# Kardiospezifische Überexpression des EP<sub>3</sub>-Prostaglandin-Rezeptors im Mausmodell

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Melanie Martin aus Essen

Düsseldorf März 2006

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. K. Schrör

Korreferent: PD Dr. U. Rüther

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2006

# Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ANF	atrial natriuretic factor
AOP <sub>2</sub>	Antioxidant protein 2
β-ΜΗϹ	β-Myosin Heavy Chain
cAMP	cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat
СК	Kreatinkinase (creatine kinase)
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacyglycerol
+dP/dt max	max. Kontraktionsgeschwindigkeit
-dP/dt max	max. Relaxationsgeschwindigkeit
EDV	enddiastolisches Volumen
ESV	endsystolisches Volumen
GAPDH	Glycerol-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
Gi	inhibitorisches G-Protein
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
Gs	stimulatorisches G-Protein
GSK-3β	Glykogen-Synthase-Kinase-3β
HF	Herzfrequenz
hEP <sub>3</sub>	humaner EP <sub>3</sub> -Rezeptor
5-HD	5-Hydroxydecanoat
HSP27	heat shock protein 27
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
Iso	Isoprenalin
K <sub>ATP</sub>	ATP-sensitive K <sup>+</sup> -Kanäle
Kd	Bindungsaffinität
LDH	Lactatdehydrogenase
ΔLVP	Änderung des linksventrikulären Druckes
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
M&B	M&B 28.767
min	Minuten

max	maximal
MRI	Magnet-Resonanz-Imaging
n.s.	nicht signifikant
tg	transgen
PG	Prostaglandin
PGHS	Prostaglandin H Synthase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
РКА	Proteinkinase A
РКС	Proteinkinase C
Prdx 6	Peroxiredoxin 6
PTX	Pertussistoxin
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RIA	Radioimmunoassay
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SV	Schlagvolumen
TSA	Thiol-specific antioxidant
$TXA_2$	Thromboxan A <sub>2</sub>
wt	Wildtyp

1.	Einl	eitung	.4
	1.1.	Prostaglandine	.4
	1.2.	Rolle der Prostaglandine im nicht-ischämischen Herz	.6
	1.3.	Rolle der Prostaglandine im ischämischen Herz	.6
	1.4.	PG-Rezeptoren und deren Signaltransduktion	.7
	1.5.	Der EP <sub>3</sub> -Rezeptor	. 8
	1.6.	Trophische Effekte von Prostaglandinen in Kardiomyozyten	12
	1.7.	Hypertrophie	13
	1.8.	Hypertrophie-beteiligte Signalwege	14
	1.9.	Fragestellung	17
2.	Mat	erial und Methoden	19
-	2.1.	Puffer und Lösungen	19
	2.2.	Substanzen	21
-	2.3.	Generierung der transgenen Mäuse	22
	2.4.	Genotypisierung der Mäuse	23
	2.4.1	1. Southernblot	23
	2.4.2	2. PCR	24
	2.5.	Rezeptorbindungsstudien	25
	2.5.1	1. Membranpräparation	25
	2.5.2	2. Ligandenbindung	26
-	2.6.	Mäuse – Langendorff – Modell	26
	2.6.1	Präparation der Herzen	26
	2.6.2	2. Versuchsprotokoll	26
	2.6.3	3. Funktionelle Messungen am Langendorff-Herz	27
	2.6.4	Biochemische Untersuchungen	27
-	2.7.	Westernblot	28
	2.7.1	1. Proteingewinnung aus Herzgewebe	28
	2.7.2	2. Proteinbestimmung	28
	2.7.3	3. Auftrennung der Proteine	28
	2.7.4	4. Detektion spezifischer Proteine	29
	2.7.5	5. Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung	29
	2.7.6	6. Densitometrische Auswertung der Röntgenfilme	30
-	2.8.	Isolierung von Kardiomyozyten	30
	2.8.1	1. cAMP-Assay	30

	2.8.2	2.	Flächenmessung	. 31
	2.9.	Isol	ierung von Gesamt-RNA aus Herzgewebe	. 31
	2.9.	1.	Quantifizierung von RNA	. 31
	2.9.2	2.	Auftrennung von RNA in Agarose-Formaldehyd-Gelen	. 31
	2.10.	Rev	verse-Transkriptase PCR (RT-PCR)	. 31
	2.11.	GA	TA-4	. 32
	2.12.	Cal	cineurin-Aktivität	. 32
	2.13.	Mag	gnet-Resonanz-Imaging (MRI)	. 32
	2.14.	2D-	Gelelektrophorese	. 33
	2.15.	Stat	istik	. 33
3.	. Erg	ebni	sse	. 34
	3.1.	Tra	nsgenes Mausmodell	. 34
	3.1.	1.	Gewebespezifische Expression des EP <sub>3</sub> -Rezeptors	. 35
	3.1.2	2.	Rezeptorexpression auf Proteinebene	. 36
	3.1.	3.	Herz-Körpergewichts-Ratio	. 37
	3.1.4	4.	Magnet-Resonanz-Imaging (MRI)	. 38
	3.1.	5.	Zellgröße	.41
	3.2.	Mo	rtalität	.41
	3.3.	Fun	ktionalität des Rezeptors	. 42
	3.3.	1.	Adenylatzyklase-Aktivität in isolierten Kardiomyozyten	. 42
	3.3.2	2.	Inhibition von G <sub>i</sub> durch Pertussistoxin (PTX)	. 43
	3.4.	Isol	iert perfundierte Herzen	. 45
	3.4.	1.	Beta-adrenerge Stimulation	. 46
	3.4.2	2.	Ischämieprotektion in vitro	. 48
	3.4.	3.	Wirkung von PGE1 im Ischämie-Modell	. 52
	3.4.4	4.	Wirkung von Talinolol	. 54
	3.4.	5.	Wirkung von 5-Hydroxydecanoat (5-HD)	. 55
	3.5.	Prot	teinexpression	. 58
	3.5.	1.	Proteomanalyse	. 59
	3.5.2	2.	Peroxiredoxin 6-mRNA im Herzen	. 61
	3.6.	Gen	nexpression von Hypertrophiemarkern im Herzgewebe	. 62
	3.7.	Sig	naltransduktion des EP <sub>3</sub> -Rezeptors	. 62
	3.7.	1.	GATA-4	. 64
	3.7.2	2.	Calcineurin-Aktivität	. 65

	3.8.	Überexpression des humanen EP <sub>3</sub> -Rezeptors in der Maus	. 65	
	3.8.1	1. Ischämie/Reperfusion am isolierten Herzen	. 65	
	3.9.	Zusammenfassung der Ergebnisse	. 67	
4.	Disk	xussion	. 68	
	4.1.	EP <sub>3</sub> -Rezeptor-vermittelte Kardioprotektion	. 68	
	4.2.	G-Proteinkopplung des EP <sub>3</sub> -Rezeptors (G <sub>i</sub> /G <sub>q</sub> )	.71	
	4.3.	Mögliche Mechanismen der anti-ischämischen Wirkung der EP3-Rezeptor-		
	Überex	xpression	.71	
	4.3.1	1. Interferenz mit cAMP-Signalwegen	.71	
	4.3.2	2. Aktivierung mitochondrialer ATP-sensitiver K <sup>+</sup> -Kanäle	. 73	
	4.3.3	3. Anti-oxidative Mechanismen	. 73	
	4.4.	EP <sub>3</sub> -Rezeptor vermittelte Hypertrophie	. 74	
	4.5.	Mögliche Mechanismen der Hypertrophie infolge von EP <sub>3</sub> -Rezeptor-		
	Überex	xpression	. 77	
	4.5.1	1. Transkriptionsfaktoren	.77	
	4.5.2	2. Phosphatasen	.77	
	4.5.3	3. Kinasen	. 78	
	4.6.	Vergleich zwischen Hypertrophie- und Kardioprotektions-Linie	. 79	
	4.7.	Ansätze zur pharmakotherapeutischen Nutzung	. 80	
5.	Zus	ammenfassung	. 84	
6.	Lite	eratur	. 85	
7.	Veröffentlichungen9			
8.	Danksagung9			
9.	Eide	esstattliche Erklärung	. 98	
10	. L	ebenslauf	. 99	

# 1. Einleitung

## 1.1. Prostaglandine

Das Myokard verfügt über verschiedene endogene Mechanismen, um Ischämie/Reperfusions-Schäden entgegen zu wirken, dazu gehört u.a. die Synthese vasodilatierender Prostaglandine (PG).

PG gehören zur Stoffklasse der Eikosanoide. Sie werden aus der mehrfach ungesättigten C20-Fettsäure Arachidonsäure (5,8,11,14-Eikosatetraensäure) synthetisiert. Die Biosynthese dieser lokal wirksamen Gewebshormone kann hormonell oder durch Wachstumsfaktoren induziert werden (Smith, 1989). Es können aber auch pathologische Stimuli wie Entzündungsprozesse, Gewebeschädigungen und Endotoxine für die Bildung der PG verantwortlich sein. Durch die zytosolische Phospholipase  $A_2$  wird die Arachidonsäure aus Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt und über den Cyclooxygenaseweg zu Prostaglandinen und Thromboxan  $A_2$ (TXA<sub>2</sub>) metabolisiert (s. Abb. 1.1).

Die Cyclooxygenase (COX) oder Prostaglandin H Synthase (PGHS) ist das Schlüsselenzym der Prostaglandin-Biosynthese. Dieses Enzym katalysiert die ersten beiden Schritte in der Umwandlung der Arachidonsäure zu PG. Das Intermediärprodukt PGH<sub>2</sub> wird schließlich durch gewebsspezifische Synthasen in die biologisch aktiven Endprodukte PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> (Prostacyclin) und Thromboxan umgewandelt. Für die COX sind zwei verschiedene Isoformen beschrieben, COX-1 und COX-2. Diese Enzyme werden unterschiedlich reguliert und haben verschiedene biologische Funktionen.





#### 1.2. Rolle der Prostaglandine im nicht-ischämischen Herz

Eine myokardiale Synthese von PG wurde zum ersten Mal 1973 von Limas und Cohn beschrieben (Limas & Cohn, 1973). Als Syntheseorte sind Endothel- und glatte Muskelzellen der Gefäßwand (Chaudhari *et al.*, 1990) und auch Kardiomyozyten beschrieben (Oudot *et al.*, 1995). Für die Synthese von PG sind zwei Mechanismen entscheidend: Zum Einen die Bereitstellung des Substrates Arachidonsäure in räumlicher Nähe zu den synthetisierenden Enzymen und zum Anderen die Menge und Aktivität dieser Enzyme. Unter physiologischen Bedingungen, ohne inflammatorischen Stimulus, ist in erster Linie die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> und die konstitutiv aktive COX-1 für die Bildung von PG zuständig.

Die basale Produktion von PG in Kardiomyozyten liegt in einem Bereich von 0,1-2 ng/mg Protein, deutlich mehr findet sich in Fibroblasten mit 1 bis 5 ng/mg Protein (Mendez & LaPointe, 2002). PGI<sub>2</sub> stellt den Hauptteil an PG unter Basalbedingungen in Kardiomyozyten, gefolgt von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> (Adderley & Fitzgerald, 1999). Auch in den Endothelzellen der Koronargefäße ist PGI<sub>2</sub> der Hauptmetabolit. In den glatten Muskelzellen ist dagegen die PG-Synthese unter basalen Bedingungen nur sehr gering ausgeprägt, wahrscheinlich aufgrund der sehr niedrigen COX-Aktivität (Schrör, 2004).

Unter physiologischen Bedingungen haben PG oder TXA<sub>2</sub> auf Herzrate und Kontraktilität nur einen geringen oder keinen Einfluss.

#### 1.3. Rolle der Prostaglandine im ischämischen Herz

Obgleich im gesunden Myokard die Expression der COX-2 nur sehr gering ist, wird ihr beim Myokard-Infarkt eine wichtige Rolle zugeschrieben. Im geschädigten Herzen wird vermehrt Arachidonsäure durch Läsion der Zellmembran und Aktivierung von Phospholipasen freigesetzt, wodurch genügend Ausgangsmaterial für eine vermehrte PG-Synthese bereitgestellt wird. Durch Ischämie kommt es zu einer Aufregulation der COX-2-mRNA. Die COX-2 stellt das wichtige Enzym der PG-Biosynthese dar. Diese Aufregulation geschieht *in vitro* bereits nach einer Stunde, gefolgt von einer vermehrten Proteinexpression und PGI<sub>2</sub>-Freisetzung (Schrör *et al.*, 1998). Die Bedeutung der COX-Enzyme wird auch eindrucksvoll in COX-1 und COX-2 *knock out*-Mäusen belegt. Hier ist die Herzfunktion nach globaler Ischämie im Vergleich zum Wildtyp (wt) eingeschränkt (Camitta *et al.*, 2001).

Der oxidative Stress, dem das Herz durch Ischämie und Reperfusion ausgesetzt ist, hat einen wichtigen Einfluss auf die Enzyminduktion. Im Zellmodell kommt es in hypoxischen, ventrikulären Myozyten der Ratte zu einer gesteigerten Bildung von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> (Oudot *et al.*, 1995). Auch beim akuten Myokard-Infarkt des Menschen ist eine Zunahme der PG

beschrieben (Rasmanis *et al.*, 1991). Dabei wird überwiegend PGI<sub>2</sub> freigesetzt, gefolgt von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2 $\alpha$ </sub>.

PG haben eine zentrale Bedeutung für die Adaptation des Myokards an Ischämie. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass exogenes  $PGI_2$  das Herz vor ischämischen Schäden (Araki & Lefer, 1980) schützt. Dieser Effekt ist allerdings nicht durch die vasodilatorische Eigenschaft von  $PGI_2$  zu erklären. Glibenclamid, ein Blocker von ATP-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen, verhinderte zwar die Dilatation der Koronargefäße im Kaninchenherzen durch das stabile  $PGI_2$ -Mimetikum Iloprost, aber nicht dessen kardioprotektive Effekte (Vesper & Schrör, 1995).

Darüber hinaus belegen noch zahlreiche weitere Befunde die Rolle von PG bei der Kardioprotektion. So konnte gezeigt werden, dass die Infarktgröße beim Hund durch PGE<sub>1</sub> und PGI<sub>2</sub> nach experimentellem Koronarverschluss reduziert wird (Jugdutt *et al.*, 1981). Weitere Befunde belegen, dass die kontraktile Funktion nach Ischämie durch endogenes Prostacyclin, z. B. nach Stimulation mit Defibrotid, verbessert wird (Hohlfeld *et al.*, 1991). PGI<sub>2</sub> scheint somit ein anti-ischämisches Potential zu besitzen. In klinischen Versuchen konnten die tierexperimentellen Befunde nicht bestätigt werden, vermutlich, weil die Dosierungen von PGI<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>-Mimetika aus den Tierexperimenten ca. 1000-fach höher sind als die, welche beim Menschen gefahrlos verabreicht werden können. Problematisch ist hierbei die massive Blutdrucksenkung durch diese Substanzen.

Dennoch scheint in dem Zusammenhang die Feststellung wichtig, dass PGI<sub>2</sub> in der Lage ist, die Ischämie-induzierte Herzschädigung zu verhindern. Eine mögliche Erklärung ist eine Hemmung der Ischämie-induzierten Katecholamin-Ausschüttung (Schrör *et al.*, 1982;Schrör *et al.*, 1981), wahrscheinlich durch eine Stabilisierung von Zellmembranen der adrenergen Nervenendigungen. Letztlich ist aber der zelluläre Mechanismus der anti-ischämischen Wirkung von PGI<sub>2</sub> nicht geklärt.

#### 1.4. PG-Rezeptoren und deren Signaltransduktion

Die Wirkungen von E-Typ Prostaglandinen und TXA<sub>2</sub> werden über Membranrezeptoren vermittelt, die der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) des Rhodopsin-Typs angehören. Aufgrund der Affinität spezifischer Liganden können neun verschiedene PG-Rezeptortypen unterschieden werden: zwei PGD<sub>2</sub>-Rezeptoren (DP<sub>1</sub> und DP<sub>2</sub>), vier Subtypen des PGE<sub>2</sub>-Rezeptors (EP<sub>1</sub>-EP<sub>4</sub>) (siehe Tabelle 1.1), der FGF<sub>2 $\alpha$ </sub>-Rezeptor (FP), der PGI<sub>2</sub>-Rezeptor (IP) und der TXA<sub>2</sub>-Rezeptor (TP).

#### Tabelle 1.1:

Einteilung und Charakteristika der EP-Rezeptoren

Rezeptor	Signalweg	Liganden	G-Protein-Familie
EP <sub>1</sub>	IP <sub>3</sub> ↑	PGE <sub>2</sub>	Gq
EP <sub>2</sub>	cAMP↑	PGE <sub>2</sub>	Gs
EP <sub>3</sub> (Subtypen <sub>I-VIII</sub> )	cAMP↓, IP <sub>3</sub> ↑	PGE <sub>2</sub>	$G_i, G_q$
EP <sub>4</sub>	cAMP↑	PGE <sub>2</sub>	Gs

cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, IP<sub>3</sub>: Inositol-1,4,5-Triphosphat

Die GPCR-vermittelte Signaltransduktion beginnt mit der Bindung des Agonisten an den Rezeptor, wodurch das heterotrimere G-Protein aktiviert wird. Das G-Protein besteht aus unterschiedlichen Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), die nachfolgend verschiedene zelluläre Effektoren aktivieren können. So vermittelt die G<sub>as</sub>-Untereinheit eine Aktivierung der Adenylatzyklase (AC), was zu einem Anstieg von cAMP als Botenstoff in der Zelle führt und eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) bewirkt. Über das G<sub>aq</sub>-Protein wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, welche wiederum die Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) bewirkt. Der Anstieg von IP<sub>3</sub> führt in Folge zu einer vermehrten Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern. Über die G<sub>βγ</sub>-Einheit kann es ebenfalls zu einer Aktivierung der PLCβ und auch der Proteinkinase C (PKC) kommen (Nürnberg, 2004).

#### **1.5.** Der EP<sub>3</sub>-Rezeptor

Der EP<sub>3</sub>-Rezeptor ist gekennzeichnet durch sieben Transmembrandomänen (s. Abb. 1.2) und existiert in verschiedenen Splicevarianten (Isoformen), die nur in ihrem C-Terminus variieren. Alle Isoformen zeigen eine G<sub>i</sub>-Kopplung, einige auch eine Bindung an G<sub>q</sub>-Proteine, was jedoch abhängig vom C-terminalen Ende ist (Narumiya *et al.*, 1999). Für einige Isoformen, so zum Beispiel die bovine EP<sub>3D</sub>-Variante, konnte auch eine Kopplung an G<sub>s</sub>-Proteine beschrieben werden (Narumiya *et al.*, 1999). Mittlerweile sind beim Menschen acht verschiedene Splicevarianten bekannt (Kotani *et al.*, 1997). Auch bei der Maus gibt es multiple Formen (Negishi *et al.*, 1996), die mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  gekennzeichnet werden. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde die porcine  $EP_{3B}$ -Form kloniert, deren Sequenz eine große Homologie zum humanen  $EP_{3 II}$ -Rezeptor aufweist (Meyer-Kirchrath *et al.*, 1998). Für diese Isoform ist eine Kopplung an G<sub>i</sub> und G<sub>q</sub>-Proteine beschrieben worden (Kotani *et al.*, 1995).

Einen wichtigen Einblick in die Funktion des EP<sub>3</sub>-Rezeptors bietet die EP<sub>3</sub> *knock out-* Maus. Diese Mäuse zeigen eine verlängerte Blutungszeit und nach intravenöser Gabe von Arachidonsäure eine verringerte Sterblichkeit aufgrund einer Lungenembolie (Ma *et al.*, 2001). Dies spricht für eine Rolle des murinen EP<sub>3</sub>-Rezeptors bei der Vermittlung der PGE<sub>2</sub>potentierten Plättchenaggregation.



## Abb. 1.2:

Schematische Darstellung des porcinen Transmembrandomänen.  $Ser_{81}$  und  $Ser_{86}$  Phosphorylierungsstellen rot gekennzeichnet.

EP<sub>3</sub>-Rezeptors mit seinen sieben sind als mögliche PKA-abhängige

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand der EP<sub>3</sub>-Rezeptor, dem wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der kardioprotektiven Effekte der PG zukommt. In Versuchen am Schweineherz konnte gezeigt werden, dass der EP<sub>3</sub>-spezifische Agonist M&B 28.767 deutlich die Infarktgröße und die Kreatinkinase-Freisetzung, als Marker für das Ausmaß des ischämischen Schadens, verringerte, wobei der Agonist keinen Einfluss auf die Hämodynamik hatte (Hohlfeld *et al.*, 2000). Ferner wurden die Ischämie-induzierten Arrhythmien reduziert. Beide Befunde würden mit der bereits beschriebenen antiadrenergen Eigenschaft von PG kompatibel sein.

In Bestätigung dieser Hypothese konnte eine *in vitro* Studie zeigen, dass eine Aktivierung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors zu einer Inhibition der Adenylatzyklase und einer Reduktion der inotropen Antwort auf beta-adrenerge Stimulation führt (Hohlfeld *et al.*, 1997). Dies ist ein Indiz dafür, dass der EP<sub>3</sub>-Rezeptor über eine Inhibition der AC der Ischämie-induzierten Katecholamin-Ausschüttung entgegen wirkt. Weiterhin zeigte diese Arbeit, dass der EP<sub>3</sub>-Rezeptor während der akuten Ischämie aufreguliert wird. Auch andere Arbeitsgruppen konnten Hinweise für protektive Effekte durch eine Stimulation von EP<sub>3</sub>-Rezeptoren finden. So konnte sowohl für M&B als auch für den EP<sub>3</sub>-Agonisten GR 63799X eine Reduktion der Infarktgröße im Rattenmodell nachgewiesen werden (Zacharowski *et al.*, 1999a).

Die Frage nach dem ischämieprotektiven Mechanismus der Wirkung ist immer noch Gegenstand der Diskussion. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung und Öffnung von ATPsensitiven K<sup>+</sup>-Kanälen (K<sub>ATP</sub>) (Thiemermann & Zacharowski, 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der kardioprotektive Effekt von M&B durch die Vorbehandlung mit 5-Hydroxydecanoat (5-HD), einem selektiven Blocker für mitochondriale K<sub>ATP</sub>-Kanäle, verhindert wird (Zacharowski *et al.*, 1999b). Weiterhin wird eine Rolle der Proteinkinase C (PKC) diskutiert. Eine selektive Inhibition der PKC durch Staurosporin oder Chelerythrin verhindert die Reduktion der Infarktgröße durch EP<sub>3</sub>-Agonisten (Zacharowski *et al.*, 1999b; Zacharowski *et al.*, 1999a). Darüber hinaus wird die Inhibition des Ca<sup>2+</sup>-Influxes während der Reperfusion über eine Blockade von L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen diskutiert (Yamamoto *et al.*, 1999).

Andererseits konnten *in vivo* Versuche am Schwein zeigen, dass Glibenclamid keinen Einfluss auf die Aktionspotentialverkürzung durch  $PGE_1$  hat. Dies spricht gegen eine Beteiligung von K<sub>ATP</sub>-Kanälen (Hohlfeld *et al.*, 2000). Ein weiterer Befund, der gegen eine Beteiligung von K<sub>ATP</sub>-Kanälen spricht, sind Experimente am Langendorffherzen mit Cromacalin, einem K<sup>+</sup>-Kanal-Öffner. Mit dieser Substanz können zwar vasodilatorische Effekte, ähnlich Iloprost, erzielt werden, ein anti-ischämischer Effekt trat allerdings nicht auf (Vesper & Schrör, 1995).

Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch die Frage nach der Lokalisation der EP<sub>3</sub>-Rezeptoren. Denkbar sind a) eine Lokalisation im Gefäßsystem und somit Einflüsse auf die Koronarperfusion und den Blutdruck, b) eine präsynaptische Lokalisation, welches neuronale Effekte, wie die Inhibition des Ischämie-induzierten Katecholamin-Anstiegs, nach sich ziehen würde, oder c) direkte myokardiale Effekte, wie zum Beispiel die Kontrolle intrazellulären Calciums und die Regulation von Kaliumkanälen. Diese Aufzählung ist wahrscheinlich immer noch nicht vollständig und berücksichtigt z.B. nicht die Wirkungen von PG auf Signalproteine im Zusammenhang mit Ischämie-induzierten Veränderungen des Phänotyps.

So kann es über die βy-Untereinheit des G-Proteins zu einer Aktivierung des Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Kinase Signalweges kommen. Eine konstitutiv aktive Akt-Kinase Mausmodell Kardiomyozyten und schützt im vor Apoptose in vitro vor Ischämie/Reperfusions-Schäden in vivo (Fujio et al., 2000). Auch Adrenomedullin, für das eine Verbesserung der Hämodynamik bei Patienten mit Herzinsuffizienz beschrieben ist, vermittelt seine kardioprotektiven Effekte über den PI3K/Akt-Signalweg (Okumura et al., 2004). Ein wichtiges Substrat der Akt-Kinase ist die Glykogensynthase-Kinase-3β (GSK-3β).

Eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) kann sowohl über G<sub>q</sub>-Proteine, als auch über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit erfolgen. Dies bewirkt eine vermehrte Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>), welches einen Anstieg des intrazellulären Calciums auslöst. DAG andererseits aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Perfundiert man isolierte Rattenherzen mit einem Aktivator für die  $\epsilon$ -Form der PKC, wird das Herz vor I/R-Schäden geschützt (Inagaki *et al.*, 2003). Auch für die  $\delta$ -Form der PKC ist eine wichtige Rolle bei der Vermittlung Adenosin-induzierter kardioprotektiver Effekte in der Maus beschrieben (Zhao & Kukreja, 2003).

Abbildung 1.3 fasst noch einmal die bisher bekannten Signalwege des EP<sub>3</sub>-Rezeptors zusammen.



#### Abb. 1.3:

Zelluläre Signaltransduktionswege der EP<sub>3</sub>-Rezeptoren.

AC: Adenylatzyklase, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, DAG: Diacylglycerol, GSK-3 $\beta$ : Glykogen-Synthase Kinase-3 $\beta$ , HSP27: heat shock protein 27, IP<sub>3</sub>: Inositol-1,4,5-Triphosphat, PKA: Proteinkinase A, PKC: Proteinkinase C, PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, PLC $\beta$ : Phospholipase C  $\beta$ .

Für andere  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren ist bereits ein kardioprotektiver Effekt beschrieben worden. Demnach schützt eine Überexpression des A<sub>1</sub>- und A<sub>3</sub>-Adenosin-Rezeptors in Kardiomyozyten die Zellen vor Ischämieschäden (Dougherty *et al.*, 1998).

#### 1.6. Trophische Effekte von Prostaglandinen in Kardiomyozyten

Ebenfalls von Bedeutung für diese Arbeit sind trophische Effekte der PG. Mendez und LaPointe konnten zeigen, dass exogen zugeführtes PGE<sub>2</sub> die Proteinsynthese in neonatalen, ventrikulären Myozyten steigert (Mendez & LaPointe, 2002). Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls durch den EP<sub>1</sub>/EP<sub>3</sub>-Agonisten Sulproston und wurde durch den EP<sub>1</sub>/EP<sub>2</sub>-Antagonisten AH6809 aufgehoben. Das PGI<sub>2</sub>-Analog Beraprost hat dagegen keinen Effekt auf die Proteinsynthese. Somit scheint PGE<sub>2</sub> über die EP-Rezeptoren, nicht aber den IP-Rezeptor, einen stimulierenden Einfluss auf das Kardiomyozytenwachstum zu haben.

Für  $PGF_{2\alpha}$  ist beschrieben worden, dass es eine myokardiale Hypertrophie in neonatalen, ventrikulären Myozyten der Ratte induzieren kann, welche von einer Aktivierung der PLC und einer Translokation der PKC begleitet wird (Schrör, 2004).

Eine Bedeutung der PG für das Zellwachstum zeigt sich auch darin, dass durch Gabe eines COX-2-Inhibitors die hypertrophe Antwort nach einem Myokardinfarkt reduziert wird (LaPointe *et al.*, 2004). Diese hypertrophen Prozesse im Zusammenhang mit Prostaglandin-Rezeptoren sind eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit gefundene myokardiale Hypertrophie im EP<sub>3</sub>-überexprimierenden Mausmodell.

## 1.7. Hypertrophie

Zur Entstehung einer kardiovaskulären Hypertrophie können verschiedene physiologische wie pathophysiologische Mechanismen beitragen. So kann wiederholte sportliche Belastung zu einer Vergrößerung des Herzens führen, die in einem gewissen Rahmen auch gewünscht ist. Unerwünscht sind allerdings die pathophysiologischen Veränderungen: So kann es durch eine chronische Herzüberlastung zunächst zu einer Kompensation durch Zunahme der Ventrikelmasse, aber nach Fortbestehen der Überlastung auch zu einer Herzinsuffizienz kommen. Auch die Spätfolgen eines Herzinfarktes können in einer Hypertrophie der noch verfügbaren Kammermuskulatur bestehen. Analoges gilt für die Hypertonie mit einem kompensatorischen Anstieg der Herzmasse.

Typisch für eine linksventrikuläre Hypertrophie ist das sogenannte Myokard-"Remodelling", welches zu einem konzentrischen oder ekzentrischen Typ der Hypertrophie führen kann. Die ekzentrische Form wird durch eine Zunahme in Wanddicke und Kammergröße bestimmt, allerdings ohne eine Veränderung der Wand-zu-Kammer-Ratio, wodurch es zu einer Vergrößerung des Kammervolumens kommt. Im Gegensatz dazu steht die konzentrische Hypertrophie. Diese ist gekennzeichnet durch einen Anstieg der Ventrikel-Wanddicke und Reduktion des Kammer-Volumens.

Auf zellulärer Ebene findet man beim myokardialen Remodelling eine gesteigerte Proteinsynthese und verschiedene morphologische Veränderungen (wie Zellgröße, Sarkomer-Strukturen) (Schaub *et al.*, 1997; Swynghedauw, 1999; MacLellan & Schneider, 2000), eine Aufregulation des *atrial natriuretic factor* (ANF), und eine Fibrose, die mit einer vermehrten Kollagensynthese einhergeht. Die Aufregulation von ANF ist Bestandteil dessen, was auch als Wiederaktivierung des fetalen Genprogramms bezeichnet wird. Es erfolgt eine Aufregulation nur embryonal aktiver Gene. Dadurch entsteht eine Ähnlichkeit in der Genexpression zwischen Hypertrophie und Embryonalentwicklung (Ghatpande *et al.*, 1999).

## 1.8. Hypertrophie-beteiligte Signalwege

In den letzten Jahren wurden verschiedene molekulare Signalwege für die kardiomyozytäre Hypertrophie beschrieben. So können unterschiedliche Auslösemechanismen verschiedene Wege der Signaltransduktion aktivieren. In vielen Hypertrophie-Modellen werden allerdings häufig die gleichen Wege aktiviert, wobei zahlreiche Überschneidungen auftreten. Im Folgenden sollen einige dieser Signalwege vorgestellt werden.

#### Calcineurin-NFAT

Die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin wird in vielen Geweben exprimiert und besteht aus einer katalytischen Untereinheit A und einer regulatorischen Untereinheit B. Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT, was zu dessen Translokation in den Kern führt. Hier bewirkt NFAT zusammen mit GATA-4 die Aktivierung verschiedener hypertrophie-assoziierter Gene. Eine konstitutive Aktivität von Calcineurin in Mäusen führt zu einer starken Herzvergrößerung und eventuell zu Herzversagen (Molkentin *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde auch bei *in vivo* sowie *in vitro* Studien eine wichtige Rolle für Calcineurin als vermittelnder Faktor der Hypertrophie beschrieben (Übersicht in Wilkins & Molkentin, 2002). In Abb. 1.4 ist ein Schema des Calcineurin-Signalweges dargestellt.



#### Abb. 1.4:

Die Aktivierung eines  $G_q$ -Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR) führt zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration und einer Aktivierung der Calmodulin (CaM)regulierten Phosphatase Calcineurin. Über eine Dephosphorylierung aktiviert Calcineurin NFAT, welches in den Kern einwandert und mit GATA-4 und anderen Proteinen eine Aktivierung des fetalen Genprogramms bewirkt. Calcineurin kann auch direkt den nukleären Faktor MEF2 aktivieren. GSK-3 $\beta$  mediiert den Export von NFAT aus dem Kern. (MEF2: myocyte enhancing factor-2, BNP: brain natriuretic peptide, MCIP1: myocyte-enriched calcineurin-interacting protein-1) (modifiziert nach Wilkins & Molkentin, 2002).

## PI3-Kinase/Akt/GSK-3β

Phosphoinositol-3 Kinasen (PI3K) gehören einer Familie von Lipidkinasen an, die an vielen sowohl physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind. PI3K können über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und über GPCR aktiviert werden. Danach generiert die PI3K Phosphatidylinositole, was wiederum zur Aktivierung von Akt/ PKB, PDK1 und monomeren G-Proteinen führen kann. Eine kardiospezifische Überexpression von konstitutiv aktiver PI3K in Mäusen resultiert in einer Herzhypertrophie (Shioi *et al.*, 2000; Crackower *et al.*, 2002; McMullen *et al.*, 2003).

Eine zentrale Rolle bei der Hypertrophie spielt auch die Akt/Proteinkinase B. So geht eine Überexpression von Akt in Mäusen mit einer Herzvergrößerung einher (Shioi *et al.*, 2002; Condorelli *et al.*, 2002).

Ein wichtiges Akt-Substrat ist die Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). GSK-3 $\beta$  ist eine in vielen Geweben exprimierte Serin/Threonin-Kinase, deren Aktivität durch Akt inhibiert wird (Cross *et al.*, 1995). GSK-3 $\beta$  phosphoryliert eine große Zahl von Substraten, so zum Beispiel die Glykogen-Synthase,  $\beta$ -Catenin und verschiedene Transkriptionsfaktoren. GSK-3 $\beta$  phosphoryliert NFAT3 und bewirkt so dessen Austritt aus dem Kern von COS-Zellen (Beals *et al.*, 1997).

Schließlich ist auch die Proteinkinase A (PKA) bedeutsam. Die PKA wird durch den Botenstoff cAMP reguliert, der über die AC gebildet wird. Somit ist eine mögliche Herabregulation der cAMP-mediierten Signaltransduktion ein Teil der EP<sub>3</sub>-vermittelten Signaltransduktion. Es ist bekannt, dass eine transgene Überexpression der PKA zu einer dilatativen Kardiomyopathie mit hypertrophen Myozyten und Fibrose führt (Antos *et al.*, 2001). Deshalb sollte auch die Rolle der PKA im hypertrophen Mausmodell untersucht werden.

#### 1.9. Fragestellung

Obwohl in Ischämiemodellen eine protektive Wirkung kardialer  $EP_3$ -Rezeptoren experimentell gut belegt wurde, ist weiterhin unbekannt, wo diese Rezeptoren lokalisiert sind und welche Signalwege distal des Rezeptors involviert sind. Denkbar sind Einflüsse auf die Koronarperfusion und den Blutdruck oder neuronale Effekte, wie die Inhibition des Ischämieinduzierten Katecholamin-Anstiegs, sowie direkte myokardiale Effekte, wie zum Beispiel die Kontrolle des intrazellulären Calciumspiegels und die Regulation von Kaliumkanälen. Am wahrscheinlichsten ist eine kardiomyozytäre Lokalisation. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein transgener Ansatz gewählt. Daher sollten Mäuse generiert werden, welche den porcinen,  $G_i$ - und  $G_q$ -gekoppelten  $EP_3$ -Rezeptor kardiomyozytär überexprimieren.

Gewählt wurde diese Isoform, weil für sie schon Befunde aus transfizierten CHO-Zellen vorlagen (Meyer-Kirchrath *et al.*, 1998). Dieser transfizierte porcine Rezeptor weist eine hohe Homologie zum humanen  $EP_3$  II-Rezeptor auf. Die Überexpression des Transgens erfolgte unter der Kontrolle des kardiomyozytenspezifischen  $\alpha$ -MHC-Promotors und sollte auf RNAund auf Proteinebene nachgewiesen werden. In einem nächsten Schritt wurde die Funktionalität des Rezeptors überprüft.

Der zentrale Aspekt dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Ischämieprotektion in vitro. Hierfür wurden die Mäuseherzen im Langendorff-Modell isoliert perfundiert und ihre Relaxationsgeschwindigkeit, Funktion (Kontraktilität, enddiastolischer Druck) und biochemischen Marker ausgewertet. Durch die Zugabe verschiedener Pharmaka (PGE<sub>1</sub>, 5-Hydroxydecanoat) sollten mögliche Mechanismen Isoprenalin, Talinolol, der Ischämieprotektion funktionell überprüft werden.

Zudem sollte die Herzfunktion *in vivo* durch Magnetresonanz-Messungen analysiert werden. Hierbei ergaben sich bereits Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien. Eine Linie zeigte eine Überexpression des EP<sub>3</sub>-Rezeptors, die mit kardioprotektiven Wirkungen im Ischämiemodell einherging. Eine andere Linie zeigte ein stark vergrößertes und dilatiertes Herz, weshalb sich ein Teil der Arbeit der Herzhypertrophie widmet.

In einem zweiten Ansatz wurde eine rein  $G_i$ -gekoppelte Isoform des humanen EP<sub>3</sub>-Rezeptors (EP<sub>3 IV</sub>) in die Maus eingebracht und ihre Ischämie-Toleranz im Langendorff-Modell überprüft werden. Dadurch sollte untersucht werden, ob ein  $G_i$ -vermittelter Signalweg allein für einen Ischämie-protektiven Effekt ausreicht.

Zur Charakterisierung der Signaltransduktion des EP<sub>3</sub>-Rezeptors sollten Unterschiede in der Proteinexpression zwischen Wildtyp- und transgenen Mäusen ermittelt werden. Das galt sowohl für die Mechanismen der Ischämieprotektion, als auch die der Herzhypertrophie.

## Ziele:

## 1. Kardiale Überexpression verschiedener EP<sub>3</sub>-Rezeptoren in der Maus

- Rezeptorbindungsstudien/gewebsspezifische Expression
- Überprüfung der funktionellen Kopplung des Rezeptors (cAMP-Assay)

## 2. Funktionelle Untersuchungen transgener Mäuseherzen

- Myokardischämie *in vitro* (u.a. Kontraktilität, enddiastolischer Druck, biochemische Marker)
- Herzfunktion *in vivo* (MRI)

## 3. Charakterisierung von Post-Rezeptor-Signalwegen (G<sub>i</sub>/G<sub>q</sub>)

- Unterschiede in der Proteinexpression (Westernblot, 2D-Gelanalyse)
- Myokardischämie *in vitro* (G<sub>i</sub>-gekoppelte Isoform)

# 4. EP<sub>3</sub>-assoziierte Mechanismen der Herzhypertrophie

- Unterschiede in der Proteinexpression/Transkriptionsfaktoren (Westernblot)
- Aktivitätsmessung von Calcineurin

# 2. Material und Methoden

# 2.1. Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Krebs-Henseleit Puffer

118 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 8 mM Glukose, 2 mM Pyruvat, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 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)

## **RIPA-Puffer**

150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1% (v/v) NP-40, 0,5 % Desoxycholat (DOC), 0,1% (m/v) SDS, 5 μl Protease-Inhibitor-Mix (#P8340, Sigma, Deisenhofen)/100 mg Gewebe

## 2x Lämmli

125 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,0), 100 mM DL-Dithiothreitol, 20% (v/v) Glycerin, 4% (m/v) SDS, 0,002% Bromphenolblau

# Lauf-Puffer

190 mM Glycin, 25 mM Tris (pH 8,5), 0,1% (m/v) SDS

# TBS-TM

TBST, 5% (m/v) Milchpulver

## TBS-T

150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,1% Tween<sup>™</sup>-20

## Perfusionsmedium für Kardiomyozyten-Präparation

110 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES (pH 7,3), 11 mM Glukose

#### 10x HBSS

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>, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 40 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7,0)

## 1x HBSS

10x HBSS verdünnen, Zusetzen von 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,5 mM Glukose, 10 mM HEPES (pH 7,8), 1 mg/ml BSA

## **RIA-Puffer**

50 mM Tris/HCl, 4 mM EDTA (pH 7,5)

## 10x E-Puffer

20 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA (pH 7,0)

## 1xTAE

40 mM Tris, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA (pH 7,8)

## Blaumarker (10x)

30% Glycerol, 0,04% Bromphenolblau

## Denaturierungslösung

1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

## Neutralisierungslösung

1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl (pH 7,2)

#### 10x SSC

3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat (pH 7,0)

## Proteinase K-Puffer

50 mM Tris (pH 8), 100 mM EDTA, 0,5 % SDS, 0,5 mg/ml Proteinase K

## **TE-Puffer**

10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA (pH 8,0)

Amido-Schwarz-Färbelösung

0,1% (m/v) Amido-Schwarz, 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung (für Amido-Schwarz-Färbung)

25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure

Bindungspuffer (für Membranpräparation)

50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 5 mM Na-EDTA, 2 mM EGTA

Trennpuffer

100 mM NaCl, 20 mM Hepes (pH 6,4)

## 2.2. Substanzen

Folgende Substanzen wurden im Langendorff-Modell eingesetzt: Talinolol (AWD Pharma, Dresden), Isoprenalin (Boehringer, Ingelheim), PGE<sub>1</sub> (Schwarz Pharma, Monheim), 5-Hydroxydecanoat (Sigma, Deisenhofen).

## 2.3. Generierung der transgenen Mäuse

Für eine kardiospezifische Überexpression des EP<sub>3</sub>-Rezeptors wurde dieser unter der Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promotors in die Vorkerne von befruchteten Maus-Oozyten von C75Bl6/C3H-Weibchen eingebracht. Abb. 2.1 zeigt eine Karte des Konstruktes. Das Plasmid ist von Frau PD Dr. Meyer-Kirchrath kloniert worden und enthält die vollständige Sequenz des porcinen EP<sub>3B</sub>-Rezeptors. Es wurde schon zu Beginn der Arbeit kloniert und in Vorarbeiten bereits beschrieben (Meyer-Kirchrath *et al.*, 1998). Die transgenen Mäuse wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Rüther am Institut für Entwicklungsbiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hergestellt.



#### Abb. 2.1:

Schematische Darstellung des Plasmids pNCEP3, welches den  $\alpha$ -MHC-Promotor und den porcinen EP<sub>3</sub>-Rezeptor trägt.

(Amp: Ampicillin-Resistenz-Kassette, EcoRI, HindIII: Schnittstellen für Restriktionsenzyme, Hgh: *Human growth hormon*-Polyadenylierungs-Stelle, bp: Basenpaare).

# 2.4. Genotypisierung der Mäuse

## 2.4.1. Southernblot

#### Restriktionsverdau:

Die gesamte genomische DNA aus einer Schwanzspitzenpräpartion (Menge nicht quantifiziert) wurde mit 2  $\mu$ l des Restriktionsenzyms EcoRI (Roche) und einem Zusatz von 50  $\mu$ l 10x Puffer in einem Volumen von 500  $\mu$ l geschnitten und bei 37 °C über Nacht inkubiert. DNA-Fällung mit Natrium-Acetat (NaAc):

Der Restriktionsverdau wurde mit 1/10 Volumen 3M NaAc, pH 5,2 und 2 Volumen Ethanol 100% versetzt und mindestens 30 min bei –20 °C gefällt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 x g, 4 °C für 15 min. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Pellet an der Luft getrocknet und abschließend die DNA in 10  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O gelöst.

## TAE-Agarose-Gel:

Die Auftrennung erfolgte in einem 1%igen TAE-Agarose-Gel mit Ethidiumbromid. Die DNA wurde für 2-3 min bei 56 °C erhitzt, mit Blaumarker versetzt, auf das Gel aufgetragen und nach dem Lauf fotographisch dokumentiert.

## Blot:

Das Gel wurde zunächst in 0,25 M HCl bei RT (Raumtemperatur) geschwenkt, bis der Blaumarker seine Farbe von blau nach gelb wechselte, dann kurz mit dH<sub>2</sub>O abgespült, 30 min in Denaturierungslösung geschwenkt, erneut mit dH<sub>2</sub>O abgespült und für 15 min mit Neutralisierungslösung geschwenkt.

## Blotaufbau:

Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht mit 10x SSC. Für das Blotting wurde nach der *downward*-Methode von Koetsier *et al.* (Koetsier *et al.*, 1993) vorgegangen, bei der 10x SSC aufgrund von Kapillarkräften durch das Gel und die darunter liegende *Hybond N* -Membran (Amersham) in einen Papierstapel gesogen wird. Die DNA wird dabei aus dem Gel eluiert und bindet aufgrund von elektrostatischen Kräften an die positiv geladene Membran.

Am nächsten Tag wurde die Membran in 6x SSC für 5 min geschwenkt und in der Microwelle die DNA für 2-3 min bei 750-900 W auf der Membran fixiert. Anschließend wurde die Membran getrocknet und bei RT gelagert oder direkt anschließend hybridisiert.

#### Sondenmarkierung:

Die Sondenmarkierung erfolgte mit "Ready-To-Go" DNA Labelling Beads von Amersham (Freiburg). Es wurden 50 ng der Sonden-DNA und markiertes dCTP ( $\alpha^{23}$ P) nach Herstellerangaben in die Reaktion eingesetzt und die markierten Sonden mit Micro Spin<sup>TM</sup> G-50 Säulen (Amersham, Freiburg) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

#### *Hybridisierung:*

Die Prähybridisierung der Membran erfolgte bei 68 °C in 10ml Hybridisierungslösung (Perfekthyb<sup>TM</sup> Plus, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA). Danach wurde die markierte Sonde mit  $\geq 1 \times 10^6$  cpm auf 5 ml zugegeben und erneut bei 68 °C für 2-3 h hybridisiert. Die Membran wurde einmal in 2x SSC/0,1%SDS für 5 min bei RT und zweimal in 0,5x SSC/0,1%SDS für 20 min bei 68 °C gewaschen. Abschließend erfolgte die Detektion mittels PhosphoImager Typhoon 8600 (Molecular Dynamics, Piscataway, NJ, USA). Da die DNA mit EcoRI geschnitten und mit einer cDNA-Sonde gegen den  $\alpha$ -MHC-Promotor hybridisiert war, konnten spezifische Banden des 3,8 kb EcoRI-Fragments detektiert werden.

#### **2.4.2. PCR**

#### Präparation genomischer DNA aus Schwanzspitzen:

Die Schwanzspitzen wurden in 0,7 ml Proteinase K-Puffer bei 55 °C über Nacht verdaut, anschließend mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt und die Phasen gut gemischt. Die Proben wurden in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) für 3-5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 0,7 ml Phenol/Chloroform (1:1) zugesetzt, gemischt und erneut zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA bei RT erfolgte mit 70  $\mu$ l 3 M NaAc (pH 5,2) und 0,7 ml 100% Ethanol; und die DNA durch Zentrifugation für 30 sec bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet, die DNA in 100  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

#### PCR:

Für die PCR fanden "Ready To Go PCR beads" (Amersham, Freiburg) Verwendung. Zugesetzt wurden 2  $\mu$ l der genomischen DNA (entspricht ca. 2  $\mu$ g), je 1  $\mu$ l der 20  $\mu$ M Primerlösungen (Endkonzentration: 20 pM) und 21  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Die Inkubation der Probe erfolgte für 10 min bei RT. Anschließend wurde dann folgendes PCR-Programm im TRIO-Thermo-Cycler (Biometra, Göttingen) gestartet:

1) 4 min 94 °C

2) 1 min 94 °C

3)1 min 60 °C

4) 1 min 72 °C

Eine Schleife von Punkt 4) an Punkt 2) wurde mit 35 Wiederholungen (Zyklen) programmiert.

5) 10 min 72 °C

6) 4°C

Abschließend wurden die Proben mit Blaumarker versetzt, im 1,2 %igen Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

#### Primersequenzen:

NCEP3 upstream: 5'-act gtg gtg cct cgt tcc ag-3' NCEP3 downstream: 5'-cat ggc act ggc gat gaa g-3' Die Primer für den porcinen EP<sub>3</sub>-Rezeptor ergeben ein Fragment von 849 bp in der PCR.

NCEP3 upstream: s.o.

hNCEP3 downstream: 5'-cat ggc gct ggc gat gaa c

Die Primer für den humanen EP<sub>3</sub>-Rezeptor ergeben ein Fragment von ca. 850 bp in der PCR.

## 2.5. Rezeptorbindungsstudien

#### 2.5.1. Membranpräparation

Die Herzen wurden in Bindungspuffer (mit 0,1 mM PMSF) mit einem Ultraturrax T 8.01 (IKA-Werke, Staufen) homogenisiert, die Homogenate anschließend gefiltert und bei 220 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 48 000 x g erneut für 10 min zentrifugiert, die Pellets anschließend zweimal mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

#### 2.5.2. Ligandenbindung

50  $\mu$ g der präparierten Membranen wurden entsprechend ihrer Konzentration mit Bindungspuffer auf 100  $\mu$ l aufgefüllt (Endkonzentration: 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l). Dazu wurde 10 nM [<sup>3</sup>H] PGE<sub>1</sub> und unmarkiertes PGE<sub>1</sub> in den Konzentrationen von 1-1000 mM pipettiert, beides ebenfalls in Bindungspuffer in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l gelöst und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Filtration der Ansätze erfolgte mit Hilfe einer Brandel-Apparatur über Whatman-Papier, welches danach dreimal mit jeweils 5 ml Trennpuffer gewaschen wurde. Das Filterpapier wurde in 4 ml Szintillationslösung 3 h lang geschüttelt und nach 1 h Ruhephase abschließend im Szintillationszähler LS 6000IC (Beckmann Coulter GmbH, Fullerton, CA, USA) vermessen. Die unspezifische Bindung wurde in der Anwesenheit von 10  $\mu$ M PGE<sub>1</sub> bestimmt und die spezifische Bindung aus der Differenz errechnet. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

## 2.6. Mäuse – Langendorff – Modell

## 2.6.1. Präparation der Herzen

Nach dem Töten der Tiere wurde der Thorax geöffnet, das Herz und umliegendes Gewebe zügig entnommen und umgehend in eisgekühlten Krebs-Henseleit-Puffer überführt, worin das Herz während der gesamten Präparation verblieb. Die Reste des umliegenden Gewebes wurden sorgfältig entfernt, die Aorta vor dem ersten Abgang im Aortenbogen (Truncus brachiocephalicus) durchtrennt, eine Kanüle (Gauge 20) in die Aorta eingeführt und durch Ligatur fixiert. Durch einen kleinen Schnitt wurde das linke Atrium geöffnet und dort nach Abschluss der Präparation der Ventrikelballon eingeführt. Nach erfolgreicher Präparation wurde das Herz umgehend in die Langendorff-Appartur eingebracht. Die Zeit zwischen Öffnung des Thorax und Beginn der Perfusion in der Langendorff-Apparatur betrug in allen Fällen weniger als 7 min.

Herzen mit einer Flussrate von 5 ml/min, die gewöhnlich auf einen Riss in der Aorta zurückzuführen ist und/oder Herzen mit einem  $\Delta$ LVP von <50 mmHg, wurden nicht verwendet.

#### 2.6.2. Versuchsprotokoll

#### Ischämie-Reperfusion:

Nach einer 20-minütigen Stabilisierungszeit der Herzen wurde der Zeitpunkt t = 0 min definiert, eine Kontrollregistrierung vorgenommen und die Perfusion für 60 min vollständig unterbrochen. Darauf folgte eine Reperfusion für 45 min. Nach Versuchsende ist das Herz

gewogen, in flüssigen N<sub>2</sub> tiefgefroren und bei -80 °C für spätere Versuche gelagert worden. Die zu testenden Substanzen wurden vor Versuchsbeginn dem Perfusat zugegeben Isoprenalin:

Um cAMP-mediierte inotrope Mechanismen zu untersuchen, wurden Herzen unter nichtischämischen Bedingungen mit steigenden Isoprenalin-Konzentrationen (3-1000 nM) perfundiert.

#### 2.6.3. Funktionelle Messungen am Langendorff-Herz

Die Perfusion erfolgte unter konstantem Druck (80 mmHg). Nach Einbringen des Herzens in die Apparatur ist vorsichtig der wassergefüllte Ventrikelballon im Lumen des linken Ventikels platziert worden. Eine Schrittmacher-Elektrode, bestehend aus zwei Platin-Iridium-Drähten (fixer Abstand 1 mm), wurde am rechten Atrium angebracht und das Herz mittels eines Pulsgenerators mit einer Frequenz von 500 Schläge/min stimuliert (Impulsbreite 4 ms, Amplitude 2,5 V). Mittels eines Wärmemantels ist die Temperatur des Herzens während des Versuchs (einschließlich Ischämie) konstant bei 37,5  $\pm$  0,5 °C gehalten worden.

Mit dem für die funktionellen Messungen eingeführten und mit einem Druckwandler (Combitrans, B. Braun, Melsungen) verbundenen Ballon wurde ein LVEDP von 3-8 mm Hg eingestellt. Der Koronarfluss ist über ein elektromagnetisches Flussmessgerät (MDL 401, Skalar Medical B.V., Delft, Niederlande) ermittelt worden. Alle Parameter wurden kontinuierlich per MacLab/8s-Computersystem (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australien) aufgezeichnet und mittels Chart-Software Version 3.5 (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australien) ausgewertet.

#### 2.6.4. Biochemische Untersuchungen

Die Messung der Kreatinkinase (CK) und Lactatdehydrogenase (LDH) diente als Marker für den Verlauf und für das Ausmaß einer ischämischen Myokardschädigung. Bei Verlust der Membranintegrität werden diese zytosolischen Enzyme in das koronare Perfusat freigesetzt. Für die Messungen wurde zu vorbestimmten Zeitpunkten Effluat gesammelt und die CK- und LDH-Aktivität jeweils mittels eines Kits (Creatine kinase, Lactate dehydrogenase, Cypress Diagnostics, Belgien) laut Herstellerprotokoll bei RT bestimmt. Es handelt sich hierbei um einen photometrischen Test, der auf der Umsetzung von NADP<sup>+</sup> zu NADPH<sup>+</sup> H<sup>+</sup> beruht. Die photometrische Messung fand bei 340 nm statt.

## 2.7. Westernblot

#### 2.7.1. Proteingewinnung aus Herzgewebe

Die Homogenisierung des tiefgefrorenen Herzgewebes erfolgte in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Teflongefäß mit einer frei beweglichen Stahlkugel in einem Mikro-Dismembrator (B. Braun, Melsungen). Das pulverisierte Gewebe wurde umgehend in eisgekühlten RIPA-Puffer (1ml pro Herz, entspricht ca. 140-200 mg Gewebe) überführt. Unmittelbar nach der Homogenisierung wurden die Lysate für 3 min auf 95 °C erhitzt und nachfolgend für 1 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, ein Aliquot zur Proteinbestimmung verwendet und der Rest mit dem gleichen Volumen 2x Lämmli-Puffer versetzt, für 10 min bei 95 °C erhitzt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

#### 2.7.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels des DC Protein Assay (#500-0112, Bio-Rad, München) nach Empfehlungen des Herstellers. Der Assay basiert auf der Methode von Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Die Erstellung der Eichkurve erfolgte mit Rinderserumalbumin. Die photometrische Auswertung wurde in einem ELISA-Reader (Microplate Reader Model 550, Bio-Rad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt. Dieser Assay wurde gewählt, da der verwendete RIPA-Puffer einen SDS-Anteil enthält, der von dem später unter 2.9.1 beschriebenen Bradford-Assay (Bio-Rad) nicht toleriert wird.

#### 2.7.3. Auftrennung der Proteine

Die Auftrennung und Analyse der gewonnenen Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE). Hierfür wurden diskontinuierliche Gele entsprechend der Methode von Fling und Gregerson (Fling & Gregerson, 1986) verwendet. Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 4%. Die Konzentration des Trenngels variierte je nach Größe der zu untersuchenden Proteine zwischen 8 und 15%. Die Auftrennung der Proteine (10 µg) erfolgte in Lauf-Puffer bei 200 V. Nach der Auftrennung im Gel wurden die Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)- Membran (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) übertragen, nachdem diese zunächst durch Schwenken in Methanol aktiviert (10 sec) wurde. Der Transfer erfolgte in einer ,Semi-Dry'-Blot-Apparatur (Biorad, München) bei 14 V für 30 min. Nach dem Blot wurden die Membranen für 60 min bei Raumtemperatur (RT) in TBS-TM inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membranen zu vermeiden.

#### 2.7.4. Detektion spezifischer Proteine

Mit spezifischen Antikörpern wurden die auf den PVDF-Membranen immobilisierten Proteine detektiert. Eine Liste der verwendeten Antikörper sowie deren Verdünnung findet sich in Tabelle 2.1. Die Inkubation erfolgte in allen Fällen bei 4 °C über Nacht. Nachfolgend wurde die Membran gewaschen (3 x 5 min in TBS-T). Es folgte die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (je nach Herstellung des Primärantikörpers s. Tabelle 2.1) für 60 min bei RT. Nach einem weiteren Waschschritt (3 x 5 min) folgte eine Inkubation mit ECL (enhanced chemiluminescence)-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim). Die an den Sekundärantikörpern befindliche Peroxidase vermittelte eine Oxidation des im ECL-Reagenz enthaltenen Luminols, und die resultierende Lichtemission wurde mittels Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien) detektiert.

#### Tabelle 2.1:

Name	Quelle	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nr.
p-PKC-Substrat	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	2261
p-Akt-Substrat	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9611
GSK-3β	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9332
p-GSK-3β	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9336
p-PKA-Substrat	Kaninchen	1 :1000	Cell Signaling	9621
HSP 27	Ziege	1:100	Santa Cruz	sc-1049
Src	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	2108

Liste der verwendeten Antikörper

## 2.7.5. Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung

Zur Überprüfung auf gleichmäßige Proteinbeladung wurden die Membranen mit Amido-Schwarz-Färbelösung für 10 min bei RT geschwenkt und anschließend mit Entfärbelösung gewaschen. Die nach der Trocknung sichtbaren Proteinbanden sind auf gleichmäßige Proteinmengen überprüft worden.

#### 2.7.6. Densitometrische Auswertung der Röntgenfilme

Die Filme wurden mit dem GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad, München) eingescannt und anschließend mit Hilfe der Software Quantity One® (BioRad, München) ausgewertet.

#### 2.8. Isolierung von Kardiomyozyten

Die Präparation des Herzens erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Das Herz wurde anschließend bei 37 °C und 80 mmHg mit Perfusionsmedium für Kardiomyozyten-Präparationen für 2 min perfundiert, um noch vorhandenes koronares Restblut zu entfernen. Dem Perfusionsmedium wurde 150 U/ml Kollagenase CLSII (Biochrom, Berlin) und 28 µM CaCl<sub>2</sub> zugegeben und das Herz damit für 25 min kontinuierlich durchspült. Der linke Ventrikel wurde mit einem McIlwain Gewebe-Häcksler (Mickle Lab Engeneering, Guilford, UK) zerkleinert und für weitere 5 min in Kollagenase-haltigem Perfusionsmedium bei 37 °C inkubiert und gelegentlich auf- und abpipettiert, um eine bessere Isolierung der Zellen zu erreichen. Die Zellen wurden durch ein Nylonnetz (Porengröße 200 µm) filtriert, bei 25 x g für 1 min zentrifugiert und anschließend mit steigenden CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen (0,125-1 mM) resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen in Earls Medium 199 (Biochrom, Berlin) aufgenommen, auf Laminin-beschichtete 24-Loch Platten transferiert und lichtmikroskopisch anhand ihrer typischen Dachziegel-artigen Form kontrolliert, bevor sie für 2 h bei 37 °C inkubiert wurden.

#### 2.8.1. cAMP-Assay

Zunächst wurden die Zellen zweimal mit je 400 μl 1xHBSS gewaschen und anschließend für 10 min bei 37 °C mit 1 mM Isobutylmethylxanthin (IBMX) inkubiert. Die Zellen wurden mit 10 μM Forskolin, dem EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonist M&B 28.767 (M&B) (100 nM, 15α-hydroxy-9oxo-16-phenoxy-17,18,19,20-tetranorprost-13-transenoic acid) oder beidem für 10 min bei 37 °C stimuliert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Reaktion mit eiskaltem 96% Ethanol gestoppt. Nachdem der Alkohol verdampft war, wurden die Zellen mit RIA-Puffer überschichtet und bei –80 °C über Nacht eingefroren. Der Puffer wurde abgenommen und mittels Radioimmunoassay (RIA) nach Steiner (Steiner *et al.*, 1972) die cAMP-Konzentration bestimmt. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte nach Bradford (Bio-Rad) gemäß Herstellerangaben mit bovinem Serum-Albumin als Standard. Die cAMP-Menge wurde hierauf bezogen. Der Effekt von Forskolin auf die cAMP-Bildung wurde ebenfalls nach Vorinkubation mit 2  $\mu$ g/ml Pertussistoxin (PTX) für 4 h bestimmt.

#### 2.8.2. Flächenmessung

Die isolierten Kardiomyozyten wurden unter dem Lichtmikroskop digital fotografiert und ihre Fläche mit Hilfe des Programms Skaletti (Conrad Electronic, Hirschau) vermessen. Pro Maus sind ca. 40-70 Myozyten vermessen worden.

## 2.9. Isolierung von Gesamt-RNA aus Herzgewebe

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Hierfür wurde das Protokoll für die Isolierung von RNA aus Herz-, Muskel- und Hautgewebe des Herstellers verwendet.

## 2.9.1. Quantifizierung von RNA

Die Konzentration und Reinheit von RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in einem Genequant II DNA/RNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Der Quotient aus beiden Absorptionswerten (260/280) bietet die Möglichkeit der Abschätzung der RNA-Reinheit. Nur wenn der Absorptionskoeffizient (260/280 nm) zwischen 1,5 und 2 betrug, ist die RNA für weitere Untersuchungen verwendet worden.

## 2.9.2. Auftrennung von RNA in Agarose-Formaldehyd-Gelen

Die Integrität der RNA wurde durch Kontrolle der 18S- und 28S-RNA-Bande auf einem denaturierendem Agarose-Formaldehydgel überprüft. Die Proben (2  $\mu$ g RNA) wurden mit Denaturierungspuffer versetzt und für 5 min bei 65 °C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte bei 60 V in 1x E-Puffer.

## 2.10. Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR)

Semiquantitative RT-PCR Reaktionen wurden in einem TRIO-Thermo-Cycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Oligonucleotid-Primer sind von Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert und sind in Tabelle 2.2 aufgeführt worden. Für die Reaktion wurde ein One-Step<sup>TM</sup> RT-PCR-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Das Enzym Glycerol-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als interner Standard koamplifiziert.

#### Tabelle 2.2:

Con	Drimor Coquenz		Annealing-	Zyklen-
Gen	r milei -Sequenz	größe (bp)	temperatur	zahl
ANF	5' gag caa atc ctg tgt aca gtg c	549	55 °C	29
7 11 11	5'-cat cga tcg tga tag atg aag g	547		
ß-MHC	5'-acc ttc aag gcc aag ctg tac g	506	58 °C	27
p-wille	5'-tag aga atg cgg ttg gga aag c	500		
Prdy6	5'-cga ttt cct ggg aga ttc atg g	501	58 °C	30
TIUXO	5'-gag ggt ggg aac tac cat cac g	501		
Q_Actin	5'-tgc ttc tgg aag aac cac agg c	512	55 °C	27
	5'-gca tac gat cgg caa tac cag g	512		

Für die RT-PCR Analyse eingesetzte Oligonukleotid-Primer und PCR-Bedingungen

## 2.11. GATA-4

Die Kernextrakte wurden aus Herzgewebe mit dem *Nuclear Extract Kit* (AcitveMotif, Rixensart, Belgium) nach Herstellerprotokoll präpariert und GATA-4 mittels *TransAM GATA-4 transcription factor assay kit* (ActiveMotif, Rixensart, Belgium) nach Angaben des Herstellers gemessen.

# 2.12. Calcineurin-Aktivität

Die Calcineurin-Aktivtät wurde mit einem Calcineurin Cellular Activity Assay Kit (Calbiochem, Darmstadt) gemessen. Die Präparation der Herzgewebeproben und deren Messung erfolgte nach Herstellerangaben.

## 2.13. Magnet-Resonanz-Imaging (MRI)

Linksventrikuläre Funktionsparameter wurden *in vivo* mittels Magnetresonanzbildgebung unter Verwendung eines vertikalen 9.4T-NMR Spektrometers (Bruker DRX 400 MHz WideBore) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden ein 40mm-Gradientensystem sowie ein 30mm-Birdcage-Resonator verwendet. Alle Messungen wurden unter Isofluran-Narkose der Tiere (1.5% in einem Gasgemisch 20%  $O_2$  / 80%  $N_2$ ) bei 37 °C mit einer EKG- und atmungsgetriggerten FLASH-Sequenz unter Verwendung folgender Parameter durchgeführt: Repetitionszeit = 5 ms, Echozeit = 2.5 ms, Pulswinkel = 15°, Sichtfeld = 30x30 mm<sup>2</sup>, Matrixgröße = 128x128 (256x256 nach Zerofilling), Schichtdicke = 1 mm. Für die
Rekonstruktion des Herzvolumens wurden sechs bis acht Schichten senkrecht zur Längsachse des Herzens (Kurzachsenschnitte) vermessen, die nahtlos den gesamten linken Ventrikel erfassten. Für jede Schicht wurden über den gesamten Herzzyklus 15-20 Bilder im Abstand der oben angegebenen Repetitionszeit angefertigt. Bei dieser hohen zeitlichen Auflösung konnten die endokardialen Flächen in der enddiastolischen und endsystolischen Phase genau bestimmt werden. Aus ihnen wurde das Volumen des Herzens zu beiden Zeitpunkten durch Multiplikation mit der Schichtdicke und Summation über alle Schichten berechnet. Aus diesen Volumina erhält man durch Differenzbildung das Schlagvolumen, aus dem sich durch Multiplikation mit der Herzfrequenz das Herzzeitvolumen berechnen lässt. Die Ejektionsfraktion ist definiert als (Schlagvolumen/enddiastolisches Volumen) x 100%. Durch Ausmessen der epikardialen Fläche ließ sich zusätzlich das Gesamtvolumen des linken Ventrikels ermitteln, aus dem sich nach Subtraktion des endokardialen Volumens die linksventrikuläre Masse bestimmen lässt.

Diese Messungen wurden von Herrn Dr. Chr. Jacoby aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. J. Schrader am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

# 2.14. 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ermöglicht es, einen großen Teil des Proteoms zeitgleich zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Methode werden Proteine zuerst nach ihrem pH-Wert und anschließend nach ihrer Größe getrennt. Dadurch entstehen einzelne Protein-Spots, hinter denen sich in der Regel ein einzelnes Protein verbirgt. Durch diese Technik ist es möglich, zwei oder mehrere Proteome miteinander zu vergleichen, um unterschiedlich regulierte Proteine zu erfassen. Die Gele wurden von Herrn Dr. M. Reinhartz aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. J. Schrader am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie in Düsseldorf hergestellt. Die Analyse erfolgte im eigenen Labor mit der Software PD Quest (BioRad).

# 2.15. Statistik

Alle Messdaten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels t-Test überprüft, multiple Vergleiche mittels ANOVA mit anschließendem Bonferroni's-Test gezogen. Unterschiede von p < 0,05 wurden als signifikant gewertet.

# 3. Ergebnisse

# 3.1. Transgenes Mausmodell

Hauptaufgabe dieser Arbeit war zunächst die Etablierung transgener Mauslinien, die den EP<sub>3</sub>-Rezeptor kardiospezifisch überexprimieren. Dafür wurde die F0-Generation mit Hilfe von PCR und Southernblot charakterisiert. Wie in Abb. 3.1 dargestellt, zeigten die Tiere mit den Nummern 1, 4, 5 und 11 eine spezifische Bande für den EP<sub>3</sub>-Rezeptor. Über die Kopienzahl des Gens kann anhand der Intensität der Bande keine Aussage gemacht werden, da die eingesetzte DNA nicht quantifiziert worden ist. Die Tiere wurden mit C57Bl/6 Mäusen weiter verpaart und ihre Nachkommen ab der F3-Generation untersucht. Das Tier Nummer 4 erzeugte keinen Nachwuchs. Nachkommen des "founder"-Tiers 1 zeigten nur eine marginal erhöhte Rezeptorbindung, daher erfolgte keine weitere Untersuchung. Für den Nachwuchs der Tiere der Linien 5 und 11 konnte eine deutliche Überexpression des Rezeptors gezeigt werden, so dass diese im Folgenden verwendet wurden.



# Abb. 3.1:

Southernblot zur Genotypisierung der Mäuse. Die oberen Banden kennzeichnen den endogenen  $\alpha$ -MHC-Promotor, während die untere Bande das  $\alpha$ -MHC/EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Konstrukt nach EcoRI-Verdau angibt.

### 3.1.1. Gewebespezifische Expression des EP<sub>3</sub>-Rezeptors

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die herzspezifische Expression des Rezeptors überprüft (s. Abb. 3.2). Ein spezifisches RT-PCR-Fragment (559 bp) für den Rezeptor zeigte sich im Herzen, aber nicht im Skelettmuskel. Geringe Signale konnten lediglich noch in Arterien- und Lungengewebe beobachtet werden, vermutlich als Folge residualer Promotoraktivität in pulmonalen Gefäßen. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich für die Linie 5.



### Abb. 3.2:

Transgen-Expression in verschiedenen ausgewählten Geweben (RT-PCR), hier am Beispiel der Linie 11. GAPDH wurde in allen Proben koamplifiziert.

### 3.1.2. Rezeptorexpression auf Proteinebene

In Abb. 3.3 sind die Ergebnisse der Ligandenbindungsstudie dargestellt. In beiden Linien wurde eine ca. 50-fach erhöhte Rezeptordichte in den transgenen (tg) Herzen im Vergleich zum Wildtyp (wt) gemessen. Für die Linien 5+11 ergaben sich signifikant größere Werte mit einer Rezeptordichte ( $B_{max}$ ) von 3059±956 fmol/mg Protein und 2898±776 fmol/mg Protein im tg Herz im Vergleich zum wt ( $B_{max}$ =59±14 fmol/mg Protein). Die Bindungsaffinitäten (Kd) unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Linie 11: (tg) 32±5 nmol/l; Linie 5: (tg) 28±5 nmol/l vs. wt: 20±4 nmol/l).



### **Abb. 3.3**:

Rezeptordichte und Affinität an isolierten Herzmembranen von wt und tg Tieren. Als Tracer wurde  $[^{3}H]PGE_{1}$  eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von n = 4-5 Herzen.

## 3.1.3. Herz-Körpergewichts-Ratio

Die Herz-Körpergewichts-Ratio der Tiere der Linie 11 war bei wt und tg Geschwistertieren vergleichbar ( $5,4\pm0,2$  wt, n = 9 vs.  $5,2\pm0,4$  tg, n = 14, p>0,05).

Die tg Mäuse der Linie 5 hingegen zeigten eine signifikante Erhöhung des Quotienten (s. Abb. 3.4). Dieses war ein erster Befund dafür, dass die Linie 5 einen hypertrophen Phänotyp zeigt. Sie wird daher im Folgenden als Hypertrophie-Linie bezeichnet. Die Linie 11, welche als Modell für die Ischämie-Protektion dient, wird (auch aufgrund der folgenden Befunde) als Kardioprotektions-Linie bezeichnet.



## Abb. 3.4:

Herz-Körpergewichts-Ratio von wt und tg Mäusen im Alter von 2-3 Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 8-14 Tieren, \* p<0,05.

#### 3.1.4. Magnet-Resonanz-Imaging (MRI)

Zur weiteren Charakterisierung der Herzfunktion wurden Magnet-Resonanz-Messungen der Herzen durchgeführt. Die Kardioprotektions-Linie (11) zeigte ein um 56% erhöhtes endsystolisches Volumen der tg Herzen im Vergleich zum Herz der wt Maus. Das enddiastolische Volumen war ebenfalls größer, jedoch nicht signifikant. Hieraus resultierte eine Erniedrigung der Ejektionsfraktion der tg Herzen um 17%. Das aus Ventrikeldimension und Herzfrequenz ermittelte Herz-Zeit-Volumen blieb unverändert (s. Tabelle 3.1).

#### Tabelle 3.1:

Herzfrequenz (HF), enddiastolisches und –systolisches Volumen (EDV, ESV), Schlagvolumen (SV), Ejektionsfraktion (EF) und Herzzeitvolumen (HZV) von tg und wt Mäusen der Kardioprotektions-Linie (11)

Genotyp (n)	HF [min <sup>-1</sup> ] EDV [µl]		ESV [µl]	SV [µl]	EF [%]	HZV
						[ml/min]
tg (4)	488±18	84±4	36±2	48±2	57±2	23±1
wt (4)	498±14	73±4	23±3	50±4	69±4	25±3
	n.s.	n.s.	p<0,05	n.s.	p<0,05	n.s.

Die Hypertrophie-Linie (5) zeigte im Gegensatz zur Kardioprotektions-Linie (11) pathologische Veränderungen der Herzfunktion. So wurde eine massive, signifikante Vergrößerung des enddiastolischen (EDV) und des endsystolischen Volumens (ESV) der tg Herzen gemessen (s. Abb. 3.6). Das Schlagvolumen (EDV-ESV) unterschied sich nicht signifikant. Für die berechnete Größe der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF=SV/EDV) wurde eine Reduktion um circa die Hälfte festgestellt. Die EF im wt ist mit einem Wert von  $82\pm1$  % signifikant größer als der für die tg Herzen ermittelte (40±3 %, p<0,001). Die Messung der Herzfrequenz (HF) *in vivo* ergab eine moderate, aber dennoch signifikante Erniedrigung der Frequenz im tg (533±16 vs. 476±14 tg, p< 0,05). Die hieraus abgeleitete Größe, das Herzzeitvolumen (SV x HF), war in beiden Gruppen vergleichbar (s. Abb. 3.5). Somit kann man von einer exzentrischen Hypertrophie in dieser Maus-Linie (5) ausgehen.



# Abb. 3.5:

Magnetresonanz-Messungen der Mausherzen der Hypertrophie-Linie (5) von 5-7 Wochen alten Tieren. EDV: enddiastolisches Volumen, ESV: endsystolisches Volumen, HZV: Herzzeitvolumen; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 7 Tieren.



Enddiastolisch

Endsystolisch

# Abb. 3.6:

Magnetresonanzbilder von wt und tg Herzen der Hypertrophie-Linie (5) in der transversalen Ebene. Dargestellt sind die Herzen in enddiastolischen und endsystolischen Zustand.

## 3.1.5. Zellgröße

Da eine Hypertrophie durch eine vermehrte Proteinexpression und somit eine Zunahme in der Zellgröße gekennzeichnet ist, wurden die isolierten Kardiomyozyten der Hypertrophie-Linie in ihrer Fläche vermessen. Die tg Zellen haben mit 909 $\pm$ 26 µm<sup>2</sup> eine signifikant größere Fläche als die wt Zellen (773 $\pm$ 22 µm<sup>2</sup>)(s. Abb. 3.7).



#### Abb. 3.7:

Zellgröße der isolierten Kardiomyozyten der Hypertrophie-Linie (5). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 3 Tieren, \* p<0,05.

# 3.2. Mortalität

Zur Erfassung einer eventuell erhöhten Mortalität sind alle Tiere herangezogen worden, die bereits in der Haltung vor dem geplanten Versuchsdatum verstorben waren. Diese Tiere waren bereits genetisch charakterisiert und konnten somit gut zugeordnet werden. Hierbei stellte sich heraus, dass die tg Tiere der Hypertrophie-Linie deutlich häufiger verstarben, als ihre wt Geschwister (25% tg vs. 5,5% wt). Für die spontan verstorbenen tg Tiere ergab sich ein durchschnittliches Alter von 5 Monaten. Nach Angaben der Tierärztin Frau Dr. med. vet. B. Peter der Tierversuchsanlage Düsseldorf verstarben die tg Tiere in der Regel an Lungenödemen. Ein geschlechtspezifischer Unterschied in der Sterblichkeit ist unter normalen Bedingungen nicht festzustellen, wohl aber in der Zucht. Hier war eine erhöhte Mortalität der schwangeren Weibchen zu verzeichnen. Für die Kardioprotektions-Linie konnte keine erhöhte Sterblichkeit festgestellt werden.

# 3.3. Funktionalität des Rezeptors

#### 3.3.1. Adenylatzyklase-Aktivität in isolierten Kardiomyozyten

Zur Überprüfung der funktionellen Kopplung des Rezeptors wurde in isolierten Kardiomyozyten die Bildung von cAMP nach Stimulation der Adenylatzyklase (AC) mit Forskolin 10  $\mu$ M in An- und Abwesenheit des EP<sub>3</sub>-spezifischen Agonisten M&B 28.767 gemessen.

In den aus wt Mäusen gewonnenen Zellen der Kardioprotektions-Linie (11) wurde erwartungsgemäß ein Anstieg des cAMP-Gehaltes nach Stimulation mit Forskolin gemessen: von  $9\pm3$  auf  $380\pm36$  pmol/mg Protein. In den transgenen Zellen dieser Linie wurde hingegen signifikant weniger cAMP gemessen (136\pm66 pmol/mg Protein, p<0,01). Der EP<sub>3</sub>-Agonist M&B hatte keinen Einfluss auf den basalen cAMP-Spiegel in Abwesenheit von Forskolin. Bei der Kombination von Forskolin und M&B ergab das gleiche Bild wie bei alleiniger Stimulation mit Forskolin (s. Abb. 3.8).



#### Abb. 3.8:

cAMP-Bildung in isolierten Kardiomyozyten von tg und wt Tieren der Kardioprotektions-Linie (11) nach Stimulation mit Forskolin (Forsk) [10  $\mu$ M] und/oder mit dem EP<sub>3</sub>-Agonisten M&B 28.767 (M&B) [100 nM], Kon.: Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von n = 4 Tieren, \* p<0,01.

In isolierten Kardiomyozyten der Hypertrophie-Linie kam es durch die Zugabe von Forskolin ebenfalls zu einem Anstieg des cAMP-Gehaltes in den wt Zellen (s. Abb. 3.9). In den tg Zellen war der Effekt von Forskolin auch in dieser Linie signifikant geringer (wt: 487±138 pmol/mg vs. tg: 102±27 pmol/mg, p<0,001). Die Applikation des EP<sub>3</sub>-Agonisten M&B hatte keinen zusätzlichen Einfluss auf die cAMP-Bildung. Unter M&B kam es durch Forskolin in den wt Zellen zu einem cAMP- Anstieg (462±103 pmol/mg), während in den tg Myozyten der Anstieg signifikant geringer war (114±13 pmol/mg).



## Abb. 3.9:

cAMP-Gehalt in isolierten Kardiomyozyten von wt und tg Mäusen der Hypertrophie-Linie nach Stimulation mit Forskolin (10  $\mu$ M) und/oder M&B (100 nM), Kon: Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von n = 4 unabhängigen Experimenten., \* p<0,001

## 3.3.2. Inhibition von G<sub>i</sub> durch Pertussistoxin (PTX)

Die Abnahme der Adenylatzyklase-Aktivität unter M&B lässt eine konstitutive Rezeptoraktivität vermuten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde im Folgeexperiment PTX verwendet, um die G<sub>i</sub>-Signaltransduktion zu inhibieren und so die Forskolin-induzierte cAMP-Bildung in den tg Herzen wieder herzustellen. Nach einer Vorinkubation der Myozyten mit PTX, was einer irreversiblen ADP-Ribosylierung entspricht, wurden die transgenen Zellen der Kardioprotektions-Linie mit Forskolin behandelt, wodurch es wieder zu einer vermehrten cAMP-Bildung (148±42 pmol/mg Protein), im Vergleich zu Forskolin ohne PTX (51±4 pmol/mg Protein), kam. Dieses Ergebnis weist auf einen konstitutiv aktiven Rezeptor hin.

Das gleiche Experiment ist auch mit Kardiomyozyten der Hypertrophie-Linie durchgeführt worden. PTX (2  $\mu$ g/ml, 4 h) allein hatte keinen Einfluss auf die cAMP-Bildung (Kontrolle: 8±1 pmol/mg vs. PTX: 9±2 pmol/mg, p>0,05). Durch die Vorinkubation mit PTX kam es in den tg Zellen nach Forskolin-Stimulation zu einem deutlichen Anstieg im cAMP-Gehalt

(484 $\pm$ 146 pmol/mg), der bei der alleinigen Anwendung von Forskolin nicht auftrat (268 $\pm$ 83 pmol/mg, p<0,05)(s. Abb. 3.10). Diese Daten lassen darauf schließen, dass es sich in der Hypertrophie-Linie ebenfalls um einen konstitutiv aktiven EP<sub>3</sub>-Rezeptor handelt.



# Abb. 3.10:

cAMP-Anstieg in tg Zellen der Hypertrophie-Linie nach Forskolin-Stimulation (10  $\mu$ M) mit und ohne PTX-Vorbehandlung (2  $\mu$ g/ml, 4 h) von n = 4 unabhängigen Versuchen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

# 3.4. Isoliert perfundierte Herzen

Die Versuche an isoliert perfundierten Herzen sollten basale Funktionalität und Ischämie/Reperfusions-Effekte klären. In Tabelle 3.2 sind kontraktile Funktionen und die Enzymfreisetzung unter Basal-Bedingungen für die Kardioprotektions-Linie dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen wt und tg für  $\Delta$ LVP, LVEDP, +dP/dt<sub>max</sub>, -dP/dt<sub>max</sub> und Koronarperfusion gemessen.

# Tabelle 3.2:

Basalfunktionen und Enzymfreisetzung der wt und tg Herzen vor Ischämie der Kardioprotektions-Linie (11)

	∆LVP (mmHg)	+dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	-dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	Koronar- perfusion (ml/min)	CK (U/min*g)	LDH (U/min*g)	LVEDP (mmHg)
wt	99 ± 7	3676 ± 311	3044 ± 277	1,9 ± 0,1	$0,129 \pm 0.05$	0,08 ± 0,03	3,1 ± 1,0
tg	99 ± 7	3306 ± 229	2867 ± 239	2,0 ± 0,1	0,.091 ± 0.02	0,06 ± 0,03	$3,0 \pm 0,4$

 $\Delta$ LVP: Linksventrikulärer Druck, +dP/dt<sub>max</sub>: max. Kontraktionsgeschwindigkeit, -dP/dt<sub>max</sub>: max. Relaxationsgeschwindigkeit, CK: Kreatinkinase, LDH: Lactatdehydrogenase, wt: Wildtyp, tg: transgen; n = 6-8 pro Gruppe.

Analog zur Kardioprotektions-Linie wurden auch die Tiere der Hypertrophie-Linie im Langendorff-Modell näher charakterisiert. In Tabelle 3.3 ist die Herzfunktion unter nicht ischämischen Bedingungen dargestellt. Die Werte beider Genotypen unterschieden sich nicht signifikant, obwohl ein Trend bestand, dass die tg Herzen in ihrer Funktion eingeschränkt sind.

# Tabelle 3.3:

Basalfunktionen und Enzymfreisetzung der wt und tg Herzen vor Ischämie der Hypertrophie-Linie (5)

	∆LVP +dP/dt <sub>max</sub> (mmHg) (mmHg/s)		-dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	Koronar- perfusion (ml/min)	CK (U/min*g)	LVEDP (mmHg)	
wt	89 ± 9	3593 ± 362	-2789 ± 348	$2,6 \pm 0,3$	0,13 ± 0,02	1,9 ± 1,0	
tg	76 ± 13	2486 ± 351	-1894 ± 244	$2,3\pm0,4$	0,04 ± 0,01	$2,0 \pm 0,4$	

n = 5-7 pro Gruppe

### 3.4.1. Beta-adrenerge Stimulation

Der G<sub>i</sub>-gekoppelte EP<sub>3</sub>-Rezeptor hat, wie oben gezeigt, einen inhibitorischen Effekt auf die cAMP-vermittelte Signaltransduktion. Um cAMP-mediierte inotrope Mechanismen zu überprüfen, wurden die Herzen mit einem  $\beta$ -adrenergen Agonisten behandelt. Die Versuche der Kardioprotektions-Linie mit dem beta-adrenergen Stimulus Isoprenalin ergaben einen konzentrationsabhängigen Anstieg des  $\Delta$ LVP, der in den wt Herzen ein Maximum von 159±5 mmHg erreichte. Das Maximum der Stimulation lag mit einem Wert von 127±22 mmHg in den tg Herzen deutlich darunter. Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Kontraktilität (+dP/dt<sub>max</sub>) und die Relaxationsgeschwindigkeit (-dP/dt<sub>max</sub>): auch hier lagen die Werte der transgenen Tiere bei maximaler Stimulation unterhalb derer der wt Tiere (s. Tabellen 3.4 und 3.5).

Für die Koronarperfusion zeigte sich in beiden Gruppen der zu erwartende Anstieg bzw. eine Gefäßdilatation bei Zunahme der Konzentration des beta-adrenergen Agonisten. In beiden Genotypen stieg die Perfusionsrate von ca. 2 ml/min bei  $10^{-10}$  M Isoprenalin auf ca. 3 ml/min bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M an. Statistische Unterschiede ergaben sich im  $\Delta$ LVP bei einer Konzentration von  $10^{-8.5}$  M. Hier lag der Wert im wt Herz mit  $115\pm41$  mmHg signifikant über dem tg Herzen mit  $53\pm10$  mmHg. Auch für –dP/dt<sub>max</sub> unterschieden sich wt und tg Herzen bei einer Konzentration von  $10^{-8.0}$  M signifikant voneinander. Die beobachtete Zunahme des  $\Delta$ LVP und der Relaxationsgeschwindigkeit scheint somit im tg Herz vermindert zu sein. Offenbar interferiert der EP<sub>3</sub>-Subtyp via Kopplung an G<sub>i</sub> mit cAMP-abhängigen inotropen Mechanismen.

## Tabelle 3.4:

lsoprenalin log[M]	ΔLVP	+dP/dt <sub>max</sub>	-dP/dt <sub>max</sub>	Koronar- perfusion	
0,0	67±3	2413±79	-1813±50	1,8±0,2	
-8,5	115±41	4659±1823	-3413±1345	$2,5 \pm 0,7$	
-8,0	149±19	7147 ± 600	-5747 ± 501	$2,9 \pm 0,5$	
-7,5	182±8	9693 ± 458	$-6840 \pm 267$	$2,8 \pm 0,4$	
-7,0	165±5	9277 ± 647	$-7200 \pm 250$	$3,2 \pm 0,4$	
-6,0	159±5	9180 ± 496	-7257 ± 291	3,1±0,3	

Herzfunktion nach Isoprenalin-Stimulation in isoliert perfundierten wt Herzen der Kardioprotektions-Linie

 $\Delta$ LVP: Linksventrikulärer Druck, +dP/dt<sub>max</sub>: Kontraktilität, -dP/dt<sub>max</sub>: Relaxations-geschwindigkeit, dargestellt ist der Mittelwert ± SEM, n = 3.

lsoprenalin log[M]	ΔLVP	+dP/dt <sub>max</sub>	-dP/dt <sub>max</sub>	Koronar- perfusion	
0,0	54±8	1803±311	-1423 ± 267	2,1±0,1	
-8,5	53±10	1923 ± 448	-1405 ± 339	2,1 ± 0,1	
-8,0	101 ± 11	$4613 \pm 512$	-3193 ± 99	$3,0 \pm 0,2$	
-7,5	132±12	$6868 \pm 550$	-4765 ± 280	$3,2 \pm 0,2$	
-7,0	$140 \pm 6$	7753 ± 449	-5313±425	$3,3 \pm 0,4$	
-6,0	127 ± 22	7140±1120	-5143 ± 1065	$3,3 \pm 0,4$	

#### Tabelle 3.5:

Herzfunktion nach Isoprenalin-Stimulation in isoliert perfundierten tg Herzen der Kardioprotektions-Linie

n = 4 pro Gruppe.

Auch die Herzen der Hypertrophie-Linie wurden im Langendorff-Modell mit steigenden Isoprenalin (Iso)-Konzentrationen  $(10^{-9} \text{ bis } 10^{-7} \text{ M})$  perfundiert. In der wt Gruppe fand sich auch hier die zu erwartende Zunahme des  $\Delta$ LVP bei steigender Iso-Konzentration (von 90±3 mmHg bei 10<sup>-9</sup> M Iso auf 191±5 mmHg, 10<sup>-7</sup> M Iso). Für die Herzen der tg Tiere konnte ebenfalls ein Anstieg des  $\Delta$ LVP mit Zunahme der beta-adrenergen Stimulation gemessen werden. Bei einer Konzentration von 10<sup>-7</sup> M Iso lag dieser Wert bei 74±7 mmHg, der Unterschied zum wt war nicht signifikant. In den tg Herzen erfolgte die Antwort auf Iso verzögert. Bei den Konzentrationen 10<sup>-8,3</sup> und 10<sup>-8</sup> M wurde ein signifikant geringerer  $\Delta$ LVP im tg Herzen gemessen (s. Abb. 3.11). Die Maximalantwort bei 10<sup>-7</sup> M war mit 191±5 mmHg im wt und 169±2 mmHg im tg zwar geringer, aber nicht signifikant.

Das gleiche Bild zeigte sich für die Kontraktilität (s. Abb. 3.11). Auch hier unterschieden sich wt und tg bei der niedrigen Konzentration nicht signifikant. Andere Ergebnisse zeigten sich bei höheren Konzentrationen. Bei 10<sup>-8,3</sup> M zeigten die wt Herzen eine Kontraktilität von 6963±800 mmHg/s, während die tg Herzen nur einen Wert von 3630±563 mmHg/s, p<0,01, erreichten. Bei 10<sup>-8</sup> M wurde ein signifikant geringerer Wert für +dP/dt<sub>max</sub> gemessen. In beiden Gruppen ist der höchste Wert bei 10<sup>-7</sup> M erreicht worden. Mit 11500±1216 mmHg/s zeigten die tg Herzen eine niedrigere Kontraktiliät als die wt Herzen (13670±741 mmHg/s), dieser Unterschied erreichte nicht das Signifikanzniveau. Für die Relaxationsgeschwindigkeit ließen sich vergleichbare Befunde ermitteln (Daten nicht gezeigt).



#### Abb. 3.11:

 $\Delta$ LVP und +dP/dt<sub>max</sub> bei steigender beta-adrenerger Stimulation (Isoprenalin) von isoliert perfundierten Herzen der Hypertrophie-Linie im Vergleich zum wt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von n = 3, \*p<0,01 wt vs. tg.

#### 3.4.2. Ischämieprotektion in vitro

Zentraler Aspekt der Arbeit war die Klärung der Ischämieprotektion des EP<sub>3</sub>-Rezeptors (siehe Einleitung). Somit wurden die Herzen der Kardioprotektions-Linie dem folgenden Protokoll unterzogen: Nach einer Einschlagphase von 20 min ist eine komplette Ischämie für 60 min erzeugt worden. Während dieser Phase fielen  $\Delta$ LVP, +dP/dt<sub>max</sub>, -dP/dt<sub>max</sub> und die Koronarperfusion in beiden Genotypen auf Null. Während des Verlaufs der Ischämie war ein Anstieg des LVEDP messbar (ischämische Kontraktur). In den wt Herzen kam es bereits nach 20 min zur Entwicklung einer ischämischen Kontraktur. Nach 30 min wurde ein LVEDP von 42±4 mmHg gemessen. Dieser Wert blieb bis zur Reperfusion nahezu konstant (s. Abb. 3.12 E). Auch in den tg Herzen war ein Anstieg des LVEDP, jedoch zu einem späteren Zeitpunkt und in einem signifikant geringeren Ausmaß, festzustellen. So betrug der linksventrikuläre Druck nach 30 min Ischämie nur 8,5±4,0 mmHg. Ein Maximum wurde in den tg Herzen erst nach 60 min erreicht und war mit 17,5±4,0 mmHg signifikant niedriger als in der wt Gruppe.

Mit Beginn der Reperfusion stieg der  $\Delta$ LVP wieder an. Nach 5 min wurde eine Druckentwicklung von 51±13 mmHg im wt vs. 59±14 mmHg im tg Herz gemessen. Über eine Zeitraum von 45 min war ein Anstieg des  $\Delta$ LVP auf ca. 70 mmHg messbar, wobei zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied bestand. Ein vergleichbarer Verlauf ergab sich für  $+dP/dt_{max}$  und  $-dP/dt_{max}$ . Auch hier bestand kein signifikanter Unterschied zwischen wt und tg Herzen (Abb. 3.12 B).

Als Marker für das Ausmaß der Zellschädigung ist die Freisetzung von Kreatinkinase (CK) in das Effluat bestimmt worden. Basal, also vor Beginn der Ischämie, wurden sehr niedrige Aktivitäten von CK im Effluat gemessen und zwar bei beiden Genotypen. Während der Reperfusion zeigte sich bereits nach 5 min ein signifikanter Unterschied in der CK-Freisetzung zwischen wt und tg. Während der Gehalt an CK im Effluat in der wt Gruppe zu diesem Zeitpunkt bereits 2,0 $\pm$ 0,3 U/min x g betrug und nach 15 min ein Maximum von 2,7 $\pm$ 0,3 U/min x g erreichte, war in der tg Gruppe der Höchstwert der CK-Aktivität bereits nach 5 min erreicht und mit 0,6 $\pm$ 0,1 U/min x g signifikant geringer. Auch im Verlauf der Reperfusion wurde von wt und tg Herzen weniger CK freigesetzt. Beide erreichten zum Versuchsende allerdings wieder nahezu den Wert vor Ischämie (s. Abb. 3.12 F).

Als weiterer Parameter der Zellschädigung wurde die Menge an Lactatdehydrogenase (LDH) im Effluat gemessen. Die Befunde entsprachen den CK-Aktivitäten. Vor Ischämie bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Während der Reperfusion lagen die Werte der tg Herzen deutlich unterhalb der wt Werte (s. Abb. 3.12 D).

Das lässt die Folgerung zu, dass eine Überexpression des EP<sub>3</sub>-Rezeptors in dieser Mauslinie den Ischämie-induzierten Myokard-Schaden deutlich reduziert. Eine Beteiligung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors an der Vermittlung anti-ischämischer PG-Effekte wird dadurch nahegelegt.



### Abb. 3.12:

Herzfunktion und Enzymfreisetzung im Ischämie/Reperfusions-Experiment von wt und tg Herzen der Kardioprotektions-Linie (A)  $\Delta$ LVP, (B) Kontraktilität, (C) Koronarperfusion (D) LDH, (F) CK im Effluat und (E) LVEDP. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. (wt:  $\blacksquare$  n = 8, tg:  $\Delta$  n = 6, LDH-Messung n = 4, 0: vor Ischämie, \* p<0,05).

Bei den Herzen der Hypertrophie-Linie ergaben sich ähnliche Befunde. Über die Zeit der Ischämie stieg der Ventrikeldruck der wt Herzen stark an, während im Vergleich dazu die tg Herzen eine signifikant geringere ischämische Kontraktur entwickelten (s. Abb 3.13 B). In der Phase der Reperfusion sank der Druck im wt Herzen wieder ab und näherte sich dem tg Wert an, so dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen mehr bestand. In der Reperfusion zeigten sich gravierende Differenzen zwischen den beiden Gruppen, sowohl für den  $\Delta$ LVP, +dP/dt<sub>max</sub> und –dP/dt<sub>max</sub>. Diese Parameter sind nach der Ischämie im tg Herzen stark reduziert. Für den  $\Delta$ LVP erreichten diese Unterschiede keine Signifikanz, wohl aber für die Kontraktilität und Relaxationsgeschwindigkeit für die Zeitpunkte 85, 95 und 105 min der Reperfusion (Tabelle 3.4). Auch in den Herzen der Linie 5 vermittelt die Überexpression der EP<sub>3</sub>-Rezeptors einen anti-ischämischen Effekt.



#### Abb. 3.13:

(A) CK im Effluat und (B) LVEDP gemessen im Langendorff-Modell von wt ( $\blacksquare$ , n = 7) und tg ( $\Delta$ , n = 5) Herzen der Hypertrophie-Linie. Die ,0' kennzeichnet den Zeitpunkt vor der Ischämie. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, \*p<0,05.

**Tabelle 3.4:** Herzfunktion von wt (n = 7) und tg (n = 5) Herzen der Hypertrophie-Linie im Langendorff-Modell

	LVP [mmHg]			+dP/dt <sub>max</sub>			-dP/dt <sub>max</sub>			
Zeit [min]	wt	tg		wt	tg		wt		tg	
0	89 ± 9	76 ± 13	ns	3593 ± 362	2486 ± 351	ns	-2789 ±348	-1894	± 244	ns
65	49 ± 14	73 ± 12	ns	2064 ± 641	2384 ± 340	ns	-1113 ± 322	-1590	± 217	ns
75	62 ± 9	45 ± 3	ns	3007 ± 486	1616 ± 105	ns	-1890 ±337	-1246	± 61	ns
85	74 ± 6	47 ± 3	ns	3690 ± 315	1764 ± 116	*	-2400 ± 223	-1332	± 64	*
95	74 ± 5	45 ± 2	ns	3766 ± 251	1704 ± 109	*	-2530 ± 167	-1244	± 59	**
105	71 ± 4	45 ± 3	ns	3661 ± 224	1706 ± 117	*	-2451 ± 168	-1240	± 70	**

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, ns: nicht signifikant wt vs. tg, \*p<0,05 wt vs. tg, \*\*p<0,01 wt vs. tg.

### 3.4.3. Wirkung von PGE<sub>1</sub> im Ischämie-Modell

Als Modell für die Ischämieprotektion fiel die Wahl auf die Kardioprotektions-Linie, da die pathologischen Veränderungen (wie unter 3.1.4 Magnet-Resonanz-Imaging beschrieben) deutlich geringer ausfielen. Das Ischämie/Reperfusions-Protokoll wurde auch in Anwesenheit von PGE<sub>1</sub>, einem Agonisten für EP und IP-Rezeptoren, durchgeführt. Zum Zeitpunkt dieser Versuche war eine konstitutive Aktivität des Rezeptors noch nicht bekannt. PGE<sub>1</sub> zeigte schon vor Beginn der Ischämie einen deutlichen Unterschied zu den Versuchen ohne Substanzapplikation. In beiden Gruppen (wt, tg) wurde durch die Substanz die Kontraktilität und die koronare Perfusion deutlich erhöht. Zu Beginn des Versuchsprotokolls war +dP/dt<sub>max</sub> im tg Herz mit 5596±437 mmHg/sec mit PGE1 signifikant größer als ohne diese Substanz (3307±229 mmHg/sec, p<0,001). Im wt Herz steigerte PGE<sub>1</sub> ebenfalls die Kontraktiliät von 3676±311 auf 4417±267 mmHg/sec, dieser Unterschied erreichte allerdings keine Signifikanz. Am deutlichsten fiel die Veränderung durch die Substanzapplikation bei der Koronarperfusion aus. Durch PGE<sub>1</sub> stieg die Flussrate vor Ischämie im wt Herz von 1,9±0,1 auf  $3,8\pm0,2$  ml/min (+PGE<sub>1</sub>), p<0,001; im tg Herzen von  $2,1\pm0,1$  auf  $3,6\pm0,3$  ml/min (+PGE<sub>1</sub>), p<0,001. Auch die Abnahme des Koronarwiderstandes zu Beginn der Reperfusion war unter PGE1 nicht erkennbar, da unter PGE1 die Koronarien schon fast maximal dilatiert waren.

Der Vergleich zwischen wt und tg in Gegenwart von  $PGE_1$  zeigte für  $\Delta LVP$ , Kontraktilität und Koronarperfusion keine signifikanten Unterschiede. In Abb. 3.14 F ist der Verlauf des LVEDP dargestellt. In den wt Herzen stieg der LVEDP bereits nach 20 min auf einen Wert von 25,7±8,0 mmHg. Die diastolische Kontraktur der tg Herzen erfolgte verzögert, hier wurde erst nach 30 min ein Druck von 26,0±4 mmHg erreicht. Ab diesem Zeitpunkt unterschieden sich die beiden Gruppen nicht mehr signifikant voneinander. Erst zu Beginn der Reperfusion - zum Zeitpunkt 65 min – ergab sich für die wt Herzen ein LVEDP der signifikant über dem der tg Herzen (26,2±4 vs. 12,3±4 mmHg) lag. Danach lag der LVEDP der wt Herzen tendenziell über dem Wert der tg Herzen, die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

Für die enzymatischen Marker, wie CK und LDH, wurden dagegen in der Reperfusion signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt. Zu Beginn der Reperfusion (5 min) stiegen CK- und LDH-Freisetzung bei den wt Herzen deutlich an (CK: 2,8 $\pm$ 0,4 U/min x g, LDH: 1,2 $\pm$ 0,2 U/min x g). Im Gegensatz dazu waren diese Werte bei den tg Herzen signifikant geringer (CK: 0,9 $\pm$ 0,1 U/min x g, LDH: 0,4 $\pm$ 0,1 U/min x g). Während der Reperfusionsphase sanken in beiden Gruppen sowohl der CK- als auch der LDH-Gehalt im Effluat und näherten sich den Werten vor der Ischämie an.



# Abb. 3.14:

Herzfunktion und enzymatische Parameter des Ischämie/Reperfusions-Versuchs mit PGE<sub>1</sub> (100 nM) in der Kardioprotektions-Linie. (A)  $\Delta$ LVP, (B) Kontraktilität (C) Koronarperfusion, (D) CK und (E) LDH im Effluat, (F) LVEDP. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (wt: **■**, tg:  $\Delta$ ; n = 8 pro Gruppe, LDH: tg n = 7, wt n = 5, \*: p<0,05).

### 3.4.4. Wirkung von Talinolol

Die voraus gegangenen Ergebnisse ließen vermuten, dass der anti-ischämische Effekt einer  $EP_3$ -Rezeptor-Überexpression auf einer  $G_i$ -vermittelten Inhibition der cAMP-mediierten Signaltransduktion beruht. Falls zytotoxische Effekte endogener Katecholamine zur Ischämie-induzierten Schädigung beitragen, würde man einen ähnlichen Ischämie-protektiven Effekt auch bei einer Blockade  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren erwarten, da dadurch ebenfalls eine Interferenz mit dem  $G_s$ -vermittelten cAMP-Anstieg erzielt wird. Daher wurden Ischämie/Reperfusions-Versuche in Anwesenheit des  $\beta_1$ -selektiven Antagonisten Talinolol (Haustein *et al.*, 1979) durchgeführt.

Zu Beginn des Versuchsprotokolls, d.h. vor der Ischämie, fanden sich keine Unterschiede in den gemessenen funktionellen Parametern zwischen wt und tg Herzen. Während der Ischämie entwickelten die wt Herzen eine ischämische Kontraktur, deren Einsetzen von 10 min (Kontrolle, vgl. Abb. 3.12) auf 30 min durch den  $\beta$ -Antagonisten verschoben wurde (s. Abb. 3.15). Der nach 60 min erreichte Wert des Ventrikeldrucks in der Anwesenheit von Talinolol lag mit 24±8 mmHg deutlich niedriger als unter Kontrollbedingungen (40,0±3,6 mmHg). Auch in der Reperfusion blieb der reduzierte LVEDP unter Talinolol erhalten (s. Abb. 3.12). Die entsprechenden Werte für wt und tg waren in Gegenwart von Talinolol vergleichbar (s. Abb. 3.15 A). Nach 45 Minuten Reperfusion erreichte der LVEDP fast wieder das Ausgangsniveau.

Durch den  $\beta$ -adrenergen Antagonisten wurde die CK-Freisetzung im wt Herz reduziert. Signifikante Unterschiede zwischen wt und tg existierten nicht mehr (s. Abb. 3.15 B). Dies unterstützt die Hypothese, dass der anti-ischämische Effekt der EP<sub>3</sub>-transgenen Herzen über eine G<sub>i</sub>-vermittelte Inhibition der AC vermittelt wird.



#### Abb. 3.15:

(A) LVEDP im Effluat und (B) CK bei wt ( $\blacksquare$ , n = 4) und tg ( $\Delta$ , n = 4) isolierten Herzen unter der Anwesenheit von Talinolol (3 µM) im Perfusat. Das Protokoll umfasst eine Einschlagzeit von 20 min, eine Ischämie von 60 min (weißer Balken) und 45 min Reperfusion (grauer Balken). Zeitpunkt 0 beschreibt den Status direkt vor der Ischämie.

### 3.4.5. Wirkung von 5-Hydroxydecanoat (5-HD)

Eine möglichen Beteiligung mitochondrialer ATP-sensitiver K-Kanäle ( $K_{ATP}$ ) an der Ischämie-protektiven Wirkung kardialer EP<sub>3</sub>-Rezeptoren wurde mit einem Inhibitor dieses Kanals, 5-Hydroxydecanoat (5-HD), überprüft.

5-HD zeigte keinen erkennbaren Einfluss auf den Unterschied zwischen der wt und der tg Gruppe über den gesamten Zeitverlauf des Versuchsprotokolls, weder für den  $\Delta$ LVP noch für +dP/dt<sub>max</sub> (s. Abb. 3.16). Für den LVEDP und die CK-Aktivität blieben die Unterschiede zwischen den wt und tg Herzen erhalten. Das Maximum der CK-Freisetzung in das Effluat lag bei den wt Herzen bei 15 min, der Unterschied zum tg Herz blieb erhalten (wt:1,8±0,6 n = 6 vs. tg: 0,2±0,0 n = 6). Über den gesamten Versuchsverlauf lag der Ventrikeldruck der wt Herzen deutlich höher als dem der tg Herzen. In Abb. 3.17 A ist die Menge an CK im Effluat zum Zeitpunkt 15 min Reperfusion mit und ohne 5-HD dargestellt. Der direkte Vergleich zeigt deutlich, dass 5-HD keinen signifikanten Einfluss auf die Zellschädigung hat. Auch der LVEDP nach 60 min Ischämie wird durch 5-HD nicht beeinflusst, weder in der wt noch in der tg Gruppe (s. Abb. 3.17 B). Eine mögliche Beteiligung von mitochondrialen K<sub>ATP</sub> ist somit auszuschließen.



## Abb. 3.16:

(A)  $\Delta$ LVP, (B) Kontraktilität, (C) CK und (D) LVEDP von isoliert perfundierten Herzen in Anwesenheit von 5-HD (100  $\mu$ M). Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von n = 5-6 unabhängigen Versuchen, wt:  $\blacksquare$ , tg:  $\Delta$ .



## Abb. 3.17:

(A) CK-Gehalt nach 15 min Reperfusion und (B) LVEDP nach 60 min Ischämie in wt und tg Herzen der Kardioprotektions-Linie im Vergleich mit 5-HD und ohne Substanzzugabe. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 6-8 Tieren. n.s.: nicht signifikant.

# 3.5. Proteinexpression

Um mögliche Unterschiede in der Signaltransduktion zur Ischämieprotektion zwischen wt und tg Tieren zu charakterisieren, sind verschiedene Proteine aus bereits beschriebenen Signalwegen des EP<sub>3</sub>-Rezeptors untersucht worden. So wurde für die Glykogen-Synthase-Kinase (GSK)-3 $\beta$ , die Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase Akt (Akt) eine antiischämische Funktion und eine Beteiligung bei der ischämischen Präkonditionierung beschrieben (zusammengefasst in Armstrong, 2004). Da diese Experimente der weiteren Charakterisierung der anti-ischämischen Wirkung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors dienen sollten, wurden diese nur in der Kardioprotektions-Linie durchgeführt.

Die Abb. 3.18 zeigt das Ergebnis der Untersuchung des GSK-3 $\beta$ -Protein im Westernblot. Sowohl für die Gesamtmenge (Test auf gleichmäßige Proteinbeladung), als auch für die phosphorylierte Form des Proteins fand sich kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Des Weiteren wurden Antikörper gegen phosphorylierte PKC-Substrate und phosphorylierte Akt-Substrate getestet. In einem Vergleich ergaben sich teilweise große interindividuelle Intensitäts-Unterschiede für einzelne Banden. Ein über alle Individuen gemittelter Vergleich ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen wt und tg Tieren (s. Abb. 3.19). Eine Beteiligung dieser Signaltransduktionswege ist daher nicht wahrscheinlich.



## Abb. 3.18:

(links) Gesamtmenge und phosphoryliertes (p) GSK-3 $\beta$ -Protein im Westernblot von 3 Tieren pro Gruppe. Pro Spur wurden 10  $\mu$ g Protein aus Herzgewebe aufgetragen. (wt: Wildtyp, tg: transgen).

## 

## Abb. 3.19:

Phosphorylierte PKC-Substrate (links) und phosphorylierte Akt-Substrate (rechts) im Westernblot von 3 Tieren pro Gruppe. Pro Spur wurden 10  $\mu$ g Protein aus Herzgewebe der Kardioprotektions-Linie aufgetragen.

### 3.5.1. Proteomanalyse

Ziel der Untersuchung war es, Unterschiede des Proteoms der Kardioprotektions-Linie zwischen den wt und tg Herzen ohne Behandlung und nach Ischämie/Reperfusion zu charakterisieren.

Der Vergleich von wt und tg Herzen ohne Langendorff-Perfusion ergab nach computergestützter Analyse neun mögliche Kandidatenproteine. Nach einer optischen Analyse zeigte sich allerdings, dass diese Spots entweder in ihrer Intensität zu schwach waren oder in Bereichen des Gels lagen, die sehr starke Querstreifen hatten, so dass eine massenspektrometrische Untersuchung nicht möglich war. Hier zeigen sich leider die Nachteile der Methodik, insbesondere die der verwendeten BioRad-Software.

Die Gele der Herzen, welche einer Ischämie/Reperfusion mit Zugabe von PGE<sub>1</sub> unterzogen wurden, konnten ebenfalls sowohl optisch als auch mit Hilfe der Software ausgewertet werden. Durch den optischen Vergleich war für die untersuchten Herzen (n = 3) ein klar unterschiedlicher Spot erkennbar (s. Abb. 3.20). Dieser Spot wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert und als Peroxiredoxin 6 (Synonym: Antioxidant Protein 2, 1-Cys-Peroxiredoxin) charakterisiert. Anschließend erfolgte aufgrund dieses Befundes die Bestimmung des basalen mRNA-Gehalts an Prdx 6 im Herzen.



# Abb. 3.20:

Unterschiede von Peroxiredoxin 6 im Herzgewebe nach Ischämie/Reperfusions-Versuchen. Repräsentative 2D-Gele von n = 3 Herzen von tg und wt Mäusen der Kardioprotektions-Linie. roter Kreis: Peroxiredoxin 6.

# 3.5.2. Peroxiredoxin 6-mRNA im Herzen

Zunächst ist eine mögliche Regulation von Prdx 6 auf mRNA-Ebene untersucht worden. In den unbehandelten Herzen war die Expression von Prdx 6 individuell sehr unterschiedlich, und es fand sich kein Unterschied zwischen wt und tg Tieren der Kardioprotektions-Linie. Außerdem wurde die RNA aus Herzen nach dem IR-Versuchsprotokoll isoliert. In Abb. 3.21 ist deutlich zu erkennen, dass eine Bildung von Prdx 6 in den wt Tieren nicht mehr stattfand, wohl aber die Bildung von GAPDH, als Kontrolle und sogenanntes *,housekeeping'* Gen. In den tg Herzen konnte Prdx 6 nachgewiesen werden.



# Abb. 3.21:

RT-PCR für Prdx 6 in wt und in tg Herzen der Kardioprotektions-Linie unter basalen Bedingungen (oben) und nach Ischämie/Reperfusion (unten) von n = 3 unterschiedlichen Tieren. GAPDH wurde in allen Proben als interner Standard koamplifiziert.

Dieser Befund zeigt eine Regulation der Prdx 6-mRNA durch Ischämie/Reperfusion. Die vermehrte mRNA in den tg Herzen könnte auf eine erhöhte Proteinmenge und eine eventuell verstärkte Aktivität von Prdx 6 hinweisen. Vergleichbaren Untersuchungen in der Hypertrophie-Linie haben nicht stattgefunden. Nur die Kardioprotektions-Linie wurde als Modell zur Untersuchung der Ischämie-Protektion hinsichtlich dieses Mechanismus untersucht.

# 3.6. Genexpression von Hypertrophiemarkern im Herzgewebe

Zur weiteren Charakterisierung der Hypertrophie-Linie wurden ebenfalls Unterschiede in der Genexpression zwischen wt und tg Tieren untersucht. Mittels RT-PCR sind verschiedene Gene des Hypertrophie-assoziierten Genprogramms im Herzgewebe untersucht worden. Es zeigte sich eine Aufregulation des *atrial natriuretic factor* (ANF). Für  $\beta$ -*Myosin Heavy Chain* ( $\beta$ -MHC) und  $\alpha$ -Actin konnte keine Regulation nachgewiesen werden (s. Abb. 3.22).



# Abb. 3.22:

Genexpressionsniveau von ANF,  $\beta$ -MHC und  $\alpha$ -Actin im Herzgewebe von wt und tg Mäusen der Hypertrophie-Linie. Als Referenz wurde GAPDH koamplifiziert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n = 3 Tieren pro Gruppe mit ähnlichen Befunden.

# 3.7. Signaltransduktion des EP<sub>3</sub>-Rezeptors

Ein Ziel der Arbeit war es, Unterschiede in der Signaltransduktion zwischen wt und tg Herzen der Hypertrophie-Linie aufzudecken, um eine Information über die Vermittlung hypertropher Effekte durch den EP<sub>3</sub>-Rezeptor zu erhalten. Dies geschah mit Hilfe der Westernblot Analyse. Hierfür wurden Antikörper gegen Proteine gewählt, deren Beteiligung an der Hypertrophie bekannt ist. Anhand dieser Zielsetzung erklärt sich die ausschließliche Untersuchung der Hypertrophie-Linie. Aus unbehandelten Herzen wurden ebenfalls Proteine isoliert, im SDS-

Gel nach ihrer Größe aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Hierbei zeigte sich für die untersuchten Proteine (GSK-3 $\beta$ , p-PKA-Substrat, Calmodulin, HSP 27, p-PKC-Substrat) kein Unterschied im Expressionsniveau zwischen wt und tg Tieren. Exemplarisch dargestellt sind die Ergebnisse für HSP 27 und p-PKA-Substrat (s. Abb. 3.23).



## Abb. 3.23:

Westernblot mit Antikörper gegen (A) phopho-PKA-Substrate und (B) HSP27 von n = 5 verschiedenen wt und tg Herzen der Hypertrophie-Linie. Pro Spur wurden 10  $\mu$ g von Gesamt-Protein aus Herzgewebe aufgetragen.

Außerdem wurde die Beteiligung von Src-Tyrosinkinasen an der Hypertrophie untersucht. Src kann über das  $G_{\beta\gamma}$  Protein des G<sub>i</sub>-Proteins aktiviert werden. In Abb. 3.24 ist eine moderate, aber dennoch signifikante Erhöhung der Expression von c-Src in den tg Herzen zu erkennen. Eine Beteiligung dieser Proteinfamilie an der Hypertrophie erscheint somit möglich.



#### Abb. 3.24:

(oben) c-Src-Protein im Westernblot von n = 4 unterschiedlichen Herzen pro Gruppe der Hypertrophie-Linie; (unten) Relative Proteinexpression von c-Src bezogen auf wt. (\*p<0,05).

## 3.7.1. GATA-4

Für den Transkriptionsfaktor GATA-4 wird eine Beteiligung an der Hypertrophie beschrieben (siehe Einleitung). Mit Hilfe eines spezifischen Assays (siehe Material und Methoden) wurde die Menge an GATA-4 in Kernextrakten aus Herzgewebe bestimmt. In den tg Herzen konnte in den Zellkernen ein geringer, aber nicht signifikanter Anstieg dieses Transkriptionsfaktor gemessen werden (s. Abb. 3.25).



#### Abb. 3.25:

GATA-4 Aktivität in Kernextrakten aus Herzgewebe von wt und tg Tieren der Hypertrophie-Linie. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Herzen.

#### 3.7.2. Calcineurin-Aktivität

Die Regulierung vieler Hypertrophie-assoziierter Gene wird von der Phosphatase Calcineurin reguliert, welche den Transkriptionsfaktor NFAT dephosphoryliert (siehe Einleitung). Dieser wandert in den Kern ein und reguliert Hypertrophie-assoziierte Gene. Wie in Abb. 3.26 zu sehen ist, konnte eine vermehrte Calcineurin-Aktivität in den tg Herzen gemessen werden (wt:  $0.37 \pm 0.08$  vs. tg:  $0.71 \pm 0.09$  n = 5, p<0,05).



#### Abb. 3.26:

Calcineurin-Aktivität gemessen als Phosphatase-Aktivität im Herz der Hypertrophie-Linie. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Versuchen, \*p<0,05.

### **3.8.** Uberexpression des humanen EP<sub>3</sub>-Rezeptors in der Maus

Analog zur Kardioprotektions-Linie wurden Langendorff-Experimente mit Mausherzen durchgeführt, die den humanen EP<sub>3</sub>-Rezeptor als Transgen erhielten. Für diesen Rezeptorsubtyp ist im Gegensatz zum porcinen Rezeptor nur eine G<sub>i</sub>-Kopplung bekannt. Hiermit sollte überprüft werden, welches G-Protein für die anti-ischämische Wirkung von Bedeutung ist. Für den humanen EP<sub>3</sub>-Rezeptor ist nur eine Linie etabliert worden. Diese exprimiert den Rezeptor kardiospezifisch auf mRNA-Ebene. Die Rezeptordichte (B<sub>max</sub>) liegt in den tg Tieren (n = 3) bei 223±24 fmol/mg Protein bei einer Kd von 12±3 mmol/l. Die Herz-Körpergewichts-Ratio dieser Tiere ist unverändert.

#### 3.8.1. Ischämie/Reperfusion am isolierten Herzen

Zu Beginn des Versuchs, also vor Ischämie, unterschieden sich wt und tg Herzen in keinem der gemessenen Parameter (s. Abb. 3.27). Während der Reperfusion zeigte die tg Gruppe einen etwas höheren  $\Delta$ LVP und vermehrte Kontraktilität, was allerdings nur einen Trend

ausdrückt, da das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Die Relaxationsgeschwindigkeit verhielt sich dazu analog (Daten nicht gezeigt). Auch die koronare Perfusion zeigte zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen den Genotypen (Daten nicht gezeigt). Die in Abb. 3.27 C dargestellte CK-Aktivität zeigt, dass die tg Herzen während der Reperfusion (t 65, t 75) signifikant weniger CK freisetzen. Das Maximum der Freisetzung war bei den wt Herzen nach 65 min erreicht, was ca. der 4-fachen Menge dessen der tg Tiere entspricht. Die ischämische Kontraktur setzte im tg Herzen zu einem späteren Zeitpunkt ein und erreichte erst am Ende der Ischämie ihr Maximum, dieser Unterschied zum wt war nicht signifikant. Auch in der Reperfusion ergab sich lediglich ein Trend hin zu einem geringeren LVEDP (s. Abb. 3.27 D). Dies bedeutet, dass der EP<sub>3</sub>-Rezeptor seine anti-ischämische Wirkung über einen Signalweg distal des G<sub>i</sub>-Proteins ausübt.



#### Abb. 3.27:

(A) LVEDP, (B) +dP/dt<sub>max</sub>, (C) CK und (D) LVEDP von isoliert perfundierten Herzen im Ischämie/Reperfusionsmodell. Gemessen wurden wt ( $\blacksquare$ , n = 6) und tg ( $\triangle$ , n = 5) Mäuse, die den humanen EP<sub>3</sub>-Rezeptor überexprimieren. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, \* p<0,05 wt vs. tg.

# 3.9. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden verschiedene Mauslinien etabliert, welche den EP<sub>3</sub>-Rezeptor kardiospezifisch überexprimieren. Hierzu ist zunächst die porcine Isoform des Rezeptors in die Maus eingebracht worden. Nach Charakterisierung der Founder-Tiere entstanden zwei Mauslinien, welche eine herzspezifische mRNA-Expression und vermehrte Proteinexpression des Rezeptors zeigten. Messungen mit isolierten Kardiomyozyten ergaben, dass der EP<sub>3</sub>-Rezeptor in einer konstitutiv aktiven Form überexprimiert wurde.

Eine ischämieprotektive Wirkung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors konnte im Langendorff-Modell bestätigt werden. So zeigten die tg Herzen beider Linien einen reduzierten ischämischen Myokardschaden, gekennzeichnet durch eine verminderte ischämische Kontraktur und eine geringere Freisetzung von biochemischen Markern der Zellschädigung (CK, LDH). Hinsichtlich des Mechanismus der ischämieprotektiven Wirkung scheinen mitochondriale K<sub>ATP</sub>-Kanäle keine Rolle zu spielen, wohl aber die G<sub>i</sub>-mediierte Inhibition der Katecholaminausschüttung während der Ischämie. Darüber hinaus scheint das zur Familie der Thiol-spezifischen Antioxidantien gehörende Peroxiredoxin 6 in der Kardioprotektions-Linie bedeutsam zu sein.

Für die Tiere der Hypertrophie-Linie wurden in Magnet-Resonanz-Messungen eine starke Erhöhung des enddiastolischen und endsystolischen Volumens und eine massive Verschlechterung in der Ejektionsfraktion gemessen. Zusammen mit der erhöhten Herz-Körpergewichts-Ratio, den vergrößerten Kardiomyozyten und der Aufregulation der ANFmRNA als Vertreter des fetalen Genprogramms kann bei dieser Linie von einer Hypertrophie mit Herzinsuffizienz gesprochen werden.

Eine weitere Mauslinie, die den humanen (Subtyp  $EP_{3 \text{ IV}}$ ), nur G<sub>i</sub>-gekoppelten  $EP_3$ -Rezeptor überexprimiert, wurde erzeugt. Untersuchungen im Langendorff-Modell lieferten ähnliche Befunde wie für die porcine Isoform. Auch hier konnte eine Reduktion des ischämischen Schadens gemessen werden.

Bei der Ermittlung der Hypertrophie-assozierten Signalmechanismen der Hypertrophie-Linie kommt der Phosphatase Calcineurin eine besondere Rolle zu. In den tg Herzen dieser Linie konnte im Gegensatz zu vielen anderen untersuchten Proteinen eine vermehrte Calcineurin-Aktivität gemessen werden.

# 4. Diskussion

Die derzeit veröffentlichten Experimente zur Ischämie-Protektion des EP<sub>3</sub>-Rezeptor liefern nur indirekte Anhaltspunkte für dessen kardiozytäre Lokalisation (Hohlfeld *et al.*, 2000; Zacharowski *et al.*, 1999a). Daher könnten auch nicht-kardiozytäre Rezeptoren an der Kardioprotektion beteiligt sein. So exprimieren sympathische Nervenenden präsynaptisch den EP<sub>3</sub>-Rezeptor (Molderings *et al.*, 1998), was einen ischämiebedingten Katecholamin-Anstieg verhindern könnte. Mit einer kardiomyozytären Überexpression des Rezeptors sollte die Lokalisation und Bedeutung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors geklärt werden.

Die Überexpression eines Rezeptors erscheint zunächst artifiziell, ist aber ein gutes Modell, um die Regulation von Rezeptoren zu untersuchen. Nach Ischämie kommt es zur Aufregulation verschiedener Rezeptoren. Bekanntestes Beispiel sind die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren (Strasser *et al.*, 1990a; Strasser *et al.*, 1990b; Vatner *et al.*, 1990). Dass es sich bei der EP<sub>3</sub>-Überexpression um ein ebenfalls *in vivo* vorkommendes Konzept handelt, zeigt eine Arbeit aus der eigenen Arbeitsgruppe (Hohlfeld *et al.*, 1997). Die EP<sub>3</sub>-Rezeptordichte wird im Ischämie/Reperfusions-Experiment am Schwein um 50% nach Ischämie erhöht, allerdings ist dieser Anstieg in der Phase der Reperfusion wieder rückläufig. Im Gegensatz dazu bietet die EP<sub>3</sub>-Überexpression die Möglichkeit, die Zahl des Rezeptors konstant aufrecht zu erhalten und Schlüsse für eine mögliche EP<sub>3</sub>-vermittelte Wirkung zu ziehen.

So wurde zunächst der porcine EP<sub>3</sub>-Rezeptor, für den eine Kopplung an  $G_i$  und  $G_q$ -Proteine beschrieben worden ist, in der Maus kardiospezifisch überexprimiert und zwei stabile transgene Linien erzeugt. In einem zweiten Ansatz ist dann eine nur  $G_i$ -gekoppelte Isoform des humanen EP<sub>3</sub>-Rezeptors (hEP<sub>3</sub>) in die Maus eingebracht und diese Linie ebenfalls hinsichtlich ihrer Ischämie-Toleranz charakterisiert worden, da zu diesem Zeitpunkt ungeklärt war, welches G-Protein die anti-ischämische Wirkung vermittelt.

# 4.1. EP<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelte Kardioprotektion

Das zweite Ziel war die funktionelle Untersuchung transgener Mäuse im Hinblick auf die Myokardischämie *in vitro*. Die Experimente am isoliert perfundierten Herz zeigten eine massive Reduktion der ischämischen Kontraktur in den EP<sub>3</sub>-überexprimierenden Mäusen. Die Kontraktur ist im Wesentlichen auf einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration und einem Verlust von ATP in den Myofibrillen zurückzuführen (Koretsune & Marban, 1990). Daneben kam es in den tg Tieren außerdem zu einer reduzierten Freisetzung von CK und LDH als Zellstabilitätsmarker. Die Messungen zur Ischämieprotektion wurden sowohl in der Kardioprotektions-Linie als auch in der Hypertrophie-Linie vorgenommen und lieferten in
beiden Fällen das gleiche Ergebnis. Dies bestätigt die Hypothese der anti-ischämischen Wirkung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors.

Der Befund, dass eine kardiale Überexpression des EP<sub>3</sub>-Rezeptors den Ischämie-induzierten Schaden reduziert, bestätigt vorangegangene Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Hohlfeld *et al.*, 2000). Diese konnten zeigen, dass der EP<sub>3</sub>-Agonist M&B 28.767 im ischämischen Schweineherzen eine Reduktion der Infarktgröße und der CK-Freisetzung bewirkt (Hohlfeld *et al.*, 2000). Gestützt wird dieses Ergebnis durch Arbeiten an der Ratte, in der M&B ebenfalls eine Reduktion der Infarktgröße bewirkt und ist bestätigt durch andere EP<sub>3</sub>-Agonisten, für die eine kardioprotektive Wirkung beschrieben worden ist (Zacharowski *et al.*, 1999a; Zacharowski *et al.*, 1999b). Gesichert werden die Befunde der Kardioprotektions-Linie auch durch die Ergebnisse in der Mauslinie, welche den humanen EP<sub>3</sub>-Rezeptor überexprimiert. Die tg Tiere zeigen ebenfalls eine Reduktion der ischämischen Kontraktur und eine geringere CK-Freisetzung ins Effluat. Es scheint sich somit um eine generelle Wirkung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors zu handeln, die nicht nur auf den porcinen EP<sub>3</sub>-Rezeptor begrenzt ist.

Auch für andere Rezeptoren ist ein kardioprotektiver Effekt beschrieben worden. So konnte gezeigt werden, dass ein Adenosin A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist eine Reduktion der Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion im porcinen Modell bewirkt (Smits *et al.*, 1998). Weiterhin soll erwähnt werden, dass auch andere protektive Interventionen zu einer Reduktion der ischämischen Kontraktur führen, so zum Beispiel die Inhibition von L-Typ-Calcium-Kanälen (Hohlfeld *et al.*, 1994) oder die Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren (Übersicht in Donato & Gelpi, 2003).

Beim Vergleich des EP<sub>3</sub>-Rezeptors mit anderen Rezeptoren aus der EP-Reihe steht der EP<sub>4</sub>-Rezeptor im Vordergrund, für den ebenfalls eine kardioprotektive Funktion diskutiert wird. So zeigen EP<sub>4</sub>-*knock out*-Mäuse eine Zunahme in der Infarktgröße im Vergleich zu ihren wt Geschwistern (Xiao *et al.*, 2004). Ebenso wurde gezeigt, dass die Applikation eines EP<sub>4</sub>-Agonisten die Infarktgröße in wt Mäusen reduziert. Als möglicher Mechanismus der Kardioprotektion wird ein Anstieg im intrazellulärem cAMP-Gehalt diskutiert. Dieser Mechanismus ist gegenläufig zu den vorliegenden Ergebnissen. Aufgrund der konstitutiven Aktivität des EP<sub>3</sub>-Rezeptors kommt es zu einem erniedrigten cAMP-Gehalt in den Kardiomyozyten der tg Tiere. Dass beide Rezeptoren dennoch einen kardioprotektiven Effekt ausüben, könnte darin begründet sein, dass sie über cAMP verschiedene PKA-Isoformen stimulieren. Man nimmt an, dass verschiedene Isoformen durch ihre unterschiedliche subzelluläre Lokalisation in der Lage sind, auch unterschiedliche cAMP-mediierte Effekte auszuüben (Übersicht in Skalhegg & Tasken, 2000). Zur Bestätigung dieser Vermutung wären weitere Untersuchungen notwendig.

Die Rolle der anderen PG-Rezeptoren wurde auch anhand von knock-out-Mäusen untersucht. lassen sich verschiedene Funktionen Diesen Rezeptoren zuordnen, wie z.B. Entzündungsprozesse, Reproduktion und Knochenwachstum (Übersicht in Narumiya et al., 1999). Eine Funktion im Rahmen der Kardioprotektion wird sonst aber nur noch dem IP-Rezeptor zugeordnet. IP<sup>-/-</sup> -Mäuse zeigen größere Myokardinfarkte, sowohl *in vivo* als auch im Langendorff-Modell, in dem Blutbestandteile keine Rolle mehr spielen (Xiao et al., 2001). Dies bestätigt die Rolle von endogenem PGI<sub>2</sub> in der Kardioprotektion, bei der durch PGI<sub>2</sub> eine anti-arrhythmische Wirkung und eine Inhibition der TXA2-Synthese von Bedeutung sind.

### Tabelle 4.1:

Zusammenstellung einer Übersicht von Interventionen, die die Ischämietoleranz erhöhen

	Wirkort	Referenz
PGI <sub>2</sub>	IP-Rezeptor	(Woditsch & Schrör, 1992)
Adenosin	A <sub>1</sub> -Rezeptor	(Donato & Gelpi, 2003)
Antioxidantien	Reaktive O <sub>2</sub> -Radikale	(Dhalla et al., 2000)
K <sub>ATP</sub> -Öffner	K <sub>ATP</sub> -Kanäle	(Rousou et al., 2004)
Calciumantagonisten	L-Typ Calcium-Kanäle	(Hohlfeld et al., 1994)
PGE <sub>1/2</sub>	EP <sub>3</sub> /EP <sub>4</sub> -Rezeptor	(Hohlfeld et al., 2000;Xiao et
		<i>al.</i> , 2004)

In der Kardioprotektions-Linie fanden wir *in vivo* eine moderate Veränderung der linksventrikulären Funktion, gekennzeichnet durch ein vergrößertes endsystolisches Volumen und eine reduzierte Ejektionsfraktion. Dieser Effekt war allerdings von geringer Bedeutung, da das Herzzeitvolumen unverändert blieb. Die geringe Bedeutung dieser Veränderung konnte durch die Langendorff-Versuche, in denen keine Unterschiede in der basalen Ventrikelfunktion gemessen wurden, bestätigt werden. Die basale Herzfunktion vor Ischämie gemessen als  $\Delta$ LVP und dP/dt wird durch die Überexpression des EP<sub>3</sub>-Rezeptors nicht verändert. Auch die Herzrate wird während der isolierten Perfusion konstant gehalten. Dadurch können wir von einem vergleichbaren Sauerstoffverbrauch im wt und tg ausgehen. Folglich zeigt eine EP<sub>3</sub>-Überexpression keinen negativen inotropen Effekt, welcher die Schwere der Ischämie beeinflussen kann.

## 4.2. G-Proteinkopplung des $EP_3$ -Rezeptors ( $G_i/G_q$ )

Der EP<sub>3</sub>-Rezeptor kann in verschiedenen Splicevarianten vorliegen, die in ihrem C-Terminus variieren. Der C-Terminus ist hauptsächlich für die Signalkopplung des Rezeptors verantwortlich. Für die porcine EP<sub>3B</sub>-Form, die mit der humanen EP<sub>3II</sub>-Form identisch ist, ist eine Kopplung an G<sub>i</sub> und G<sub>q</sub>-Proteine beschrieben (überexprimiert in der Hypertrophie- und Kardioprotektionslinie). Für den humanen EP<sub>3IV</sub>-Rezeptor (überexprimiert in Mauslinie hEP<sub>3</sub>) konnte nur eine G<sub>i</sub>-Kopplung nachgewiesen werden. Bislang ist allerdings nicht bekannt, welcher der beiden Signalwege distal des EP<sub>3</sub>-Rezeptors (G<sub>i</sub> oder G<sub>q</sub>) für eine Kardioprotektion von Bedeutung ist. Ein Vergleich der unterschiedlichen Mausmodelle zeigt, dass in beiden die Überexpression des Rezeptors zu einer Ischämie-Protektion führte. Im Langendorff-Modell durch eine Reduktion der CK im Effluat und der ischämischen Kontraktur der tg Herzen der hEP<sub>3</sub>-Linie bestätigt. Somit liegt es nahe, dass der EP<sub>3</sub>-Rezeptor seine anti-ischämischen Effekte über einen Signalweg distal des G<sub>i</sub>-Proteins ausübt.

Ebenfalls wurde die  $G_q$ -Protein-Kopplung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors untersucht. Über das  $G_q$ -Protein kann es zu einer Aktivierung der PKC kommen, für die eine Beteiligung an der EP<sub>3</sub>vermittelten Kardioprotektion beschrieben ist (Zacharowski *et al.*, 1999b). Im Westernblot zeigte sich, dass die PKC-abhängige Substratphosphorylierung durch die Überexpression des EP<sub>3</sub>-Rezeptors nicht beeinflusst wurde. In der Kardioprotektions-Linie war kein Unterschied zwischen wt und tg erkennbar, somit scheint die EP<sub>3</sub>-Signaltransduktion vom G<sub>q</sub>-Protein unabhängig zu sein.

# 4.3. Mögliche Mechanismen der anti-ischämischen Wirkung der EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Überexpression

### 4.3.1. Interferenz mit cAMP-Signalwegen

Die Kopplung an G<sub>i</sub>-Proteine und somit an die Adenylatzyklase ist der primäre Signaltransduktionsweg von allen EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Subtypen. Die Untersuchung der funktionellen Kopplung des Rezeptors in isolierten Kardiomyozyten zeigte, dass der Forskolin-induzierte cAMP-Anstieg in tg Kardiomyozyten signifikant niedriger war als in den wt Zellen. Dieses Ergebnis gilt für die Kardioprotektions- und die Hypertrophie-Linie. Da es sich beim EP<sub>3</sub>-Rezeptor um einen G<sub>i</sub>-gekoppelten Rezeptor handelt, deutet dieser geringe cAMP-Anstieg auf eine permanent gehemmte AC hin. Im Folgenden wurden die Myozyten mit PTX vorbehandelt, einem G<sub>i</sub>-Protein-Inhibitor. Tg Zellen, die so vorbehandelt wurden, zeigten nach Forskolin-Stimulation wieder einen Anstieg im cAMP-Gehalt, wie er durch Forskolin alleine nicht erreicht wurde. Das führte zu der Annahme, dass es sich um einen konstitutiv aktiven Rezeptor handelt. In früheren Studien wurde ebenfalls eine konstitutive Aktivität verschiedener EP<sub>3</sub>-Isoformen nachgewiesen (Negishi *et al.*, 1996). Dieser Befund wird gestützt durch den verminderten inotropen Effekt von Isoprenalin in perfundierten tg Herzen. Aufgrund der konstitutiven Aktivität des Rezeptors konnten die folgenden Versuche ohne die Gegenwart eines Rezeptoragonisten durchgeführt werden.

Auch in wt Kardiomyozyten konnte kein Einfluss des EP<sub>3</sub>-Agonisten auf den cAMP-Spiegel gemessen werden. Dieser Befund ist nicht überraschend, da in Bindungsstudien belegt werden konnte, dass die wt Tiere endogen nur eine sehr geringe Menge des Rezeptors im Herzen exprimieren, so dass die Antwort auf eine Stimulation des Rezeptors mittels Agonist wohl zu gering ausfällt. Daher konnte kein reduzierter cAMP-Gehalt nach Forskolin- und M&B 28.767-Stimulation gemessen werden.

Daran anschließend ergab sich die Frage, ob die cAMP-mediierten inotropen Mechanismen in den tg Herzen noch intakt sind. Zu diesem Zweck wurden die Herzen beider Linien mit steigender Isoprenalin-Konzentration isoliert perfundiert. Die beobachtete Zunahme der Kontraktilität war im tg Herz im Vergleich zum wt deutlich vermindert. Diese Befunde gelten für beide Linien. cAMP-abhängige inotrope Mechanismen werden wahrscheinlich vom EP<sub>3</sub>-Rezeptor über G<sub>i</sub>-Kopplung beeinflusst.

Die reduzierte inotrope Antwort kann ebenfalls auf den konstitutiv aktiven Rezeptor zurückgeführt werden. Eine ständige Inhibition der AC durch das G<sub>i</sub>-Protein unterdrückt eine Stimulation von G<sub>s</sub>-Proteinen der  $\beta$ -Rezeptoren. Im Zellmodell wurde dieser Weg schon beschrieben. Eine Überexpression von G<sub>αi-2</sub> führt zur Unterdrückung der β-adrenergen Signaltransduktion in Kardiomyozyten (Rau *et al.*, 2003).

In der Annahme, dass die anti-ischämischen Effekte des EP<sub>3</sub>-Rezeptors auf einer Inhibition des cAMP-Signalweges unterhalb der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren beruhen und so vor den negativen Folgen einer Ischämie-induzierten Katecholaminausschüttung schützen, würde man einen ähnlichen Effekt von einer Inhibition der  $\beta$ -Rezeptoren auf pharmakologischem Wege

erwarten. Zu diesem Zweck sind die Herzen dem Ischämie/Reperfusions-Protokoll in der Anwesenheit des  $\beta_1$ -selektiven Antagonisten Talinolol unterzogen worden. Es zeigte sich, dass sowohl die ischämische Kontraktur, als auch die Menge an CK im Effluat in den wt Herzen deutlich reduziert wurde. Die Unterschiede zwischen wt und tg Herzen waren nicht mehr signifikant. Dieser Befund unterstreicht die Hypothese, dass eine G<sub>i</sub>-mediierte Inhibition des cAMP-Signalweges zum anti-ischämischen Effekt des EP<sub>3</sub>-Rezeptors führt.

### 4.3.2. Aktivierung mitochondrialer ATP-sensitiver K<sup>+</sup>-Kanäle

Zacharowski et al. konnten in Ratten zeigen, dass die Behandlung mit 5-Hydroxydecanoat (5-HD), einem spezifischen Inhibitor für mitochondriale ATP-sensitive K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>ATP</sub>), den kardioprotektiven Effekt eines EP3-Agonisten abschwächt (Zacharowski et al., 1999b). Auch für den Adenosin-Rezeptor wird vermutet, dass er seine Wirkung über KATP ausübt. Für den Adenosin A1-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass er, ebenso wie der EP3-Rezeptor, funktionell an Gi-Proteine gekoppelt ist (Kirsch et al., 1990). Dies führte zu der Vermutung, dass K<sub>ATP</sub>-Kanäle eine Rolle bei der EP<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelten Ischämie-Protektion spielen. Um dieses zu überprüfen, wurden die wt und tg Herzen der Kardioprotektions-Linie dem Ischämie/Reperfusions-Protokoll unter Zugabe von 5-HD unterzogen. Dieser Inhibitor zeigte weder einen Einfluss auf die wt Herzen noch auf die tg Herzen. Somit können wir den Zusammenhang zwischen dem anti-ischämischen Effekt des EP3-Rezeptors und den mitochondrialen KATP-Kanälen nicht bestätigen. Gestützt wird dieses Ergebnis durch eine Arbeit am Kaninchenherzen. Cromocalin, ein K<sup>+</sup>-Kanal-Öffner, besitzt zwar vasodilatorische Eigenschaften, ein anti-ischämischer Effekt trat allerdings nicht auf (Vesper & Schrör, 1995). Weitere Arbeiten mit Glibenclamid, einem KATP-Kanal-Blocker, sprechen ebenfalls gegen eine Beteiligung von KATP-Kanälen. Glibenclamid zeigte keinen Einfluss auf die Aktionspotentialverkürzung durch PGE1 (Hohlfeld et al., 2000), und auch bei der ischämischen Präkonditionierung im isolierten Rattenherz konnte eine Beteiligung nicht nachgewiesen werden (Yabe et al., 1995).

#### 4.3.3. Anti-oxidative Mechanismen

Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des  $EP_3$ -Rezeptors, der seine Wirkung über G<sub>i</sub>-Proteine vermittelt, zur Kardioprotektion führt. Darüber hinaus sollten mögliche Zielproteine unterhalb der G-Proteine ermittelt werden, die hierfür eine Rolle spielen. Daher wurde das Mausproteom nach dem Ischämie/Reperfusion-Versuch in der 2D- Gelelektrophorese aufgetrennt. Prdx 6 konnte als differenziell reguliertes Protein und damit als möglicher Kandidat für weitere Untersuchungen ermittelt werden.

Prdx 6 (AOP2) ist ein 24,9 kDa großes Homodimer, welches zur Familie der Peroxiredoxine gehört. Peroxiredoxine gehören zur *thiol-specific antioxidant* (TSA) Gen-Familie und stellen eine Besonderheit unter den Peroxidasen dar.

Peroxidasen reduzieren Peroxide bei gleichzeitiger Oxidation eines Kosubstrates. Die Besonderheit der Peroxiredoxine liegt darin, dass sie sowohl Peroxidase als auch Kosubstrat sind. Das Enzym wird selbst während der Reaktion oxidiert. Dafür haben Peroxiredoxine ein Cystein in ihrem aktiven Zentrum. Peroxiredoxine werden anhand der Anzahl der Cysteine in ihrer Sequenz (1-Cys und 2-Cys Formen) in zwei Unterfamilien unterteilt. Prdx 6 gehört zur Familie der 1-Cys Peroxiredoxine. Die Expression von Prdx 6 mRNA und Protein ist bei der Ratte in der Lunge am höchsten, gefolgt von Gehirn, Niere und Herz (Fujii *et al.*, 2001). Prdx 6 wird von der Maus in den meisten Geweben exprimiert, am stärksten in Leber und Lunge, wenig im Herzen (Wang *et al.*, 2003). Rabilloud *et al.* konnten zeigen, dass eine Hauptantwort von Lymphom-Zellen auf oxidativen Stress die Modifikation verschiedener Peroxiredoxine darstellt (Rabilloud *et al.*, 2002). In unserem Modell ist es noch unklar, ob es sich um die oxidierte oder reduzierte Form des Proteins handelt. Der Nachweis könnte mittels spezifischer Antiköper gegen die oxidierte bzw. die reduzierte Form von Prdx 6 erfolgen.

Zunächst war es uns möglich den Gehalt an Prdx 6 auf mRNA-Ebene zu ermitteln. Ohne Behandlung zeigten die Herzen ein individuell sehr unterschiedliches Expressionsniveau. Nach I/R zeigten die tg Tiere sehr viel weniger Prdx 6 mRNA als ihre wt Geschwister. Das würde der geringeren Ischämietoleranz dieser Herzen entsprechen. So zeigten auch Prdx 6*knock out*-Mäuse eine geringere Überlebensrate und schwerere Organschäden nach oxidativem Stress (Wang *et al.*, 2003). In einem nächsten Schritt könnten diese Befunde mittels Westernblot weiter untersucht werden.

## 4.4. EP<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelte Hypertrophie

Zur näheren Charakterisierung der Phänotypen wurde die Herz/Körpergewichtsratio bestimmt. Hier traten deutliche Unterschiede zwischen der Kardioprotektions- und Hypertrophie-Linie auf. Die tg Tiere der Hypertrophie-Linie zeigten eine Zunahme der Herzmasse und somit eine Vergrößerung der Herz/Körpergewichtsratio. Dieser erste Hinweis auf eine Hypertrophie veranlasste die daran anschließenden Experimente und wurde durch die Messung der Zellgröße und die Magnet-Resonanz-Messungen bestätigt und erweitert. Die mittels MRI gewonnen Daten und Bilder belegen eindruckvoll eine dilatative Kardiomyopathie der tg Herzen der Hypertrophie-Linie. Dies zeigte sich deutlich in der Ejektionsfraktion, welche mit 40% die eingeschränkte Funktion der Herzen widerspiegelt. Bei der Ejektionsfraktion handelt es sich um eine berechnete Größe aus Schlagvolumen durch enddiastolisches Volumen. Das enddiastolische Volumen hat in den tg Herzen um mehr als die Hälfte abgenommen. Auch das endsystolische Volumen der tg Herzen ist stark verringert und verdeutlicht die eingeschränkte Funktion dieser Herzen. Eine Verschlechterung des HZV, was ein entscheidendes Merkmal für eine Herzinsuffizienz wäre, konnte in diesem Stadium bzw. in dem Alter der Mäuse nicht nachgewiesen werden,.

Die Veränderung in der Herz/Körpergewichtsratio wird durch die Magnet-Resonanz-Messungen bestätigt, denn auch mit dieser Methode konnte eine Zunahme der Herzmasse in Relation zum Körpergewicht nachgewiesen werden. In dem hier untersuchten Maus-Modell handelt es sich um eine ekzentrische Hypertrophie (Hypertrophie mit Dilatation), im zu einer konzentrischen Hypertrophie, die mit einer Gegensatz Zunahme der Ventrikelwanddicke einhergeht. Eine Hypertrophie ist zudem meist durch einen fibrotischen Prozess gekennzeichnet. Auch in Mäusen der Hypertrophie-Linie wurde vermehrt fibrotisches Gewebe nachgewiesen und eine Steigerung der Expression matrixassoziierte Gene, wie Biglycan, Kollagen Typ I und Typ III (Daten von Prof. Fischer) gezeigt. Die Daten für die Kardioprotektions-Linie zeigen nur eine geringe Verschlechterung der EF (57%). Das enddiastolische Volumen ist im Vergleich zu wt Herzen nicht verändert und die Herzgewichte unterscheiden sich nicht signifikant zwischen wt und tg.

Ein Teil der Hypertrophieantwort besteht in einer Wiederaktivierung des fetalen Genprogramms, zu dem beispielsweise ANF oder  $\alpha$ -Actin gehören (Ghatpande *et al.*, 1999). Daher wurde in der Hypertrophie-Linie das Expressionsniveau dieser Gene untersucht. ANF, als Peptid-Hormon, hat natriuretische, diuretische, vasodilatorische, Renin- und Aldosteronunterdrückende Eigenschaften und ist in die Regulation von Volumen und Elektrolyt-Gleichgewichten und des Blutdrucks involviert. So zeigen ANF-defiziente Mäuse einen massiven Anstieg des Herz- und LV-Gewichtes nach Experimenten zur Volumen-Überlastung (Mori *et al.*, 2004). In der Hypertrophie-Linie zeigte sich eine Zunahme der ANF-mRNA.  $\beta$ -MHC und  $\alpha$ -Actin wiesen das gleiche Expressionsniveau in wt und tg Herzen auf.

Dass nur ANF als Insuffizienzmarker in der  $EP_3$ -überexprimierenden Maus aufreguliert wurde und nicht, wie in vielen anderen Modellen, weitere Gene des fetalen Genprogramms ist durchaus nicht ungewöhnlich. So ist die Expression dieser Gene in verschiedenen Mausstämmen, die eine kardiale Hypertrophie ausbilden, unterschiedlich. Ein Vergleich verschiedener Hypertrophie-Maus-Modelle mittels Microarrays zeigte zudem, dass ANF als einziges Gen konsistent aufreguliert wurde. Andere transkriptionelle Unterschiede waren von Modell zu Modell stark unterschiedlich (Aronow *et al.*, 2001).

Dass sich in einer der untersuchten Mauslinien eine Hypertrophie entwickelt hat, kann auf die wachstumsfördernden Effekte von Prostaglandinen zurück geführt werden. So steigert exogenes PGE<sub>2</sub> die Proteinsynthese in neonatalen ventrikulären Myozyten. Diese Studie zeigt weiterhin, dass EP<sub>1</sub>, EP<sub>3</sub> und EP<sub>4</sub> –Rezeptoren involviert sein können (Mendez & LaPointe, 2002). Die Zunahme der Herzmasse der tg Tiere der Hypertrophie-Linie geht auf eine Vergrößerung der Kardiomyozyten also eine vermehrte Proteinsynthese zurück. Eine Beteiligung von cAMP als Botenstoff ist denkbar, aber nur eine von vielen Möglichkeiten.

Die Aktivierung des IP-Rezeptors vermittelt anti-hypertrophe Effekte in adulten Rattenkardiomyozyten durch einen Anstieg im cAMP-Gehalt (Ritchie *et al.*, 2004). In den Zellen der Hypertrophie-Linie konnte durch Forskolin nur ein geringer Anstieg im cAMP Gehalt gemessen werden. Wenn man davon ausgeht, dass ein Anstieg im cAMP-Spiegel zu anti-hypertrophen Effekten führt, dann könnte im Umkehrschluss gelten, dass ein dauerhaft niedriger cAMP-Spiegel, wie er durch einen konstitutiv aktiven EP<sub>3</sub>-Rezeptor bedingt sein kann, eine hypertrophe Antwort bewirkt. Dies führt zu der Vermutung, dass cAMP ein wichtiger Mediator wachstumsfördernder Prozesse ist.

Die Tiere der Hypertrophie-Linie zeigten eine erhöhte Mortalität. Die meisten tg Tiere starben an Atemdepression infolge von Ödemen, was bei einer dilatativen Myopathie durchaus nicht ungewöhnlich ist. So zeigen viele Hypertrophie-Mausmodelle eine erhöhte Mortalität, in denen zum Beispiel  $G_q$ -Proteine (Mende *et al.*, 2001) oder Gh/tTg (Zhang *et al.*, 2003) überexprimiert sind. Auch beim Menschen ist eine erhöhte Sterblichkeit infolge von Hypertrophie des Herzens ein seit langem bekanntes Problem. Viele tg Tiere erreichten das Alter von 5 Monaten nicht, was Untersuchungen an älteren Tieren sehr erschwerte. Wann es zum Einsetzen der Hypertrophie kommt, könnte im Folgenden an jungen Mäusen untersucht werden. So könnte erforscht werden, welche Veränderungen der Signaltransduktion bereits früh einsetzen und eine hypertrophe Antwort nach sich ziehen und welche Veränderungen als Folge der Hypertrophie zu werten sind.

# 4.5. Mögliche Mechanismen der Hypertrophie infolge von EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Überexpression

Ein wichtiger Teilaspekt dieser Arbeit war die Frage, wie der EP<sub>3</sub>-Rezeptor seine hypertrophe Wirkung vermittelt. Auch die Hypertrophie-Linie wurde hinsichtlich ihrer Signaltransduktion näher untersucht.

Eine Beteiligung von G<sub>i</sub>-Proteinen an der Hypertrophie ist durchaus nicht ungewöhnlich und auch in anderen Modellen beschrieben. So führt ein verstärktes G<sub>i</sub>-Signaling in der Maus zu letaler Kardiomyophatie (Redfern *et al.*, 2000). Zou *et al.* konnten ebenfalls eine Beteiligung des G<sub>i</sub> Proteins an der kardiomyozytären Hypertrophie nachweisen (Zou *et al.*, 1999). Generell werden viele verschiedene Wege der Signaltransduktion distal von G-Protein gekoppelten Rezeptoren beschrieben, die an hypertrophen Mechanismen beteiligt sind. In dem vorliegenden Modell wurden Wege betrachtet, die distal des EP<sub>3</sub>-Rezeptors angesiedelt sind und zu einer hypertrophen Antwort führen können.

## 4.5.1. Transkriptionsfaktoren

GATA-4 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher eine wichtige Rolle in der Herzentwicklung und bei Hypertrophie spielt (Übersicht in Pikkarainen *et al.*, 2004). In unserem Modell der Hypertrophie-Linie konnte ein Trend zur vermehrten GATA-4 Aktivierung gemessen werden. Eine Überexpression von GATA-4 in der Maus führt im adulten Herz zu einer Zunahme der Herz/Körpergewicht-Ratio und einer Aktivierung des Hypertrophie-assoziierten Genprogramms (Liang *et al.*, 2001).

## 4.5.2. Phosphatasen

Auch Calcineurin wird eine wichtige Rolle als Regulator von hypertrophen Antworten auf verschiedene Stimuli zugeschrieben. Calcineurin wird durch Ca<sup>2+</sup> und Calmodulin reguliert und dephosphoryliert die Mitglieder der NFAT Transkriptionsfaktor-Familie, worauf diese in den Kern einwandern.

So zeigt die Calcineurin-transgene Maus einen dramatischen Anstieg der Herzgröße, mit zunehmendem Alter eine Dilatation des Ventrikels einhergehend mit dem Auftreten von spontanem Tod und eine Reaktivierung des fetalen Genprogramms (beta-MCH, BNP) (Molkentin *et al.*, 1998). Des Weiteren konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass Calcineurin den Transkriptionsfaktor NFAT3 dephosphoryliert und dieser mit GATA4 interagiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des EP<sub>3</sub>-Rezeptors im Herzen ebenfalls zu einer verstärkten Aktivierung von Calcineurin führte, was wahrscheinlich die verstärkte hypertrophe Antwort der Herzen der tg Tiere der Hypertrophie-Linie hervorrief. Calcineurin bietet des Weiteren einen Erklärungsansatz für die verbesserte Ischämietoleranz der tg Herzen. So konnten De Windt *et al.* zeigen, dass eine Calcineurinmediierte Hypertrophie Kardiomyozyten vor Apoptose *in vitro* und *in vivo* schützt. Die Ischämie/Reperfusions-Versuche mit Calcineurin-transgenen Herzen zeigten weniger DNA-Fragmentierung, was die Vermutung zulässt, dass Calcineurin-mediierte Hypertrophie vor apoptotischen Stimuli schützt (De Windt *et al.*, 2000).

#### 4.5.3. Kinasen

Neben Calcineurin wurden noch weitere Proteine wie zum Beispiel GSK-3 $\beta$  in der Hypertrophie-Linie untersucht. GSK-3 $\beta$  phosphoryliert NFATs, GATA-4 und  $\beta$ -Catenin. Dadurch wird deren prohypertropher Effekt verhindert, da sie vom Kern fern gehalten oder inaktiviert werden (Hardt & Sadoshima, 2004). Aus diesem Grund wurde sowohl die Menge, als auch der Phosphorylierungsstatus von GSK-3 $\beta$  untersucht. In der Hypertrophie-Linie fanden sich für dieses Protein allerdings keine Unterschiede zwischen wt und tg Herzen. GSK-3 $\beta$  wird selbst negativ durch die PI3-Kinase und Akt-Kinase reguliert. Eine vermehrte Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  führt zu seiner Inaktivierung, was wiederum den antihypertrophen Effekt dieser Kinase aufhebt. Eine vermehrte Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$ wurde in den hypertrophen Mäuseherzen nicht beobachtet. Somit scheint dieser Signaltransduktionsmechanismus der Hypertrophie in der untersuchten Mauslinie unwahrscheinlich.

Darüber hinaus lag die Vermutung nahe, dass die PKA und die PKC an der Signalkaskade beteiligt waren. Es ist untersucht worden, ob eine vermehrte Phosphorylierung der Substrate, also eine höhere Aktivität dieser Kinasen, in den tg hypertrophen Herzen feststellbar war. Durch Westernblot-Analyse ließ sich dies nicht nachweisen. Es ist allerdings möglich, dass geringe Effekte, also nur die vermehrte Phosphorylierung einzelner Proteine, unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Somit ist eine stärkere Aktivität dieser Kinasen nicht ausgeschlossen.

Für die Entwicklung einer kardiomyozytären Hypertrophie sind mittlerweile mehrere verschiedene, teilweise ineinander greifende, molekulare Signalwege beschrieben (Übersicht in Frey & Olson, 2003). Darunter fallen auch G<sub>i</sub>-Proteine, für die auch eine Aufregulation bei humaner Herzinsuffizienz beschrieben ist (Neumann *et al.*, 1988; Eschenhagen *et al.*, 1992).

Zou *et al.* konnten zeigen, dass sowohl  $G_s$  als auch  $G_i$ -Proteine in die Isoproterenol-induzierte kardiomyozytäre Hypertrophie involviert sind. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass eine Aktivierung des  $G_i$ -Proteins über  $G_{\beta\gamma}$ , Src-Tyrosinkinasen, Ras und Raf-1 zu einer ERK Aktivierung führt (Zou *et al.*, 1999). Dies führte zu der Frage, ob in unserem Hypertrophiemodell, in dem ein  $G_i$ -gekoppelter Rezeptor überexprimiert wurde, auch eine Beteiligung der Src Familie vorliegt.

Die vorliegenden Daten zeigen eine moderate, aber dennoch signifikant vermehrte Expression dieser Proteine. So ist anzunehmen, dass es durch die Überexpression des EP<sub>3</sub>-Rezeptors zu einer verstärkten  $G_{\beta\gamma}$ -Aktivierung kommt, was wiederum zu einer Zunahme der Src-Tyrosinkinasen führt. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass es durch Überexpression des  $\alpha_{1B}$ -Adrenergen Rezeptors in der Maus in tg Herzen zu einem starken Anstieg im Src-Proteingehalt kommt (Yun *et al.*, 2003).

### 4.6. Vergleich zwischen Hypertrophie- und Kardioprotektions-Linie

Eine bisher unbeantwortete Frage ist, warum sich die beiden Linien, die den porcinen EP<sub>3</sub>-Rezeptor überexprimieren, hinsichtlich ihres Phänotyps unterscheiden. In großen Teilen zeigen beide Linien, sowohl für die Rezeptorbindung, als auch für die Ischämie-Toleranz, Übereinstimmungen. Offen bleibt allerdings, warum die Hypertrophie-Linie diese ausgeprägte Hypertrophie entwickelte, während in der Kardioprotektions-Linie nur geringe Veränderungen im endsystolischen Volumen und der Ejektionsfraktion messbar waren. Einen Erklärungsansatz hierfür bieten die möglicherweise unterschiedlichen Integrationsstellen des Konstruktes in das Genom (Le Corvoisier *et al.*, 2003). So wurden verschiedene genetische Loci für Unterschiede im kardialen Phänotyp verantwortlich gemacht. Es erscheint möglich, dass der EP<sub>3</sub>-Rezeptor an unterschiedlichen Stellen in das Genom integriert wurde, und es hierdurch zu Veränderungen im Phänotyp kommt.

Nicht nur die Lokalisation des Integrationsortes spielt für die Ausprägung des Phänotyps eine Rolle, sondern auch die Anzahl der Kopien des Gens, welches in das Mausgenom integriert wurde. So zeigte ein Maus-Modell mit herzspezifischer Überexpression des ebenfalls G<sub>i</sub>gekoppelten A<sub>3</sub> Adenosin-Rezeptors bei milder Überexpression (1 Kopie) nach *in vivo* Infarkt eine Reduktion der Infarktgröße um ca. 30%, bei starker Überexpression (6 Kopien) eine Reduktion der Infarktgröße um ca. 40%. Zusätzlich entwickelten die Tiere eine dilatative Kardiomyopathie mit einem Anstieg der Hypertrophie-Marker wie ANF und alpha-Actin (Black, Jr. et al., 2002).

In unserem Modell ist zwar die Zahl der Kopien, die ins Genom integriert sind, ungeklärt, bekannt ist jedoch die Rezeptordichte. Diese ist in beiden Linien, die die porcine Form exprimieren annähernd gleich. Daher scheint die Rezeptordichte für den Phänotyp der EP<sub>3</sub>überexprimierenden Maus nicht von Bedeutung zu sein. Vielleicht reichen aber auch schon kleinste Unterschiede aus, um einen "milden" hypertrophen Phänotyp in eine stark ausgeprägte Hypertrophie zu verwandeln.

Hiervon ausgehend scheint es interessant zu klären, worin sich die Signaltransduktion der Kardioprotektions-Linie von der Hypertrophie-Linie unterscheidet. Hierfür sind die Microarray-Technik sowie ein Proteomvergleich besonders geeignet. Dadurch ließen sich Unterschiede in der Genexpression oder auch differenziell regulierte Proteine festhalten.

Obwohl die Rezeptormenge in beiden Linien gleich ist, könnten sie sich hinsichtlich ihrer funktionellen Kopplung unterscheiden. Es scheinen die gleichen Mechanismen an einer Ischämie-Protektion wie an einer Hypertrophie beteiligt zu sein.

Ein möglicher Kandidat für weitere Untersuchungen ist Calcineurin. Wird dieses überexprimiert, so ist es in der Lage Hypertrophien zu vermitteln, aber auch vor Ischämieinduzierter Apoptose zu schützen (De Windt *et al.*, 2000). Um mögliche Unterschiede im Aktivitätsmuster von verschiedenen Calcineurin-assozzierten Signalwegen festzustellen, sind noch weitere Studien notwendig.

Weiterhin wäre zu klären, ob die Menge an G<sub>i</sub>-Proteinen, die letztendlich den ersten Schritt der Signalweiterleitung kennzeichnen, unterschiedlich ist.

Die genauere Charakterisierung der Signaltransduktion hinsichtlich Ischämie vs. Hypertrophie liefert möglicherweise interessante Ansätze für neue klinische Anwendungen.

### 4.7. Ansätze zur pharmakotherapeutischen Nutzung

Ein möglicher pharmakotherapeutischer Ansatz, der sich aus dieser Arbeit ableiten lässt, ist ein Einsatz des Rezeptors in der Gentherapie. Eine Überexpression von EP<sub>3</sub>-Rezeptoren auf Kardiomyozyten zur Verbesserung der Ischämieprotektion ist denkbar. Die Natur scheint dieses Prinzip ebenfalls zu verfolgen, so konnte eine Aufregulation des EP<sub>3</sub>-Rezeptors nach Ischämie im Tierversuch bereits gezeigt werden (Hohlfeld *et al.*, 1997). Das Ausmaß ist allerdings erheblich geringer, als es mit einem transgenen Ansatz erreicht werden kann. Es handelt sich hierbei um ein zweiseitiges Konzept, da es auch zu einer massiven hypertrophen Antwort kommen könnte. Wie es zu unterschiedlichen Phänotypen trotz gleicher genetischer Ausgangssituation kommen konnte, muss noch grundlegend untersucht werden. Für die Möglichkeit einer Gentherapie spricht die Erkenntnis, dass unter nicht-ischämischen Bedingungen die EP<sub>3</sub>-Überexpression keinen Einfluss auf die Hämodynamik des Herzens hat. Die unerwünschten Nebenwirkungen sind somit gering. Vielversprechender wäre eine transiente Überexpression des Rezeptors. Hierbei könnte die kardioprotektive Eigenschaft des EP<sub>3</sub>-Rezeptors genutzt werden. Da es sich um eine zeitlich befristete Veränderung handelt, fallen die unerwünschten Wirkungen einer Hypertrophie, welche einen längeren Zeitraum zur Ausbildung benötigt, nicht ins Gewicht. Eventuell müssen aber thrombotische Ereignisse behandelt werden.

Die Eigenschaften des EP<sub>3</sub>-Rezeptors ließen sich auch möglicherweise beim Stammzelltransfer nutzen. Unklar ist allerdings, ob der EP<sub>3</sub>-Rezeptor auf Stammzellen vorhanden ist. Die trophischen Effekte, wie in dieser Arbeit beschrieben, und die Rolle des EP<sub>3</sub>-Rezeptors bei der Migration (Blindt *et al.*, 2002), könnten den Einsatz von EP<sub>3</sub>-Agonisten rechtfertigen.

Die ursprüngliche Zielsetzung zur Entwicklung von spezifischen EP<sub>3</sub>-Agonisten war ihre erhoffte magenprotektive Wirkung. Durch den Einsatz dieser Agonisten sollte die ulcerogene Wirkung der nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID) gemindert werden. Als nachteilig erwies sich, dass der EP<sub>3</sub>-Rezeptor weit im Körper verbreitet ist, beispielsweise im Zentralnervensystem, auf Thrombozyten und im Gefäßsystem, was zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie etwa thrombotischen Ereignissen führen kann. So konnte gezeigt werden, dass die proaggregatorische Wirkung von PGE<sub>2</sub> über den EP<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelt wird. Als Mechanismus hierfür wird die Inhibition der cAMP-Produktion diskutiert (Fabre *et al.*, 2001). Daneben spielt der EP<sub>3</sub>-Rezeptor auch eine wichtige Rolle in der Suppression von Colonkarzinomen (Shoji *et al.*, 2004). Ein Einsatz von EP<sub>3</sub>-Agonisten zur Tumorsuppression wäre denkbar.

Vorangegangene Arbeiten am Tiermodell sprechen für die Möglichkeit des Einsatzes eines EP<sub>3</sub>-Agonisten mit anti-ischämischer Wirkung (Hohlfeld *et al.*, 2000;Thiemermann & Zacharowski, 2000). Zu diskutieren wäre der Einsatz solcher Substanzen zur Herzinfarkt-Prävention, ähnlich der Acetylsalicylsäure. Unter nicht-ischämischen Bedingungen zeigen die meisten EP<sub>3</sub>-Agonisten keinen Einfluss auf Herzfrequenz oder Blutdruck, somit sind unerwünschte Nebenwirkungen in diesem Bereich gering. Die bereits entwickelten Substanzen (zum Beispiel: M&B 28767, GR-63799X, TEI-3356, Sulproston) sind allerdings noch nicht spezifisch genug. In diesem Zusammenhang müsste auch die Frage geklärt werden, ob ein kardioprotektiver Effekt ebenfalls vorhanden ist, wenn der Agonist erst nach dem ischämischen Ereignis verabreicht wird. Ein solcher Einsatz als Akut-Medikation würde von großem Nutzen sein. Allerdings müsste überprüft werden, ob ein messbarer Vorteil im Vergleich zu der jetzt bestehenden Behandlung vorhanden ist.

Nach einem vorangegangenen Infarkt ist es wichtig, die Herzfrequenz, die Kontraktilität und somit auch den Sauerstoffverbrauch des Herzens zu senken. Das wird u.a. durch die Gabe von Beta-Blockern und Calcium-Antagonisten gewährleistet. Für den EP<sub>3</sub>-Agonisten GR 63799X konnte nach myokardialer Ischämie ebenfalls eine Senkung der Herzfrequenz beschrieben werden (Zacharowski *et al.*, 1999a), was sich bei einer Behandlung mit diesem EP<sub>3</sub>-Agonisten positiv auf das Herz auswirken würde. In dieser Arbeit wurde auch eine Senkung der Herzfrequenz für den EP<sub>3</sub>-Agonisten M&B beschrieben. Die steht im Widerspruch zu den Befunden von Hohlfeld *et al.* ist (Hohlfeld *et al.*, 2000). Hier wurde keine Änderung der Herzfrequenz nach Ischämie/Reperfusion festgestellt. Ein dritter Agonist TEI-3356 zeigte keine hämodynamischen Veränderungen, weder vor noch nach Ischämie (Zacharowski *et al.*, 1999a). Weiterhin scheint keiner der EP<sub>3</sub>-Agonisten einen Einfluss auf den Blutdruck zu haben.

Nach einem akuten Myokard-Infarkt wird außerdem der koronare Blutfluß durch die Gabe von Nitraten und Calcium-Antagonisten erhöht. Die Wirkung eines EP<sub>3</sub>-Agonisten hierauf müsste geklärt werden. Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass der therapeutische Einsatz eines EP<sub>3</sub>-Agonisten wohl nur zusätzlich zur derzeit bestehenden Medikation erfolgen könnte.

Diese Arbeit liefert auch einen möglichen weiteren Erklärungsansatz für das erhöhte kardiovaskuläre Risiko der selektiven COX-2-Inhibitoren, die in der Vergangenheit kontrovers diskutiert wurden. Als Hauptursache für das erhöhte Risiko wird die erniedrigte PGI<sub>2</sub>-Konzentration angenommen. Daneben können noch weitere Wirkungen eine Rolle spielen. Durch Ischämie kommt es im Herzen zu einer Aufregulation der COX-2 (Schrör *et al.*, 1998), wodurch es zu einem Anstieg der endogenen PG-Synthese kommt, welche zur Kardioprotektion des Herzens zum Beispiel auch über den EP<sub>3</sub>-Rezeptor beitragen kann. Dieser Anstieg ist nach Gabe eines selektiven COX-2-Inhibitors nicht mehr möglich. Dadurch

ist die endogene Protektion als Mechanismus ausgeschaltet, was einen weiteren Erklärungsansatz für den Schaden dieser Arzneistoffgruppe bietet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine kardiale Überexpression des EP<sub>3</sub>-Rezeptors in der Maus zu einer Reduktion des ischämischen Schadens führt. Ob allerdings daraus eine klinische Anwendung resultieren könnte, bedarf noch weiterer grundlegender Untersuchungen.

# 5. Zusammenfassung

Das Herz verfügt über zahlreiche endogene Mechanismen, die vor Schäden durch Ischämie/Reperfusion schützen. Dazu zählt die Bildung von E-Typ Prostaglandinen. Diese vermitteln ihre Wirkung über spezifische G-Protein gekoppelte EP-Rezeptoren, von denen vier Subtypen unterschieden werden ( $EP_{1-4}$ ). Im Herzen spielt insbesondere der  $EP_3$ -Rezeptor eine entscheidende Rolle. Es konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass selektive Stimulation dieses Rezeptors durch einen spezifischen Agonisten zu einer Ischämieprotektion führt.

Unklar blieb hierbei der nachfolgende Signalweg ( $G_i$  oder  $G_q$ ), über den dieser Rezeptor seine Wirkung ausübt, sowie die zelluläre Lokalisation (Kardiomyozyten bzw. nicht-kardiozytäre Zellen). Daher wurde sowohl eine  $G_i/G_q$ -gekoppelte als auch eine nur  $G_i$ -gekoppelte Variante des EP<sub>3</sub>-Rezeptors in der Maus kardiomyozyten-spezifisch überexprimiert.

Zunächst wurde die  $G_i/G_q$ -gekoppelte Isoform des Rezeptors (EP<sub>3 B</sub>, porcin) in der Maus überexprimiert und wodurch man zwei stabile Linien erhielt. Die tg Tiere beider Linien zeigten eine ca. 50-fache Erhöhung der Rezeptordichte, wobei dieser Rezeptor konstitutiv aktiv war.

Ischämie/Reperfusions-Versuche in vitro ergaben, dass der EP<sub>3</sub>-Rezeptor in den tg Tieren einen erheblichen anti-ischämischen Effekt vermittelt, erkennbar an einer Reduktion der ischämischen Kontraktur und der Freisetzung biochemischer Marker der irreversiblen Zellschädigung. Eine Beteiligung mitochondrialer KATP-Kanäle konnte ausgeschlossen werden, vielmehr scheint der EP3-Rezeptor in der Lage zu sein, aufgrund der Gi-Protein-Kopplung der Ischämie-induzierten Katecholamin-Ausschüttung entgegen wirken zu können. Auch die Überexpression des Gi-gekoppelten EP<sub>3</sub>-Rezeptors (EP<sub>3 IV</sub>, human) ergab eine deutliche Ischämieprotektion in vitro. Eine Beteiligung der G<sub>q</sub>-vermittelten Signaltransduktion für den anti-ischämischen Effekt des EP3-Rezeptors ist somit unwahrscheinlich.

Darüber hinaus lieferte eine der Linien des porcinen EP<sub>3</sub>-Rezeptors Hinweise dafür, dass neben der Ischämieprotektion eine linksventrikuläre Hypertrophie induziert wird, der EP<sub>3</sub>-Rezeptor also auch ventrikuläre Hypertrophie vermittelt. In den Herzen dieser Mäuse konnte eine vermehrte Aktivität der Phosphatase Calcineurin nachgewiesen werden, die diese Hypertrophie erklären kann.

Kardiomyozytär konstitutiv aktive EP<sub>3</sub>-Rezeptoren sind damit über einen G<sub>i</sub>-mediierten Mechanismus maßgeblich an der Ischämieprotektion von Kardiomyozyten beteiligt, tragen darüber hinaus aber auch wesentlich zu Hypertrophie und Zellwachstum bei.

# 6. Literatur

- 1. Adderley, S. R. & Fitzgerald, D. J. (1999). Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *J.Biol.Chem.* **274**, 5038-5046.
- 2. Antos, C. L., Frey, N., Marx, S. O., Reiken, S., Gaburjakova, M., Richardson, J. A., Marks, A. R., & Olson, E. N. (2001). Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ.Res.* **89**, 997-1004.
- 3. Araki, H. & Lefer, A. M. (1980). Role of prostacyclin in the preservation of ischemic myocardial tissue in the perfused cat heart. *Circ.Res.* 47, 757-763.
- 4. Armstrong, S. C. (2004). Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc.Res.* **61**, 427-436.
- 5. Aronow, B. J., Toyokawa, T., Canning, A., Haghighi, K., Delling, U., Kranias, E., Molkentin, J. D., & Dorn, G. W. (2001). Divergent transcriptional responses to independent genetic causes of cardiac hypertrophy. *Physiol Genomics* **6**, 19-28.
- Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P., & Crabtree, G. R. (1997). Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275, 1930-1934.
- 7. Black, R. G., Jr., Guo, Y., Ge, Z. D., Murphree, S. S., Prabhu, S. D., Jones, W. K., Bolli, R., & Auchampach, J. A. (2002). Gene dosage-dependent effects of cardiac-specific overexpression of the A<sub>3</sub> adenosine receptor. *Circ.Res.* **91**, 165-172.
- 8. Blindt, R., Bosserhoff, A. K., vom, D. J., Hanrath, P., Schrör, K., Hohlfeld, T., & Meyer-Kirchrath, J. (2002). Activation of IP and EP(3) receptors alters cAMP-dependent cell migration. *Eur.J.Pharmacol.* **444**, 31-37.
- Camitta, M. G., Gabel, S. A., Chulada, P., Bradbury, J. A., Langenbach, R., Zeldin, D. C., & Murphy, E. (2001). Cyclooxygenase-1 and -2 knockout mice demonstrate increased cardiac ischemia/reperfusion injury but are protected by acute preconditioning. *Circulation* 104, 2453-2458.
- 10. Chaudhari, A., Pedram, A., & Kirschenbaum, M. A. (1990). Prostanoid biosynthesis in cultured rabbit renal microvascular smooth muscle cells. Effect of arachidonic acid, calcium, and A23187. *Lab Invest* **63**, 30-37.

- Condorelli, G., Drusco, A., Stassi, G., Bellacosa, A., Roncarati, R., Iaccarino, G., Russo, M. A., Gu, Y., Dalton, N., Chung, C., Latronico, M. V., Napoli, C., Sadoshima, J., Croce, C. M., & Ross, J., Jr. (2002). Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 12333-12338.
- Crackower, M. A., Oudit, G. Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., Sah, R., Cheng, H. Y., Rybin, V. O., Lembo, G., Fratta, L., Oliveira-dos-Santos, A. J., Benovic, J. L., Kahn, C. R., Izumo, S., Steinberg, S. F., Wymann, M. P., Backx, P. H., & Penninger, J. M. (2002). Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110, 737-749.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- De Windt, L. J., Lim, H. W., Taigen, T., Wencker, D., Condorelli, G., Dorn, G. W., Kitsis, R. N., & Molkentin, J. D. (2000). Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circ.Res.* 86, 255-263.
- 15. Dhalla, N. S., Elmoselhi, A. B., Hata, T., & Makino, N. (2000). Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc.Res.* **47**, 446-456.
- 16. Donato, M. & Gelpi, R. J. (2003). Adenosine and cardioprotection during reperfusionan overview. *Mol.Cell Biochem.* **251**, 153-159.
- 17. Dougherty, C., Barucha, J., Schofield, P. R., Jacobson, K. A., & Liang, B. T. (1998). Cardiac myocytes rendered ischemia resistant by expressing the human adenosine A<sub>1</sub> or A<sub>3</sub> receptor. *FASEB J.* **12**, 1785-1792.
- Eschenhagen, T., Mende, U., Nose, M., Schmitz, W., Scholz, H., Haverich, A., Hirt, S., Doring, V., Kalmar, P., Hoppner, W., & . (1992). Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein alpha subunit G<sub>i</sub> alpha-2 in human end-stage heart failure. *Circ.Res.* 70, 688-696.
- Fabre, J. E., Nguyen, M., Athirakul, K., Coggins, K., McNeish, J. D., Austin, S., Parise, L. K., FitzGerald, G. A., Coffman, T. M., & Koller, B. H. (2001). Activation of the murine EP<sub>3</sub> receptor for PGE<sub>2</sub> inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation. *J.Clin.Invest* 107, 603-610.
- 20. Fling, S. P. & Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal.Biochem.* **155**, 83-88.

- 21. Frey, N. & Olson, E. N. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu.Rev.Physiol* **65**, 45-79.
- 22. Fujii, T., Fujii, J., & Taniguchi, N. (2001). Augmented expression of peroxiredoxin VI in rat lung and kidney after birth implies an antioxidative role. *Eur.J.Biochem.* **268**, 218-225.
- 23. Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R. N., & Walsh, K. (2000). Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* **101**, 660-667.
- 24. Ghatpande, S., Goswami, S., Mascareno, E., & Siddiqui, M. A. (1999). Signal transduction and transcriptional adaptation in embryonic heart development and during myocardial hypertrophy. *Mol.Cell Biochem.* **196**, 93-97.
- 25. Hardt, S. E. & Sadoshima, J. (2004). Negative regulators of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc.Res.* **63**, 500-509.
- 26. Haustein, K. O., Fiehring, H., Oltmanns, G., & Femmer, K. (1979). On the clinical pharmacology of talinolol, a new beta 1-adrenoceptor blocking agent. *Int.J.Clin.Pharmacol.Biopharm.* **17**, 465-470.
- 27. Hohlfeld, T., Braun, M., Strobach, H., & Schrör, K. (1994). Protection of reperfused ischemic pig myocardium by nexopamil, a new combined Ca<sup>2+</sup> and serotonin antagonist. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **23**, 922-931.
- 28. Hohlfeld, T., Meyer-Kirchrath, J., Vogel, Y. C., & Schrör, K. (2000). Reduction of infarct size by selective stimulation of prostaglandin EP(3)receptors in the reperfused ischemic pig heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* **32**, 285-296.
- 29. Hohlfeld, T., Strobach, H., & Schrör, K. (1991). Stimulation of prostacyclin synthesis by defibrotide: improved contractile recovery from myocardial "stunning". *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **17**, 108-115.
- 30. Hohlfeld, T., Zucker, T. P., Meyer, J., & Schrör, K. (1997). Expression, function, and regulation of E-type prostaglandin receptors (EP<sub>3</sub>) in the nonischemic and ischemic pig heart. *Circ.Res.* **81**, 765-773.
- 31. Inagaki, K., Hahn, H. S., Dorn, G. W., & Mochly-Rosen, D. (2003). Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with delta-protein kinase C inhibitor and epsilon-protein kinase C activator. *Circulation* **108**, 869-875.

- 32. Jugdutt, B. I., Hutchins, G. M., Bulkley, B. H., & Becker, L. C. (1981). Dissimilar effects of prostacyclin, prostaglandin E<sub>1</sub>, and prostaglandin E<sub>2</sub> on myocardial infarct size after coronary occlusion in conscious dogs. *Circ.Res.* **49**, 685-700.
- Kirsch, G. E., Codina, J., Birnbaumer, L., & Brown, A. M. (1990). Coupling of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels to A<sub>1</sub> receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am.J.Physiol* 259, H820-H826.
- 34. Koetsier, P. A., Schorr, J., & Doerfler, W. (1993). A rapid optimized protocol for downward alkaline Southern blotting of DNA. *Biotechniques* **15**, 260-262.
- 35. Koretsune, Y. & Marban, E. (1990). Mechanism of ischemic contracture in ferret hearts: relative roles of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation and ATP depletion. *Am.J.Physiol* **258**, H9-16.
- 36. Kotani, M., Tanaka, I., Ogawa, Y., Usui, T., Mori, K., Ichikawa, A., Narumiya, S., Yoshimi, T., & Nakao, K. (1995). Molecular cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype generated by alternative messenger RNA splicing: multiple second messenger systems and tissue-specific distributions. *Mol.Pharmacol.* 48, 869-879.
- 37. Kotani, M., Tanaka, I., Ogawa, Y., Usui, T., Tamura, N., Mori, K., Narumiya, S., Yoshimi, T., & Nakao, K. (1997). Structural organization of the human prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor subtype gene (PTGER3). *Genomics* **40**, 425-434.
- 38. LaPointe, M. C., Mendez, M., Leung, A., Tao, Z., & Yang, X. P. (2004). Inhibition of cyclooxygenase-2 improves cardiac function after myocardial infarction in the mouse. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **286**, H1416-H1424.
- 39. Le Corvoisier, P., Park, H. Y., Carlson, K. M., Marchuk, D. A., & Rockman, H. A. (2003). Multiple quantitative trait loci modify the heart failure phenotype in murine cardiomyopathy. *Hum.Mol.Genet.* **12**, 3097-3107.
- 40. Liang, Q., De Windt, L. J., Witt, S. A., Kimball, T. R., Markham, B. E., & Molkentin, J. D. (2001). The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* **276**, 30245-30253.
- 41. Limas, C. J. & Cohn, J. N. (1973). Isolation and properties of myocardial prostaglandin synthetase. *Cardiovasc.Res.* **7**, 623-628.
- 42. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275.

- 43. Ma, H., Hara, A., Xiao, C. Y., Okada, Y., Takahata, O., Nakaya, K., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Narumiya, S., & Ushikubi, F. (2001). Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(3). *Circulation* **104**, 1176-1180.
- 44. MacLellan, W. R. & Schneider, M. D. (2000). Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu.Rev.Physiol* **62**, 289-319.
- 45. McMullen, J. R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M. C., Kang, P. M., & Izumo, S. (2003). Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 12355-12360.
- 46. Mende, U., Semsarian, C., Martins, D. C., Kagen, A., Duffy, C., Schoen, F. J., & Neer, E. J. (2001). Dilated cardiomyopathy in two transgenic mouse lines expressing activated G protein alpha(q): lack of correlation between phospholipase C activation and the phenotype. *J.Mol.Cell Cardiol.* **33**, 1477-1491.
- 47. Mendez, M. & LaPointe, M. C. (2002). Trophic effects of the cyclooxygenase-2 product prostaglandin E(2) in cardiac myocytes. *Hypertension* **39**, 382-388.
- 48. Meyer-Kirchrath, J., Kuger, P., Hohlfeld, T., & Schrör, K. (1998). Analysis of a porcine EP<sub>3</sub>-receptor: cloning, expression and signal transduction. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **358**, 160-167.
- 49. Molderings, G. J., Likungu, J., & Gothert, M. (1998). Modulation of noradrenaline release from the sympathetic nerves of human right atrial appendages by presynaptic EP<sub>3</sub>- and DP-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **358**, 440-444.
- 50. Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R., & Olson, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-228.
- 51. Mori, T., Chen, Y. F., Feng, J. A., Hayashi, T., Oparil, S., & Perry, G. J. (2004). Volume overload results in exaggerated cardiac hypertrophy in the atrial natriuretic peptide knockout mouse. *Cardiovasc.Res.* **61**, 771-779.
- 52. Narumiya, S., Sugimoto, Y., & Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* **79**, 1193-1226.
- Negishi, M., Hasegawa, H., & Ichikawa, A. (1996). Prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub>gamma isoform, with mostly full constitutive G<sub>i</sub> activity and agonist-dependent G<sub>s</sub> activity. *FEBS Lett.* 386, 165-168.

- 54. Neumann, J., Schmitz, W., Scholz, H., von Meyerinck, L., Doring, V., & Kalmar, P. (1988). Increase in myocardial G<sub>i</sub>-proteins in heart failure. *Lancet* **2**, 936-937.
- 55. Nürnberg, B. (2004). Classification and functional properties of G alpha subunits. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**, 577-626.
- 56. Okumura, H., Nagaya, N., Itoh, T., Okano, I., Hino, J., Mori, K., Tsukamoto, Y., Ishibashi-Ueda, H., Miwa, S., Tambara, K., Toyokuni, S., Yutani, C., & Kangawa, K. (2004). Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation* 109, 242-248.
- 57. Oudot, F., Grynberg, A., & Sergiel, J. P. (1995). Eicosanoid synthesis in cardiomyocytes: influence of hypoxia, reoxygenation, and polyunsaturated fatty acids. *Am.J.Physiol* **268**, H308-H315.
- 58. Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkela, R., & Ruskoaho, H. (2004). GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc.Res.* **63**, 196-207.
- Rabilloud, T., Heller, M., Gasnier, F., Luche, S., Rey, C., Aebersold, R., Benahmed, M., Louisot, P., & Lunardi, J. (2002). Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *J.Biol.Chem.* 277, 19396-19401.
- 60. Rasmanis, G., Vesterqvist, O., Green, K., Edhag, O., & Henriksson, P. (1991). Prostacyclin production in myocardial infarction in the acute phase and during followup. *J.Intern.Med.* **229**, 135-141.
- 61. Rau, T., Nose, M., Remmers, U., Weil, J., Weissmuller, A., Davia, K., Harding, S., Peppel, K., Koch, W. J., & Eschenhagen, T. (2003). Overexpression of wild-type Galpha(i)-2 suppresses beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J.* **17**, 523-525.
- Redfern, C. H., Degtyarev, M. Y., Kwa, A. T., Salomonis, N., Cotte, N., Nanevicz, T., Fidelman, N., Desai, K., Vranizan, K., Lee, E. K., Coward, P., Shah, N., Warrington, J. A., Fishman, G. I., Bernstein, D., Baker, A. J., & Conklin, B. R. (2000). Conditional expression of a Gi-coupled receptor causes ventricular conduction delay and a lethal cardiomyopathy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 4826-4831.
- 63. Ritchie, R. H., Rosenkranz, A. C., Huynh, L. P., Stephenson, T., Kaye, D. M., & Dusting, G. J. (2004). Activation of IP prostanoid receptors prevents cardiomyocyte hypertrophy via cAMP-dependent signaling. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **287**, H1179-H1185.

- 64. Rousou, A. J., Ericsson, M., Federman, M., Levitsky, S., & McCully, J. D. (2004). Opening of mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels enhances cardioprotection through the modulation of mitochondrial matrix volume, calcium accumulation, and respiration. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **287**, H1967-H1976.
- 65. Schaub, M. C., Hefti, M. A., Harder, B. A., & Eppenberger, H. M. (1997). Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J.Mol.Med.* **75**, 901-920.
- 66. Schrör, K. (2004). Eicosanoid generation and effects in cardiac muscle and coronary vessels. In *The eicosanoids*, ed. Peter Curtis-Pior, pp. 393-404. John Wiley and Sons, Chichester.
- 67. Schrör, K., Addicks, K., Darius, H., Ohlendorf, R., & Rosen, P. (1981). PGI<sub>2</sub> inhibits ischemia-induced platelet activation and prevents myocardial damage by inhibition of catecholamine release from adrenergic nerve terminals. Evidence for cAMP as common denominator. *Thromb.Res.* **21**, 175-180.
- 68. Schrör, K., Darius, H., Addicks, K., Koster, R., & Smith, E. F., III (1982). PGI<sub>2</sub> prevents ischemia-induced alterations in cardiac catecholamines without influencing nerve-stimulation-induced catecholamine release in nonischemic conditions. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **4**, 741-748.
- 69. Schrör, K., Zimmermann, K. C., & Tannhäuser, R. (1998). Augmented myocardial ischaemia by nicotine-mechanisms and their possible significance. *Br.J.Pharmacol.* **125**, 79-86.
- Shioi, T., Kang, P. M., Douglas, P. S., Hampe, J., Yballe, C. M., Lawitts, J., Cantley, L. C., & Izumo, S. (2000). The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* 19, 2537-2548.
- 71. Shioi, T., McMullen, J. R., Kang, P. M., Douglas, P. S., Obata, T., Franke, T. F., Cantley, L. C., & Izumo, S. (2002). Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol.Cell Biol.* **22**, 2799-2809.
- Shoji, Y., Takahashi, M., Kitamura, T., Watanabe, K., Kawamori, T., Maruyama, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Narumiya, S., Sugimura, T., & Wakabayashi, K. (2004). Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> during colon cancer development. *Gut* 53, 1151-1158.
- 73. Skalhegg, B. S. & Tasken, K. (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* **5**, D678-D693.

- 74. Smith, W. L. (1989). The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem.J.* **259**, 315-324.
- 75. Smits, G. J., McVey, M., Cox, B. F., Perrone, M. H., & Clark, K. L. (1998). Cardioprotective effects of the novel adenosine A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub> receptor agonist AMP 579 in a porcine model of myocardial infarction. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 286, 611-618.
- Steiner, A. L., Parker, C. W., & Kipnis, D. M. (1972). Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. *J.Biol.Chem.* 247, 1106-1113.
- 77. Strasser, R. H., Krimmer, J., Braun-Dullaeus, R., Marquetant, R., & Kubler, W. (1990a). Dual sensitization of the adrenergic system in early myocardial ischemia: independent regulation of the beta-adrenergic receptors and the adenylyl cyclase. *J.Mol.Cell Cardiol.* **22**, 1405-1423.
- Strasser, R. H., Marquetant, R., & Kubler, W. (1990b). Independent sensitization of beta-adrenoceptors and adenylate cyclase in acute myocardial ischaemia. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **30 Suppl 1**, 27S-35S.
- 79. Swynghedauw, B. (1999). Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* **79**, 215-262.
- 80. Thiemermann, C. & Zacharowski, K. (2000). Selective activation of E-type prostanoid(3)-receptors reduces myocardial infarct size. A novel insight into the cardioprotective effects of prostaglandins. *Pharmacol.Ther.* **87**, 61-67.
- 81. Vatner, D. E., Young, M. A., Knight, D. R., & Vatner, S. F. (1990). Beta-receptors and adenylate cyclase: comparison of nonischemic, ischemic, and postmortem tissue. *Am.J.Physiol* **258**, H140-H144.
- 82. Vesper, A. & Schrör, K. (1995). The cardioprotective actions of iloprost in myocardial ischemia of the rabbit can be separated from its vasodilatory effects mediated by K<sub>ATP</sub>(+)-channel opening. *Agents Actions Suppl* **45**, 93-99.
- Wang, X., Phelan, S. A., Forsman-Semb, K., Taylor, E. F., Petros, C., Brown, A., Lerner, C. P., & Paigen, B. (2003). Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J.Biol.Chem.* 278, 25179-25190.
- 84. Wilkins, B. J. & Molkentin, J. D. (2002). Calcineurin and cardiac hypertrophy: where have we been? Where are we going? *J.Physiol* **541**, 1-8.

- 85. Woditsch, I. & Schrör, K. (1992). Prostacyclin rather than endogenous nitric oxide is a tissue protective factor in myocardial ischemia. *Am.J.Physiol* **263**, H1390-H1396.
- Xiao, C. Y., Hara, A., Yuhki, K., Fujino, T., Ma, H., Okada, Y., Takahata, O., Yamada, T., Murata, T., Narumiya, S., & Ushikubi, F. (2001). Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia-reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors. *Circulation* 104, 2210-2215.
- 87. Xiao, C. Y., Yuhki, K., Hara, A., Fujino, T., Kuriyama, S., Yamada, T., Takayama, K., Takahata, O., Karibe, H., Taniguchi, T., Narumiya, S., & Ushikubi, F. (2004). Prostaglandin E<sub>2</sub> protects the heart from ischemia-reperfusion injury via its receptor subtype EP<sub>4</sub>. *Circulation* 109, 2462-2468.
- Yabe, K., Nasa, Y., & Takeo, S. (1995). Hypoxic preconditioning in isolated rat hearts: non-involvement of activation of adenosine A<sub>1</sub> receptor, G<sub>i</sub> protein, and ATPsensitive K<sup>+</sup> channel. *Heart Vessels* 10, 294-303.
- 89. Yamamoto, T., Habuchi, Y., Tanaka, H., Suto, F., Morikawa, J., Kashima, K., & Yoshimura, M. (1999). EP receptor-mediated inhibition by prostaglandin E(1) of cardiac L-type Ca(2+) current of rabbits. *Am.J.Physiol* **277**, H1369-H1374.
- Yun, J., Zuscik, M. J., Gonzalez-Cabrera, P., McCune, D. F., Ross, S. A., Gaivin, R., Piascik, M. T., & Perez, D. M. (2003). Gene expression profiling of alpha(1b)adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy by oligonucleotide arrays. *Cardiovasc.Res.* 57, 443-455.
- Zacharowski, K., Olbrich, A., Otto, M., Hafner, G., & Thiemermann, C. (1999a). Effects of the prostanoid EP<sub>3</sub>-receptor agonists M&B 28767 and GR 63799X on infarct size caused by regional myocardial ischaemia in the anaesthetized rat. *Br.J.Pharmacol.* **126**, 849-858.
- 92. Zacharowski, K., Olbrich, A., & Thiemermann, C. (1999b). Reduction of myocardial injury by the EP<sub>3</sub> receptor agonist TEI-3356. Role of protein kinase C and of K(ATP)-channels. *Eur.J.Pharmacol.* **367**, 33-39.
- Zhang, Z., Vezza, R., Plappert, T., McNamara, P., Lawson, J. A., Austin, S., Pratico, D., Sutton, M. S., & FitzGerald, G. A. (2003). COX-2-dependent cardiac failure in Gh/tTG transgenic mice. *Circ.Res.* 92, 1153-1161.
- Zhao, T. C. & Kukreja, R. C. (2003). Protein kinase C-delta mediates adenosine A<sub>3</sub> receptor-induced delayed cardioprotection in mouse. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 285, H434-H441.

95. Zou, Y., Komuro, I., Yamazaki, T., Kudoh, S., Uozumi, H., Kadowaki, T., & Yazaki, Y. (1999). Both G<sub>s</sub> and G<sub>i</sub> proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J.Biol.Chem.* **274**, 9760-9770.

# 7. Veröffentlichungen

## Originalarbeiten:

Melanie Martin; Jutta Meyer-Kirchrath; Gernot Kaber; Christoph Jacoby; Ulrich Flögel; Jürgen Schrader; Ulrich Rüther; Karsten Schrör; Thomas Hohlfeld. Cardiospecific Overexpression of the Prostaglandin EP<sub>3</sub> Receptor Attenuates Ischemia-Induced Myocardial Injury *Circulation*. 2005 Jul 19;112(3):400-6

## Vorträge:

1) Martin, M., Meyer-Kirchrath, J., Jacoby, C., Flögel, U., Schrader, J., Schrör, K., Hohlfeld, T.;

Heart-Specific Overexpression of the EP<sub>3</sub> Prostaglandin Receptor Induces Left Ventricular Dysfunction. *Circulation* 2003 (Suppl): 975

2) M. Martin, J. Meyer-Kirchrath, G. Kaber, Chr. Jakoby, U. Flögel, J. Schrader, K. Schrör, T. Hohlfeld

Linksventrikuläre Dysfunktion durch kardiale Überexpression des EP<sub>3</sub> Prostaglandin Rezeptors in der Maus (V617).

Z Kardiol 93: Suppl 3 (2004).

70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 15.-17.04.2004, Mannheim

3) M. Martin, J. Meyer-Kirchrath, G. Kaber, C. Jacoby, U. Flögel, J. Schrader, U. Rüther, K. Schrör, T. Hohlfeld

Cardiospecific overexpression of the prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor attenuates ischemia-induced myocardial injury

Cardio-Visionen 2004, Verlag Ferdinand Schöningh Symposium der Nordrhein-Westfälischen Akademie der Wissenschaften 2004

4) M. Martin, G. Kaber, Chr. Jakoby, U. Flögel, J. Schrader, K. Schrör, T. Hohlfeld, J. Meyer-Kirchrath

Kardiospezifische Überexpression des Prostaglandin EP<sub>3</sub> Rezeptors reduziert die Schädigung des reperfundierten ischämischen Myokards

Zeitschrift für Kardiologie, Band 94, Supplement 1, 2005

71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 31.03-2.04.2005, Mannheim

5) M. Martin, G. Kaber, C. Jacoby, U. Flögel, J. Schrader, K. Schrör, T. Hohlfeld, J. Meyer-Kirchrath

Cardio-specific overexpression of prostaglandin  $\mathrm{EP}_3$  receptor reduces ischemia-reperfusion injury

Circulation 2005 (Suppl.): Vol. 112, No 17

### **Poster:**

M. Martin, J. Meyer-Kirchrath, G. Kaber, C. Jacoby, U. Flögel, J. Schrader, K. Schrör, T. Hohlfeld.

Cardio-specific Prostaglandin EP<sub>3</sub> Receptor overexpression induces servere left ventricular dysfunction.

*Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmakology.* Volume 371. Supplement 1. February 2005

46th Spring Meeting

Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie 15-17 March 2005, Mainz

# 8. Danksagung

Prof. Dr. K. Schrör danke ich für die Überlassung des Themas, für die Betreuung 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 Generierung der transgenen Mäuse an die Mitarbeiter seines Instituts.

Prof. Dr. T. Hohlfeld und PD Dr. J. Meyer-Kirchrath danke ich für die freundliche Unterstützung, anregenden Diskussionen, zahlreichen Ratschläge und eine gute Zusammenarbeit im Rahmen des SFB-Projekts, das diese Arbeit ermöglicht hat.

Prof. Dr. J. Schrader danke ich für die Unterstützung seitens seines Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie, ein besonderer Dank gilt Dr. U. Flögel und Dr. C. Jacoby für die Durchführung der MRI und Dr. M. Reinhartz für die Herstellung der 2D-Gele.

Bärbel Reupert, Kerstin Freidel und Kirsten Bartkowski danke ich für die technische Assistenz und für ihre herzliche Unterstützung und die ein oder andere Zigarettenpause.

Erika Lohman und Karin Montag danke ich herzlich für die Organisation des Institutslebens und die stetige Hilfbereitschaft bei Dienstreisevorbereitung, Reisekostenabrechnungen und Materialbestellung. Darüber hinaus für zahlreiche Kekse.

Den lieben Kollegen möchte ich für das wirklich nette Arbeitsklima und nette Abende im Cocomo ("der Kasten bleibt sauber") danken.

Meiner Familie danke ich für ihre jahrelange Unterstützung, ohne die ich heute nicht an dieser Stelle wäre, mein wärmster Dank gilt meiner Schwester Eva für ihre jederzeit verfügbare mentale Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Gunnar bedanken, der mich während dieser Zeit begleitet und mich auch in den anstrengenden Phasen unterstützt hat.

# 9. Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfen angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

(Melanie Martin)

# 10. Lebenslauf

#### **Persönliche Daten**

Melanie Martin geboren am 20.05.1978

### Ausbildung

Ab Okt. 2002

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Promotion am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie Titel der Arbeit: Kardiospezifische Überexpression des EP<sub>3</sub>-Prostaglandin-Rezeptors im Mausmodell

Okt. 1997-Okt. 2002

Philipps-Universität Marburg Hochschulstudium der Biologie Diplomarbeit: Detektion hypothalamischer Neuropeptide im ZNS von *Phodopus sungorus* Schwerpunkte im Hauptstudium: Tierphysiologie, Genetik, spezielle Zoologie

- 1994 1997 städt. Gymnasium Essen-Werden
- Juni 1997 Abitur
- 1988 1994 städt. Gymnasium Ratingen
- 1984 1988 städt. Grundschule Ratingen-Hösel

Düsseldorf, den