Größenstandard, P1: Positivkontrolle mit pNC1  $hEP_4$  als Matrizen-DNA, P2: Positivkontrolle mit pNC1  $hEP_4$  gemischt mit genomischer Schwanzspitzen-DNA eines zuvor negativ getesteten Tieres. 3-10: Zahl aus fortlaufender Nummerierung der potenziell  $hEP_4$ -transgenen Mäuse.

# 3.3.3 Konditionelle kardiospezifische Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung

Die zweite Alternativstrategie zur Erzeugung hEP<sub>4</sub>-transgener Mäuse, welche letzlich eine konditionelle Überexpression von EP<sub>4</sub> erst im Adultstadium ermöglichen sollte, geschah unter Verwendung des Plasmids pNC1 hEP<sub>4</sub>-YFP neoflox (s. 2.8.2). Die Pronukleus-Injektion des entsprechenden *BamHI*-Fragments führte zu 11 potenziell transgenen Mäusen. In der Schwanzspitzen-DNA eines dieser Tiere (Nr. 1,  $\sigma^a$ ) konnte das Transgen mittels PCR (Oligonukleotide:  $\alpha$ MHCPromUp/ $\alpha$ MHCNeoDown) nachgewiesen werden (Abb. 23).



Abbildung 23: PCR-Ergebnis zum Nachweis von hEP<sub>4</sub>-YFP neoflox in potenziell transgenen Mäusen (Auswahl). Produkt von 276 bp zeigt HPRT-Gen als interne Kontrolle an, Produkt von 557 bp (EP<sub>4</sub>-TG) zeigt hEP<sub>4</sub>-YFP neoflox-Transgen an. M: DNA-Größenstandard, P1: Positivkontrolle mit pNC1 hEP<sub>4</sub> als Matrizen-DNA, P2: Positivkontrolle mit pNC1 hEP<sub>4</sub> gemischt mit genomischer Schwanzspitzen-DNA eines zuvor negativ getesteten Tieres. Die Zahlen geben die Tiernummer an.

Die transgene Founder-Maus (Nr. 1) wurde mit Wildtyp-Weibchen (C57BL/6) rückgekreuzt. In der RNA transgen-positiver F1-Tiere konnte die kardiale Expression von Neomyzin nachgewiesen werden (Abb. 24). Hierzu wurden die Oligonukleotide "NCEP3Up/ $\alpha$ MHCNeoDown" verwendet. NCEP3Up ist im zweiten Exon des  $\alpha$ MHC-Promotors lokalisiert, wodurch Amplifikationsprodukte auf Basis von DNA und RNA unterschieden werden konnten (vgl. Abb. 8).



Abbildung 24: RT-PCR-Ergebnis zum Nachweis kardialer Neomyzin-Expression in positivtransgenem Nachwuchs von Founder-Tier Nr. 1 (F1-Generation). Produkt von 797 bp geht auf DNA-Kontamination zurück, Produkt von 506 bp zeigt das Vorhandensein gespleißter RNA an. M: DNA-Größenstandard, Lu: RNA aus Lungengewebe, He: RNA aus Herzgewebe

Der heterozygot transgene Nachwuchs wird nachfolgend zur Weiterkreuzung mit Mäusen verwendet, welche eine induzierbare Cre-Rekombinase exprimieren, wie in Kapitel 2.8.2 erläutert.

# 3.4 Analyse EP₄-Rezeptor-vermittelter Signalwege in H9c2 Kardiomyoblasten

Zur Aufklärung von Signalwegen, welche in den EP<sub>4</sub>-Rezeptor exprimierenden H9c2-Zellen nach deren Stimulation aktiviert werden, wurden ausgewählte Signalkomponenten mittels Western-Blot analysiert. Hierfür wurden H9c2-Zellen ÜN in Hungermedium mit 1  $\mu$ M Diclofenac inkubiert und anschließend mit 10 bzw. 100 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) bis zu einer Zeit von 120 min stimuliert. Nachfolgend wurden Totallysate der Zellen angefertigt bzw. zum Nachweis von Rap1-Aktivierung gemäß Kapitel 2.11.4 verfahren. Zunächst erfolgte jedoch der Nachweis der erfolgreichen Transfektion der H9c2-Zellen sowie der funktionellen Kopplung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors an G<sub>5</sub>.

# 3.4.1 Lentivirale Transfektion von H9c2-Zellen

Zur Analyse EP<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelter Signalwege in Kardiomyoblasten erfolgte die lentivirale Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors in H9c2-Zellen (s. 2.10.1). Diese exprimieren endogen kein EP<sub>4</sub>. Mittels RT-PCR wurden die resultierenden Zellen auf eine erfolgreiche Expression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit YFP-Markierung überprüft (Oligonukleotide s. Tab. 6, hEP<sub>4</sub>Up/Down). Abbildung 25 zeigt einen positiven Nachweis des hEP<sub>4</sub>-YFP-Konstruktes nur in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP, erwartungsgemäß jedoch nicht in den EGFP exprimierenden Kontrollzellen.



**Abbildung 25:** Ergebnis einer RT-PCR zum Nachweis der Expression des humanen  $EP_4$ -Rezeptors in lentiviral transfizierten H9c2-Zellen. Produkt von 405 bp Größe zeigt  $hEP_4$ -YFP-Expression an ( $EP_4$ ), Produkt von 238 bp zeigt GAPDH-Expression als interne Kontrolle. M: DNA-Größenstandard, E: H9c2 EGFP, Y: H9c2  $hEP_4$ -YFP, L: Leerkontrolle

Ein entsprechender Nachweis wurde zudem auf Proteinebene mittels Western-Blot erbracht (Abb. 26).



**Abbildung 26**: Western-Blot zum Nachweis der EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Proteinexpression. Eine Bande von ca. 80 kDa zeigt das Vorhandensein des YFP-markierten humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors an. E: H9c2 EGFP, Y: H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP

Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnte darüber hinaus die EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Expression in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen sowie die Lokalisierung des Rezeptors untersucht werden. Abbildung 27 zeigt lebende H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen, welche zuvor ÜN in Hungermedium mit 1 µM Diclofenac inkubiert wurden. Die Vorinkubation mit Diclofenac diente dabei der COX-Inhibierung, um eine evtl. auftretende Rezeptorinternalisierung aufgrund hoher basaler Prostaglandin-Spiegel zu unterbinden. Man erkennt eine ausgeprägte perinukleäre Lokalisation des Rezeptors in Vesikeln sowie ein deutliches Auftreten in der Zellmembran.



**Abbildung 27:** Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahme von gehungerten, lebenden H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen. Zu sehen ist die auf die Z-Achse bezogene mittige Schnittebene. Detektiert wurde die YFP-Fluoreszenz nach 488 nm-Anregung und damit die Lokalisation des entsprechend markierten EP<sub>4</sub>-Rezeptors. Die Lokalisation des Rezeptors ist überwiegend perinukleär und membranär.

# 3.4.2 Funktionelle Kopplung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors an G<sub>s</sub>

Weitere Versuche mit den lentiviral transfizierten H9c2-Zellen beinhalteten die Überprüfung der funktionellen Kopplung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors an stimulatorisches G-Protein durch Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration (s. 2.12). Durch 10-minütige Stimulation mit dem EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten L-000902688 stieg die cAMP-Konzentration bezogen auf den Gesamtproteingehalt der Zellen auf etwa das 4- bis 5-fache der nicht stimulierten Kontrolle an (Abb. 28). Jeglicher cAMP-Anstieg nach EP<sub>4</sub>-spezifischer Stimulation blieb in den EGFP exprimierenden Kontrollzellen aus. Mit dem direkten Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin und mit PGE<sub>1</sub> als nicht selektiver EP-Agonist kam es erwartungsgemäß ebenfalls zu einer cAMP-Erhöhung. Das Ergebnis bestätigt die funktionelle Kopplung des heterolog exprimierten EP<sub>4</sub>-Rezeptors an G<sub>s</sub>.



**Abbildung 28:** Intrazellulärer cAMP-Gehalt in H9c2-Zellen nach 10-minütiger Stimulation bezogen auf den Gesamtproteingehalt. Normalisierung erfolgte jeweils anhand des Wertes der Kontrolle = 1. Kon: kein Stimulus, For: Forskolin, EP<sub>4</sub>: EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688), (je n = 4 bis 5, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwert ± SEM)

## 3.4.3 Einfluss von EP<sub>4</sub> auf Proteinkinase A (PKA)

Die Kopplung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors an  $G_s$  und eine erhöhte cAMP-Produktion in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP in Reaktion auf die EP<sub>4</sub>-spezifische Stimulation konnte zuvor nachgewiesen werden. Da die PKA ein typisches cAMP-reguliertes Enzym darstellt, welches nachgeschaltet eine Reihe von Signalantworten vermittelt, wurde dessen EP<sub>4</sub>-abhängige Aktivität untersucht. Hierzu wurde der Phosphorylierungsstatus von PKA-Substraten analysiert.

Beim Nachweis phosphorylierter PKA-Substrate (p-PKA-Subst) zeigte sich unter mehreren nachgewiesenen Banden für die Bande einer Höhe von ca. 36 kDa eine Signalverstärkung nach 30 min EP₄-Stimulation (Abb. 29).



**Abbildung 29:** Western-Blot zum Nachweis phosphorylierter PKA-Substrate (p-PKA-Subst) in H9c2 EGFP (Kontrollzellen) und H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (repräsentativ für n = 3). Stimulation erfolgte über die angegebenen Zeiträume mit 100 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688). Der Pfeil zeigt auf das in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP nach 30 min Stimulation verstärkt phosphorylierte PKA-Substrat.  $\beta$ -Aktin-Nachweis zur Beladungskontrolle. Kon: nicht stimulierte Kontrolle.

# **3.4.4** Einfluss von EP<sub>4</sub> auf Exchange protein directly activated by cAMP (Epac)

Als weitere Komponente neben PKA, welche die Signalweiterleitung in Reaktion auf eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung vermitteln kann, wurde Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) in Betracht gezogen. Rap1, eine kleine GTPase, stellt einen zentralen Effektor von aktiviertem Epac dar. Wie in Kapitel 2.11.4 beschrieben, wurden H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen auf die Aktivierung von Rap1 unter EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Stimulation analysiert. Bevor eine Untersuchung der von Epac abhängigen Rap1-Aktivierung erfolgte, wurde zunächst die Expression der im Herzen überwiegenden Form Epac1 in H9c2-Zellen nachgewiesen. Abbildung 30 zeigt den positiven Nachweis von Epac1 in H9c2-Totallysat und in AHVEC-Totallysat (*Adult Human Vascular Endothelial Cells*) als Positivkontrolle in Form einer Bande in einer Höhe von ca. 105 kDa.



**Abbildung 30**: Western-Blot zum Nachweis der Epac1-Proteinexpression. Eine Bande von ca. 105 kDa zeigt das Vorhandensein von Epac1 in H9c2-Totallysat und AHVEC-Totallysat als Positivkontrolle

Abbildung 31 zeigt den Nachweis einer EP<sub>4</sub>-vermittelten Rap1-Aktivierung in gehungerten H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen, welche entsprechend Kapitel 2.11.4 behandelt wurden. Die EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Stimulation im Bereich von 1 bis 30 min führte zu einer Erhöhung des Anteils an aktiviertem Rap1 gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle.



Abbildung 31: Nachweis von aktiviertem Rap1 in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP nach Stimulation mit 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) für die angegebenen Zeiträume (repräsentativ für n = 2). Rap1-GTP: aktiviertes Rap1, Kon: nicht stimulierte Kontrolle.

## 3.4.5 Einfluss von EP<sub>4</sub> auf MAP-Kinase ERK1/2

Als zentrale Komponente für eine Vielzahl GPCR-vermittelter Effekte wurde die  $EP_4$ abhängige Aktivität der MAP-Kinase ERK1/2 untersucht. Eine deutliche Reaktion auf die  $EP_4$ -Stimulation konnte bereits nach 5 min Stimulationsdauer nachgewiesen werden (Abb. 32).



**Abbildung 32**: Western-Blot zum Nachweis von phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2) in H9c2 EGFP (Kontrollzellen) und H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (repräsentativ für n = 4). Die Stimulation erfolgte über die angegebenen Zeiträume mit 100 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688).  $\beta$ -Aktin-Nachweis zur Beladungskontrolle. Kon: nicht stimulierte Kontrolle.

Die Aktivierung von ERK1/2 kann z. B. durch eine Aktiverung von PI3K oder Epac erfolgen. Es wurde jedoch auch schon eine  $EP_4$ -abhängige ERK1/2-Aktivierung beschrieben, welche einer EGFR-Transaktivierung bedarf. Um eine derartige Beteiligung zu untersuchen, wurde der  $EP_4$ -abhängige Phosphorylierungszustand von ERK1/2 in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP auch nach Vorinkubation mit dem EGF-Rezeptor-Inhibitor PD153035 analysiert. Abbildung 33 zeigt, dass die Aktivierung von ERK1/2 unabhängig von der Aktivierung des EGF-Rezeptors erfolgte.



Abbildung 33: Western-Blot zum Nachweis von phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2) in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP. Die Stimulation erfolgte nach 30-minütiger Vorinkubation mit 10 nM EGF-Rezeptor-Inhibitor (PD153035, + EI) und ohne vorangehende EGF-Rezeptor-Inhibierung (- EI) über die angegebenen Zeiträume mit 100 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688). β-Aktin-Nachweis zur Beladungskontrolle. Kon: nicht stimulierte Kontrolle.

# 3.4.6 Einfluss von EP<sub>4</sub> auf Proteinkinase B (AKT) und Glykogen-Synthase-Kinase3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )

Bei der PI3K-AKT-GSK3 $\beta$ -Signaltransduktionskaskade handelt es sich um einen Signalweg, der bereits in anderen Zellmodellen als EP<sub>4</sub>-abhängig beschrieben ist und als bedeutsam für die Überlebensfähigkeit von Zellen angesehen wird. In den hier untersuchten H9c2-Zellen hatte die EP<sub>4</sub>-Stimulation auf das Aktivitätsniveau von AKT und GSK3 $\beta$  keinen Einfluss (Abb. 34).



**Abbildung 34:** Western-Blots zum Nachweis phosphorylierter AKT-Kinase (p-AKT) bzw. phosphorylierter Glykogensynthase-Kinase- $3\beta$  (p-GSK $3\beta$ ) in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP nach Stimulation über die angegebenen Zeiträume mit 100 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) (repräsentativ für n = 3 bzw. n = 2). Kon: nicht stimulierte Kontrolle.

# 3.4.7 Einfluss von $EP_4$ auf die Translokation von $NF\kappa B$

Transkriptionsfaktoren der NF $\kappa$ B-Familie regulieren u. a. eine Vielzahl von Apoptoseassoziierten Genen und sind somit ein Element der Zelltod-Regulation. Um herauszufinden, ob die Stimulation des EP<sub>4</sub>-Rezeptors in gehungerten H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen eine Auswirkung auf diesen Aspekt hat, wurde die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B untersucht. Dazu wurde NF $\kappa$ B p65 (auch RelA genannt) in Zytosol und kernreicher Fraktion von H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen nachgewiesen, welche vor EP<sub>4</sub>-Stimulation ca. 24 h in Hungermedium mit 1 µM Diclofenac inkubiert wurden (s. 2.11.6). Es zeigte sich hierbei, dass unter Normoxie eine bis zu 2 h andauernde EP<sub>4</sub>-Stimulation das Verhältnis von nukleärem NF $\kappa$ B zu zytosolischem kaum beeinflusst. Auch eine entsprechende 24-stündige Stimulation unter Hypoxie zeigte lediglich eine leichte tendenzielle Erhöhung dieses Quotienten (Abb. 35).



**Abbildung 35:** A: Western-Blot zum Nachweis von NF $\kappa$ B p65 in nukleärer (NF) und zytosolischer Fraktion (ZF) von H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (repräsentativ für n = 3). Stimulation erfolgte für die angegebenen Zeiträume mit 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist. Kon: nicht stimulierte Kontrolle. +O<sub>2</sub>: Normoxie,  $-O_2$ : 24 h Hypoxie. **B**: Densitometrische Auswertung von A. Angegeben ist der Quotient aus der Signalintensität in der nukleusreichen Fraktion und der zytosolischen Fraktion, normalisiert auf die nicht stimulierte Kontrolle (n = 3, Alle Angaben sind Mittelwerte ± SEM).

## 3.4.8 Einfluss von EP4 auf die Aktivierung von Caspase-3

Bei den Caspasen handelt es sich um eine Familie von Cystein-Proteasen, die eine wichtige Rolle u. a. bei der Auslösung der Apoptose spielen. Unter ihnen gibt es Initiator-Caspasen, die wiederum so genannte Effektor-Caspasen durch proteolytische Spaltung aktivieren. Es wurde untersucht, ob die Stimulation des  $EP_4$ -Rezeptors einen Einfluss auf die Caspase-Aktivierung hat. Hierzu wurden H9c2 h $EP_4$ -YFP-Zellen vor der  $EP_4$ -Stimulation ca. 24 h in Hungermedium mit 1 µM Diclofenac inkubiert. Nach der Stimulation wurde Caspase-3, eine der Effektor-Caspasen, sowie ihre entsprechende prozessierte Form mittels Western-Blot nachgewiesen. In keinem Fall konnte die prozessierte Form von Caspase-3 einer Größe von 17 bzw. 19 kDa nachgewiesen werden (Abb. 36).



**Abbildung 36**: Western-Blot zum Nachweis von Caspase-3 (35 kDa) und dessen prozessierter Form (17 + 19 kDa) in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (repräsentativ für n = 3). Die Stimulation erfolgte mit 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) für die angegebenen Zeiträume. Kon: nicht stimulierte Kontrolle. +O<sub>2</sub>: Normoxie, -O<sub>2</sub>: 24 h Hypoxie.

# 3.4.9 Einfluss von EP₄ auf die EGFR-Aktivierung und Identifikation von Interaktionspartnern in H9c2 hEP₄-YFP-Zellen

Gemäß der in Kapitel 2.11.5 beschriebenen Methode wurde eine potenzielle Transaktivierung des EGF-Rezeptors infolge  $EP_4$ -Stimulation in H9c2 h $EP_4$ -YFP analysiert. Die Hybridisierung der Zelllysate mit der hierfür verwendeten Proteinmatrix und die anschließende immunologische Detektion zeigte eine  $EP_4$ -abhängige Interaktion des EGF-Rezeptor-Adapterproteins SHC2 mit dem EGF-Rezeptor und damit auch indirekt die Aktivierung des Rezeptors selbst (Abb. 37).



Abbildung 37: A: Anordnung der potenziell mit aktiviertem EGF-Rezeptor interagierenden Proteine auf der Proteinmatrix-Membran des verwendeten "EGFR Tyrosine Phosphorylation Array Kit". B: Immunologischer Nachweis von an spezifische SH2-Domänen gebundenem EGF-Rezeptor aus Totallysaten von H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP. Kon: nicht stimulierte Kontrolle, 5' EP<sub>4</sub>: Stimulation der Zellen mit 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) für 5 min.

# 3.5 Einfluss der EP₄-Rezeptor-Stimulation auf die Viabilität von H9c2-Zellen

Die Überlebensfähigkeit sowie auch indirekt die Schädigung von hEP<sub>4</sub>-exprimierenden H9c2-Zellen bzw. EGFP-exprimierenden Kontrollzellen wurde gemäß den Kapiteln 2.13 und 2.11.7 unter Normoxie sowie unter Hypoxie bestimmt. Hierbei wurde zunächst der Einfluss der EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Stimulation mittels L-000902688 untersucht. Außerdem kamen verschiedene Inhibitoren oder spezifische Aktivatoren zum Einsatz, um die Beteiligung bestimmter Signalwege zu bestimmen.

# 3.5.1 Einfluss der EP₄-Rezeptor-Stimulation auf die Viabilität von H9c2-Zellen unter Normoxie

Die Gabe des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten (10 nM) führte unter normoxischen Bedingungen bei 24 h gehungerten und mit 1  $\mu$ M Diclofenac vorinkubierten H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen zu einer signifikanten Verringerung der Zahl toter (SYTOX-positiver) Zellen um 33 % (Abb. 38). Die LDH-Aktivität des entsprechenden Zellüberstands als biochemischer Marker für die Zellschädigung war um 59 % vermindert (Abb. 39). Bei den EGFP exprimierenden Kontrollzellen hatte der EP₄-Agonist keinen signifikanten Einfluss auf diese beiden Parameter.



**Abbildung 38:** Zahl toter (SYTOX<sup>®</sup> Green-positiver) H9c2-Zellen nach 72 h serumfreier Kultur. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 48 h. EGFP: H9c2 EGFP, hEP<sub>4</sub>-YFP: H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (je n = 12, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM)



**Abbildung 39:** LDH-Aktivität im Zellüberstand von H9c2-Zellen nach 72 h serumfreier Kultur. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 48 h. EGFP: H9c2 EGFP, hEP<sub>4</sub>-YFP: H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (je n = 4, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM)

## 3.5.2 Einfluss der EP₄-Rezeptor-Stimulation auf die Viabilität von H9c2-Zellen unter Hypoxie

In einer modifizierten Versuchsdurchführung wurden die zuvor für ca. 24 h in Hungermedium mit 1  $\mu$ M Diclofenac inkubierten H9c2-Zellen mit 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist stimuliert. Anschließend wurden sie einer 24-stündigen Hypoxie (<0,1 % O<sub>2</sub>) mit anschließender Reoxygenierung für 1 h ausgesetzt. Hierbei wurde die Zahl toter H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen um rund 45 % durch Stimulation mit dem EP<sub>4</sub>-Agonisten reduziert (Abb. 40). Die LDH-Aktivität in den Zellüberständen als biochemischer Marker für die Zellschädigung war entsprechend um 66 % verringert (Abb. 41).



**Abbildung 40:** Zahl toter (SYTOX<sup>®</sup> Green-positiver) H9c2-Zellen nach 48 h serumfreier Kultur, davon die letzten 24 h unter Hypoxie und anschließende Reoxygenierung für 1 h. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 24 h. EGFP: H9c2 EGFP, hEP<sub>4</sub>-YFP: H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (je n = 14, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM)



**Abbildung 41**: LDH-Aktivität im Zellüberstand von H9c2-Zellen nach 48 h serumfreier Kultur, davon die letzten 24 h unter Hypoxie und anschließende Reoxygenierung für 1 h. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 48 h. EGFP: H9c2 EGFP, hEP<sub>4</sub>-YFP: H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (je n = 8 bis 11, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM)

### 3.5.3 Beteiligung möglicher Signalwege an EP₄-vermittelter Überlebensfähigkeit: PKA

Die Proteinkinase A wurde im Zuge der SYTOX Green<sup>®</sup> Viabilitätsversuche unter hypoxischen Bedingungen durch Rp-cAMPS inhibiert. Dieses cAMP-Analogon konkurriert mit cAMP um die Bindung an PKA, führt jedoch im Gegensatz zu cAMP nicht zur Aktivierung der PKA. Abbildung 42 zeigt, dass diese Art der PKA-Inhibierung keinerlei Effekt auf die EP<sub>4</sub>-vermittelte Steigerung der Überlebensfähigkeit hatte.



**Abbildung 42:** Zahl toter (SYTOX<sup>®</sup> Green-positiver) H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen nach 48 h serumfreier Kultur, davon die letzten 24 h unter Hypoxie und anschließende Reoxygenierung für 1 h. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 24 h, RP: 30 µM PKA-Inhibitor (Rp-cAMPS) 30 min vor EP<sub>4</sub>-Stimulation. (je n = 4 bis 23, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM)

#### 3.5.4 Beteiligung möglicher Signalwege an EP₄-vermittelter Überlebensfähigkeit: Epac/Rap1

Nachdem klar war, dass in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP distal des EP<sub>4</sub>-Rezeptors eine Signalweiterleitung hin zu Rap1 erfolgt (s. 3.4), wurden SYTOX<sup>®</sup> Green-Viabilitätsversuche und Untersuchungen der LDH-Aktivität im Zellüberstand mit direkter Aktivierung von Epac durchgeführt, um festzustellen, ob dieser Signalweg maßgeblich an der Verbesserung der Überlebensfähigkeit der Zellen beteiligt ist. Hierzu wurde das spezifisch Epac aktivierende cAMP-Analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP ("007") verwendet. Beide Untersuchungsmethoden zeigten im Ergebnis, dass "007" eine leichte bis mäßige Reduktion der Zahl toter Zellen bzw. der LDH-Aktivität im Zellüberstand verursacht (Abb. 43 und 44). Beides war jedoch statistisch nicht signifikant und somit nicht mit dem durch EP<sub>4</sub>-Stimulation hervorgerufenen Effekt vergleichbar.



**Abbildung 43**: Zahl toter (SYTOX<sup>®</sup> Green-positiver) H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen nach 48 h serumfreier Kultur, davon die letzten 24 h unter Hypoxie und anschließende Reoxygenierung für 1 h. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 24 h, "007": 250 µM Epac-Aktivator (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP) während der letzten 24 h (je n = 4 bis 23, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM)



**Abbildung 44**: LDH-Aktivität im Zellüberstand von H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen nach 48 h serumfreier Kultur, davon die letzten 24 h unter Hypoxie und anschließende Reoxygenierung für 1 h. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 24 h, "007": 250 µM Epac-Aktivator (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP) (je n = 3 bis 11, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM)

#### 3.5.5 Beteiligung möglicher Signalwege an EP₄-vermittelter Überlebensfähigkeit: PI3-Kinase

Wie in Kapitel 2.13 beschrieben, wurden im Zuge der Viabilitätsversuche Inhibitoren einiger dem EP<sub>4</sub>-Rezeptor nachgeschalteten Signalmoleküle verwendet. Unter Anderem kam hierbei der PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 zum Einsatz. Hierbei wurde dieser jeweils 30 min vor Stimulation des EP<sub>4</sub>-Rezeptors zugesetzt. Die Abbildungen 45 bis 47 zeigen die unter diesen Bedingungen ermittelten Ergebnisse des SYTOX Green<sup>®</sup> Viabilitätsversuches bzw. der LDH-Aktivitätsbestimmung. Unter Normoxie führte die Gabe des Inhibitors bei den EP<sub>4</sub>-Rezeptor exprimierenden H9c2-Zellen zu einer deutlich gesteigerten Zahl toter Zellen. Dies war sowohl mit als auch ohne EP<sub>4</sub>-Agonist der Fall. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen wurde zudem durch den PI3K-Inhibitor aufgehoben (Abb. 45). Unter hypoxischen Bedingungen hingegen konnte kein Effekt des Inhibitors festgestellt werden (Abb.46 und 47).



**Abbildung 45:** Zahl toter (SYTOX<sup>®</sup> Green-positiver) H9c2-Zellen nach 72 h serumfreier Kultur. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 48 h, LY: 10  $\mu$ M PI3K-Inhibitor (LY294002) 30 min vor EP<sub>4</sub>-Stimulation. EGFP: H9c2 EGFP, hEP<sub>4</sub>-YFP: H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (je n = 4 bis 12, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM)



**Abbildung 46:** Zahl toter (SYTOX<sup>®</sup> Green-positiver) H9c2-Zellen nach 48 h serumfreier Kultur, davon die letzten 24 h unter Hypoxie und anschließende Reoxygenierung für 1 h. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 24 h, LY: 10  $\mu$ M PI3K-Inhibitor (LY294002) 30 min vor EP<sub>4</sub>-Stimulation. EGFP: H9c2 EGFP, hEP<sub>4</sub>-YFP: H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (je n = 6 bis 14, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM)



**Abbildung 47:** LDH-Aktivität im Zellüberstand von H9c2-Zellen nach 48 h serumfreier Kultur, davon die letzten 24 h unter Hypoxie und anschließende Reoxygenierung für 1 h. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 24 h, LY: 10 µM PI3K-Inhibitor (LY294002) 30 min vor EP<sub>4</sub>-Stimulation. EGFP: H9c2 EGFP, hEP<sub>4</sub>-YFP: H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (je n = 3 bis 11, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM)

### 3.5.6 Beteiligung möglicher Signalwege an EP₄-vermittelter Überlebensfähigkeit: ERK1/2

Als weiterer Inhibitor fand die Substanz PD98059 zur Inhibierung der MAP-Kinase-Kinase MEK1 und damit indirekt auch der nachgeschalteten MAP-Kinase ERK1/2 Verwendung. Es zeigte sich im SYTOX<sup>®</sup> Green-Versuch, dass die MEK1-Inhibition unter normoxischen Bedingungen den EP<sub>4</sub>-vermittelten Effekt der verbesserten Überlebensfähigkeit soweit reduziert, dass hierduch kein signifikanter Unterschied zu den nicht EP<sub>4</sub>-stimulierten Zellen bestand (Abb. 48). Unter Hypoxie resultierte bei ansonsten identischen Bedingungen kein deutlicher Effekt durch den MEK1-Inhibitor, es bestand nach wie vor eine signifikant erhöhte Überlebensfähigkeit durch den EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonist (Abb. 49).



**Abbildung 48**: Zahl toter (SYTOX<sup>®</sup> Green-positiver) H9c2-Zellen nach 72 h serumfreier Kultur. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 48 h, PD: 10  $\mu$ M MEK1-Inhibitor (PD98059) 30 min vor EP<sub>4</sub>-Stimulation. EGFP: H9c2 EGFP, hEP<sub>4</sub>-YFP: H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (je n = 3 bis 12, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM)



**Abbildung 49:** Zahl toter (SYTOX<sup>®</sup> Green-positiver) H9c2-Zellen nach 48 h serumfreier Kultur, davon die letzten 24 h unter Hypoxie und anschließende Reoxygenierung für 1 h. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 24 h, PD: 10  $\mu$ M MEK1-Inhibitor (PD98059) 30 min vor EP<sub>4</sub>-Stimulation. EGFP: H9c2 EGFP, hEP<sub>4</sub>-YFP: H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP (je n = 4 bis 23, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM)

## 3.5.7 Beteiligung möglicher Signalwege an EP₄-vermittelter Überlebensfähigkeit: MMPs und EGFR

Zur Inhibierung einer möglichen Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch den EP<sub>4</sub>-Rezeptor, welche wahrscheinlich durch die Aktivität von Metalloproteinasen vermittelt wird, wurden letztere durch den Einsatz des unspezifischen MP-Inhibitors GM6001 inhibiert. Die EGF-Rezeptor-Aktivierung, d. h. dessen Tyrosin-Phosphorylierung, wurde mit Hilfe des spezifischen EGFR-Inihbitors PD153035 unterbunden. Beide Substanzen wurden jeweils in getrennten Versuchen analog zu den anderen Inhibitoren den Zellen 30 min vor Gabe des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten zugesetzt. Abbildung 50 fasst die resultierenden Ergebnisse zusammen. Beide Inhibitoren reduzierten den Effekt der EP<sub>4</sub>-Stimulation zwar leicht, der signifikante Unterschied zu den jeweils nicht EP<sub>4</sub>-stimulierten Zellen blieb jedoch bestehen.



**Abbildung 50**: Zahl toter (SYTOX<sup>®</sup> Green-positiver) H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen nach 48 h serumfreier Kultur, davon die letzten 24 h unter Hypoxie und anschließende Reoxygenierung für 1 h. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 24 h, EI: 10 nM PD153035 (EGFR-Inhibitor) 30 min vor EP<sub>4</sub>-Stimulation, GM: 100 nM GM6001 (MP-Inhibitor) 30 min vor EP<sub>4</sub>-Stimulation. (je n = 6 bis 23, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM)

#### 3.5.8 Beteiligung der Rezeptorinternalisierung an EP₄-vermittelter Überlebensfähigkeit: Inhibierung mittels hypertonischer Saccharose bzw. Concanavalin A

Um die Relevanz der üblicherweise nach Stimulation auftretenden Internalisierung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors für dessen Signalweiterleitung im vorliegenden System unter Hypoxie beurteilen zu können, wurde die Internalisierung durch Zugabe von hypertonischer Saccharose bzw. dem Pflanzenlectin Concanavalin A 30 min vor EP<sub>4</sub>-Rezeptorstimulation inhibiert (Heuser & Anderson, 1989; Yu *et al.*, 1993). Abbildung 51 zeigt die Ergebnisse der entsprechenden SYTOX Green<sup>®</sup> Viabilitätsversuche. Beide Substanzen führten einerseits basal zu einer deutlich erhöhten Zahl toter Zellen, waren jedoch nicht in der Lage, den durch EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Stimulation hervorgerufenen Effekt aufzuheben oder abzuschwächen. Im Gegenteil, der relative Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonist fiel in beiden Fällen noch größer aus als ohne Inhibitor.



**Abbildung 51**: Zahl toter (SYTOX<sup>®</sup> Green-positiver) H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen nach 48 h serumfreier Kultur, davon die letzten 24 h unter Hypoxie und anschließende Reoxygenierung für 1 h. Kon: ohne Stimulus, EP<sub>4</sub>: 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688) während der letzten 24 h, Sac: 0,4 M Saccharose 30 min vor EP<sub>4</sub>-Stimulation, ConA: 250 µg/ml Concanavalin A 30 min vor EP<sub>4</sub>-Stimulation. (je n = 3 bis 23, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM)

# **3.6** Genexpressionsanalyse in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP nach EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Stimulation

Um EP<sub>4</sub>-regulierte Gene in H9c2-Zellen zu finden, die zudem möglicherweise mit zytoprotektiven Wirkungen in Verbindung gebracht werden können, wurde eine Genexpressionsanalyse (s. 2.7.3) mit H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden diese zuvor ÜN gehungert und mit 1 µM Diclofenac inkubiert. Anschließend erfolgte eine 6-stündige Stimulation mit 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist und eine Microarray-Analyse im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen. Bei der Auswertung der DNA-Microarray-Daten wurden nur solche Gene als relevant reguliert angesehen, deren Expression durch die EP<sub>4</sub>-Stimulation in mindestens zwei der drei Messungen um den Faktor 2 oder höher geändert war. Unter diesen Kriterien fanden sich ausschließlich hochregulierte Gene. Tabelle 11 fasst die entsprechenden Ergebnisse zusammen.

**Tabelle 11:** Zusammenstellung der Gene, deren Expression nach 6-stündiger  $EP_4$ -Stimulation in H9c2 h $EP_4$ -YFP mindestens um Faktor 2 gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle geändert war. Auswertung erfolgte mit Affymetrix Microarray Suite 5.0. Die Expressionsänderung ist als Mittelwert angegeben. Fett gedruckt ist das Ergebnis, welches nach zusätzlicher Analyse mit Hilfe der Software "R" als signifikanter Treffer gewertet wurde (vgl. Text).

| Accession No. | Expressionsänderung<br>EP₄-Stimulation vs.<br>Kontrolle | Genprodukt   |
|---------------|---|--|
| AF321837      | + 4,64  | Regulator of G-protein signaling 2 (Rgs2)                                |
| AB051214      | + 4,05  | Trpc6 gene for transient receptor potential Ca <sup>2+</sup> channel C 6 |
| AY043246      | + 3,88  | Regulator of G-protein signaling 2 (Rgs2)                                |
| NM_017123     | + 3,48  | Amphiregulin   |
| NM_022236     | + 3,16  | Phosphodiesterase 10A  |
| NM_024388     | + 2,86  | Immediate early gene transcription factor NGFI-B (Nr4a1)                 |
| NM_053750     | + 2,64  | Natriuretic peptide precursor C (Nppc)                                   |
| AB027156      | + 2,46  | Phosphodiesterase 10A3   |
| NM_030845     | + 2,14  | Gro (Gro1)   |

Nach zusätzlicher eingehender Auswertung der Daten unter Anwendung des Programms "R" (s. 2.7.3) wurde das Gen *Areg* (*Accession No.* NC\_005113.2), welches für Amphiregulin kodiert, als bedeutsamstes Ergebnis gewertet, da hierbei im Gegensatz zu den anderen Treffern eine statistische Signifikanz gegeben war. Bei Amphiregulin handelt es sich um ein dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähnlichem Protein.

Die EP<sub>4</sub>-abhängige Amphiregulin-Regulation wurde mittels semiquantitativer RT-PCR verifiziert, wobei die Expression nach EP<sub>4</sub>-spezifischer Stimulation auf etwa das Doppelte anstieg (Abb. 52). Dieser Faktor entspricht der Größenordnung nach der Regulation, welche durch die Microarray-Analyse bestimmt wurde.



**Abbildung 52:** Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Amphiregulin-Expression in H9c2  $hEP_4$ -YFP-Zellen. A: Bande von 534 bp zeigt Amphiregulin-Produkt, Bande von 238 bp zeigt GAPDH-Produkt als internen Standard. +: 6 h Stimulation mit 100 nM  $EP_4$ -Agonist (L-000902688), -: nicht stimulierte Kontrolle. M: DNA-Größenstandard **B**: Densitometrische Auswertung von A. Kon: nicht stimulierte Kontrolle,  $EP_4$ : 6 h Stimulation mit 100 nM  $EP_4$ -Agonist (L-000902688). Angegeben ist der Quotient aus Amphiregulin- und GAPDH, normalisiert auf die nicht stimulierte Kontrolle (n = 3, \*p < 0,05, Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM).

# 3.6.1 Analyse der Amphiregulin-Expression in H9c2-Zellen

Die durch Stimulation des EP<sub>4</sub>-Rezeptors induzierte Expressionsteigerung von Amphiregulin wurde auf ihre Zeitabhängigkeit in einem Zeitraum von 1 h bis 24 h untersucht. Abbildung 53 zeigt, dass die Expression bereits nach einer Stimulationsdauer von 1 h deutlich gesteigert wurde und auch über einen Zeitraum von 24 h auf einem vergleichbar hohen Niveau bleibt. In den EGFP exprimierenden Kontrollzellen hingegen tritt auch über diesen längeren Zeitraum keine vermehrte Amphiregulin-Expression im Vergleich zum Basalniveau auf.



Abbildung 53: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Amphiregulin-Expression in H9c2-Zellen. Bande von 534 bp zeigt Amphiregulin-Produkt, Bande von 238 bp zeigt GAPDH-Produkt als internen Standard. Stimulation mit 100 nM EP₄-Agonist (L-000902688) für die angegebenen Zeiträume. Kon: nicht stimulierte Kontrolle, M: DNA-Größenstandard

Des Weiteren wurde durch Stimulation von H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen mit Forskolin überprüft, ob die Aufregulation der Amphiregulin-Expression cAMP-abhägig erfolgt. Aus Abbildung 54 geht hervor, dass Forskolin keinen Einfluss auf das Expressionsniveau von Amphiregulin hatte.



Abbildung 54: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Amphiregulin-Expression in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen. Bande von 534 bp zeigt Amphiregulin-Produkt, Bande von 238 bp zeigt GAPDH-Produkt als internen Standard. Stimulation mit 1  $\mu$ M Forskolin für die angegebenen Zeiträume. M: DNA-Größenstandard, P: Positivkontrolle mit RNA aus EP<sub>4</sub>-stimulierten Zellen (1 h, 10 nM L-000902688)

Um die EP<sub>4</sub>-abhängige Regulation der Amphiregulin-Expression in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP detaillierter zu untersuchen, wurden in diesem Zusammenhang ausgewählte Inhibitorsubstanzen verwendet. Diese umfassten den PI3-Kinase-Inhibitor LY294002, den MEK1-Inhibitor PD98059 sowie den EGF-Rezeptor-Inhibitor PD153035, die jeweils 30 min vor EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Stimulation zugesetzt wurden. Anschließend wurde die Amphiregulin-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Dabei zeigte sich, dass keiner der Inhibitoren die durch den EP<sub>4</sub>-Agonisten gesteigerte Expression beeinflusst (Abb. 55). Dies deutet darauf hin, dass die EP<sub>4</sub>-vermittelte Regulation der Amphiregulin-Expression unabhängig von diesen Signalwegen erfolgt.



**Abbildung 55**: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Amphiregulin-Expression in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen. Bande von 534 bp zeigt Amphiregulin-Produkt, Bande von 238 bp zeigt GAPDH-Produkt als internen Standard. +: 6 h Stimulation mit 10 nM EP<sub>4</sub>-Agonist (L-000902688), -: ohne EP<sub>4</sub>-Agonist, Kon: ohne Inhibitor, EI: 10 nM PD153035 (EGFR-Inhibitor) PI: 10 µM PI3-Kinase-Inhibitor, MI: 10 µM MEK1-Inhibitor (PD98059)

# 4 Diskussion

Vorausgegangene Untersuchungen weisen auf ischämieprotektive Wirkungen von Prostaglandinen hin, darunter auch solche des E-Typs (s. Kapitel 1.2.2). Beispielsweise existieren mehrere Befunde, welche kardioprotektive Wirkungen belegen, die durch den EP<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelt werden (Hohlfeld *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2005). Daneben gibt es wenige Untersuchungen, welche eine derartige Rolle auch für den EP<sub>4</sub>-Rezeptor nahelegen. Insbesondere solche EP<sub>4</sub>-vermittelten Effekte am Herzen bzw. in Kardiomyozyten sind bisher nur unzureichend analysiert worden. Erste Hinweise auf eine Beteiligung von EP<sub>4</sub> an der Kardioprotektion bei Ischämie/Reperfusion (I/R) lieferten die Untersuchung von EP₄-Knock-Out-Mäusen durch Xiao et al. (2004). Hierbei sind jedoch die protektiven Wirkungen nur indirekt (durch deren Fehlen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren) belegt. Zudem ist ein solches Modell nur schlecht dazu geeignet, protektionsrelevante Signalwege zu identifizieren, zumal nicht geklärt ist, welche Zelltypen in welchem Umfang beteiligt sind. Eine neuere Arbeit von Hishikari et al. (2008) beschreibt eine Kardioprotektion durch EP<sub>4</sub>-Wirkungen in Makrophagen, die auf eine Reduktion der Makrophagen-Infiltration ins Myokard zurückgeführt wurde. Eine verbesserte Herzfunktion nach I/R deutet einer Arbeit von Qian et al. (2008) zufolge auch auf eine protektive Rolle kardiomyozytärer EP4-Rezeptoren hin, wobei jedoch die hierbei essenziellen Signalwege nicht geklärt sind. Detaillierte Informationen zur Signaltransduktion sind Teil der Voraussetzungen für eine potenzielle Entwicklung pharmakologischer Therapien. Daher widmete sich die vorliegende Arbeit der Untersuchung EP<sub>4</sub>-vermittelter Kardioprotektion bei I/R im Hinblick auf zugrunde liegende Signalwege.

# 4.1 Einfluss der EP₄-Rezeptor-Stimulation am isoliert perfundierten Mäuseherzen

Um herauszufinden, ob eine Stimulation des EP<sub>4</sub>-Rezeptors im wildtypischen Mäuseherzen bei I/R zu einer Verbesserung der Funktion des linken Ventrikels nach einer Ischämie führt, wurden isoliert perfundierte Mäuseherzen untersucht. Das Modell des isoliert perfundierten Herzens erlaubt eine gezielte Untersuchung der im Organ selbst zugrunde liegenden biochemischen Prozesse, die unabhängig vom Blutkreislauf ablaufen. Hierfür wurde dem Perfusat der potente und hochspezifische EP<sub>4</sub>-Rezeptoragonist L-000902688 zugesetzt. Dieser ist bei physiologischem pH-Wert und einer Temperatur von 37 °C über einen längeren Zeitraum stabil (z. B.  $t_{1/2}$  in Ratte: 12 h, Young et al., 2004) und war daher prinzipiell gut für den geplanten Einsatzzweck geeignet. Wie aus Abbildung 16 hervorgeht, hatte der EP<sub>4</sub>-Agonist keine signifikanten Auswirkungen auf die gemessenen Basalfunktionen der Herzen. Für einen G<sub>s</sub>-gekoppelten Rezeptor, welcher eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes bewirkt, hätte man eine Steigerung von Kontraktilität und linksventrikulärem Druck erwarten können. Beispielsweise vermitteln die G<sub>s</sub>-gekoppelten β-adrenergen Rezeptoren am Herzen einen solchen Effekt (Rockman et al., 2002). Das Ausbleiben einer derartigen Wirkung kann mehrere Ursachen haben, die evtl. zusammenwirken. Möglicherweise reicht die Zahl an EP<sub>4</sub>-Rezeptoren auf Wildtyp-Kardiomyozyten nicht aus, um unter den gewählten Bedingungen die gemessenen Parameter zu beeinflussen. Xiao et al. (2004) hatten zwar im Gesamtgewebe von Mausventrikeln eine im Vergleich zu  $EP_1$ , EP<sub>2</sub> und EP<sub>3</sub> stark ausgeprägte EP<sub>4</sub>-Expression feststellen können, jedoch führte eine spezifische EP4-Stimulation nur in Nicht-Kardiomyozyten zu einem mehr als zehnfachen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. In Kardiomyozyten hingegen wurde lediglich ein entsprechender Anstieg auf das ca. 1,5-fache verzeichnet. Wahrscheinlich führt auch eine bestimmte subzelluläre Lokalisation von EP<sub>4</sub> bzw. der nachgeschalteten Effektorsysteme in Kardiozyten dazu, dass eine positiv inotrope Wirkung ausbleibt. Beispielsweise ist für die partikuläre PKA eine Kompartimentierung durch Assoziation mit bestimmten A-Kinase-Ankerproteinen (AKAP) beschrieben (Kapiloff, 2002). Durch Bindung an solche Ankerproteine können in der Zelle spezifisch räumlich lokalisierte Proteinkomplexe auftreten, die trotz der Beteiligung eines diffusionsfähigen sekundären Botenstoffes (cAMP) gezielte und lokal begrenzte Signalantworten auslösen (Dodge-Kafka et al., 2005). Man spricht dabei auch von so genannten Mikrodomänen. So können Rezeptoren, welche dieselben Effektormechanismen wie z.B. eine cAMP-Erhöhung ansprechen, dennoch unterschiedliche Wirkungen erzielen (Skalhegg & Tasken, 2000). Ferner spielen bei dieser räumlichen Beschränkung von cAMP-Effekten spezifisch lokalisierte Phosphodiesterase(PDE)-Isoformen eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass PDE2 und PDE4 in unterschiedlichen Zellkompartimenten zusammen mit jeweils einer bestimmten PKA-Isoform lokalisiert sind (Di Benedetto et al., 2008). Die cAMP-Antwort der EP<sub>4</sub>-Stimulation könnte zudem auch aufgrund einer bestehenden Kopplung an G<sub>i</sub> (Fujino & Regan,

2006), welche eine Inhibierung der AC bewirkt, relativ schwach ausfallen. Eine solche Kopplung ist wahrscheinlich je nach Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt.

Nach Ischämie zeigten die isoliert perfundierten Herzen unter EP<sub>4</sub>-Stimulation - wenn auch keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden - durchweg eine tendenziell bessere Wiederherstellung von ΔLVP (Abb. 17) und Kontraktilität (Abb. 18) gegenüber den nicht stimulierten Kontrollherzen. Auch die CK-Freisetzung ins Effluat als Maß für die Schädigung von Kardiomyozyten war unter EP<sub>4</sub>-Stimulation tendenziell niedriger als in den Kontrollen (Abb. 19). Dies bestätigt die bisherigen Hinweise darauf, dass der EP<sub>4</sub>-Rezeptor einen Teil zur Ischämieprotektion beiträgt (Xiao et al., 2004). Der Umstand, dass in der vorliegenden Arbeit die EP<sub>4</sub>-Stimulation keine deutlicher ausgeprägte - signifikante - Unterschiede gegenüber den Kontrollen hervorrief, steht in klarem Gegensatz zu den Ergebnissen von Xiao et al. (2004). In jener Arbeit wurde u. a. ein Mausmodell des akuten Myokardinfarktes verwendet, in welchem der vordere absteigende Ast der linken Koronararterie für 1 h verschlossen wurde. Die subkutane Injektion des EP<sub>4</sub>-Agonisten 4819-CD (Ono Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) bewirkte sowohl bei Verabreichung 1 h vor der Okklusion als auch 50 min danach eine signifikante Reduktion der Infarktgröße. Durch den anderen Agonisten sowie aufgrund des verwendeten in vivo-Modells, in welchem systemische Effekte wie eine bereits angesprochene Wirkung auf Makrophagen - nicht ausgeschlossen werden können, ist keine gute Vergleichbarkeit zu dieser Arbeit gegeben. Zudem fanden Mäuse mit einem gemischten genetischen Hintergrund Verwendung (129/Ola und C57BL/6). Ähnliches gilt hinsichtlich der Vergleichbarkeit zu den Arbeiten von Qian et al. (2008) und Hishikari et al. (2008), wobei zum einen ebenfalls ein in vivo-Modell zum Einsatz kam und andererseits ausdrücklich Monozyten bzw. Makrophagen an den EP4-vermittelten Effekten beteiligt sein sollen. Letztendlich war daher die Generierung von Mäusen mit kardiospezifischer EP<sub>4</sub>-Überexpression ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit, um den direkten Nachweis von EP<sub>4</sub>-vermittelten Wirkungen am Herzen zu führen.

# 4.2 Kardiospezifische Überexpression des humanen EP₄-Rezeptors im Mausmodell

Die Generierung von Mäusen mit kardiospezifischer Expression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors mit C-terminaler YFP-Markierung führte unter 38 potenziellen Founder-Tieren zu zwei Individuen mit erfolgreicher Transgen-Insertion (Abb. 20). Die Expression des Transgens in Nachkommen erfolgte jedoch in keinem Fall (Abb. 21). Eine einfache Erklärungsmöglichkeit für die nicht vorhandene EP<sub>4</sub>-Expression in den transgenen Mäusen könnte der Integrationsort der eingebrachten Fremd-DNA sein. Da bei der verwendeten Methode der Pronukleus-Injektion die Insertion des Transgens ungerichtet erfolgte, war dies evtl. in transkriptionell inaktiven Regionen des Genoms geschehen. Das Ausbleiben der Transgen-Expression steht aber möglicherweise auch mit einer potenziell hinderlichen Wirkung auf die Embryonalentwicklung der Tiere in Zusammenhang. Eventuell kam es trotz Verwendung des  $\alpha$ -MHC-Promotors, welcher die Expression auf Kardiomyozyten einschränken sollte, anteilig zu einer erhöhten Expression in benachbarten Geweben. In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde bei der kardiospezifischen Überexpression des porcinen EP<sub>3</sub>-Rezeptors in Mäusen ein derartiger Effekt beobachtet. Hier kam es zu einer Expression des Transgens auch in Aorta und Lunge (Martin, Inauguraldissertation 2006). Demnach wäre in der vorliegenden Arbeit eine anteilige EP<sub>4</sub>-Überexpression z. B. auch im Ductus Arteriosus (DA) denkbar. Wie bereits in Kapitel 1.4.3 erwähnt, ist der EP<sub>4</sub>-Rezeptor bei der Regulation des Zustandes dieses Verbindungsgefäßes von entscheidender Bedeutung. So stirbt der größte Anteil an EP<sub>4</sub>-Knock-Out-Mäusen kurze Zeit nach der Geburt aufgrund eines nicht geschlossenen DA (Sugimoto et al., 2000). Normalerweise steigt die EP<sub>4</sub>-Expression erst zum Ende der Embryonalentwicklung hin stark an (Yokoyama et al., 2006). Ein EP<sub>4</sub>-Überschuss in Verbindung mit einer zu frühen Expression könnte ein übermäßig stark ausgeprägtes und zu frühes Remodeling und damit ein vorzeitiges Verschließen des DA zur Folge gehabt haben.

Eventuell auftretende nachteilige Auswirkungen einer vorzeitigen EP₄-Überexpression sollten mittels der in Kapitel 2.8.2 beschriebenen Strategie zur konditionellen Expression, welche gezielt im Adultstadium erfolgen kann, umgangen werden können. Dies wird Gegenstand künftiger Untersuchungen sein. Entsprechend transgene Mäuse ("neoflox-Mäuse") konnten mittlerweile erfolgreich erzeugt werden. Diese geben das Transgen an die Nachkommen weiter und offenbar kommt es auch zur gewünschten kardialen Expression der Neomyzin-Resistenz (Abb. 24). Durch Sequenzierung des entsprechenden RT-PCR-Produktes einer Größe von 506 bp wurde die Expression der gespleißten RNA bestätigt (persönliche Mitteilung, Dr. Jutta Meyer-Kirchrath).

Die angestrebte Erzeugung von Mäusen mit kardiospezifischer Überexpression des humanen EP<sub>4</sub>-Rezeptors *ohne* YFP-Markierung hingegen erfolgte aufgrund der Überlegung, dass YFP möglicherweise einen nicht vorhersehbaren Einfluss auf bestimmte Signalmechanismen haben kann. So wurde z. B. im Zuge einer Untersuchung des NFkB-Signalweges entdeckt, dass das dem YFP sehr ähnliche EGFP signalrelevante Ubiquitinierungen inhibiert (Baens *et al.*, 2006). Ferner wurde gezeigt, dass EGFP die Aktin-Myosin-Interaktion in Kardiomyozyten behindern kann (Agbulut *et al.*, 2007). Solche Einflüsse sind offenbar stark vom Zelltyp und der konkreten Situation abhängig, und auf sie wird im folgenden Kapitel nochmals kurz eingegangen. Die Erzeugung EP<sub>4</sub>-transgener Mäuse mit dem entsprechenden unmarkierten Konstrukt führte zu insgesamt 22 potenziellen Founder-Tieren, wovon jedoch keines positiv getestet wurde (Abb. 22). Dies mag - auch im Hinblick auf den bereits erwähnten methodisch bedingten Umstand der ungerichteten Transgen-Insertion - einer zu geringen Zahl an potenziellen Foundertieren geschuldet sein.

#### **4.3** EP<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelte Signalwege in H9c2-Kardiomyoblasten

Zur Untersuchung EP<sub>4</sub>-vermittelter Wirkungen *in vitro*, die in Zusammenhang mit einer Kardioprotektion bei I/R gebracht werden können, sowie zugrunde liegender Signalmechanismen, wurde die von embryonalem Ventrikelgewebe des Rattenherzens abgeleitete Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2 verwendet (Kimes & Brandt, 1976). Diese Zellline wurde bereits vielfach von anderen Gruppen zur Analyse kardiomyozytärer Überlebensmechanismen verwendet (Hwang *et al.*, 2008; Borchi *et al.*, 2008; Mizukami *et al.*, 2008; etc.).

#### 4.3.1 Zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP)

Nach erfolgreicher Herstellung von H9c2-Zellen, welche den humanen  $EP_4$ -Rezeptor mit C-terminalem YFP-Tag überexprimierten (H9c2 h $EP_4$ -YFP, Abb. 25 bis 27), wurde zunächst die funktionelle Kopplung des Rezeptors an G<sub>s</sub> nachgewiesen (Abb. 28). Die

EP<sub>4</sub>-spezifische Stimulation mit L-000902688 führte zu einer cAMP-Erhöhung auf etwa das 4- bis 5-fache des Kontrollniveaus. Dieser Effekt blieb in den kontrolltransfizierten Zellen (H9c2 EGFP) aus. Neben der direkten AC-Aktivierung mit Forskolin verursachte in den Kontrollzellen lediglich die Stimulation mit PGE<sub>1</sub> einen geringen cAMP-Anstieg, was wahrscheinlich auf eine Aktivierung von endogen exprimierten ebenfalls G<sub>s</sub>-gekoppelten - EP<sub>2</sub>-Rezeptoren zurückzuführen ist. Die cAMP-Antwort von H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP auf Stimulation mit L-000902688 fällt gerade im Vergleich mit dem durch Forskolin deutlich gewordenen cAMP-Potenzial der Zellen recht niedrig aus. Dieser Befund passt zu den Ergebnissen von Fujino et al. (2002), die zeigten, dass die cAMP-Bildung in EP<sub>4</sub>-Rezeptor transfizierten HEK-Zellen nach PGE<sub>2</sub>-Stimulation im Vergleich zu entsprechenden EP<sub>2</sub>-Rezeptor transfizierten Zellen relativ gering ausfiel. Obwohl beide Zellpopulationen eine vergleichbar hohe Expression des Rezeptors aufwiesen und der EP4-Rezeptor zudem eine höhere PGE2-Affinität besitzt (Kiriyama et al., 1997), wurde in den EP<sub>4</sub>-exprimierenden HEK-Zellen lediglich ein cAMP-Anstieg auf das 10-fache verzeichnet, während die EP<sub>2</sub>-exprimierenden Zellen unter denselben Bedingungen einen deutlich höheren Anstieg auf das 71-fache der Kontrolle zeigten. Dies belegt, dass EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptoren, obwohl beide an G<sub>s</sub> gekoppelt, deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Signaltransduktion aufweisen. Eine Erklärungsmöglichkeit für die verschieden stark ausgeprägten cAMP-Effekte konnten Fujino & Regan (2006) anbieten, nachdem sie eine mögliche Kopplung von EP<sub>4</sub> an G<sub>i</sub> fanden. Demnach könnte eine gleichzeitig stattfindende Gegenregulation der AC durch G<sub>i</sub> den G<sub>s</sub>-vermittelten cAMP-Anstieg abschwächen.

Eine weitere Erklärung für ein relativ schwach ausgeprägtes cAMP-Signaling könnte eine schnell auftretende Desensibilisierung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors bieten. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Stimulationen zur anschließenden Bestimmung des cAMP-Gehaltes (Abb. 28) erfolgten ohne eine Vorinkubation mit dem COX-Inhibitor Diclofenac. Eine spätere Messung nach Diclofenac-Vorinkubation zeigte zwar unter PGE<sub>1</sub>- und EP<sub>4</sub>-Stimulation im Vergleich zu den Messungen ohne COX-Inhibierung unveränderte cAMP-Konzentrationen, der basale cAMP-Wert (ohne Stimulus) fiel jedoch niedriger als ohne Diclofenac aus (nicht gezeigt). Für den EP<sub>4</sub>-Rezeptor ist eine relativ schnelle Internalisierung mit daraus resultierender Desensibilisierung beschrieben (Bastepe & Ashby, 1999; Desai *et al.*, 2000; Slipetz *et al.*, 2001). Es ist vorstellbar, dass eine EP<sub>4</sub>-Stimulation durch endogen gebildetes PGE<sub>2</sub> bereits ein gewisses Maß an Rezeptorinternalisierung und damit Densensibilisierung verursacht. In Übereinstimmung damit zeigte sich bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie von H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP ohne Diclofenac-Vorinkubation keine deutlich ausgeprägte Membranlokalisation des YFP-markierten EP<sub>4</sub>-Rezeptors (nicht gezeigt). Mit Diclofenac-Vorinkubation war jedoch die membranäre Lokalisation des Rezeptors deutlich erkennbar (Abb. 27). Darüber hinaus war sowohl mit als auch ohne Diclofenac eine ausgeprägte perinukleäre Lokalisation des Rezeptors sichtbar. Dies mag zum Einen auf eine hohe Synthese-Aktivität am endoplasmatischen Retikulum zurückzuführen sein, bestätigt zum Anderen aber auch Beobachtungen von Bhattacharya *et al.* (1999), wonach in Endothelzellen und in überexprimierenden HEK-Zellen sowohl EP<sub>3</sub>als auch EP<sub>4</sub>-Rezeptoren im Bereich der Kernmembran vorkommen.

Eine evtl. auftretende basal erhöhte PGE<sub>2</sub>-Bildung könnte möglicherweise mit der YFP-Markierung des heterolog exprimierten Rezeptors in Zusammenhang stehen. Zhang *et al.* (2003) beschreiben, dass sowohl *green fluorescent protein* (GFP) als auch YFP in Endothelzellen eine gesteigerte Expression von *heat shock protein 70* (HSP70) verursacht. Die HSP70-Expression wiederum war in diesem Fall mit einer Hochregulation von COX-2 und einer gesteigerten PGE<sub>2</sub>-Bildung assoziiert. Wenn man von einer Vergleichbarkeit des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-YFP-Fusionsproteins mit reinem GFP ausgeht, könnte im Prinzip eine ähnliche Wirkung eintreten. Der Effekt konnte allerdings in einigen anderen Zelltypen nicht nachgewiesen werden. Dennoch wurde aufgrund der Annahme einer evtl. auftretenden erhöhten Prostaglandin-Synthese, welche möglicherweise einen Einfluss auf die Rezeptorinternalisierung ausübt, Diclofenac als COX-Inhibitor zur Vorbehandlung der Zellen in nachfolgenden Versuchen eingesetzt.

#### 4.3.2 Proteinkinase A (PKA)

Da H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen in Reaktion auf EP<sub>4</sub>-Stimulation erwartungsgemäß mit einer erhöhten cAMP-Bildung reagierten, wurden nachgeschaltete cAMP-regulierte Signalmechanismen analysiert. Die Proteinkinase A (PKA) ist Teil eines derart regulierten Signalmechanismus' und wird durch cAMP aktiviert. PKA phosphoryliert daraufhin eine Reihe unterschiedlicher Zielproteine, welche eine bestimmte Konsensussequenz zur Phosphorylierung (K/R-K/R-X-S-X) aufweisen. Um also PKA-Aktivität erkennbar zu machen, wurden Proteine mit solchen Sequenzen im phosphorylierten Zustand nach-
gewiesen (Abb. 29). Für den untersuchten Zeitraum konnte keine ausgeprägte und umfassende PKA-Aktivität festgestellt werden, was möglicherweise durch eine lediglich partielle PKA-Aktivierung zu erklären ist. Di Benedetto et al. (2008) hatten herausgefunden, dass verschiedene GPCR anscheinend distinkte subzelluläre Kompartimente mit verschiedenen PKA-Isoformen ansprechen und damit reguliert auf spezifische Zielproteine wirken. Dies geschieht offenbar auch mit durch die funktionelle Kopplung individueller PDE-Isoformen an spezifische GPCR (Mongillo et al., 2004). Zusammen mit dem Befund der relativ schwach ausgeprägten cAMP-Antwort nach EP<sub>4</sub>-Stimulation, scheint es daher nachvollziehbar, dass keine deutlicher ausgeprägte und breiter gestreute PKA-Aktivität zu verzeichnen war. Ein ca. 36-38 kDa großes PKA-Substrat war jedoch nach 30-minütiger EP<sub>4</sub>-Stimulation deutlich vermehrt phosphoryliert. Die Größe im Western-Blot lässt vermuten, dass es sich dabei um den zur CREB/ATF-Familie gehörenden Transkriptionsfaktor ATF1 handeln könnte (Jean et al., 1998). Fujino et al. (2005) hatten in EP<sub>4</sub>-transfizierten HEK-Zellen eine EP<sub>4</sub>-abhängige Phosphorylierung sowohl von CREB als auch von ATF1 nachweisen können, wenngleich diese auch bereits nach 5 min Stimulation mit PGE<sub>2</sub> auftrat. CREB und ATF1 binden als Homo- oder Heterodimere dieselbe Sequenz in Promotorregionen - cAMP response element (CRE) - und können damit im Prinzip die gleichen Wirkungen entfalten. Bleckmann et al. (2002) zeigten, dass ATF1 und CREB wichtig für die Zellviabilität während der murinen Embryonalentwicklung sind. Andererseits wurde anhand eines kardiomyozytenspezifischen Knock-Out in Mäusen deutlich, dass CREB in Kardiomyozyten für die normale Funktionalität des Herzens entbehrlich ist (Matus et al., 2007). Beide Arbeiten begründen die nicht essenzielle Rolle von CREB allerdings mit einer Kompensation durch ATF1 oder andere Transkriptionsfaktoren der CREB-Familie. Für CREB wurde mehrfach eine positiv regulatorische Wirkung auf die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 nachgewiesen (Pugazhenthi et al., 1999; Freeland et al., 2001). Matus et al. konnten in ihren Untersuchungen der CREB-Knock-Out-Mäuse jedoch keine Veränderung von Bcl-2-Expression und auch nicht der Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den Kontrolltieren feststellen. Möglicherweise spielt auch hierbei eine kompensatorische Funktion verwandter Transkriptionsfaktoren eine Rolle. Allerdings sind diese Befunde nur unter basalen Bedingungen erhoben wurden. Unter hypoxischen Bedingungen wurde für CREB in Kardiomyozyten sehr wohl eine Rolle an der Hochregulation von Bcl-2, also eine anti-apoptotische Wirkung, nachgewiesen

(Mehrhof *et al.*, 2001). Daher ist denkbar, dass auch ATF1 in Reaktion auf EP<sub>4</sub>-Stimulation zumindest unter Hypoxie anti-apoptotische Effekte vermitteln kann. Wenn man zudem die Ergebnisse von Fujino *et al.* (2005) berücksichtigt, sollte man in Erwägung ziehen, dass eine derartige EP<sub>4</sub>-vermittelte Aktivierung von CREB/ATF1 nicht unbedingt cAMP/PKA-abhängig geschieht (wie sonst bei vielen anderen G<sub>s</sub>gekoppelten Rezeptoren, z. B. bei EP<sub>2</sub>), sondern möglicherweise primär durch einen PI3K-Signalweg mit nachfolgender Beteiligung von AKT, Signalkomponenten, auf die im weiteren Verlauf eingegangen wird.

## 4.3.3 Exchange Protein directly activated by cAMP (Epac)

Als weitere cAMP-regulierte Komponente, welche demnach auch als Vermittler EP<sub>4</sub>spezifischer Wirkungen in Frage kam, wurde die Aktivität von Epac bestimmt. Dies erfolgte indirekt über den Nachweis von aktiviertem Rap1, einer kleinen GTPase, deren Aktivität von Epac abhängt. Yokoyama *et al.* (2008) hatten gefunden, dass in glatten Gefäßmuskel-Zellen des Ratten-Ductus Arteriosus der EP<sub>4</sub>-Rezeptor zu einer Rap1-Aktivierung führt, was einen wichtigen Anteil am Verschließen des Gefäßes hat (vgl. 1.4.4). Wie sich in der vorliegenden Arbeit zeigte, kommt es in Reaktion auf EP<sub>4</sub>-Stimulation auch in H9c2-Kardiomyoblasten zu einer raschen Aktivierung von Rap1, was auf eine Aktivierung von Epac hindeutet (Abb. 31). Unter den beiden bekannten Isoformen ist im Herzen Epac1 vorherrschend (Holz *et al.*, 2006). Dort spielt Epac in Kardiomyozyten eine wichtige Rolle bei der Bildung von Gap Junctions via Rap1 (Somekawa *et al.*, 2005). Eine neuere Arbeit von Kwak *et al.* (2008) zeigt für Epac1 auch eine AKT-abhängige protektive Wirkung auf Kardiomyozyten bei NOinduzierter Apoptose. Demnach könnte auch eine entsprechende Wirkung von Epac in Folge einer EP<sub>4</sub>-Stimulation vermutet werden.

## 4.3.4 Extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2)

Eine sehr deutlich ausgeprägte Reaktion auf die Stimulation des EP<sub>4</sub>-Rezeptors konnte für die MAP-Kinase ERK1/2 (bzw. p44/42-MAPK) nachgewiesen werden (Abb. 32). Bereits nach einer Stimulationsdauer von fünf Minuten war die Aktivität von ERK1/2 gegenüber der Kontrolle deutlich gesteigert und hatte nach 15 min ihr Maximum. In den kontrolltransfizierten Zellen blieb ein derartiger Effekt ganz aus. Eine durch EP<sub>4</sub>-Stimulation ausgelöste ERK1/2-Aktivierung wurde bereits mehrfach in HEK-Zellen, welche den EP<sub>4</sub>-Rezeptor rekombinant exprimierten, nachgewiesen. Dabei stellte sich die Frage, auf welchem Weg es dazu kommt. Desai & Ahsby (2001) konnten zeigen, dass die Aktivierung von ERK1/2 unabhängig von der EP<sub>4</sub>-Rezeptorinternalisierung geschieht. Damit erschien eine β-Arrestin-vermittelte MAP-Kinase-Aktivierung in der Form, wie sie z. B. für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor beschrieben ist (Shenoy et al., 2006), zunächst unwahrscheinlich. Mendez und LaPointe (2005) beschrieben eine ERK1/2-Aktivierung distal des EGF-Rezeptors, welcher durch EP<sub>4</sub> transaktiviert werden kann. Fujino et al. (2003) konnten - ebenfalls in HEK-Zellen - zeigen, dass die ERK1/2-Aktivierung nach EP<sub>4</sub>-Stimulation PI3K-abhängig geschieht und zur Expression von Early Growth Response-1 (EGR-1) führt. Insgesamt gibt es eine Reihe von Befunden, die belegen, dass die EP<sub>4</sub>-vermittelte ERK-Aktivierung über PI3K geschieht und auch in nativen Zellsystemen vorkommt (Fujino & Regan, 2006; Renò & Cannas, 2005; Pozzi et al., 2004). Angesichts der mehrfach nachgewiesenen Aktivierung von PI3K durch die G-Protein-Untereinheiten  $G_{\beta\gamma}$  (Voigt *et al.*, 2006; Yart *et al.*, 2002) Leopoldt *et al.*, 1998) und der gefundenen Kopplung von  $EP_4$  an  $G_1$  liegt es nahe, dass eben eine derartige G-Protein-Kopplung einen Signalweg über PI3K in Gang setzen kann und einen maßgeblichen Anteil an der EP4-Signaltransduktion hat. PI3K kann aber auch distal von EGFR angesprochen werden, was z. B. vor oxidativem Stress schützen kann (Nair & Sealfon, 2003; Liu et al., 2004). Die Inhibierung des EGF-Rezeptors in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP war in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht in der Lage, die EP4-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 abzuschwächen oder gar aufzuheben (Abb. 33). Daher erscheint es höchst unwahrscheinlich, dass diese über eine Transaktivierung des EGFR verläuft. Unabhängig davon ist für ERK1/2 neben einer Vielzahl von weiteren Effekten auch eine Beteiligung an der Kardioprotektion bei I/R - u. a. durch anti-apoptotische Wirkungen beschrieben (Jin et al., 2008; Hausenloy & Yellon, 2004). Daher muss bei protektiven EP<sub>4</sub>-Wirkungen auch eine Beteiligung von ERK1/2 in Betracht gezogen werden.

#### 4.3.5 Proteinkinase B (AKT) und Glykogen-Synthase-Kinase 3β (GSK3β)

Die aktive PI3K kann auch zur Aktivierung der Proteinkinase B (AKT) führen, was vielfach als ein weiterer bedeutsamer Signalweg zur Kardioprotektion bei I/R angesehen wird (Hausenloy *et al.*, 2005; Hua *et al.*, 2007; Mocanu & Yellon, 2007; etc.). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Signalmechanismus z. B. durch Prä- und Postkonditionierung ausgelöst wird. AKT wirkt dabei dem Zelluntergang im Myokard entgegen, indem es einige pro-apoptotische Substrate (z. B. GSK3β, Nishihara et al., 2006; Bad, Jonassen et al., 2001) inhibiert und andererseits anti-apoptotische (z. B. p70s6-Kinase, Jonassen et al., 2001; oder auch eNOS, Bell & Yellon, 2003) aktiviert. Angesichts der zuvor erwähnten EP<sub>4</sub>-vermittelten PI3K-Aktivierung hätte man in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP auch einen Einfluss auf die nachgeschalteten Kinasen AKT und GSK3β erwarten können. Im untersuchten Zeitraum konnte jedoch keine Aktivitätsänderung dieser beiden Komponenten nachgewiesen werden (Abb. 34). Daher ist unwahrscheinlich, dass im vorliegenden Modell anti-apoptotische Wirkungen über den AKT/GSK3β-Signalweg vermittelt werden. Allerdings gibt es Belege dafür, dass sowohl AKT als auch GSK3β in H9c2-Zellen PI3K-abhängig reguliert werden und unter bestimmten Bedingungen in Zusammenhang mit einer erhöhten Überlebensfähigkeit stehen. So wurde gezeigt, dass moderate Konzentrationen von Ethanol (10 - 500 µM) via PI3K, AKT und GSK3β der MPTP-Öffnung in H9c2-Zellen entgegenwirken (Zhou et al., 2008). Letztendlich kann - da AKT und GSK3ß nur unter Normoxie analysiert wurden - nicht ausgeschlossen werden, dass es im vorliegenden Modell zumindest unter hypoxischen Bedingungen zu einer gesteigerten Phosphorylierung von AKT und GSK3β kommt.

### 4.3.6 Caspasen

Beim apoptotischen Zelluntergang führen verschiedene Signalmechanismen in der Regel letztendlich zur Aktivierung von Effektor-Caspasen, die durch ihre proteolytische Aktivität eine ausführende Rolle beim Zelltod spielen (Chowdhury *et al.*, 2008). Die Apoptose trägt neben dem nekrotischen Zelltod auch zur Myokardschädigung durch I/R bei (Anversa & Kajstura, 1998; James, 1998). Da nicht geklärt ist, auf welchem Weg der EP<sub>4</sub>-Rezeptor kardioprotektive Wirkungen entfaltet, war auch ein möglicher Einfluss auf die Aktivierung von Caspasen in Erwägung zu ziehen. Daher wurde Caspase-3, eine der Effektor-Caspasen, nachgewiesen. Sowohl bei serumfreier Inkubation von H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP unter Normoxie als auch mit zusätzlicher Hypoxie von 24 h und 1 h Reoxygenierung blieb selbst in den nicht stimulierten Zellen eine Aktivierung der Caspase-3 aus (Abb. 36). Hierfür sind verschiedene Erklärungen denkbar. Zunächst wurden weitere zentrale Effektor-Caspasen (z. B. Caspase-6 und -7) nicht nachgewiesen, weshalb nicht sicher ist, dass der vorliegende Zelltod gänzlich Caspase-unabhängig verläuft. Mittlerweile wird sogar vermutet, dass die Caspase-Maschinerie in differenzierten Kardiomyozyten nicht vollständig aktiv ist und ihr eine untergeordnete Rolle zukommt (Bahi *et al.*, 2006).

Der programmierte Zelltod kann durchaus auch unabhängig von Caspasen erfolgen. Susin et al. (1999) charakterisierten in diesem Zusammenhang beispielsweise den Apoptose induzierenden Faktor (AIF), ein normalerweise im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiertes Flavoprotein. Dieses wird bei eintretender Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (MPTP-Öffnung) freigesetzt und transloziert in den Nukleus, wo es zur Chromatin-Kondensierung und -Fragmentierung führt. Dies geschieht, wie anhand isolierter Nuklei und rekombinantem AIF gezeigt wurde, unabhängig von weiteren zytosolischen Interaktionspartnern. Allerdings ist es offenbar von der konkreten Situation und dem Zelltyp abhängig, ob AIF alleine oder im Zusammenwirken mit Caspasen den Zelltod auslösen kann (Candé et al., 2002). Untersuchungen an der AIF-defekten Harlequin-Maus lassen sogar Zweifel aufkommen, ob AIF in Kardiomyozyten überhaupt pro-apoptotische Effekte hat und nicht vielmehr der Apoptose entgegenwirkt, indem es vor oxidativem Stress schützt (Van Empel et al., 2005). Jedenfalls findet in den H9c2-Zellen unter den gewählten Bedingungen eine typische Caspase-Kaskade, welche auch eine Prozessierung von Caspase-3 beinhaltet, offenbar nicht statt. Ob Caspasen bei EP<sub>4</sub>-vermittelten Wirkungen in Kardiomyozyten eine Rolle spielen, bleibt daher offen.

Ein weiterer Faktor, welchem eine maßgebliche Rolle in der Caspase-unabhängigen DNA-Degradation zugeschrieben wird, ist die Endonuklease G (EndoG). Auch hierbei handelt es sich um ein mitochondrial lokalisiertes Protein, welches nach seiner Freisetzung im Nukleus zur DNA-Fragmentierung führt (Li *et al.*, 2001; Parrish *et al.*, 2001). Bahi *et al.* (2006) zeigten, dass möglicherweise gerade in Kardiomyozyten EndoG essenziell am programmierten Zelltod beteiligt ist. Da mit AIF und EndoG also mehrfach Mechanismen ohne die zwingende Beteiligung von Caspasen auch im Zusammenhang mit ischämischen Ereignissen beschrieben wurden, müssen sie als weiterer potenzieller Angriffspunkt zelltodinhibierender Wirkungen bei I/R in Betracht gezogen werden (Bahi *et al.*, 2006; Cho & Toledo-Pereyra, 2008). Ob EP<sub>4</sub>-vermittelte Wirkungen jedoch mit derartigen Wegen des Zelltods in Zusammenhang stehen, bleibt in zukünftigen Arbeiten zu klären.

#### 4.3.7 Nukleärer Faktor Kappa B (NFκB)

Unter der Bezeichnung nukleärer Faktor Kappa B (NFKB) ist eine Familie von Transkriptionsfaktoren mit einer Vielzahl von Wirkungen zusammengefasst. Sie bilden nach ihrer Aktivierung Homo- oder Heterodimere, die im Nukleus an so gennante kb-Sequenzen der DNA binden und die Transkription vieler Gene zumeist positiv beeiflussen. Unter Anderem werden durch NFkB pro-apoptotische Wirkungen vermittelt. Beispielsweise wurde eine durch oxidativen Stress ausgelöste NFkB-Aktivierung im Rattenherzen mit einer TNF $\alpha$ -vermittelten Apoptose in Verbindung gebracht (Kin et al., 2008). Allerdings konnte hierbei aufgrund der eingesetzten Techniken nicht zwischen verschiedenen Zelltypen des Myokards differenziert werden. Andererseits ist für NFkB mehrfach eine anti-apoptotische Rolle beschrieben worden. So fanden Maulik et al. (1998), dass in isolierten Rattenherzen die protektiven Effekte einer Präkonditionierung (s. 1.5.3) von der NFkB-Translokation in den Nukleus abhängig sind. Des Weiteren konnten Bergmann et al. (2001) zeigen, dass in Reaktion auf eine TNF $\alpha$ -Stimulation NF $\kappa$ B aktiviert wird und dem Zelluntergang entgegen wirkt. Darüber hinaus existieren weitere Arbeiten, welche eine anti-apoptotische Rolle für NFκB belegen (Malik et al., 2006; Bubici et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob eine EP<sub>4</sub>-Stimulation mit einer Translokation von NF<sub>K</sub>B in den Nukleus in Zusammenhang steht. Wie sich jedoch zeigte, war für die analysierten Stimulationszeiträume unter Normoxie als auch nach Hypoxie und Reoxygenierung der nukleäre Anteil an NFkB p65 bestenfalls leicht erhöht (Abb. 35). Eine signifikante Änderung gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle konnte nicht festgestellt werden. Damit erscheint eine ausgeprägte  $EP_4$ -vermittelte NF $\kappa$ B-Aktivierung, die mit protektiven Wirkung in Verbindung stehen könnte, im vorliegenden Modell unwahrscheinlich.

### 4.3.8 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und Amphiregulin (AR)

Als eine weitere distal von EP<sub>4</sub> lokalisierte potenziell protektiv wirkende Komponente wurde der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) in Betracht gezogen. Mendez & LaPointe (2005) hatten in Kardiomyozyten eine EP<sub>4</sub>-vermittelte EGFR-Transaktivierung mit nachgeschalteter Aktivierung von ERK1/2 und resultierender Hypertrophie nachgewiesen. Eine solche Transaktivierung von EGFR, die zu einer nachfolgenden (cAMP/PKA-unabhängigen) Aktivierung von ERK führen kann, wurde zuvor schon für andere GPCR beschrieben. Dabei wird vermutet, dass diese Signaltransduktion initial von den  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins ausgeht (Pierce *et al.*, 2001). Zudem gibt es einige Hinweise darauf, dass bei der EGFR-Transaktvierung die c-Src-Kinase essenziell beteiligt ist (Nair & Sealfon, 2003; Liu et al., 2004). Die EGFR-Aktivierung hängt letztlich von der Verfügbarkeit freier EGFR-Liganden ab. Diese bilden die Gruppe der EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren, welche sieben Mitglieder umfasst, darunter z. B. Amphiregulin, Heparin-binding-EGF (HB-EGF) und EGF selbst. Sie sind als inaktive Pro-Form in der Zellmembran lokalisiert und werden durch membranäre Metalloproteinasen prozessiert. Somit werden extrazellulär lösliche Liganden verschiedener Größe frei, deren Gemeinsamkeit in einer EGF-ähnlichen Domäne besteht. Über diese binden und aktivieren sie autokrin und/oder parakrin EGFR (Schneider & Wolf, 2008). Die an der Prozessierung (dem sog. shedding) beteiligten Metalloproteinasen sind der Gruppe der ADAM-Proteine (A Disintegrin And Metalloprotease) zugehörig. Ein Beispiel hierfür ist ADAM12, welches als eine entscheidende Komponente zur Vermittlung kardialer Hypertrophie identifiziert wurde. Der wachstumsfördernde Effekt von ADAM12 ergibt sich aus der Freisetzung von HB-EGF und der dadurch gesteigerten EGFR-Aktivierung (Asakura *et al.*, 2002). Mehrfach konnte gezeigt werden, dass der transaktivierte EGFR zytoprotektiv wirkt. Dies geht wahrscheinlich auf eine nachgeschaltete Aktivierung des PI3K-AKT-Weges zurück und schützt z. B. vor oxidativem Stress (Nair & Sealfon, 2003; Shah et al., 2006). Für EGFR wurde auch eine explizit kardioprotektive Wirkung bei der Reperfusion von Kaninchenherzen gezeigt, die wiederum mit einer Aktivierung von AKT und ERK1/2 einherging (Förster et al., 2007). Um Hinweise auf einen derartigen Signalmechanismus in Reaktion auf die EP<sub>4</sub>-Stimulation in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP zu erhalten, wurde der Phosphorylierungsstatus von EGFR im entsprechenden Zelllysat bestimmt. Dies geschah mit Hilfe einer Matrix, welche diverse Proteine enthält, die mittels ihrer SH2-Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste in einem spezifischen Aminosäure-Kontext binden (vgl. 2.11.5). Hierbei wurde die Interaktion von aktiviertem EGFR-Rezeptor mit dem Protein SHC2 (Src Homology 2 Domain Containing Transforming Protein 2) nachgewiesen (Abb. 37). Dieses wiederum fungiert als Adapterprotein und bindet Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2), welches ein weiteres Adapterprotein darstellt und im Prinzip auch direkt an EGFR binden kann (Schlessinger & Ullrich, 1992). Grb2 koppelt an Son of Sevenless (Sos), wobei es sich

um einen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) für die kleine GTPase Ras handelt. Durch die damit entstehende räumliche Nähe von Sos und dem membranassoziierten Ras wird letzteres daraufhin aktiviert und kann über Raf die MAPK-Kaskade bis hin zur Aktivierung von ERK1/2 auslösen (Sakaguchi et al., 1998; Qian et al., 1998). Eine prinzipiell auftretende direkte Grb2-Interaktion mit EGFR hätte auch mit Hilfe der Proteinmatrix detektiert werden könnnen. Deratige Interaktionen von EGFR mit weiteren Signalkomponenten waren vielleicht nicht nachweisbar, weil das Produkt zur Benutzung mit humanen Lysaten entwickelt wurde. Möglicherweise war die Stimulationsdauer von 5 min auch ein zu kurzer Zeitraum, um weitere Interaktionen zu beobachten. Wahrscheinlich geschieht aber (zumindest in den ersten Minuten nach Stimulation) im vorliegenden Modell jedoch keine direkte Interaktion von Grb2 oder auch c-Src (ebenfalls Teil der Proteinmatrix) mit EGFR, sondern nur eine Signaltransduktion mittels SHC2 als Adapter. Letztendlich ist so aber eine EP<sub>4</sub>-abhängige rasche EGFR-Aktivierung nachgewiesen. Damit offenbart sich ein weiterer EP<sub>4</sub>vermittelter Signalweg, welcher an der Weiterleitung zytoprotektiver Effekte beteiligt sein könnte.

#### 4.3.9 EP<sub>4</sub>-regulierte Gene: Amphiregulin und weitere Gene

Die zur Identifizierung von EP<sub>4</sub>-regulierten Genen in H9c2-Zellen durchgeführte Expressionsanalyse ließ eine signifikante Aufregulation von Amphiregulin (AR) erkennen (Tab. 11, Abb. 52). Dabei handelt es sich, wie bereits erwähnt, um einen EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor, der vor allem durch ADAM17 (= TACE, *TNFa converting enzyme*) prozessiert wird. AR wirkt via EGFR autokrin und parakrin in vielen Zell-typen bzw. Zelllinien proliferationsfördernd, andererseits wurde auch eine gegenteilige Wirkung von AR nachgewiesen. Aus diesen gegenteiligen Wirkungen leitet sich auch seine Bezeichnung ab (Plowman *et al.*, 1990). Zumeist steht die proliferationsbzw. wachstumssteigernde Wirkung mit der Progression von Tumorzellen in Zusammenhang. So wurde z. B. gezeigt, dass PGE<sub>2</sub> über eine cAMP/PKA-abhängige Signaltransduktion die AR-Expression steigert und dies seinerseits unter Beteiligung weiterer Komponenten das Wachstum von Kolonkarzinom-Zellen vorantreibt (Shao *et al.*, 2003). Auch in T-Zellen wird die AR-Expression cAMP/PKA-abhängig und ohne die Mitwirkung von Epac erhöht (Johansson *et al.*, 2004). Dies geschieht offensichtlich anteilig mittels des CRE im AR-Promotor. Die Rolle von AR im Herzen ist noch

ungeklärt. Im Herzen von Diabetikern, welche sich einer Bypass-Operation unterzogen, wurde im Vergleich zu Nicht-Diabetikern eine hohe AR-Expression gefunden (Voisine et al., 2004). Der Grund hierfür ist unbekannt, ebenso wie kardiale Wirkungen von AR. RT-PCR-Analysen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass in H9c2-Zellen die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration mittels Forskolin nicht zur Expressionssteigerung von AR führt (Abb. 54). Dies ist insofern überraschend, als dass die AR-Expression mehrfach als cAMP-abhängig beschrieben wurde (Shao et al., 2003; Johansson et al., 2004). Andererseits enthält die AR-Promotor-Region neben einem CRE auch weitere Bindestelle für Transkriptionsfaktoren wie z. B. AP-1 (Plowman et al., 1990). Die Expressionsregulation geschieht darüber hinaus unabhängig von ERK1/2, PI3K und EGFR (Abb. 55). Nicht getestet wurde der Epac-Aktivator 007. Damit bleibt unklar, wie EP<sub>4</sub> auf die AR-Expression Einfluss nimmt, was jedoch via Epac/Rap geschehen könnte, auch wenn dies in anderen Arbeit z. T. ausgeschlossen wurde (Johansson *et al.*, 2004). Da  $EP_4$  in einigen Zelltypen u. a. in der Kernmembran lokalisiert ist (Bhattacharya et al., 1999), was evtl. auch in den hier verwendeten H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen der Fall ist (Abb. 27), könnte man aber auch einen direkten Einfluss auf AR regulierende Transkriptionsfaktoren vermuten. Letztlich trägt die EP<sub>4</sub>-abhängige AR-Regulation in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP, die mindestens bis zu 24 h nach Stimulation anhält (Abb. 53), wahrscheinlich zu einer längeren und verstärkten EGFR-Antwort bei oder ist sogar hauptverantwortlich für die EGFR-Aktivierung.

Neben Amphiregulin fanden sich einige weitere hochregulierte Gene, auch wenn deren Expression nicht signifikant erhöht war (Tab. 11). Mittels unterschiedlicher Sonden wurde das Gen für *Regulator of G-Protein Signaling* 2 (Rgs2) zweimal detektiert. Bei Rgs2 handelt es sich um eine früh regulierte Komponente der G-Protein-Signalmaschinerie, welches der Aktivität von  $G_q$ - und  $G_s$ -Proteinen durch direkte Interaktion bzw. durch Inhibierung der AC entgegenwirken kann (Roy *et al.*, 2006). Möglicherweise trägt es damit zu der relativ schwach ausgeprägten cAMP-Antwort der EP<sub>4</sub>-Stimulation bei. Ebenfalls in dieses Schema passen die ebenso hochregulierten Phosphodiesterasen 10A2 bzw. 10A3, welche intrazellulär gebildetes cAMP und cGMP zu AMP bzw. GMP hydrolysieren (Fujishige *et al.*, 1999). Ebenfalls tendenziell hochreguliert ist das Vorläufermolekül des aktiven C-Typ Natriuretischen Peptids (CNP). CNP kann dem Remodeling nach Myokardinfarkt entgegenwirken und hat antihypertrophe Effekte auf Kardiomyozyten (Soeki *et al.*, 2005; Tokudome et al., 2004). Remodeling-bezogene Effekte sind von Wirkungen auf kardiale Fibroblasten abhängig, darüber hinaus vermittelt endothel-abgeleitetes CNP durch Regulation des koronaren Blutflusses eine I/R-Protektion (Hobbs *et al.*, 2004). Daher tragen im Gesamtherzen Kardiomyozyten möglicherweise auch durch eine Freisetzung von CNP zu protektiven Effekten bei, wohingegen eine autokrine schützende Wirkung gegen simulierte I/R in einer reinen Kardiomyoblasten-Zellkultur wahrscheinlich von geringerer Bedeutung ist.

## 4.4 Zytoprotektive EP<sub>4</sub>-vermittelte Signalwege in H9c2-Zellen

Zum direkten Nachweis von EP4-abhängigen zytoprotektiven Wirkungen wurde zunächst der Einfluss der EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Stimulation auf die Überlebensfähigkeit bzw. Schädigung von gehungerten H9c2-Zellen unter normoxischen Bedingungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die EP<sub>4</sub>-Stimulation das Absterben von H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen signifikant reduziert. Dies wird durch die verringerte Zahl toter Zellen (Abb. 38) und überdies durch die verminderte LDH-Freisetzung (Abb. 39) belegt. Mit der Hypoxie und Reoxygenierung der H9c2-Zellen wurde ein Modellsystem etabliert, welches wesentliche Aspekte der Ischämie und Reperfusion in vitro simuliert. Zum einen kommt während einer Ischämie die Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen aus dem Blutkreislauf zum Erliegen. Dies spiegelte sich im Modellsystem näherungsweise durch das Hungern der Zellen wider. Die ebenfalls ausbleibende Sauerstoffversorgung in dieser Phase wurde durch die Inkubation der Zellen in einer nahezu sauerstofffreien Atmosphäre (< 0,1 %) nachgestellt. Ebenso wie in vivo (Dennis et al., 1991) kam es auch im hier verwendeten Modellsystem zu einer Ansäuerung des Milieus, was durch den Farbumschlag des pH-Indikators im Kulturmedium deutlich wurde (nicht gezeigt). Durch die Reperfusion nach Ischämie erfolgt eine erneute Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff. Das gewählte Modellsystem berücksichtigte bzw. imitierte mit der Reoxygenierung der Zellen zwar nur die erneute Sauerstoffversorgung, was aber ohne Zweifel den für die Zellschädigung bedeutsameren Aspekt darstellt. Der EP<sub>4</sub>-vermittelte Effekt der Reduzierung des Zelltods trat nach Hypoxie und Reoxygenierung im Vergleich zu normoxischen Bedingungen noch deutlicher zu Tage (Abb. 40 u.41). Einerseits werden also offenbar apoptotische/nekrotische Vorgänge unter Normoxie inhibiert, anderseits solche unter Hypoxie und nach Reoxygenierung. Möglicherweise sind dabei Vorgänge involviert, die sich nicht vollständig überschneiden. Daher wäre denkbar, dass EP<sub>4</sub> in den Kardiomyoblasten auf mehrere verschiedene Aspekte Einfluss nimmt. Letztlich stehen diese Aspekte wohl mit der Regulation des Zelltods direkt oder indirekt in Zusammenhang. Hierfür kommt eine ganze Reihe prinzipiell bekannter Signalwege in Betracht, von denen viele bereits zuvor erwähnt wurden. Mit dem Ziel, die für die zytoprotektiven Effekte relevanten Signalwege zu bestimmen bzw. die Zahl der in Frage kommenden Wege einzugrenzen, kamen im Zuge der Viabilitätsversuche unter Hypoxie verschiedene Agonisten bzw. Inhibitoren zum Einsatz. Da für die EP<sub>4</sub>-Stimulation in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP zuvor eine Aktivierung von PKA, Epac, ERK1/2 und EGFR, sowie eine Expressionssteigerung von Amphiregulin nachgewiesen werden konnte (Kap. 4.3), war die Vermutung naheliegend, dass eine oder mehrere dieser Signalkomponenten für die Vermittlung zellprotektiver Effekte bei Hypoxie und Reoxygenierung wichtig ist.

## 4.4.1 Proteinkinase A (PKA)

Die Inhibierung von PKA mit Rp-cAMPs konnte die EP<sub>4</sub>-abhängige Zellprotektion unter Hypoxie nicht aufheben (Abb. 42). Dies könnte prinzipiell mehrere Ursachen haben. Einerseits wäre vorstellbar, dass die EP<sub>4</sub>-vermittelte Signaltransduktion unter hypoxischen Bedingungen anders verläuft und damit eine PKA-Aktivierung ausbleibt. Andererseits ist aber wahrscheinlich die prinzipiell in Reaktion auf EP<sub>4</sub>-Stimulation nachgewiesene PKA-Aktivität für die beobachtete überlebenssteigernde Wirkung unter Hypoxie nicht essenziell. Eine Beteiligung von CREB, wie sie im Zusammenhang mit PKA in Kapitel 4.3.2 als ein anti-apoptotischer Mechanismus angesprochen wurde, kann damit allerdings nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Unabhängig von PKA konnte eine protektiv wirkende CREB-Aktivierung auch für den MAPK-Signalweg via ERK1/2 nachgewiesen werden (Bonni *et al.*, 1999).

### 4.4.2 Exchange Protein directly activated by cAMP (Epac)

Die spezifische Aktivierung von Epac mit "007" führte unter Hypoxie nicht zu einer zytoprotektiven Wirkung auf die H9c2-Zellen, wie sie durch den EP<sub>4</sub>-Agonisten erreicht wurde (Abb. 43 u. 44). In diesem Zusammenhang fällt jedoch insbesondere

bei Betrachtung der Zahl SYTOX-positiver Zellen (Abb. 43) auf, dass mit "007" auch für die EGFP exprimierenden Kontrollzellen eine tendenziell gesteigerte Überlebensfähigkeit zu verzeichnen war. Diese verfügen zwar im Vergleich zu H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP über keine nennenswerte Zahl an EP<sub>4</sub>-Rezeptoren, jedoch über Epac, wie zuvor anhand wildtypischer H9c2-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 30). Möglicherweise tritt hier ein protektiver Effekt via Epac zu Tage, der allerdings derart moderat ausfällt, dass ein signifikanter Unterschied zu den entsprechenden nicht stimulierten Zellen ausbleibt. Somit könnte eine Signaltransduktion via Epac einen kleinen Beitrag zur Überlebensfähigkeit der Zellen beisteuern, ist allerdings für sich genommen nicht ausreichend, um die Zellen signifikant vor I/R-Schäden zu schützen.

## 4.4.3 Extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2)

Auch die indirekte Inhibierung von ERK1/2 durch Blockierung der vorgeschalteten MEK-Aktivität mit PD98059 konnte die EP<sub>4</sub>-abhängige Zytoprotektion unter Hypoxie nicht aufheben (Abb. 49). Zwar existieren ausgehend von EP<sub>4</sub> mehrere Signalwege, die zu einer Aktivierung von ERK1/2 führen und auch prinzipiell bei der Vermittlung zellprotektiver Effekte von Bedeutung hätten sein können (vgl. Kap. 1.4.2). Allerdings ist ERK1/2 isoliert betrachtet im verwendeten Modellsystem unter hypoxischen Bedingungen für die EP<sub>4</sub>-abhängige Steigerung der Überlebensfähigkeit offenbar nicht essenziell. Unter Normoxie führte die Vorinkubation von H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen mit dem MEK-Inhibitor PD98059 zur Aufhebung des signifikanten Unterschiedes zwischen den EP<sub>4</sub>-stimulierten Zellen und jenen ohne EP<sub>4</sub>-Stimulation, allerdings mit einem hohen Standardfehler.

## 4.4.4 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und Amphiregulin (AR)

Aufgrund der nachgewiesenen EP<sub>4</sub>-vermittelten EGFR-Aktivierung (Abb. 37) sowie einer ebenso EP<sub>4</sub>-abhängigen Expressionssteigerung von AR (Abb. 52 u. 53) - einem typischen EGFR-Liganden - war zur weiteren Untersuchung zytoprotektiver Signalwege der Einsatz eines EGFR-Inhibitors naheliegend. Die zu diesem Zweck verwendete Substanz PD153035 war ebenfalls nicht in der Lage, den protektiven Effekt der EP<sub>4</sub>-Stimulation unter Hypoxie aufzuheben (Abb. 50). Allerdings fiel die EP<sub>4</sub>-Wirkung im Vergleich zur Gruppe ohne EGFR-Inhibitor etwas geringer aus. Für den u. a. EP<sub>4</sub>regulierten EGFR-Liganden AR ist auch eine EGFR-unabhängige, anti-apoptotische Wirkung über den *insulin-like growth factor receptor* (IGFR) beschrieben (Hurbin *et al.*, 2002). Demzufolge wäre eine Beteiligung von AR an der gesteigerten Überlebensfähigkeit durch EP<sub>4</sub>-Stimulation immer noch denkbar, wenn auch möglicherweise nicht über EGFR. Um die Bedeutung von AR in diesem Zusammenhang näher zu untersuchen, fand der Metalloproteinase-Inhibitor GM6001 Verwendung. Da - wie bereits erwähnt - AR an der Zelloberfläche hauptsächlich durch die Metalloproteinase TACE (= ADAM17) aus dem membrangebundenem Vorläufermolekül freigesetzt wird, konnte mit GM6001 von einer reduzierten Verfügbarkeit von AR als Rezeptor-Ligand ausgegangen werden. Wie auch unter Inhibierung von EGFR fiel die EP<sub>4</sub>-Wirkung mit GM6001-Vorinkubation schwächer aus als in der Gruppe ohne einen der beiden Inhibitoren (Abb. 50). Der signifikante Effekt des EP<sub>4</sub>-Agonisten blieb jedoch bestehen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Amphiregulin und EGFR wahrscheinlich in einem gewissen Umfang an der Vermittlung zytoprotektiver Effekte nach EP<sub>4</sub>-Stimula-tion beteiligt, aber einzeln betrachtet nicht essenziell sind.

### 4.4.5 Phosphatidylinsotol-3-Kinase (PI3K-AKT-Weg)

Für den EP<sub>4</sub>-Rezeptor wurde in anderen Zellmodellen mehrfach eine Aktivierung der PI3K beschrieben (Fujino et al., 2003 & 2005; George et al., 2007). Wie bereits einleitend in Kapitel 1.4.2 ausgeführt, nimmt die PI3K im Myokard eine zentrale Rolle bei der Vermittlung überlebensfördernder Wirkungen ein. Dies ergibt sich vor allem aus der distalen Aktivierung von AKT und ERK1/2. Diese Kinasen werden der Gruppe der sog. RISK-Proteine (reperfusion injury salvage kinases) zugerechnet, deren Aktivität zu Beginn der Reperfusion oder auch bereits vor der Ischämie zu einer ausgeprägten Protektion gegen I/R-Schäden führt (Hausenloy & Yellon, 2004 & 2007). Eine Inhibierung der PI3K unter normoxischen Bedingungen mit LY294002 behinderte bei H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP den viabilitätsfördernden Effekt der EP<sub>4</sub>-Stimulation und führte außerdem zu einer basal deutlich erhöhten Zahl an SYTOX<sup>®</sup> Green-positiven Zellen (Abb. 45). Dies deutet auf ein gewisses Ausmaß konstitutiver PI3K-Aktivität in diesen Zellen hin. Damit übereinstimmend wurde in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP auch eine basale Phosphorylierung der nachgeschalteten AKT nachgewiesen (Abb. 34). Zwar wird diese durch die EP<sub>4</sub>-Stimulation nicht verstärkt, allerdings wird evtl. bereits durch die basale Aktivität eine gewisses Maß an anti-apoptotischer Wirkung vermittelt. Damit ist es zunächst nachvollziehbar, dass eine PI3K-Inhibierung, die wahrscheinlich auch in einer verminderten AKT-Aktivität resultiert, zu einem verstärkten Zelluntergang führt. Da die PI3K-Inhibierung in den EGFP-exprimierenden Kontrollzellen jedoch nicht zu einem vermehrten Zelltod führt, existiert offensichtlich ein Unterschied zwischen den beiden Zelltypen, der möglicherweise mit der EP<sub>4</sub>-Überexpression in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP oder aber der EGFP-Überexpression in H9c2 EGFP zusammenhängt. Um diesen Umstand weiter zu untersuchen, wäre evtl. ein künftiger Vergleich mit entsprechend behandelten Wildtyp-H9c2-Zellen hilfreich. Wie in Kapitel 4.3.1 erwähnt, kann GFP unter Umständen eine verstärkte Expression von HSP70 nach sich ziehen (Zhang et al., 2003). Dies ist auch für das sehr ähnliche EGFP vorstellbar, zumal für dieses gezeigt wurde, dass es auch andere grundlegende zelluläre Prozesse wie z. B. die Polyubiquitinierung beeinflussen kann (Baens et al., 2006). Eine erhöhte Expression von HSP70 schützt Rattenherzen vor I/R-Schäden durch den Erhalt der mitochondrialen Funktion, ein Mechanismus der auch in kultivierten Kardiomyozyten bei Hypoxie und Reoxygenierung funktioniert und zudem mit einer geringeren Bildung von ROS einhergeht (Jayakumar et al., 2001; Williamson et al., 2008). Zwar sind diese Effekte als relevant zum Schutz vor Schädigungen durch I/R bzw. simulierte I/R beschrieben, dennoch lässt sich nicht ausschließen, dass sie auch - wie hier - unter normoxischen Bedingungen bei gehungerten Zellen einen Beitrag zu deren Überlebensfähigkeit leisten können. Welche Ursachen auch dem Unterschied zwischen beiden Zelltypen in der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen, unter Hypoxie beeinflusst die PI3K-Inhibierung die Viabilität der Zellen sowie die EP<sub>4</sub>-bedingte überlebensfördernde Wirkung in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP nicht (Abb. 46 u. 47).

Demnach existieren hinsichtlich der EP<sub>4</sub>-abhängigen Signaltransduktion und/oder der PI3K-Wirkungen in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP offensichtlich Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie. Dies entspricht in der Tendenz den bereits erwähnten Ergebnissen der Viabilitätsversuche unter MAPK-Inhibierung. Möglicherweise findet also in den Zellen zumindest anteilig eine EP<sub>4</sub>-abhängige Signaltransduktion via PI3K zu ERK1/2 statt, was dem Prinzip nach auch schon für entsprechend transfizierte HEK293-Zellen beschrieben wurde (Fujino *et al.*, 2003). Die zugrunde liegenden Ursachen für die Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie müssen in Zukunft geklärt werden. Fest steht, dass die PI3K unter hypoxischen Bedingungen für die Vermittlung des protektiven EP<sub>4</sub>-Effektes in Kadiomyoblasten offensichtlich nicht essenziell ist.

#### 4.4.6 Rezeptorinternalisierung

Mehrfach wurde gezeigt, dass die GPCR-Internalisierung an sich ein für die Signaltransduktion des Rezeptors relevanter bzw. essenzieller Vorgang ist. Daaka *et al.* (1998) beschrieben z. B., dass die  $\beta$ -Arrestin-vermittelte Internalisierung des  $\beta_2$ adrenergen Rezeptors ein essenzielles Ereignis für eine vollständig ausgeprägte MAPK-Aktivierung ist. Dabei wurde vermutet, dass sich nach Ligandenbindung ein rezeptorassoziierter Multiprotein-Komplex ausbildet, welcher u. a. die MAPK-Kinase-Kinase Raf enthält, die wiederum durch die Internalisierung in die räumliche Nähe zur zytosolisch lokalisierten MAPK-Kinase MEK gebracht wird. So kann eine Signalweiterleitung von Raf an MEK erfolgen. Mit dem Nachweis, dass  $\beta$ -Arrestin an aktivierte  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren bindet und dabei die Src-Kinase rekrutiert, welche relativ nahe am Anfang einer Signaltransduktionskaskade hin zu ERK1/2 steht, wurde diese Vermutung bestätigt (Luttrell *et al.*, 1999).

Es erscheint nicht unwahrscheinlich, dass solche Mechanismen evtl. auch für die Signaltransduktion des EP<sub>4</sub>-Rezeptors eine wichtige Rolle spielen, zumal es auch einige Parallelen zwischen dem EP<sub>4</sub>- und dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor gibt, wie z. B. die relativ schnelle Internalisierung und die Kopplung an sowohl G<sub>s</sub> als auch G<sub>1</sub>. (January *et al.*, 1997; Xiao & Lakatta, 1995). Aus diesem Grund wurden in den Versuchen der vorliegenden Arbeit zwei Substanzen zur Inhibierung der Rezeptorinternalisierung eingesetzt, Concanavalin A (ConA) und hypertonische Saccharose (Sac). Beide Stoffe waren nicht in der Lage, die überlebensfördernde Wirkung der EP<sub>4</sub>-Stimulation unter Hypoxie aufzuheben (Abb. 51). Allerdings verursachten sowohl Sac als auch ConA in Abwesenheit des EP<sub>4</sub>-Stimulus eine deutliche Zunahme des Zellsterbens um jeweils über 100 % gegenüber den gänzlich unbehandelten Zellen. Die relative Ausprägung der gesteigerten Viabilität durch EP<sub>4</sub>-Stimulation war jedoch sowohl mit Sac als auch mit ConA deutlich stärker als unter allen anderen Bedingungen, welche im Zuge der SYTOX<sup>®</sup> Green-Viabilitätsversuche dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

Bei ConA handelt es sich um ein Pflanzenlectin, welches bevorzugt Trisaccharide aus D-Mannose bindet aber auch eine Vielzahl von glykosylierten Proteinen und Lipiden (Lis & Sharon, 1998). Es wurde in der Vergangenheit bereits vielfach zur unspezifischen Inhibierung der Rezeptorinternalisierung benutzt (z. B. Yu *et al.*, 1993; Daaka *et al.*, 1998). In Anbetracht der Tatsache, dass ConA durch seine zuckerbindenden

Eigenschaften eine Quervernetzung von Oberflächenglykoproteinen verursacht und unspezifisch die Endozytose inhibiert, verwundert es nicht, dass es nach längerer (24 h) Exposition zu einem vermehrten Zellsterben kommt. In einer Dissertation unseres Instituts, welche sich mit dem IP-Rezeptor befasste, wurden bereits anhand anderer Zellkulturmodelle entsprechende Beobachtungen unter Anwendung von ConA gemacht (Randewig, Inauguraldissertation 2003). Dennoch stellt sich die Frage, wie der aktivierte EP<sub>4</sub>-Rezeptor H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen weitestgehend vor den Auswirkungen von ConA zu schützen vermag. Für periphere Blutmonozyten bzw. T-Zellen ist beschrieben, dass ConA zu einer Sekretion von IFN-y führt, welches apoptotisch wirken kann (Dooper et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von EP<sub>2</sub>/EP<sub>4</sub>-Rezeptoren diesem Effekt cAMP-abhängig entgegenwirkt (Okano et al., 2006). Ein derartiger Mechanismus ist in Kardiomyoblasten aber unwahrscheinlich, da IFN-y vorwiegend in T-Zellen und Natural Killer-Zellen produziert wird (Young & Hardy, 1995). Allerdings kann wegen der recht unspezifischen Effekte von ConA ohne eingehendere Untersuchungen nur gemutmaßt werden, welche Aspekte in diesem Zusammenhang tatsächlich von Belang sind.

Zur alternativen Inhibierung der Rezeptorinternalisierung wurden durch Zugabe von 0,4 M Saccharose hypertonische Bedingungen geschaffen. Bereits 1985 konnten Daukas und Zigmond zeigen, dass auf diesem Weg die rezeptorvermittelte Endozytose inhibiert werden kann. Heuser und Anderson (1989) hatten wenig später herausgefunden, dass dieser Effekt auf eine Blockierung der Ausbildung von Stachelsaumbläschen zurückzuführen ist. Unter hypertonischen Bedingungen bildet nämlich das hierfür benötigte Clathrin intrazellulär sog. Mikrokäfige und steht damit nicht mehr für die Endozytosemaschinerie zur Verfügung. Die in Anwesenheit von 0,4 M Saccharose deutlich erhöhte Zahl SYTOX® Green-positiver Zellen (Abb. 51) ist höchstwahrscheinlich zu einem großen Teil dem dadurch ausgelösten hyperosmotischem Stress zuzuschreiben. Diese Art von Stress löst eine Reihe von Reaktionen aus, die ein Zellsterben begünstigen können (Übersicht in Burg et al., 2007). Auch hier war eine Stimulation des EP<sub>4</sub>-Rezeptors in der Lage, die abträglichen Effekte des hypertonischen Mediums weitestgehend aufzuheben. Da es hinsichtlich der Schädigungen auf subzellulärer Ebene eine Reihe von Parallelen gibt, sind daran möglicherweise dieselben Ereignisse beteiligt, welche die Zellen auch vor den Schädigungen durch Hypoxie/Reoxygenierung schützen (Burg et al., 2007). Jedenfalls wird die Rezeptorinternalisierung offenbar nicht essenziell zur Vermittlung der EP<sub>4</sub>-abhängigen Zytoprotektion benötigt. Wie auch in den bereits angeführten Literaturverweisen wird die Internalisierung zumeist mit einer Aktivierung des MAPK-Weges in Verbindung gebracht. Dessen Inhibierung in der vorliegenden Arbeit konnte den EP<sub>4</sub>-Effekt allerdings auch nicht aufheben, was demnach mit den Ergebnissen zur Inhibierung der Rezeptorinternalisierung in Übereinstimmung steht.

### 4.4.7 Zusammenfassung und weitere in Frage kommende Signalwege

Insgesamt hat sich anhand der verwendeten Aktivatoren bzw. Inhibitoren in den hier durchgeführten Versuchen keine Signalkomponente für sich alleine betrachtet als essenziell für die zytoprotektive EP<sub>4</sub>-Wirkung unter simulierten I/R-Bedingungen herausgestellt. Dies lässt verschiedene mögliche Schlüsse zu.

In der zur Verfügung stehenden Zeit konnten nicht alle Signalwege untersucht werden, für die prinzipiell vorstellbar ist, dass sie distal von EP<sub>4</sub> angesprochen werden könnten. Da mehrere Untersuchungen zeigen konnten, dass G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten (z. B. von  $G_i$ ) PLC- $\beta$  aktivieren können, wäre somit eine essenzielle Beteiligung der nachfolgend aktivierten PKC auch durch den EP<sub>4</sub>-Rezeptor denkbar (Camps et al., 1992; Boyer et al., 1992; Blank et al., 1992). In der Vergangenheit konnte mehrfach belegt werden, dass PKC - welche auch der Gruppe der RISK zugerechnet wird - im Herzen protektiv gegen I/R-Schäden wirksam ist. Sie ist oftmals als eine bedeutsame Komponente der Prä- und Postkonditionierung beschrieben (Miki et al., 1998; Zatta et al., 2006; Fantinelli & Mosca, 2007). Einige Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine ischämieprotektive Signaltransduktion von PKC z. B. durch eine ERK-Aktivierung (Jiang et al., 2007) oder auch eine zusätzliche PI3K-Aktivierung (Sung et al., 2007) erfolgen kann. Als entscheidend wird dabei die Aktivität einer bestimmten PKC-Isoform, und zwar PKC-ε, angesehen (Baines et al., 2003; Churchill & Mochly-Rosen, 2007). Die Wirkung z. B. der eng verwandten Isoform PKC-δ hingegen wird in diesem Kontext kontrovers gesehen. Es existieren Befunde, welche sie als schädigend darstellen (Inagaki et al., 2003; Zatta et al., 2006), und solche, die sie protektiv erscheinen lassen (Kostyak et al., 2006). Jedenfalls wurde im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Prä- und Postkonditionierung gezeigt, dass ein zur I/R-Protektion entscheidender Angriffspunkt, nämlich die MPTP u. a. PKC-ε-abhängig inhibiert wird (Ping et al., 1997; Penna et al., 2006). Dies geschieht neueren Erkenntnissen zufolge möglicherweise nicht nur durch Translokation von PKC zu den Mitochondrien, sondern auch auf indirektem Wege durch die Reduzierung der ROS-Bildung zu Beginn der Reperfusion (Townsend *et al.*, 2007; Fantinelli & Mosca, 2007). Die Bedeutung der PKC bei der EP<sub>4</sub>-vermittelten Zytoprotektion wird letztlich Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Weitere Signalkomponenten, welche mehrfach mit ischämieprotektiven Wirkungen im Herzen in Zusammenhang gebracht wurden, sind die Proteine der Signal Transducer and Activator of Transcription-Gruppe (STAT), insbesondere STAT-3. Üblicherweise wird deren Aktivität induziert, wenn Zytokine (v. a. IL-6) oder Wachstumsfaktoren an ihre jeweiligen Rezeptoren (z. B. gp130) binden, welche im Folgenden Janus-Kinasen aktivieren, die ihrerseits die nachgeschalteten STAT-Proteine phosphorylieren (JAK-STAT-Signalweg) und damit aktivieren. Insbesondere existieren Untersuchungen, die belegen, dass kardioprotektive Wirkungen der Präkonditionierung mit von der Aktivität von STAT-3 abhängen. Dessen Proteinexpression und Ausmaß an DNA-Bindung wird durch Präkonditionierung erhöht (Hattori et al., 2001; Xuan et al., 2001 & 2007). In Kardiomyozyten STAT-3-defizienter Mäuse war die Präkonditionierung gehemmt, ebenso wie bei einer pharmakologischen Inhibierung des JAK-STAT-Signalweges in isolierten Rattenherzen (Hattori et al., 2001; Smith et al., 2004). Als ein Grund für die schützende Wirkung von STAT-3 wird eine verminderte ROS-Freisetzung durch Expressionsteigerung der Enzyme Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) oder Metallothioenin 1 und 2 (MT-1/2) angeführt, welche als "Radikalfänger" bekannt sind (Negoro et al., 2001; Oshima et al., 2005). Da der EP<sub>4</sub>-Agonist in den Experimenten der vorliegenden Arbeit vor Hypoxie zugegeben wurde, besteht zumindest zeitlich gesehen eine Parallele zur Präkonditionierung. Eine EP<sub>4</sub>-abhängige Aktivierung von STAT-3 in Kardiomyozyten wurde zuvor z. B. in Zusammenhang mit der Entstehung von Hypertrophie beschrieben (Frias et al., 2007). Hierbei war die STAT-3-Aktivierung ERK1/2-abhängig, ein alternativer Weg der Aktivierung z. B. über eine gesteigerte IL-6-Produktion kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden. Isolierte Kardiomyozyten sind nämlich in der Lage, IL-6 zu produzieren und zu sekretieren (Ancey et al., 2002). Eine gesteigerte IL-6-Produktion kann dabei durch PGE<sub>2</sub> induziert werden. Demnach ist vorstellbar, dass EP4 via STAT-3 auch zur I/R-Protektion in Kardiomyozyten beiträgt.

Neben der Möglichkeit, dass Signalwege, welche in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, essenziell für die hier gefundenen EP<sub>4</sub>-Wirkungen sind, gibt es jedoch eine weitere gute Erklärungsmöglichkeit. Zwei oder mehrere der untersuchten Signalkomponenten könnten in ihrem gemeinsamen Wirken essenziell an der Vermittlung der EP<sub>4</sub>-Wirkungen beteiligt sein. Schließlich wird aus dem bislang geschildertem deutlich, dass der EP<sub>4</sub>-Rezeptor potenziell viele Signaltransduktionswege anspricht, unter denen hinsichtlich protektiver Effekte möglicherweise Redundanzen auftreten. Wenn man einen dieser Signalwege inhibiert, könnte die Aktivität eines weiteren ausreichend sein, um protektive Wirkungen zu vermitteln. Zwischen den Signalwegen könnte dabei eine Art von "Cross-Talk" auftreten. Fujino et al. (2005) beschrieben für ihr EP<sub>4</sub>-exprimierendes HEK293-Modellsystem, dass eine Blockierung der PI3K zu einer gesteigerten Aktivität der PKA-Signaltransduktion führt (vgl. Abb. 3). Hausenloy et al. (2004) fanden eine deutliche "Cross-Talk"-Aktivität der beiden Signalwege PI3K/AKT und MEK1/2-ERK1/2. Eine Inhibierung der PI3K-Signaltransduktion in isoliert perfundierten Rattenherzen verstärkte die ERK1/2-Phosphorylierung, während im umgekehrten Fall die PI3K-nachfolgende AKT-Phosphorylierung erhöht war. Bei einem derartigen Effekt gegenseitiger Beeinflussung war im Modellsystem der vorliegenden Arbeit daher möglicherweise kein signifikanter Einfluss auf die überlebensfördernde EP<sub>4</sub>-Wirkung durch Inhibierung von nur jeweils einem einzigen Signalweg feststellbar. Deshalb sollten in weiterführenden Untersuchungen Kombinationen mehrerer Inhibitoren eingesetzt werden. Dabei wäre vor allem interessant, den ERK- und PI3K-Signalweg gleichzeitig zu Inhibieren, da diese beiden in anderen System zur Vermittlung I/R-protektiver Wirkungen oft zusammen angesprochen werden (Übersicht in Hausenloy & Yellon, 2004).

# 5 Ausblick

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zu den zytoprotektiven Wirkungen des Prostaglandin-Rezeptors EP<sub>4</sub> erbrachten sowohl neue Erkenntnisse als auch gute Ansätze für weiterführende Untersuchungen.

Die EP<sub>4</sub>-Stimulation isoliert perfundierter Wildtyp-Mäuseherzen konnte diese tendenziell vor I/R-Schäden schützen. Aufgrund der beobachteten tendenziell protektiven Wirkungen gilt es jedoch, in zukünftigen Untersuchungen eine Beteiligung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors an der Kardioprotektion als eine von mehreren Komponenten weiterhin zu berücksichtigen.

Die Erfahrungen bei der Etablierung eines Mausmodells mit kardiospezifischer EP<sub>4</sub>-Überexpression lassen Spekulation zu, dass diese Überexpression möglicherweise negative Auswirkungen auf die Embryonalentwicklung der Mäuse hatte. Auf der Suche nach einer Alternativstrategie konnte diese Arbeit die Generierung eines Mausmodells zur konditionellen kardiospezifischen Überexpression von EP<sub>4</sub> erfolgreich vorbereiten. Eine weitere Kreuzung der bis zum jetzigen Zeitpunkt existierenden Tiere mit EP<sub>4</sub>-vorgeschalteter neoflox-Kassette, die in naher Zukunft erfolgen wird, ermöglicht im Folgenden eine Untersuchung der kardialen EP<sub>4</sub>-Überexpression *in vivo*.

Im untersuchten Kardiomyoblasten-Zellmodell mit  $EP_4$ -Überexpression hatte sich keiner der untersuchten Signalwege, die prinzipiell protektiv gegen simulierte I/R hätten sein können, isoliert betrachet als essenziell zur Vermittlung zytoprotektiver  $EP_4$ -Wirkungen herausgestellt. Aus den gewonnenen Kenntnissen lassen sich jedoch Ansätze für ein weiteres Vorgehen ableiten. Zum Einen sollten mehrere Signalweg-Inhibitoren kombiniert eingesetzt werden. Insbesondere die gleichzeitige Inhibierung von PI3K und ERK1/2 könnte ergeben, dass im vorliegenden Modellsystem beide Signalwege redundant wirken. Dies würde eine Besonderheit darstellen, da in vielen Untersuchungen gezeigt wurde, dass bereits die Blockierung eines dieser Signalwege ausreicht, um z. B. die protektiven Wirkungen einer Präkonditionierung aufzuheben (Übersicht in Hausenloy & Yellon, 2004).

Eine gute Möglichkeit, um zu bestimmen, ob die hier in den Viabilitätsversuchen gefundenen zytoprotektiven Effekte der EP<sub>4</sub>-Stimulation essenziell von der Kopplung

des Rezeptors an G<sub>i</sub> abhängen, wäre der Einsatz von Pertussis-Toxin (PTX) zur Blockierung von G<sub>i</sub>.

Die in dieser Arbeit erstmals gezeigte EP<sub>4</sub>-regulierte Expression des EGFR-Liganden Amphiregulin ist offenbar nicht cAMP-, PI3K- oder (in einer Art Feedbackschleife) EGFR-abhängig. Angesichts der in anderen Arbeiten gefundenen möglichen nukleären Lokalisation von EP<sub>4</sub>-Rezeptoren scheint es vorstellbar, dass EP<sub>4</sub> die Expression von Amphiregulin und evtl. auch weiterer Gene auf direktem Weg beeinflusst. Dieser bislang unzureichend untersuchten Möglichkeit sollte in künftigen Arbeiten Beachtung geschenkt werden. Weitere Experimente zur Klärung der Bedeutung von Amphiregulin oder evtl. auch anderer löslicher Faktoren sollten die Anwendung von konditioniertem Zellüberstand EP<sub>4</sub>-stimulierter H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP-Zellen bei H9c2 EGFP oder Wildtyp-H9c2-Zellen sowie der Einsatz eines spezifischen TACE-Inhibitors (z. B. GW280264X) umfassen.

Wichtig wäre ferner die Analyse der Beteiligung von PKC an der  $EP_4$ -vermittelten Zytoprotektion im Zellmodell zunächst durch die Verwendung geeigneter Inhibitoren wie beispielsweise Chelerythrin oder evtl. auch durch Einsatz von RNAi-Techniken. Angesichts der vielen Befunde, die eine Rolle der PKC als RISK belegen, ist eine Relevanz auch für die  $EP_4$ -Signaltransduktion nicht unwahrscheinlich.

Um ein Erklärung für die unterschiedliche Relevanz von PI3K in H9c2 hEP<sub>4</sub>-YFP bei Normoxie und Hypoxie zu finden, wäre eine Genexpressionsanalyse der hypoxisch inkubierten Zellen hilfreich. In diesem Zusammenhang sollte auch das Ausmaß der Phosphorylierung von AKT und GSK3 $\beta$  nach Hypoxie/Reoxygenierung mit und ohne EP<sub>4</sub>-Stimulation untersucht werden.

Insgesamt wurden somit auf Basis der in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse verschiedene weiterführende Untersuchungsmöglichkeiten aufgezeigt.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Prostaglandin-Rezeptor EP<sub>4</sub> hinsichtlich seiner zytoprotektiven Eigenschaften bei Ischämie/Reperfusion (I/R) bzw. bei Hypoxie/Reoxygenierung im Kardiozyten-Zellmodell untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die in diesem Zusammenhang auftretende Signaltransduktion gerichtet.

Die EP<sub>4</sub>-Stimulation isoliert perfundierter Wildtyp-Mäuseherzen resultierte im Vergleich zu Kontrollherzen in tendenziell verbesserten funktionalen Paramatern nach I/R.

Ein angestrebtes transgenes Mausmodell mit kardiospezifischer EP<sub>4</sub>-Überexpression für entsprechende Untersuchungen konnte nicht realisiert werden. Die Suche nach möglichen Erklärungen führte letzlich zur Erzeugung eines alternativen EP<sub>4</sub>-DNA-Konstruktes mit vorgeschalteter Neomyzin-Resistenzkassette, was die EP<sub>4</sub>-Expression zunächst verhindert. Mit diesem Konstrukt konnten mittlerweile auch erste Tiere mit erfolgender Transgen-Expression erhalten werden. Damit wurde die Generierung einer transgenen Mauslinie mit konditioneller EP<sub>4</sub>-Überexpression im adulten Tier, wofür es noch eines weiteren Kreuzungsschrittes bedarf, erfolgreich vorbereitet.

Anhand des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Kardiomyoblasten-Zellmodellsystems (H9c2) mit EP<sub>4</sub>-Überexpression konnte gezeigt werden, dass der stimulierte EP<sub>4</sub>-Rezeptor zu einer Aktivierung von PKA, Epac, ERK1/2 und EGFR führt. Ferner wurde erstmals eine EP4-abhängige Expressionsregulation des Wachstumsfaktors Amphiregulin (AR) gefunden. Außerdem wurde festgestellt, dass die EP4-spezifische Stimulation der Zellen diese effektiv vor dem Absterben schützt. Dies tritt besonders bei simulierter I/R (Hypoxie/Reoxygenierung) zutage und bestätigt bisherige Befunde, dass  $EP_4$  in diesem Kontext erheblich an der Zytoprotektion beteiligt ist. Interessanterweise stellte sich heraus, dass bei simulierter I/R keine der untersuchten Signalkomponenten (PKA, Epac, ERK1/2, AR/EGFR, PI3K) und auch nicht die Rezeptor-Internalisierung jeweils isoliert betrachtet essenziell für die EP4-vermittelte Zytoprotektion sind. Diese und weitere Befunde anderer Gruppen legen nahe, dass unter Hypoxie entweder PKC und/oder STAT-3, welche nicht analysiert wurden, von entscheidender Bedeutung sind, oder dass mindestens zwei Signaltransduktionswege (z. B. PI3K/ERK) redundant wirken und bei Inhibierung eines Weges durch "Cross-Talk" der jeweils andere kompensatorisch hochreguliert wird. Insgesamt konnten aus den gewonnenen Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit wertvolle Ansätze zur weiterführenden Untersuchung zytoprotektiver EP<sub>4</sub>-Wirkungen abgeleitet werden.

## 7 Summary

In the present work, the prostaglandin receptor  $EP_4$  was investigated with regard to its cyto-protective properties in ischemia/reperfusion (I/R) and during hypoxia/reoxygenation using a cardiocyte cell model. The main focus was on the signal transduction occuring in this context.

Stimulation of the EP<sub>4</sub> receptor in isolated perfused wildtype mouse hearts tended to improve functional parameters after I/R compared with control hearts.

The generation of transgenic mice with cardiac-specific  $EP_4$  overexpression for according experiments could not be accomplished. In search of possible explanations, an alternative  $EP_4$  DNA construct with an upstream neomycin resistence, intended to suppress premature  $EP_4$  expression, was created. Using this construct, animals with successful transgene expression could be obtained by now. Hence, the generation of a transgenic mouse lineage conditionally overexpressing the  $EP_4$  receptor in the adult stage, which requires one more cross-breeding step, was prepared successfully.

In the course of this work a cardiac myoblast cell model (H9c2) with EP<sub>4</sub> overexpression was established. Using this cell culture model, it could be shown that EP<sub>4</sub> stimulation leads to activation of PKA, Epac, ERK1/2 and EGFR. Furthermore, for the first time an EP<sub>4</sub>-dependent regulation of the growth factor amphiregulin (AR) was found. In addition, it was determined that EP<sub>4</sub>-specific stimulation efficiently protects these cells from cell death. This effect is especially developed when cells are subjected to simulated I/R (i. e. hypoxia/reoxygenation), confirming existing results which show that in this context EP<sub>4</sub> is substantially involved in cytoprotection. Interestingly, it turned out that, viewed individually, during simulated I/R neither one of the signaling components investigated (PKA, Epac, ERK1/2, AR/EGFR, PI3K) nor receptor internalization is essential for EP<sub>4</sub>-mediated cytoprotection. These findings as well as reports from other groups suggest that during hypoxia either PKC and/or STAT-3, which have not been analyzed, are of vital importance. On the other hand, at least two signaling pathways (e.g. PI3K/ERK) could act redundantly: If one of them is inhibited, the second pathway might be upregulated by cross-talk mechanisms. Overall, the present work provided valuable insights for further investigation of cyto-protective EP<sub>4</sub> effects.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adderley SR, Fitzgerald DJ. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. J. Biol. Chem. 1999; 274: 5038-46; PMID: 9988750
- 2. Agbulut O, Huet A, Niederländer N, Puceat M, Menasché P, Coirault C. Green fluorescent protein impairs actin-myosin interactions by binding to the actin-binding site of myosin. J. Biol. Chem. 2007; 282: 10465-71; PMID: 17289667
- 3. Alvarez-Soria MA, Largo R, Sanchez-Pernaute O, Calvo E, Egido J, Herrero-Beaumont G. Prostaglandin E2 receptors EP1 and EP4 are up-regulated in rabbit chondrocytes by IL-1beta, but not by TNFalpha. *Rheumatol. Int.* 2007; 27: 911-7; PMID: 17401567
- 4. Ancey C, Corbi P, Froger J, Delwail A, Wijdenes J, Gascan H, Potreau D, Lecron JC. Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture. *Cytokine* 2002; 18: 199-205; PMID: 12126642
- 5. Anversa P, Kajstura J. Myocyte cell death in the diseased heart. *Circ. Res.* **1998**; 82: 1231-3; PMID: 9633922
- 6. Baens M, Noels H, Broeckx V, Hagens S, Fevery S, Billiau AD, Vankelecom H, Marynen P. The dark side of EGFP: defective polyubiquitination. *PLoS ONE* 2006; 1: e54; PMID: 17183684
- 7. Bahi N, Zhang J, Llovera M, Ballester M, Comella JX, Sanchis D. Switch from caspasedependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes. J. Biol. Chem. 2006; 281: 22943-52; PMID: 16754658
- 8. Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM, Ping P. Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ. Res.* 2003; 92: 873-80; PMID: 12663490
- 9. Baratelli F, Krysan K, Heuzé-Vourc'h N, Zhu L, Escuadro B, Sharma S, Reckamp K, Dohadwala M, Dubinett SM. PGE2 confers survivin-dependent apoptosis resistance in human monocytederived dendritic cells. J. Leukoc. Biol. 2005; 78: 555-64; PMID: 15908458
- Bastepe M, Ashby B. Identification of a region of the C-terminal domain involved in shortterm desensitization of the prostaglandin EP4 receptor. Br. J. Pharmacol. 1999; 126: 365-71; PMID: 10051157
- Bastepe M, Ashby B. The long cytoplasmic carboxyl terminus of the prostaglandin E2 receptor EP4 subtype is essential for agonist-induced desensitization. *Mol. Pharmacol.* 1997; 51: 343-9; PMID: 9203641
- 12. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc. Res.* 2004; 61: 461-70; PMID: 14962477
- **13.** Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. J. Mol. Cell Cardiol. **2003**; 35: 185-93; PMID: 12606259
- 14. Bergmann MW, Loser P, Dietz R, von Harsdorf R. Effect of NF-kappa B Inhibition on TNFalpha-induced apoptosis and downstream pathways in cardiomyocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. 2001; 33: 1223-32; PMID: 11444925

- **15.** Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* **1999**; 79: 1127-55; PMID: 10508231
- Bhattacharya M, Peri K, Ribeiro-da-Silva A, Almazan G, Shichi H, Hou X, Varma DR, Chemtob S. Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. J. Biol. Chem. 1999; 274: 15719-24; PMID: 10336471
- 17. Bhola NE, Grandis JR. Crosstalk between G-protein-coupled receptors and epidermal growth factor receptor in cancer. *Front. Biosci.* 2008; 13: 1857-65; PMID: 17981673
- **18.** Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **1979**; 7: 1513-23; PMID: 388356
- **19.** Blank JL, Brattain KA, Exton JH. Activation of cytosolic phosphoinositide phospholipase C by G-protein beta gamma subunits. J. Biol. Chem. **1992**; 267: 23069-75; PMID: 1331076
- 20. Bleckmann SC, Blendy JA, Rudolph D, Monaghan AP, Schmid W, Schütz G. Activating transcription factor 1 and CREB are important for cell survival during early mouse development. *Mol. Cell Biol.* 2002; 22: 1919-25; PMID: 11865068
- 21. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R. The myocardial JAK/STAT pathway: From protection to failure. *Pharmacol. Ther.* 2008; 120: 172-85; PMID: 18786563
- 22. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **1999**; 286: 1358-62; PMID: 10558990
- Borchi E, Parri M, Papucci L, Becatti M, Nassi N, Nassi P, Nediani C. Role of NADPH oxidase in H9c2 cardiac muscle cells exposed to simulated ischemia-reperfusion. J. Cell. Mol. Med. 2008 Aug 27 [Epub ahead of print]; PMID: 18754815
- 24. Boyer JL, Waldo GL, Harden TK. Beta gamma-subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C. J. Biol. Chem. 1992; 267: 25451-6; PMID: 1460039
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-54; PMID: 942051
- 26. Breyer MD, Breyer RM. G Protein-Coupled Prostanoid Receptors and the Kidney. Annu. Rev. Physiol. 2001; 63: 579-605; PMID: 11181968
- 27. Bubici C, Papa S, Dean K, Franzoso G. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. *Oncogene* 2006; 25: 6731-48; PMID: 17072325
- 28. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 1441-74; PMID: 17928589
- 29. Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br. J. Pharmacol.* 2007; 152: 855-69; PMID: 17700722
- **30.** Camitta MG, Gabel SA, Chulada P, Bradbury JA, Langenbach R, Zeldin DC, Murphy E. Cyclooxygenase-1 and -2 knockout mice demonstrate increased cardiac ischemia/reperfusion injury but are protected by acute preconditioning. *Circulation* **2001**; 104: 2453-8; PMID: 11705824

- **31.** Camps M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker PJ, Gierschik P. Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature* **1992**; 360: 684-6; PMID: 1465133
- **32.** Candé C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell Sci.* **2002**; 115: 4727-34; PMID: 12432061
- 33. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 2002; 296: 1655-7; PMID: 12040186
- 34. Chantara W, Watcharasit P, Thiantanawat A, Satayavivad J. Acrylonitrile-induced extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation via protein kinase C (PKC) in SK-N-SH neuroblastoma cells. J. Appl. Toxicol. 2006; 26: 517-23; PMID: 17080406
- **35.** Chaudhari A, Pedram A, Kirschenbaum MA. Prostanoid biosynthesis in cultured rabbit renal microvascular smooth muscle cells. Effect of arachidonic acid, calcium, and A23187. *Lab. Invest.* **1990**; 63: 30-7; PMID: 2115610
- **36.** Cherukuri DP, Chen XB, Goulet AC, Young RN, Han Y, Heimark RL, Regan JW, Meuillet E, Nelson MA. The EP4 receptor antagonist, L-161,982, blocks prostaglandin E2-induced signal transduction and cell proliferation in HCA-7 colon cancer cells. *Exp. Cell Res.* **2007**; 313: 2969-79; PMID: 17631291
- 37. Cho BB, Toledo-Pereyra LH. Caspase-independent programmed cell death following ischemic stroke. J. Invest. Surg. 2008; 21: 141-7; PMID: 18569435
- **38.** Choi JS, Kim HY, Chun MH, Chung JW, Lee MY. Expression of prostaglandin E2 receptor subtypes, EP2 and EP4, in the rat hippocampus after cerebral ischemia and ischemic tolerance. *Cell Tissue Res.* **2006**; 324: 203-11; PMID: 16437207
- 39. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases an update. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2008; 151: 10-27; PMID: 18602321
- **40.** Churchill EN, Mochly-Rosen D. The roles of PKCdelta and epsilon isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**; 35: 1040-2; PMID: 17956273
- **41.** Cipollone F, Fazia ML, Iezzi A, Cuccurullo C, De Cesare D, Ucchino S, Spigonardo F, Marchetti A, Buttitta F, Paloscia L, Mascellanti M, Cuccurullo F, Mezzetti A. Association between prostaglandin E receptor subtype EP4 overexpression and unstable phenotype in atherosclerotic plaques in human. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**; 25: 1925-31; PMID: 16020747
- **42.** Coleman RA, Grix SP, Head SA, Louttit JB, Mallett A, Sheldrick RLG. A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* **1994**; 47: 151-68; PMID: 8016385
- **43.** Correa F, Soto V, Zazueta C. Mitochondrial permeability transition relevance for apoptotic triggering in the post-ischemic heart. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**; 39: 787-98; PMID: 17306600
- 44. Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, Lefkowitz RJ. Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 1998; 273: 685-8; PMID: 9422717
- **45.** Danesch U, Weber PC, Sellmayer A. Arachidonic acid increases c-fos and Egr-1 mRNA in 3T3 fibroblasts by formation of prostaglandin E2 and activation of protein kinase C. J. Biol. Chem. **1994**; 269: 27258-63; PMID: 7961634

- **46.** Danielian PS, White R, Hoare SA, Fawell SE, Parker MG. Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* **1993**; 7: 232-240; PMID: 8469236
- 47. Daukas G, Zigmond SH. Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leukocytes. J. Cell Biol. 1985; 101: 1673-9; PMID: 4055891
- **48.** Dennis SC, Gevers W, Opie LH. Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? J. Mol. Cell. Cardiol. **1991**; 23: 1077-86; PMID: 1658348
- **49.** Desai S, April H, Nwaneshiudu C, Ashby B. Comparison of agonist-induced internalization of the human EP2 and EP4 prostaglandin receptors: role of the carboxyl terminus in EP4 receptor sequestration. *Mol. Pharmacol.* **2000**; 58: 1279-86; PMID: 11093764
- **50.** Di Benedetto G, Zoccarato A, Lissandron V, Terrin A, Li X, Houslay MD, Baillie GS, Zaccolo M. Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. *Circ. Res.* **2008**; 103: 836-44; PMID: 18757829
- Dieckmann-Schuppert A, Schnittler HJ. A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. Cell Tissue Res. 1997; 288: 119-26; PMID: 9042779
- **52.** Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Carlisle Michel JJ, Langeberg LK, Kapiloff MS, Scott JD. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* **2005**; 437: 574-8; PMID: 16177794
- **53.** Dooper MM, Wassink L, M'Rabet L, Graus YM. The modulatory effects of prostaglandin-E on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells are independent of the prostaglandin subtype. *Immunology* **2002**; 107: 152-9; PMID: 12225374
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. J. Virol. 1998; 72: 8463-71; PMID: 9765382
- **55.** Echeverria V, Clerman A, Doré S. Stimulation of PGE receptors EP2 and EP4 protects cultured neurons against oxidative stress and cell death following beta-amyloid exposure. *Eur. J. Neurosci.* **2005**; 22: 2199-206; PMID: 16262658
- **56.** Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* **2006**; 7: 606-19; PMID: 16847462
- Fantinelli JC, Mosca SM. Comparative effects of ischemic pre and postconditioning on ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Mol. Cell. Biochem.* 2007; 296: 45-51; PMID: 16933149
- 58. Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* 2003; 31: 1203-8; PMID: 14641026
- 59. Fischer SM. Prostaglandins and cancer. Front. Biosci. 1997; 2: d482-500; PMID: 9300941
- **60.** Förster K, Kuno A, Solenkova N, Felix SB, Krieg T. The delta-opioid receptor agonist DADLE at reperfusion protects the heart through activation of pro-survival kinases via EGF receptor transactivation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**; 293: H1604-8; PMID: 17545478
- **61.** Freeland K, Boxer LM, Latchman DS. The cyclic AMP response element in the Bcl-2 promoter confers inducibility by hypoxia in neuronal cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2001**; 92: 98-106; PMID: 11483246

- Frias MA, Rebsamen MC, Gerber-Wicht C, Lang U. Prostaglandin E2 activates Stat3 in neonatal rat ventricular cardiomyocytes: A role in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 2007; 73: 57-65; PMID: 17067562
- 63. Fujino H, Regan JW. EP4 Prostanoid Receptor Coupling to a Pertussis Toxin-Sensitive Inhibitory G Protein. *Mol. Pharmacol.* 2006; 69: 5-10; PMID: 16204467
- **64.** Fujino H, West KA, Regan JW. Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase-3 and Stimulation of T-cell Factor Signaling following Activation of EP2 and EP4 Prostanoid Receptors by Prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.* **2002**; 277: 2614-9; PMID: 11706038
- **65.** Fujino H, Xu W, Regan JW. Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. J. Biol. Chem. **2003**; 278: 12151-6; PMID: 12566441
- **66.** Fujishige K, Kotera J, Michibata H, Yuasa K, Takebayashi S, Okumura K, Omori K. Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). J. Biol. Chem. **1999**; 274: 18438-45; PMID: 10373451
- 67. Fullerton DA, Agrafojo J, McIntyre RC Jr. Pulmonary vascular smooth muscle relaxation by cAMP-mediated pathways. J. Surg. Res. 1996; 61: 444-8; PMID: 8656622
- **68.** Garcia-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M, González MA, Solares J, Juliá M, Barrabés JA, Soler-Soler J. Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation* **1997**; 96: 3579-86; PMID: 9396458
- 69. García-Dorado D, Théroux P, Desco M, Solares J, Elizaga J, Fernandez-Avilés F, Alonso J, Soriano J. Cell-to-cell interaction: a mechanism to explain wave-front progression of myocardial necrosis. *Am. J. Physiol.* 1989; 256: H1266-73; PMID: 2719127
- **70.** George RJ, Sturmoski MA, Anant S, Houchen CW. EP4 mediates PGE2 dependent cell survival through the PI3 kinase/AKT pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **2007**; 83: 112-20; PMID: 17259077
- **71.** Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* **2008**; 117: 2761-8; PMID: 18490522
- 72. Guan Y, Stillman BA, Zhang Y, Schneider A, Saito O, Davis LS, Redha R, Breyer RM, Breyer MD. Cloning and expression of the rabbit prostaglandin EP2 receptor. *BMC Pharmacol.* 2002; 2: 14; PMID: 12097143
- **73.** Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* **2004**; 61: 372-85; PMID: 14962470
- 74. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 2002; 84: 153-66; PMID: 12022946
- **75.** Han S, Ritzenthaler JD, Wingerd B, Rivera HN, Roman J. Extracellular matrix fibronectin increases prostaglandin E2 receptor subtype EP4 in lung carcinoma cells through multiple signaling pathways: the role of AP-2. J. Biol. Chem. **2007**; 282: 7961-72; PMID: 17237224
- 76. Hanahan D. Techniques for transformation of E. coli. In Glover D. (ed.) DNA cloning. A practical approach. 1985 IRL Press, Oxford

- 77. Hattori R, Maulik N, Otani H, Zhu L, Cordis G, Engelman RM, Siddiqui MA, Das DK. Role of STAT3 in ischemic preconditioning. J. Mol. Cell. Cardiol. 2001; 33: 1929-36; PMID: 11708838
- **78.** Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* **2004**; 63: 305-12; PMID: 15249188
- **79.** Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2005**; 288: H971-6; PMID: 15358610
- **80.** Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemiareperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc. Res.* **2004**; 61: 448-60; PMID: 14962476
- 81. Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail. Rev.* 2007; 12: 217-34; PMID: 17541822
- 82. He YY, Huang JL, Chignell CF. Delayed and sustained activation of extracellular signalregulated kinase in human keratinocytes by UVA: implications in carcinogenesis. J. Biol. Chem. 2004; 279: 53867-74; PMID: 15471881
- 83. Heuser JE, Anderson RGW. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. J. Cell Biol. 1989; 108: 389-400; PMID: 2563728
- 84. Hishikari K, Suzuki JI, Ogawa M, Isobe K, Takahashi T, Onishi M, Takayama K, Isobe M. Pharmacological activation of the prostaglandin E2 receptor EP4 improves cardiac function after myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 2008; [Epub ahead of print]; PMID: 18805784
- 85. Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Matsuoka T, Noda Y, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 10501-6; PMID: 10468638
- **86.** Hobbs A, Foster P, Prescott C, Scotland R, Ahluwalia A. Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide. *Circulation* **2004**; 110: 1231-5; PMID: 15337698
- Hofer F, Fields S, Schneider C, Martin GS. Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 11089-93; PMID: 7972015
- **88.** Hohlfeld T, Meyer-Kirchrath J, Vogel YC, Schrör K. Reduction of infarct size by selective stimulation of prostaglandin EP(3)receptors in the reperfused ischemic pig heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2000**; 32: 285-96; PMID: 10722804
- **89.** Hohlfeld T, Strobach H, Schrör K. Stimulation of endogenous prostacyclin protects the reperfused pig myocardium from ischemic injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**; 264: 397-405; PMID: 8423539
- 90. Hohlfeld T, Strobach H, Schrör K. Stimulation of prostacyclin synthesis by defibrotide: improved contractile recovery from myocardial "stunning". J. Cardiovasc. Pharmacol. 1991; 17: 108-15; PMID: 1708043
- Honda A, Sugimoto Y, Namba T, Watabe A, Irie A, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A. Cloning and Expression of a cDNA for Mouse Prostaglandin E Receptor EP2 Subtype. J. Biol. Chem. 1993; 286: 7759-62; PMID: 8385118

- **92.** Hua F, Ha T, Ma J, Li Y, Kelley J, Gao X, Browder IW, Kao RL, Williams DL, Li C. Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J. Immunol.* **2007**; 178: 7317-24; PMID: 17513782
- **93.** Hurbin A, Dubrez L, Coll JL, Favrot MC. Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. J. Biol. Chem. **2002**; 277: 49127-33; PMID: 12356750
- **94.** Hwang JT, Kwon DY, Park OJ, Kim MS. Resveratrol protects ROS-induced cell death by activating AMPK in H9c2 cardiac muscle cells. *Genes Nutr.* **2008**; 2: 323-6; PMID: 18850225
- **95.** Inagaki K, Hahn HS, Dorn GW 2nd, Mochly-Rosen D. Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with delta-protein kinase C inhibitor and epsilon-protein kinase C activator. *Circulation* **2003**; 108: 869-75; PMID: 12860903
- **96.** James TN. The variable morphological coexistence of apoptosis and necrosis in human myocardial infarction: significance for understanding its pathogenesis, clinical course, diagnosis and prognosis. *Coron. Artery Dis.* **1998**; 9: 291-307; PMID: 9710689
- **97.** January B, Seibold A, Whaley B, Hipkin RW, Lin D, Schonbrunn A, Barber R, Clark RB. beta2adrenergic receptor desensitization, internalization, and phosphorylation in response to full and partial agonists. J. Biol. Chem. **1997**; 272: 23871-9; PMID: 9295336
- **98.** Jayakumar J, Suzuki K, Sammut IA, Smolenski RT, Khan M, Latif N, Abunasra H, Murtuza B, Amrani M, Yacoub MH. Heat shock protein 70 gene transfection protects mitochondrial and ventricular function against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* **2001**; 104(12 Suppl 1): 1303-7; PMID: 11568073
- **99.** Jiang R, Zatta A, Kin H, Wang N, Reeves JG, Mykytenko J, Deneve J, Zhao ZQ, Guyton RA, Vinten-Johansen J. PAR-2 activation at the time of reperfusion salvages myocardium via an ERK1/2 pathway in in vivo rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**; 293: H2845-52; PMID: 17720772
- 100. Jin YC, Kim KJ, Kim YM, Ha YM, Kim HJ, Yun UJ, Bae KH, Kim YS, Kang SS, Seo HG, Lee JH, Chang KC. Anti-apoptotic effect of magnolol in myocardial ischemia and reperfusion injury requires extracellular signal-regulated kinase1/2 pathways in rat in vivo. *Exp. Biol. Med.* (*Maywood*) 2008; 233: 1280-8; PMID: 18641058
- 101. Johansson CC, Yndestad A, Enserink JM, Ree AH, Aukrust P, Taskén K. The epidermal growth factor-like growth factor amphiregulin is strongly induced by the adenosine 3',5'-monophosphate pathway in various cell types. *Endocrinology* 2004; 145: 5177-84; PMID: 15284208
- **102.** Jugdutt BI, Hutchins GM, Bulkley BH, Becker LC. Dissimilar effects of prostacyclin, prostaglandin E1, and prostaglandin E2 on myocardial infarct size after coronary occlusion in conscious dogs. *Circ. Res.* **1981**; 49: 685-700; PMID: 7020976
- **103.** Kambe A, Iguchi G, Moon Y, Kamitani H, Watanabe T, Eling TE. Regulation of EP4 expression via the Sp-1 transcription factor: inhibition of expression by anti-cancer agents. *Biochim Biophys Acta.* **2008**; 1783:1211-9; PMID: 18346464
- 104. Kannel WB, Sorlie P, McNamara PM. Prognosis after initial myocardial infarction: the Framingham study. *Am. J. Cardiol.* **1979**; 44: 53-9; PMID: 453046
- **105.** Kapiloff MS. Contributions of protein kinase A anchoring proteins to compartmentation of cAMP signaling in the heart. *Mol. Pharmacol.* **2002**; 62: 193-9; PMID: 12130668

- **106.** Katoh H, Watabe A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Negishi M. Characterization of the signal transduction of prostaglandin E receptor EP1 subtype in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**; 1244: 41-8; PMID: 7766667
- 107. Keith RL, Geraci MW, Nana-Sinkam SP, Breyer RM, Hudish TM, Meyer AM, Malkinson AM, Dwyer-Nield LD. Prostaglandin E2 receptor subtype 2 (EP2) null mice are protected against murine lung tumorigenesis. *Anticancer Res.* 2006; 26: 2857-61; PMID: 16886605
- Kevin LG, Camara AKS, Riess ML, Novalija E, Stowe DF. Ischemic preconditioning alters realtime measure of O-2 radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.* 2003; 284: H566-H574; PMID: 12414448
- **109.** Kin H, Wang NP, Mykytenko J, Reeves J, Deneve J, Jiang R, Zatta AJ, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappa B translocation and TNF alpha release. *Shock* **2008**; 29: 761-8; PMID: 18496137
- **110.** Kiriyama M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y, Narumiya S. Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br. J. Pharmacol.* **1997**; 122: 217-24; PMID: 9313928
- 111. Kirtikara K, Raghow R, Laulederkind SJ, Goorha S, Kanekura T, Ballou LR. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in the human microvascular endothelial cell line, HMEC-1: control by the combinatorial actions of AP2, NF-IL-6 and CRE elements. *Mol. Cell Biochem.* 2000; 203: 41-51; PMID: 10724331
- **112.** Kooistra MR, Dubé N, Bos JL. Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. J. Cell Sci. **2007**; 120: 17-22; PMID: 17182900
- **113.** Kostyak JC, Hunter JC, Korzick DH. Acute PKCdelta inhibition limits ischaemia-reperfusion injury in the aged rat heart: role of GSK-3beta. *Cardiovasc. Res.* **2006**; 70: 325-34; PMID: 16542646
- **114.** Kotani M, Tanaka I, Ogawa Y, Usui T, Mori K, Ichikawa A, Narumiya S, Yoshimi T, Nakao K. Molecular cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP3 subtype generated by alternative messenger RNA splicing: multiple second messenger systems and tissue-specific distributions. *Mol. Pharmacol.* **1995**; 48: 869-79; PMID: 7476918
- **115.** Kotani M, Tanaka I, Ogawa Y, Usui T, Tamura N, Mori K, Narumiya S, Yoshimi T, Nakao K. Structural organization of the human prostaglandin EP3 receptor subtype gene (PTGER3). *Genomics* **1997**; 40: 425-34; PMID: 9073510
- **116.** Kuehl FA Jr, Egan RW. Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science* **1980**; 210: 978-84; PMID: 6254151
- **117.** Kwak HJ, Park KM, Choi HE, Chung KS, Lim HJ, Park HY. PDE4 inhibitor, roflumilast protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways. *Cell. Signal.* **2008**; 20: 803-14; PMID: 18276108
- **118.** Lämmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **1970**; 227: 680-85; PMID: 5432063
- **119.** Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Thiere* **1895**; 61: 291-332
- **120.** Lazarus M. The differential role of prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in regulation of fever. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**; 50: 451-5; PMID: 16534751

- 121. Leonhardt A, Glaser A, Wegmann M, Schranz D, Seyberth H, Nüsing R. Expression of prostanoid receptors in human ductus arteriosus. *Br. J. Pharmacol.* 2003; 138: 655-9; PMID: 12598419
- **122.** Leopoldt D, Hanck T, Exner T, Maier U, Wetzker R, Nürnberg B. Gbetagamma stimulates phosphoinositide 3-kinase-gamma by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J. Biol. Chem.* **1998**; 273: 7024-9; PMID: 9507010
- **123.** Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice. *Circulation* **2000**; 101: 547-52; PMID: 10662753
- 124. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412: 95-9; PMID: 11452314
- **125.** Limas CJ, Cohn JN. Isolation and properties of myocardial prostaglandin synthetase. *Cardiovasc. Res.* **1973**; 7: 623-8; PMID: 4753298
- 126. Liu J, Liao Z, Camden J, Griffin KD, Garrad RC, Santiago-Pérez LI, González FA, Seye CI, Weisman GA, Erb L. Src homology 3 binding sites in the P2Y2 nucleotide receptor interact with Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. J. Biol. Chem. 2004; 279: 8212-8; PMID: 14670955
- 127. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 1999; 283: 655-61; PMID: 9924018
- 128. Ma H, Hara A, Xiao CY, Okada Y, Takahata O, Nakaya K, Sugimoto Y, Ichikawa A, Narumiya S, Ushikubi F. Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(3). *Circulation* 2001; 104: 1176-80; PMID: 11535576
- **129.** Ma X, Kundu N, Rifat S, Walser T, Fulton AM. Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. *Cancer Res.* **2006**; 66: 2923-7; PMID: 16540639
- **130.** MacManus JP, Whitfield JF. Cyclic AMP, prostaglandins, and the control of cell proliferation. *Prostaglandins* **1974**; 6: 475-87; PMID: 4366017
- 131. Malik G, Gorbounov N, Das S, Gurusamy N, Otani H, Maulik N, Goswami S, Das DK. Ischemic preconditioning triggers nuclear translocation of thioredoxin and its interaction with Ref-1 potentiating a survival signal through the PI-3-kinase-Akt pathway. *Antioxid. Redox. Signal.* 2006; 8: 2101-9; PMID: 17034353
- **132.** Marnett LJ, DuBois RN. COX-2: a target for colon cancer prevention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**; 42: 55-80; PMID: 11807164
- **133.** Martin M, Meyer-Kirchrath J, Kaber G, Jacoby C, Flögel U, Schrader J, Rüther U, Schrör K, Hohlfeld T. Cardiospecific overexpression of the prostaglandin EP3 receptor attenuates ischemia-induced myocardial injury. *Circulation* **2005**; 112: 400-6; PMID: 16009796
- **134.** Martin M. Kardiospezifische Überexpression des EP3-Prostaglandin-Rezeptors im Mausmodell. *Inauguraldissertation* **2006**, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
- **135.** Mattioni T, Louvion JF, Picard D. Regulation of protein activities by fusion to steroid binding domains. *Methods Cell Biol.* **1994**; 43: 335-352; PMID: 7823870

- Maulik N, Sato M, Price BD, Das DK. An essential role of NFkappaB in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia. FEBS Lett. 1998; 429: 365-9; PMID: 9662450
- **137.** McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS. G-protein signaling: back to the future. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**; 62: 551-77; PMID: 15747061
- **138.** Mendez M, LaPointe MC. PGE2-induced hypertrophy of cardiac myocytes involves EP4 receptor-dependent activation of p42/44 MAPK and EGFR transactivation. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **2005**; 288: H2111-7; PMID: 15626689
- **139.** Mendez M, LaPointe MC. Trophic effects of the cyclooxygenase-2 product prostaglandin E(2) in cardiac myocytes. *Hypertension* **2002**; 39: 382-8; PMID: 11882577
- **140.** Miki T, Cohen MV, Downey JM. Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Mol. Cell. Biochem.* **1998**; 186: 3-12; PMID: 9774179
- 141. Mizukami Y, Ono K, Du CK, Aki T, Hatano N, Okamoto Y, Ikeda Y, Ito H, Hamano K, Morimoto S. Identification and physiological activity of survival factor released from cardiomyocytes during ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 2008; 79: 589-99; PMID: 18534967
- 142. Mocanu MM, Yellon DM. PTEN, the Achilles' heel of myocardial ischaemia/reperfusion injury? *Br. J. Pharmacol.* 2007; 150: 833-8; PMID: 17293884
- 143. Mongillo M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V, Terrin A, Huston E, Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD, Zaccolo M. Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ. Res.* 2004; 95: 67-75; PMID: 15178638
- 144. Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompré AM, Vandecasteele G, Lezoualc'h F. cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* 2005; 97: 1296-304; PMID: 16269655
- **145.** Mudalagiri NR, Mocanu MM, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Keogh B, Yellon DM. Erythropoietin protects the human myocardium against hypoxia/reoxygenation injury via phosphatidylinositol-3 kinase and ERK1/2 activation. *Br. J. Pharmacol.* **2008**; 153: 50-6; PMID: 17952111
- **146.** Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, Kudo I. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membraneassociated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **2000**; 275: 32783-92; PMID: 10869354
- 147. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **1986**; 74: 1124-36; PMID: 3769170
- 148. Mustard JF, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA. Prostaglandins and platelets. *Annu. Rev. Med.* 1980; 31: 89-96; PMID: 6994628
- 149. Mutoh M, Watanabe K, Kitamura T, Shoji Y, Takahashi M, Kawamori T, Tani K, Kobayashi M, Maruyama T, Kobayashi K, Ohuchida S, Sugimoto Y, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 2002; 62: 28-32; PMID: 11782353
- **150.** Nair VD, Sealfon SC. Agonist-specific transactivation of phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by the dopamine D2 receptor. *J. Biol. Chem.* **2003**; 278: 47053-61; PMID: 12970364

- **151.** Namba T, Sugimoto Y, Negishi M, Irie A, Ushikubi F, Kakizuka A, Ito S, Ichikawa A, Narumiya S. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature* **1993**; 365: 166-70; PMID: 8396726
- **152.** Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Phys. Rev.* **1999**; 79: 1193-226; PMID: 10508233
- **153.** Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, Osugi T, Izumi M, Oshima Y, Nakaoka Y, Hirota H, Kishimoto T, Yamauchi-Takihara K. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation* **2001**; 104: 979-81; PMID: 11524388
- **154.** Neuschäfer-Rube F, DeVries C, Hänecke K, Jungermann K, Püschel GP. Molecular cloning and expression of a prostaglandin E2 receptor of the EP3 beta subtype from rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **1994**; 351: 119-22; PMID: 8076679
- **155.** Neuschäfer-Rube F, Hänecke K, Püschel GP. The C-terminal domain of the human EP4 receptor confers agonist-induced receptor desensitization in a receptor hybrid with the rat EP3beta receptor. *FEBS Lett.* **1997**; 415: 119-24; PMID: 9350980
- 156. Neuschäfer-Rube F, Hermosilla R, Rehwald M, Rönnstrand L, Schülein R, Wernstedt C, Püschel GP. Identification of a Ser/Thr cluster in the C-terminal domain of the human prostaglandin receptor EP4 that is essential for agonist-induced B-arrestin1 recruitment but differs from the apparent principal phosphorylation site. *Biochem. J.* 2004; 379: 573-85; PMID: 14709160
- **157.** Nishigaki N, Negishi M, Honda A, Sugimoto Y, Namba T, Narumiya S, Ichikawa A. Identification of prostaglandin E receptor 'EP2' cloned from mastocytoma cells EP4 subtype. *FEBS Lett.* **1995**; 364: 339-41; PMID: 7758593
- **158.** Nishihara M, Miura T, Miki T, Sakamoto J, Tanno M, Kobayashi H, Ikeda Y, Ohori K, Takahashi A, Shimamoto K. Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2006**; 291: H748-55; PMID: 16565311
- **159.** Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*. **1995**; 9: 484-96; PMID: 7737456
- 160. Oestreich EA, Wang H, Malik S, Kaproth-Joslin KA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV. Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca2+ mobilization in cardiac myocytes. J. Biol. Chem. 2007; 282: 5488-95; PMID: 17178726
- **161.** Oka N, Wang L, Mi W, Caldarone CA. Inhibition of mitochondrial remodeling by cyclosporine A preserves myocardial performance in a neonatal rabbit model of cardioplegic arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2008**; 135: 585-93; PMID: 18329475
- **162.** Oka T. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors. *Front. Biosci.* **2004**; 9: 3046-57; PMID: 15353336
- 163. Okano M, Sugata Y, Fujiwara T, Matsumoto R, Nishibori M, Shimizu K, Maeda M, Kimura Y, Kariya S, Hattori H, Yokoyama M, Kino K, Nishizaki K. E prostanoid 2 (EP2)/EP4-mediated suppression of antigen-specific human T-cell responses by prostaglandin E2. *Immunology* 2006; 118: 343-52; PMID: 16827895
- **164.** Oshima Y, Fujio Y, Nakanishi T, Itoh N, Yamamoto Y, Negoro S, Tanaka K, Kishimoto T, Kawase I, Azuma J. STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovasc. Res.* **2005**; 65: 428-35; PMID: 15639482

- **165.** Oudot F, Grynberg A, Sergiel JP. Eicosanoid synthesis in cardiomyocytes: influence of hypoxia, reoxygenation, and polyunsaturated fatty acids. *Am. J. Physiol.* **1995**; 268: H308-15; PMID: 7840277
- **166.** Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in C. elegans. *Nature* **2001**; 412: 90-4; PMID: 11452313
- 167. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G, Pagliaro P. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K+ channel and protein kinase C activation. Basic Res. Cardiol. 2006; 101: 180-9; PMID: 16450075
- **168.** Pierce KL, Tohgo A, Ahn S, Field ME, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. J. Biol. Chem. **2001**; 276: 23155-60; PMID: 11290747
- 169. Ping P, Zhang J, Qiu Y, Tang XL, Manchikalapudi S, Cao X, Bolli R. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ. Res.* 1997; 81: 404-14; PMID: 9285643
- **170.** Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* **2004**; 61: 365-71; PMID: 14962469
- **171.** Pozzi A, Yan X, Macias-Perez I, Wei S, Hata AN, Breyer RM, Morrow JD, Capdevila JH. Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation. *J. Biol. Chem.* **2004**; 279: 29797-804; PMID: 15123663
- **172.** Pugazhenthi S, Miller E, Sable C, Young P, Heidenreich KA, Boxer LM, Reusch JE. Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* **1999**; 274: 27529-35; PMID: 10488088
- **173.** Qian JY, Harding P, Liu Y, Shesely E, Yang XP, LaPointe MC. Reduced cardiac remodeling and function in cardiac-specific EP4 receptor knockout mice with myocardial infarction. *Hypertension* **2008**; 51: 560-6; PMID: 18180401
- 174. Qian X, Vass WC, Papageorge AG, Anborgh PH, Lowy DR. N terminus of Sos1 Ras exchange factor: critical roles for the Dbl and pleckstrin homology domains. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18: 771-8; PMID: 9447973
- 175. Randewig N. Resensibilisierung des Prostazyklinrezeptors nach homologer Langzeitdesensibilisierung in verschiedenen Zellkultursystemen. *Inauguraldissertation* 2003, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
- **176.** Rasmanis G, Vesterqvist O, Green K, Edhag O, Henriksson P. Prostacyclin production in myocardial infarction in the acute phase and during follow-up. *J. Intern. Med.* **1991**; 229:135-41; PMID: 1997639
- **177.** Renò F, Cannas M. Effect of prostaglandin E2 on PMA-induced macrophage differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **2005**; 75: 13-24; PMID: 15789612
- **178.** Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **2002**; 415: 206-12; PMID: 11805844
- **179.** Roy AA, Nunn C, Ming H, Zou MX, Penninger J, Kirshenbaum LA, Dixon SJ, Chidiac P. Upregulation of endogenous RGS2 mediates cross-desensitization between Gs and Gq signaling in osteoblasts. J. Biol. Chem. **2006**; 281: 32684-93; PMID: 16950788

- 180. Saffitz JE, Hames KY, Kanno S. Remodeling of gap junctions in ischemic and nonischemic forms of heart disease. J. Membr. Biol. 2007; 218: 65-71; PMID: 17585361
- 181. Sakaguchi K, Okabayashi Y, Kido Y, Kimura S, Matsumura Y, Inushima K, Kasuga M. Shc phosphotyrosine-binding domain dominantly interacts with epidermal growth factor receptors and mediates Ras activation in intact cells. *Mol. Endocrinol.* 1998; 12: 536-43; PMID: 9544989
- **182.** Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM. Role of the reverse mode of the Na+/Ca2+ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc. Res.* **2001**; 51: 241-50; PMID: 11470463
- **183.** Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **1992**; 9: 383-91; PMID: 1326293
- **184.** Schlüter KD, Jakob G, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors. *Am. J. Physiol.* **1996**; 271: H428-34; PMID: 8770080
- **185.** Schneider MR, Wolf E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. J. Cell. *Physiol.* **2008** Nov 12. [Epub ahead of print]; PMID: 19006176
- **186.** Schrör K, Zimmermann KC, Tannhäuser R. Augmented myocardial ischaemia by nicotine -Mechanisms their possible significance. *Br. J. Pharmacol.* **1998**; 125: 79-86; PMID: 9776347
- **187.** Schrör K. Eicosanoid generation and effects in cardiac muscle and coronary vessels. In: Curtis-Prior P (ed.). *The eicosanoids*. Chichester:Wiley, **2004**: 393-404
- Shah BH, Neithardt A, Chu DB, Shah FB, Catt KJ. Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs. J. Cell. Physiol. 2006; 206: 47-57; PMID: 15920762
- **189.** Shao J, Lee SB, Guo H, Evers BM, Sheng H. Prostaglandin E2 stimulates the growth of colon cancer cells via induction of amphiregulin. *Cancer Res.* **2003**; 63: 5218-23; PMID: 14500348
- **190.** Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **2001**; 276: 18075-81; PMID: 11278548
- **191.** Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O, Lefkowitz RJ. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **2006**; 281: 1261-73; PMID: 16280323
- **192.** Shinmura K, Tang XL, Wang Y, Xuan YT, Liu SQ, Takano H, Bhatnagar A, Bolli R. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**; 97: 10197-202; PMID: 10963682
- **193.** Siegmund B, Klietz T, Schwartz P, Piper HM. Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **1991**; 260: H426-35; PMID: 1996686
- **194.** Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balser C, Piper HM. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation* **1997**; 96: 4372-9; PMID: 9416906
- 195. Skalhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front. Biosci.* 2000; 5: D678-93; PMID: 10922298
- **196.** Slipetz D, Buchanan S, Mackereth C, Brewer N, Pellow V, Hao C, Adam M, Abramovitz M, Metters KM. Sequestration and phosphorylation of the prostaglandin E2 EP4 receptor: dependence on the C-terminal tail. *Biochem. Pharmacol.* **2001**; 62: 997-1012; PMID: 11597569
- **197.** Smith RM, Suleman N, Lacerda L, Opie LH, Akira S, Chien KR, Sack MN. Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning. *Cardiovasc. Res.* **2004**; 63: 611-6; PMID: 15306216
- **198.** Soeki T, Kishimoto I, Okumura H, Tokudome T, Horio T, Mori K, Kangawa K. C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2005**; 45: 608-16; PMID: 15708711
- 199. Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, Witt SA, Kimball TR, Tymitz KM, Penninger JM, Molkentin JD. Temporally Regulated and Tissue-Specific Gene Manipulations in the Adult and Embryonic Heart Using a Tamoxifen-Inducible Cre Protein. *Circ. Res.* 2001; 89: 20-25; PMID: 11440973
- **200.** Somekawa S, Fukuhara S, Nakaoka Y, Fujita H, Saito Y, Mochizuki N. Enhanced functional gap junction neoformation by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **2005**; 97: 655-62; PMID: 16123333
- 201. Steiner AL, Parker CW, Kipnis DM. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. J. Biol. Chem. 1972; 247: 1106-13; PMID: 4334491
- 202. Sternberg N, Sauer B, Hoess R, Abremski K. Bacteriophage P1 cre Gene and its Regulatory Region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. J. Mol. Biol. 1986; 187: 197-212; PMID: 3486297
- 203. Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nürnberg B, Gierschink P, Seedorf K, Hsuan JJ, Waterfield MD, Wetzker R. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. Science 1995; 269: 690-3; PMID: 7624799
- 204. Sugimoto Y, Narumiya S, Ichikawa A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. *Prog. Lipid Res.* 2000; 39: 289-314; PMID: 10856600
- **205.** Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ. Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol. Ther.* **2001**; 89: 29-46; PMID: 11316512
- **206.** Sun Y, McGarrigle D, Huang XY. When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Mol. Biosyst.* **2007**; 3: 849-54; PMID: 18000562
- **207.** Sung SM, Jung DS, Kwon CH, Park JY, Kang SK, Kim YK. Hypoxia/reoxygenation stimulates proliferation through PKC-dependent activation of ERK and Akt in mouse neural progenitor cells. *Neurochem. Res.* **2007**; 32: 1932-9; PMID: 17562163
- **208.** Sung YM, He G, Fischer SM. Lack of expression of the EP2 but not EP3 receptor for prostaglandin E2 results in suppression of skin tumor development. *Cancer Res.* **2005**; 65: 9304-11; PMID: 16230392
- 209. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 1999; 397: 441-6; PMID: 9989411

- 210. Tabata H, Tanaka S, Sugimoto Y, Kanki H, Kaneko S, Ichikawa A. Possible coupling of prostaglandin E receptor EP1 to TRP5 expressed in Xenopus laevis oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2002; 298: 398-402; PMID: 12413954
- 211. Takeuchi K, Takahashi N, Kato T, Abe T, Taniyama Y, Tsutsumi E, Ito O, Nakagawara K, Abe K. Functional analysis and chromosomal gene assignment of rat kidney prostaglandin EP3 receptor. *Kidney Int. Suppl.* **1996**; 55: S183-6; PMID: 8743550
- **212.** Tilley SL, Audoly LP, Hicks EH, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, Koller BH. Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *J. Clin. Invest.* **1999**; 103: 1539-45; PMID: 10359563
- 213. Toh H, Ichikawa A, Narumiya S. Molecular evolution of receptors for eicosanoids. *FEBS Lett*. 1995; 361: 17-21; PMID: 7890033
- **214.** Tokudome T, Horio T, Soeki T, Mori K, Kishimoto I, Suga S, Yoshihara F, Kawano Y, Kohno M, Kangawa K. Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide (CNP) on cultured cardiac myocyte hypertrophy: interference between CNP and endothelin-1 signaling pathways. *Endocrinology* **2004**; 145: 2131-40; PMID: 14749356
- **215.** Townsend PA, Davidson SM, Clarke SJ, Khaliulin I, Carroll CJ, Scarabelli TM, Knight RA, Stephanou A, Latchman DS, Halestrap AP. Urocortin prevents mitochondrial permeability transition in response to reperfusion injury indirectly by reducing oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**; 293: H928-38; PMID: 17483234
- **216.** Tsuji T, Ohga Y, Yoshikawa Y, Sakata S, Abe T, Tabayashi N, Kobayashi S, Kohzuki H, Yoshida KI, Suga H, Kitamura S, Taniguchi S, Takaki M. Rat cardiac contractile dysfunction induced by Ca2+ overload: possible link to the proteolysis of alpha-fodrin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2001**; 281: H1286-94; PMID: 11514299
- 217. Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 1998; 395: 281-4; PMID: 9751056
- **218.** van Empel VP, Bertrand AT, van der Nagel R, Kostin S, Doevendans PA, Crijns HJ, de Wit E, Sluiter W, Ackerman SL, De Windt LJ. Downregulation of apoptosis-inducing factor in harlequin mutant mice sensitizes the myocardium to oxidative stress-related cell death and pressure overload-induced decompensation. *Circ. Res.* **2005**; 96: e92-e101; PMID: 15933268
- 219. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1998; 38: 97-120; PMID: 9597150
- 220. Voigt P, Dorner MB, Schaefer M. Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. J. Biol. Chem. 2006; 281: 9977-86; PMID: 16476736
- 221. Voisine P, Ruel M, Khan TA, Bianchi C, Xu SH, Kohane I, Libermann TA, Otu H, Saltiel AR, Sellke FW. Differences in gene expression profiles of diabetic and nondiabetic patients undergoing cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest. *Circulation* 2004; 110 (11 Suppl 1): II280-6; PMID: 15364876
- **222.** Wang CY, Lei HJ, Huang CY, Zhang Z, Mukherjee AB, Yuan CJ. Induction of cyclooxygenase-2 by staurosporine through the activation of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) and activator protein 2 (AP2) in an osteoblast-like cell line. *Biochem. Pharmacol.* **2002**; 64: 177-84; PMID: 12123737

- 223. Wang Z, Dillon TJ, Pokala V, Mishra S, Labudda K, Hunter B, Stork PJ. Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation. *Mol. Cell Biol.* 2006; 26: 2130-45; PMID: 16507992
- 224. Williamson CL, Dabkowski ER, Dillmann WH, Hollander JM. Mitochondria protection from hypoxia/reoxygenation injury with mitochondria heat shock protein 70 overexpression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008; 294: H249-56; PMID: 17982016
- 225. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. J. Cell Biol. 1997; 139: 1281-92; PMID: 9382873
- 226. Xiao CY, Yuhki KI, Hara A, Fujino T, Kuriyama S, Yamada T, Takayama K, Takahata O, Karibe H, Taniguchi T, Narumiya S, Ushikubi F. Prostaglandin E2 protects the heart from ischemiareperfusion injury via its receptor subtype EP4. *Circulation* 2004; 109: 2462-8; PMID: 15123528
- 227. Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* 1995; 47: 322-9; PMID: 7870040
- 228. Xuan YT, Guo Y, Han H, Zhu Y, Bolli R. An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 9050-5; PMID: 11481471
- **229.** Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, Wang OL, Rokosh G, Bolli R. Endothelial nitric oxide synthase plays an obligatory role in the late phase of ischemic preconditioning by activating the protein kinase C epsilon p44/42 mitogen-activated protein kinase pSer-signal transducers and activators of transcription1/3 pathway. *Circulation* **2007**; 116: 535-44; PMID: 17606840
- 230. Yart A, Chap H, Raynal P. Phosphoinositide 3-kinases in lysophosphatidic acid signaling: regulation and cross-talk with the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1582: 107-11; PMID: 12069817
- 231. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M, Jiao Q, Watanabe M, Otsu K, Iwasaki S, Nishimaki S, Sato M, Ishikawa Y. Prostaglandin E2-activated Epac promotes neointimal formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of cAMPdependent protein kinase A. J. Biol. Chem. 2008; 283: 28702-9; PMID: 18697745
- **232.** Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Ghatak S, Akaike T, Segi-Nishida E, Iwasaki S, Iwamoto M, Misra S, Tamura K, Hori H, Yokota S, Toole BP, Sugimoto Y, Ishikawa Y. Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J. Clin. Invest.* **2006**; 116: 3026-34; PMID: 17080198
- 233. Yoshikawa Y, Hagihara H, Ohga Y, Nakajima-Takenaka C, Murata KY, Taniguchi S, Takaki M. Calpain inhibitor-1 protects the rat heart from ischemia-reperfusion injury: analysis by mechanical work and energetics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 288: H1690-8; PMID: 15528229
- 234. Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. J. Leukoc. Biol. 1995; 58: 373-81; PMID: 7561512
- **235.** Young RN, Billot X, Han Y, Slipetz DA, Chauret N, Belley M, Metters K, Mathieu MC, Greig GM, Denis D, Girard M. Discovery an synthesis of a potent, selective and orally bioavailable EP4 receptor agonist. *Heterocycles* **2004**; 64: 437-46
- 236. Yu SS, Lefkowitz RJ, Hausdorff WP. Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. J. Biol. Chem. 1993; 5: 337-41; PMID: 8380158

- **237.** Zatta AJ, Kin H, Lee G, Wang N, Jiang R, Lust R, Reeves JG, Mykytenko J, Guyton RA, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovasc. Res.* **2006**; 70: 315-24; PMID: 16443207
- 238. Zhang F, Hackett NR, Lam G, Cheng J, Pergolizzi R, Luo L, Shmelkov SV, Edelberg J, Crystal RG, Rafii S. Green fluorescent protein selectively induces HSP70-mediated up-regulation of COX-2 expression in endothelial cells. *Blood* 2003; 102: 2115-21; PMID: 12805066
- 239. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 285: H579-88; PMID: 12860564
- 240. Zhou K, Zhang L, Xi J, Tian W, Xu Z. Ethanol Prevents Oxidant-Induced Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening in Cardiac Cells. *Alcohol Alcohol*. 2008 Nov 25. [Epub ahead of print]; PMID: 19033378
- 241. Zhu T, Gobeil F, Vazquez-Tello A, Leduc M, Rihakova L, Bossolasco M, Bkaily G, Peri K, Varma DR, Orvoine R, Chemtob S. Intracrine signaling through lipid mediators and their cognate nuclear G-protein-coupled receptors: a paradigm based on PGE2, PAF, and LPA1 receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 84: 377-91; PMID: 16902584
- 242. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 2006; 70: 181-90; PMID: 16580655

### 9 Veröffentlichungen

#### 9.1 Kongressbeiträge

- Treml M, Martin M, Schooß C, Fischer J, Floegel U, Jacoby C, Schrader J, Schroer K, Hohlfeld T, Meyer-Kirchrath J. Cardiac Overexpression of the EP3 Receptor Induces Left Ventricular Eccentric Hypertrophy. *American Heart Association Scientific Sessions 2006, Chicago, IL, USA,* 12. - 15.11.2006
- 2. Bobbe A, Treml M, Schrör K, Weber AA, Censarek P. PSGL-1-independent transfer of tissue factor from monocytes to platelets. *XXIst European Platelet Meeting, Lutherstadt Wittenberg,* 12. 14.10.2006

#### 10 Danksagung

Prof. Dr. K. Schrör danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an dem von ihm geleiteten Institut.

Prof. Dr. U. Rüther danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats. Darüber hinaus geht mein Dank für die Bemühungen zur Generierung transgener Mäuse an die Mitarbeiter des Instituts für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere.

Besonderer Dank gebührt PD Dr. Jutta Meyer-Kirchrath für die Betreuung der Arbeit sowie anregende Diskussionen, Meinungsaustausche und ermunternde Worte. Ebenso danke ich in diesem Zusammenhang Prof. Dr. T. Hohlfeld für Anregungen und wertvolle Kritik.

Kerstin Freidel, Bärbel Reupert, Beate Weyrauther sowie Irmhild Rüter möchte ich für ihre hervorragende technische Unterstützung und für ihren Beitrag zur überaus angenehmen Arbeitsatmosphäre danken.

Für die Bereitstellung der Plasmide zur Lentiviren-Produktion geht mein Dank an Prof. Dr. H. Hanenberg.

Herrn Prof. Dr. A. Weber (Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen) und seinen Mitarbeitern danke ich für die Hilfe beim Nachweis von Epac und Rap1.

Herrn Dr. G. Röder (Onkologische Chemie) sowie Herrn Dipl.-Math. D. Hafner (Pharmakologie) danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung bzw. Auswertung der Genexpressionsanalyse.

Bei meinen Kollegen bedanke ich mich für das angenehme Institutsklima und ein produktives sowie erheiterndes Miteinander.

Erika Lohmann und Karin Montag danke ich herzlich für die Organisation des Institutslebens.

Zuletzt gilt meinen Eltern, die mir all dies ermöglicht haben, sowie meiner Freundin Anett und ihrer Familie großer Dank für die vielfältige Unterstützung, gerade auch in moralischer Hinsicht.

## 11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt und zuvor keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Ort, Datum

(Marcel Treml)

# 12 Lebenslauf

| Name                                     | Marcel Treml   |
|--|--|
| Geburtsdatum                             | 19.06.1979   |
| Geburtsort                               | Solingen   |
| <b>Berufl. Werdegang</b><br>seit 01/2009 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter,<br>Wissenschaftliches Institut Bethanien e. V., Solingen   |
| Promotion                                |  |
| 05/2005 - 01/2009                        | Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Klinische<br>Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf   |
| Studium                                  |  |
| 10/1999 - 04/2005                        | Biologie (Dipl.), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf<br>Schwerpunkt: Mikrobiologie / Molekularbiologie<br>Diplomarbeit: Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktasen aus<br>Arabidopsis thaliana<br>Diplomnote: ausgezeichnet |
| Wehrdienst                               |  |
| 09/1998 - 06/1999                        | Grundwehrdienst, Bergische Kaserne, Düsseldorf   |
| Schulausbildung                          |  |
| 1998                                     | Abitur   |
| 1989 - 1998                              | Gymnasium Vogelsang, Solingen  |
| 1985 - 1989                              | Grundschule Katternberger Str., Solingen   |
| Düsseldorf, den                          |  |

Marcel Treml