

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Martin J. Lohse

Der Einfluss von RKIP auf die Progression von Herzinsuffizienz

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Katrin Kahlert
aus Göttingen**

Würzburg, Februar 2016



Referentin:

Prof. Dr. Kristina Lorenz

Koreferent bzw. Koreferentin:

Priv.-Doz. Dr. Peter Nordbeck

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Dienstag, 23. August 2016

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Problematik der Herzinsuffizienz.....	1
1.1.1 Definition.....	2
1.1.2 Pathogenese.....	2
1.1.3 Prinzipien der pharmakologischen Therapie.....	4
1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR).....	6
1.2.1 Die Familie der GPCR.....	6
1.2.2 Die Desensibilisierung von GPCR-Signalen.....	8
1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK).....	10
1.3.1 Die Familie der GRK.....	10
1.3.2 Die Rolle von GRK2 im kardiovaskulären System.....	12
1.4 Das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP).....	14
1.4.1 Aufbau, Funktion und Regulation von RKIP.....	14
1.4.2 Die Rolle von RKIP bei physiologischen Prozessen und im kardiovaskulären System.....	15
1.5 Zielsetzung.....	17
2 Material	19
2.1 Versuchstiere.....	19
2.2 Humane Myokardbiopsien.....	19
2.3 Antikörper.....	20
2.4 Oligonukleotidprimer.....	20
2.5 Puffer, Lösungen und Medien.....	21
2.6 Chemikalien.....	22
2.7 Geräte.....	23
2.8 Verbrauchsmaterial.....	23

3 Methoden	25
3.1 Histologische Methoden	25
3.1.1 Anfertigung von Paraffinschnitten	25
3.1.2 Histochemische Färbungen	25
3.1.2.1 Sirius Rot-Kollagenfärbung	25
3.1.2.2 TUNEL-Assay	26
3.2 Proteinbiochemische Methoden	28
3.2.1 Quantifizierung der Proteinexpression	28
3.2.1.1 Herstellung von Proteinlysaten	28
3.2.1.2 Quantifizierung der Proteinkonzentration in Lysaten	28
3.2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
3.2.1.4 <i>Westernblot</i>	29
3.2.1.5 Immundetektion der immobilisierten Proteine	29
3.3 Molekularbiologische Methoden	30
3.3.1 Quantifizierung der mRNA-Expression mittels <i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion (<i>real-time</i> PCR)	30
3.3.1.1 Isolation und Quantifizierung von mRNA	30
3.3.1.2 Umschreiben der RNA in komplementäre DNA	31
3.3.1.3 Prinzip und Durchführung der <i>real-time</i> PCR	31
3.3.1.4 Auswertung der <i>real-time</i> PCR	33
3.3.2 Caspase-Assay	33
3.4 Physiologische Methoden	34
3.4.1 Organentnahme	34
3.4.2 Ligation der <i>Aorta transversa</i> (TAC)	34
3.4.3 Echokardiographie	35
3.5 Statistik	35
4 Ergebnisse	37
4.1 Die Expression von RKIP ist bei Herzinsuffizienz und Aortenstenose gesteigert	37
4.2 Die herzspezifische Überexpression von RKIP bewirkt dauerhaft eine verbesserte Herzfunktion in Mäusen	39
4.3 RKIP schützt vor durch TAC induzierter Herzinsuffizienz	41
4.3.1 RKIP schützt vor Verschlechterung der Herzfunktion	41
4.3.2 RKIP schützt vor kardialer Apoptose	44

4.3.3	RKIP schützt vor kardialer interstitieller Fibrose	46
4.3.4	RKIP beeinflusst die Expression der Herzinsuffizienzmarker BNP und ANF	49
5	Diskussion.....	51
5.1	Welche Funktion hat RKIP bei Herzinsuffizienz?.....	51
5.2	Die Expression von RKIP in humanem und murinem Herzgewebe unter kardialen Stressbedingungen	51
5.3	RKIP induziert einen gut tolerierten hyperkontraktilen Phänotyp in Mäusen	52
5.4	Die Ligation der <i>Aorta transversa</i> (TAC) bewirkt in C57BL/6J- Mäusen einen herzinsuffizienten Phänotyp	54
5.5	Die herzspezifische RKIP-Überexpression hat protektive Effekte im murinen Herzinsuffizienzmodell TAC	56
5.5.1	RKIP schützt vor Verschlechterung der Herzfunktion	56
5.5.2	RKIP schützt vor kardialer Apoptose und Fibrose	58
5.5.3	Die herzspezifische Überexpression von RKIP beeinflusst die Expression der Herzinsuffizienzmarker ANF und BNP	60
5.6	Inhibitoren der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2 (GRK2).....	62
5.7	Ausblick.....	65
6	Zusammenfassung	67
7	Literaturverzeichnis.....	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors.....	6
Abbildung 2:	Aktivierung eines GPCR und Interaktion mit einem G-Protein.....	8
Abbildung 3:	Homologe Desensibilisierung eines GPCR durch GRK2.....	9
Abbildung 4:	Modell der gesteigerten Kardiomyozytenkontraktilität durch RKIP-GRK2-Interaktion.....	16
Abbildung 5:	Protein-Expression von RKIP in Wildtyp-Mäusen nach drei Wochen TAC.....	37
Abbildung 7:	Protein-Expression von RKIP bei Herzinsuffizienz	38
Abbildung 8:	Protein-Expression von RKIP bei Aortenstenose	39
Abbildung 9:	Verkürzungsfraction von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen	40
Abbildung 10:	Überleben von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen	40
Abbildung 11:	Verkürzungsfraction von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen unter basalen Bedingungen und nach drei Wochen TAC.....	42
Abbildung 12:	Überleben von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen nach drei Wochen TAC.....	44
Abbildung 13:	Analyse der Kardiomyozytenapoptose in Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen mittels TUNEL-Assay	45
Abbildung 14:	Analyse der Kardiomyozytenapoptose in Herzen von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen mittels Caspase-Assay	46
Abbildung 15:	Analyse der kardialen interstitiellen Fibrose mittels Sirius-Rot-Kollagenfärbung	47
Abbildung 16:	mRNA-Expression verschiedener Fibrosemarker in Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen.....	49
Abbildung 17:	mRNA-Expression von BNP und ANF in Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen.....	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Antikörper	20
Tabelle 2:	Oligonukleotide	20
Tabelle 3:	Puffer, Lösungen und Medien	21
Tabelle 4:	Geräte	23
Tabelle 5:	Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 6:	Echokardiographische Charakterisierung von Wildtyp- Mäusen und RKIP-tg-Mäusen nach drei Wochen TAC.....	43

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (<i>engl. angiotensin-converting enzyme</i>)
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
BCA	Bicinchoninsäure (<i>engl. bicinchoninic acid</i>)
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>engl. cyclic adenosine monophosphate</i>)
Caspase	<i>engl. cysteine aspartic acid-specific protease</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>engl. complementary DNA</i>)
CML	Chronische myeloische Leukämie
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNase	Desoxyribonuklease
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
FS	Verkürzungsfraction (<i>engl. fractional shortening</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanindiphosphat
GTP	Guanintriphosphat
GIRK	G-Protein-gekoppelter einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
HI	Herzinsuffizienz
IVS	Interventrikuläre septale Wandstärke
LTCC	L-Typ Calciumkanal (<i>engl. L-type calcium channel</i>)
LVID	Linksventrikulärer innerer Durchmesser

LVPW	Linksventrikuläre posteriore Wandstärke
mRNA	Boten-RNA (<i>engl. messenger RNA</i>)
MS	Mitralstenose
NCD	nicht übertragbare Erkrankung (<i>engl. non communicable disease</i>)
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
NF κ B	Nukleärer Faktor kappa B
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEBP	Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein
PI	Proteaseinhibitor
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RhoGEF	Rho-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
RNAse	Ribonuklease
RKIP	Raf Kinase Inhibitor Protein
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>engl. sodium dodecyl sulfate</i>)
TAC	Ligation der <i>Aorta transversa</i>
Tdt	<i>engl. terminal desoxynucleotidyl transferase</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α)
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>engl. World Health Organization</i>)
wt	Wildtyp

1 Einleitung

Das Funktionieren eines Organismus beruht auf dem Zusammenwirken unzähliger Signalwege und der Interaktion tausender Proteine. Ein komplexes molekulares Netz bewirkt den reibungslosen Ablauf physiologischer Prozesse. Die Störung dieses Zusammenspiels kann eine ursächliche Rolle bei Erkrankungen spielen.

Man nimmt an, dass bei Herzinsuffizienz die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Signalgebung (GPCR-Signalgebung) verändert und dies mitverantwortlich für eine gestörte kardiale Kontraktilität ist. Das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP), ein Regulatorprotein wichtiger Signalkaskaden, interagiert unter anderem mit der für die GPCR-Signalgebung wichtigen G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase 2 (GRK2) und könnte eine protektive Wirkung bei Herzinsuffizienz haben. Im Folgenden sollen die Problematik der Herzinsuffizienz und die bereits bekannten molekularen Zusammenhänge über RKIP und GRK2 vorgestellt werden.

1.1 Die Problematik der Herzinsuffizienz

Nicht übertragbare Erkrankungen stellen weltweit laut aktuellem „*Global Status Report on noncommunicable diseases 2014*“ der „*World Health Organization*“ die häufigste Todesursache dar. Mit über 30 % sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen vor malignen Erkrankungen die vorherrschende Todesursache und ein weiterer Anstieg dieser Zahl in den kommenden Jahren ist zu erwarten (Dietel et al. 2012, Mendis 2014, WHO 2014). Die zu den kardiovaskulären Erkrankungen zählende koronare Herzkrankheit und arterielle Hypertonie sind die häufigsten der Herzinsuffizienz vorausgehenden Krankheiten (Ho et al. 1993, Dietel et al. 2012).

Die „*Framingham Heart Study*“ ist eine Langzeitstudie über die Epidemiologie und die Ursachen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die im Zeitraum von 1948 bis 1988 durchgeführt wurde. Sie ermittelte einen rasanten Anstieg der Prävalenz von Herzinsuffizienz mit zunehmendem Alter. Für Männer stieg die Prävalenz von 0,8 % bei 50- bis 59-Jährigen auf 6,6 % bei 80- bis 89-Jährigen.

Frauen zeigten in den gleichen Altersgruppen einen Anstieg von 0,8 % auf 7,9 %. Die mittlere Überlebensdauer nach Diagnosestellung lag für Männer bei 1,66 Jahren und für Frauen bei 3,17 Jahren, das 5-Jahres-Überleben bei unter 40 % (Ho et al. 1993). Ähnliche Trends wurden in der „*Rotterdam Study*“ ermittelt, einer weiteren Langzeitstudie zur Epidemiologie der Herzinsuffizienz, die zwischen 1989 und 2000 durchgeführt wurde (Bleumink et al. 2004).

1.1.1 Definition

Die „*European Society of Cardiology*“ definiert Herzinsuffizienz in ihren Leitlinien klinisch als ein Syndrom, welches als Folge einer Störung der kardialen Struktur oder Funktion auftritt, und mit der Unfähigkeit des Herzens einhergeht, die peripheren Gewebe adäquat mit Sauerstoff zu versorgen. Das klinische Bild ist vielfältig und differiert je nach zu Grunde liegender Ursache. Es manifestieren sich klinische Symptome wie zum Beispiel Luftnot, Knöchel-Ödeme und Müdigkeit, und es zeigen sich Krankheitszeichen wie zum Beispiel ein erhöhter Jugularvenenpuls und Rasselgeräusche in der Lunge (Dickstein et al. 2008, McMurray et al. 2012).

Häufig ist die Ursache von Herzinsuffizienz eine myokardiale Erkrankung, die zu einer ventrikulären systolischen Dysfunktion führt. Von der systolischen Herzinsuffizienz beziehungsweise der Herzinsuffizienz mit verminderter Ejektionsfraktion unterscheidet man die Herzinsuffizienz mit erhaltener oder leicht verminderter Ejektionsfraktion (McMurray et al. 2012).

Die NYHA-Stadien („*New York Heart Association*“-Stadien) ermöglichen eine Einteilung des Schweregrades von Herzinsuffizienz anhand der symptomatischen Einschränkung bei körperlicher Aktivität. Im NYHA-Stadium I sind Patienten unter körperlicher Aktivität beschwerdefrei, im NYHA-Stadium IV bestehen in Ruhe Beschwerden wie zum Beispiel Luftnot (McMurray et al. 2012).

1.1.2 Pathogenese

Die Pathogenese der Herzinsuffizienz mit eingeschränkter Ejektionsfraktion ist weitgehend bekannt (Aktories et al. 2009, Dietel et al. 2012). Ein insuffizientes

Herz weist eine gestörte Herzkontraktion auf. Aus der häufig damit einhergehenden verminderten Pumpleistung des Herzens resultiert eine nicht adäquate Sauerstoffversorgung des Stoffwechsels und der peripheren Organe sowie ein Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks. Im Anfangsstadium einer Herzinsuffizienz sind Patienten asymptomatisch oder symptomarm, weil Reflexmechanismen dem Sauerstoffdefizit vorübergehend entgegenwirken und unmittelbare Folgen des verminderten kardialen Auswurfes kompensieren. Der Körper reagiert mit funktionellen, neurohumoralen und morphologischen Anpassungsmechanismen: (1) Die verminderte Sauerstoffspannung im Blut und der Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks führen zur Reizung von Baro- und Chemorezeptoren mit der Folge einer gesteigerten Ausschüttung von Katecholaminen durch das sympathische Nervensystem. Aus der Aktivierung kardialer β -adrenerger Rezeptoren resultiert eine Steigerung von Herzfrequenz und Herzkontraktilität, was vorübergehend das Herzzeitvolumen aufrechterhält, aber langfristig zu einem ungünstig erhöhten Energieverbrauch führt. Die über α -Rezeptoren vermittelte periphere Vasokonstriktion führt zu erhöhtem venösen Rückstrom und erhöhtem ventrikulären Füllungsdruck. (2) Durch den mit dem geringen Auswurfvolumen verbundenen verminderten Blutdruck kommt es aufgrund einer abnehmenden Nierendurchblutung und einem verminderten glomerulären Filtrationsdruck zur Freisetzung von Renin in den Nieren. Über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wird eine periphere Vasokonstriktion, die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Aldosteron sowie über Angiotensin-1-Rezeptoren die Freisetzung von Katecholaminen vermittelt. (3) Der verminderte Blutdruck führt zudem zur Freisetzung des antidiuretischen Hormons (ADH) aus der Hypophyse mit dem Resultat einer vermehrten Wasserretention in den Nieren und einer Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes. (4) Durch die Freisetzung von atrialem natriuretischem Faktor (ANF) und B-Typ natriuretischem Peptid (BNP) sowie anderer vasodilatierender Moleküle wie Prostaglandinen oder Stickstoffmonoxid wird den Wirkungen von Renin und ADH vorübergehend entgegengearbeitet. Die zwei natriuretischen Peptide bewirken eine renale Salz- und Wasserausscheidung. Durch den gesteigerten venösen Rückstrom kommt es

zur Dehnung der Herzvorhöfe und einem Wachstumsreiz der Herzmuskelzellen sowie der Ausschüttung von ANF und BNP aus den Herzmuskelzellen (Aktories et al. 2009, Dietel et al. 2012).

Langfristig bewirken die Reflexmechanismen eine kardiale Strukturschädigung und Funktionseinschränkung. Zu den Veränderungen im Sinne des kardialen *Remodeling* zählen unter anderem Hypertrophie, Nekrose, Apoptose und Phagozytose von Kardiomyozyten, die Desensibilisierung β -adrenerger Rezeptoren, die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix und veränderte kontraktile Eigenschaften. Die mechanische Belastung der Kardiomyozyten sowie die Freisetzung von neurohumoralen Faktoren wie zum Beispiel Noradrenalin, inflammatorischer Zytokine wie zum Beispiel Tumor-Nekrose-Faktor und Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel Endothelin sind Auslöser der genannten Veränderungen (Dietel et al. 2012).

1.1.3 Prinzipien der pharmakologischen Therapie

Im Mittelpunkt der aktuellen Therapie der Herzinsuffizienz stehen die Verlängerung des Überlebens, die Besserung klinischer Symptome und die Verringerung der Hospitalisierung (McMurray et al. 2012). Die Pharmakotherapie besitzt neben nicht pharmakologischen Allgemeinmaßnahmen zur Reduktion von kardiovaskulären Risikofaktoren einen hohen Stellenwert in der Therapie der Herzinsuffizienz. Grundlage der medikamentösen Behandlung sind Kenntnisse über die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. Je nach Schweregrad und Verträglichkeit werden unterschiedliche Medikamentenkombinationen empfohlen.

Die Basis einer erfolgreichen Behandlung der chronischen systolischen Herzinsuffizienz stellt die Verringerung der Flüssigkeitsretention beziehungsweise die Normalisierung des Volumenstatus durch Diuretika wie zum Beispiel Thiazide dar. Bei Herzinsuffizienz mit verminderter Ejektionsfraktion sollte zudem mit einem *Angiotensin-converting enzyme*-Hemmer (ACE-Hemmer) beziehungsweise Angiotensin-I-Rezeptorantagonisten sowie einem β -Blocker behandelt werden. Über den Einsatz von ACE-Hemmern oder Angiotensin-I-Rezeptorantagonisten wird die RAAS vermittelte

Gefäßkonstriktion vermindert und das kardiale *Remodeling* positiv beeinflusst. β -Blocker wirken über die kompetitive Antagonisierung adrenerger Rezeptoren der dauerhaften Aktivierung des sympathischen Nervensystems entgegen, führen zur Regulation der Herzfrequenz und verbessern die Ejektionsfraktion. In ausgewählten Patientengruppen mit persistierenden Symptomen oder Progression der Herzinsuffizienz kommen weitere Medikamente zum Einsatz. Ivabradin wirkt Herzfrequenz-regulierend und kann bei Patienten mit Sinusrhythmus, verminderter Ejektionsfraktion ($\leq 35\%$) und Herzfrequenz $> 70/\text{min}$ eingesetzt werden, die unter adäquaten Dosen der anderen Medikamente (β -Blocker, ACE-Hemmer, Aldosteronantagonisten) persistierende Symptome zeigen. Zur Kontrolle der Ventrikelfrequenz bei persistierenden Symptomen und linksventrikulärer Dysfunktion (Ejektionsfraktion $\leq 45\%$) oder bei persistierendem Vorhofflimmern und linksventrikulärer Dysfunktion dienen Digitalisglykoside als Reservemittel, wenn β -Blocker nicht vertragen werden oder nicht ausreichend wirken. Der Einsatz von Amiodaron stellt eine weitere Möglichkeit zur Kontrolle der Ventrikelfrequenz bei Vorhofflimmern und linksventrikulärer Dysfunktion dar. Hydralazin und Isosorbiddinitrat sind als Alternative zu ACE-Hemmern oder als zusätzliches Therapeutikum bei Herzinsuffizienz mit verminderter Ejektionsfraktion in Erwägung zu ziehen. Bei nicht ausreichender Wirkung der medikamentösen Behandlung kommen apparative und operative Therapien wie zum Beispiel die Implantation eines Herzschrittmachers zur Verhinderung des plötzlichen Herztodes oder im Endstadium der Herzinsuffizienz eine Herztransplantation zum Einsatz. Zudem muss die medikamentöse Therapie bei bestehendem Thromboembolierisiko durch Vorhofflimmern und bei Komorbiditäten ausgeweitet werden (Aktories et al. 2009, Dietel et al. 2012, McMurray et al. 2012).

Einen besonderen Stellenwert in der Therapie der Herzinsuffizienz haben ACE-Hemmer und β -Blocker, da sie kombiniert positive Effekte auf kardiales *Remodeling*, Hospitalisierung und Lebenserwartung haben (Dietel et al. 2012). Ihre Wirkung wird über GPCR vermittelt, nämlich Angiotensin-1-Rezeptoren und β -Adrenozeptoren (Guo et al. 2001, Wallukat 2002).

1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

1.2.1 Die Familie der GPCR

Es besteht großes Potential für die Entwicklung von Medikamenten, die über GPCR wirken. Mehr als die Hälfte der modernen Medikamente wirken über GPCR (Flower 1999, Fredriksson et al. 2003).

Die Familie der GPCR ist die größte unter den Membranproteinen. Im menschlichen Genom sind über 800 verschiedene GPCR beschrieben. Viele extrazelluläre Stimuli, die auf eine Zelle einwirken wie zum Beispiel Hormone, Neurotransmitter, Chemokine oder Calciumionen, setzen ihre Signale mit Hilfe von GPCR um. Wichtige physiologische Prozesse wie zum Beispiel Sehen und Schmecken sind GPCR-kontrolliert (Pierce et al. 2002). Gemeinsame Strukturmerkmale von GPCR sind ein extrazellulärer Aminoterminus (N-Terminus), sieben hydrophobe transmembranäre Segmente und ein intrazellulärer Carboxyterminus (C-Terminus) (Kobilka 2007). Aufgrund der Struktur werden GPCR auch heptahelikale Rezeptoren genannt.

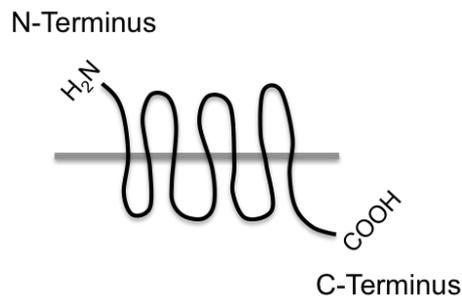


Abbildung 1: Struktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors

Vereinfachte Darstellung der GPCR-Struktur. Der G-Protein gekoppelte Rezeptor besitzt einen extrazellulären Aminoterminus (N-Terminus), sieben transmembranäre Segmente und einen intrazellulären Carboxy-Terminus (C-Terminus).

Die Bezeichnung G-Protein gekoppelter Rezeptor bezieht sich auf den ersten Teil des Signalzyklus, der für die Transduktion der Rezeptoraktivierung in das Zellinnere verantwortlich ist. Die Aktivierung eines GPCR führt zur Interaktion mit einem heterotrimeren G-Protein. G-Proteine besitzen eine α -Untereinheit, die eine Bindungsstelle für ein Guanin-Nukleotid aufweist, und je eine β - und eine γ -Untereinheit, die einen festen Verbund in Form eines Dimers darstellen.

Im inaktiven Zustand ist Guanindiphosphat (GDP) an die α -Untereinheit des G-Proteins gebunden. Die Aktivierung eines GPCR durch einen Liganden führt zum Austausch von GDP durch Guanintriphosphat (GTP) und zur anschließenden Dissoziation des G-Proteins in eine $G\alpha$ -GTP-Untereinheit und eine $G\beta\gamma$ -Untereinheit. Je nach Effektor der $G\alpha$ -Untereinheit werden vier Klassen von G-Proteinen unterschieden: $G\alpha_s$ aktivieren die Adenylylcyclase, $G\alpha_i$ inhibieren die Adenylylcyclase und aktivieren G-Protein-gekoppelte einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (GIRK), $G\alpha_q$ aktivieren die Phospholipase C, $G\alpha_{12}$ aktivieren Rho-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (RhoGEF). Die $G\beta\gamma$ -Untereinheit interagiert mit sekundären Botenstoffen und zum Beispiel G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen. Die Spaltung von GTP in GDP führt zur Reassoziierung von GDP an die $G\alpha$ -Untereinheit und zur Deaktivierung der Signaltransduktion. Regulatoren von G-Protein-Signalen (RGS) tragen zur Aktivierung der GTPase-Aktivität der α -Untereinheit und zur Hydrolyse von GTP bei (Pitcher et al. 1992, Hamm 1998, Bunemann and Hosey 1999, Ross and Wilkie 2000, Pierce et al. 2002).

Durch die Aktivierung eines GPCR kommt es zur massiven Signalamplifikation. Ein einziger GPCR aktiviert zum Beispiel um die hundert $G\alpha_s$ -Proteine, die jeweils eine Adenylylcyclase aktivieren. Während GTP an das $G\alpha_s$ -Molekül gebunden ist, katalysiert die Adenylylcyclase die Bildung einer großen Anzahl des sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), sodass mehrere hundert Moleküle cAMP gebildet werden (Lodish 2000). Ein Beispiel, dass auch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit für die Signalumsetzung eine essentielle Rolle spielt, ist die Fähigkeit zum Sehen im Dunkeln (Kolesnikov et al. 2011).

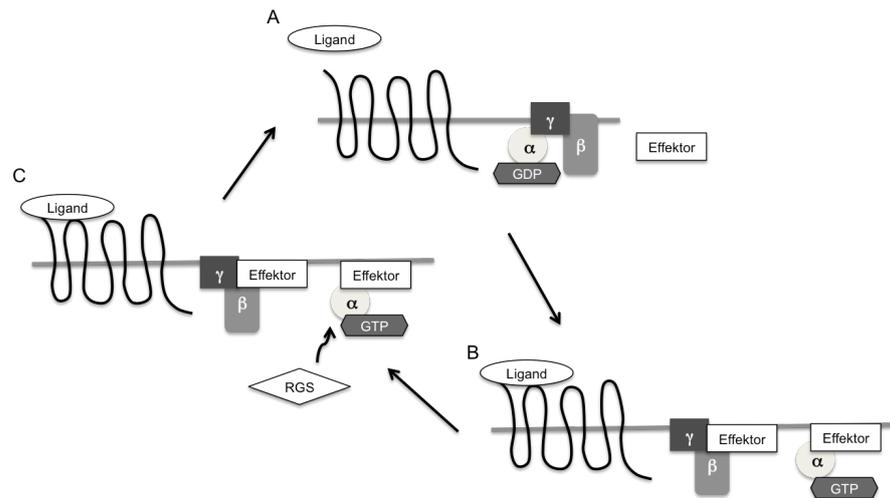


Abbildung 2: Aktivierung eines GPCR und Interaktion mit einem G-Protein
 Gezeigt ist eine vereinfachte Darstellung der GPCR-Aktivierung. **A** Im inaktiven Zustand ist GDP an die α -Untereinheit des G-Proteins gebunden. **B** Die Aktivierung des GPCR durch einen Liganden führt zum Austausch von GDP durch GTP und zur Hydrolyse des G-Proteins. Es kommt zur Interaktion der α -GTP-Untereinheit und des $\beta\gamma$ -Dimers mit Effektoren. **C** Regulatoren von G-Protein Signalen (RGS) tragen zur Aktivierung der GTPase-Eigenschaft der α -Untereinheit bei, sodass es zur Reassoziierung von GDP und G-Protein sowie zur Beendigung des Signalzyklus kommt.

1.2.2 Die Desensibilisierung von GPCR-Signalen

Ein wichtiger Mechanismus zur Steuerung von Stärke und Länge eines GPCR-Signals ist die Desensibilisierung. Das Vorhandensein eines extrazellulären Stimulus führt zeitabhängig zur Verminderung der Signalweiterleitung (Krupnick and Benovic 1998, Pitcher et al. 1998, Bunemann et al. 1999).

Die Unterbrechung der Signalkaskade kann auf Ebene des Rezeptors, des G-Proteins oder der Effektorproteine stattfinden (Bunemann and Hosey 1999). Man unterscheidet nach zeitlichem Auftreten die schnelle und die langsame Desensibilisierung, nach ursächlichem Stimulus die heterologe und die homologe Desensibilisierung und nach Mechanismus unter anderem die Funktionsunterbindung der GPCR-Signalgebung und die Abnahme der GPCR-Dichte in der Plasmamembran (Lohse 1993).

Die homologe Desensibilisierung stellt den schnellsten und quantitativ wichtigsten Mechanismus bei der Abschaltung von GPCR-vermittelten Signalen dar. Dieser Funktionsverlust innerhalb von Sekunden oder Minuten betrifft nur aktivierte, Rezeptor-besetzte GPCR und ist vermutlich Folge der

Phosphorylierung durch spezifische Rezeptorkinasen. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) (Benovic et al. 1986, Benovic et al. 1989, Benovic et al. 1991, Lohse 1993, Bunemann and Hosey 1999). Durch die GRK-induzierte Phosphorylierung des GPCR kommt es zur Bindung von β -Arrestin an den GPCR und die Interaktion zwischen G-Protein und Rezeptor wird unterbunden. Man nimmt an, dass β -Arrestin die Clathrin-abhängige Endozytose der GPCR in Endosomen bewirkt und die Rezeptorinternalisierung die Resensibilisierung des GPCR einleiten oder die Rezeptor-Desensibilisierung verursachen kann (Lohse et al. 1990, Lohse et al. 1992, Ferguson et al. 1996, Goodman et al. 1996, Krupnick and Benovic 1998). Die Vorstellung über den Ablauf der GRK-vermittelten Desensibilisierung konnte durch *in vitro*-Versuche erhärtet werden, die zeigten, dass die Überexpression von β -adrenergen Rezeptorkinasen (β ARK, GRK) beziehungsweise β -Arrestin zur gesteigerten homologen Desensibilisierung von β_2 -adrenergen Rezeptoren führte (Pippig et al. 1993).

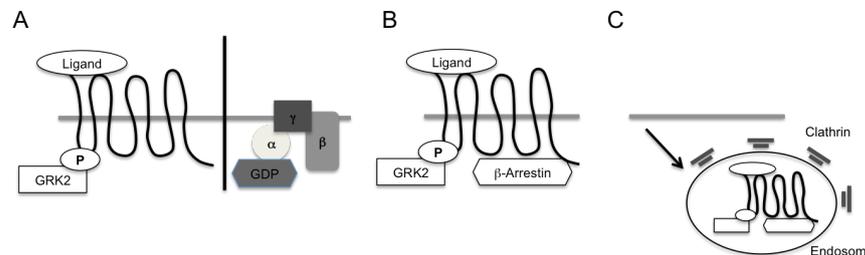


Abbildung 3: Homologe Desensibilisierung eines GPCR durch GRK2
 Gezeigt ist eine vereinfachte Darstellung der homologen Desensibilisierung eines GPCR. **A** Das längerfristige Vorhandensein eines Liganden führt zur Phosphorylierung des GPCR durch GRK2. Die Interaktion zwischen GPCR und G-Protein wird unterbunden. **B** Die GRK2-vermittelte Phosphorylierung führt zur Bindung von β -Arrestin. **C** β -Arrestin vermittelt die Clathrin-abhängige Endozytose des GPCR in Endosomen.

Eine wichtige Rolle bei der langsamen heterologen Desensibilisierung aktivierter und nicht aktivierter GPCR spielt die Rezeptor-Phosphorylierung durch Proteinkinasen, die durch sekundäre Botenstoffe aktiviert werden. Die Proteinkinase A und die Proteinkinase C vermitteln die Desensibilisierung der Rezeptoren vermutlich über die Phosphorylierung von Sequenzen innerhalb der

GPCR, die für deren Interaktion mit G-Proteinen wichtig sind (Pitcher et al. 1992, Lohse 1993).

Weitere Mechanismen, die zu einer abgeschwächten Rezeptorsignalgebung trotz vorhandenem Stimulus führen, sind die Rezeptordegradation zum Beispiel in Lysosomen oder die Regulation der GPCR-Transkription beziehungsweise der GPCR-Translation (Collins et al. 1991, Tsao and von Zastrow 2000, Pierce et al. 2002).

1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK)

1.3.1 Die Familie der GRK

GRK gehören zu den Serin/Threoninkinasen (Premont et al. 1995, Pitcher et al. 1998). Es existieren sieben GRK-Isoformen mit unterschiedlichen Expressionsmustern: Während GRK1 und GRK7 überwiegend in Photorezeptoren der Retina (Weller et al. 1975, Hisatomi et al. 1998, Weiss et al. 1998) und GRK4 hauptsächlich im Hoden exprimiert werden (Premont et al. 1996, Virlon et al. 1998), zeigen GRK2, GRK3, GRK5 und GRK6 eher ubiquitäre Expressionsmuster (Benovic et al. 1989, Benovic et al. 1991, Benovic and Gomez 1993, Kunapuli and Benovic 1993). Hinsichtlich sequenzieller und funktioneller Gemeinsamkeiten werden GRK in drei Gruppen unterteilt: GRK1-Gruppe (GRK1, GRK7), GRK2-Gruppe (GRK2, GRK3) und GRK4-Gruppe (GRK4, GRK5, GRK6) (Premont et al. 1999, Gurevich et al. 2012).

Der generelle strukturelle Aufbau ist bei allen GRK gleich: Die Proteine besitzen eine zentrale katalytische Domäne mit einer Länge von 263-266 Aminosäuren, die von einer aminoterminalen Domäne mit einer Länge von circa 185 Aminosäuren und einer in der Länge variierenden carboxyterminalen Domäne eingeschlossen ist (Pitcher et al. 1998). Dem N-Terminus, welcher innerhalb der GRK-Familie einen einheitlichen Aufbau zeigt, schließen sich eine homologe RGS-Domäne (*engl. regulator of G-Protein signaling*, RH) und eine Serin/Threonin-Proteinkinase-Domäne (KD) an (Gurevich et al. 2012). Der C-Terminus der verschiedenen GRK-Isoformern enthält Sequenzen, die für die Membrantranslokation verantwortlich gemacht werden (Gurevich et al. 2012):

GRK1 und GRK7 weisen zum Beispiel eine Prenylierungssequenz auf (Inglese et al. 1992, Hisatomi et al. 1998), GRK2 und GRK3 enthalten eine Pleckstrin-Homologie (PH) (Pitcher et al. 1992, DebBurman et al. 1995, Pitcher et al. 1998), GRK4 und GRK6 tragen Palmitoylierungsstellen (Stoffel et al. 1994, Premont et al. 1996) und GRK5 und GRK6 Lipid-bindende Elemente (Pitcher et al. 1996, Thiagarajan et al. 2004, Jiang et al. 2007).

Gemeinsames funktionelles Merkmal aller GRK ist, dass sie aktivierte, Agonist-besetzte GPCR phosphorylieren und inaktivieren. Durch die Interaktion der GRK mit dem Rezeptor wird ihre Kinaseaktivität gesteigert. Es existieren um die 800 GPCR und nur fünf nicht-visuelle GRK-Isoformen. Für die Phosphorylierung der GPCR durch GRK sind Mechanismen nötig, die zur Membrantranslokation der GRK und zur Substratspezifität beitragen. Unklar ist, wie die Rezeptorspezifität von GRK reguliert wird. Neben GPCR phosphorylieren GRK viele andere Proteine, zum Beispiel Transkriptionsfaktoren. Die Vielfalt an Zielmolekülen zeigt, dass GRK Einfluss auf wichtige Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, Zelltod, Immunität oder Entwicklung haben könnten (Pitcher et al. 1998, Gurevich et al. 2012).

Als weiterer Regulationsmechanismus von GRK sind Protein-Protein-Interaktionen beschrieben. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass G $\beta\gamma$ -Untereinheiten die Aktivität von GRK2 und GRK3 über die oben genannte PH-Domäne im C-Terminus von GRK2 und GRK3 verstärkten (Kim et al. 1993, Pitcher et al. 1995). Verschiedene *in vitro*-Studien zeigten, dass auch die Phosphorylierung zur Regulation von GRK beiträgt: Die Autophosphorylierung von GRK1 (Buczylko et al. 1991), die PKA-vermittelte Phosphorylierung von GRK1 und GRK7 (Horner et al. 2005), die Erk1/2-vermittelte Phosphorylierung von GRK2 (Pitcher et al. 1999) und die PKC-vermittelte Phosphorylierung von GRK5 (Pronin and Benovic 1997) führten jeweils zu einer verminderten Kinaseaktivität. Die Autophosphorylierung von GRK5 (Kunapuli et al. 1994) und die PKC- (Winstel et al. 1996) und PKA-vermittelte (Cong et al. 2001) Phosphorylierung von GRK2 verursachten eine Steigerung der jeweiligen Kinaseaktivität.

1.3.2 Die Rolle von GRK2 im kardiovaskulären System

Viele menschliche Erkrankungen korrelieren mit einer veränderten Expression von GRK-Isoformen. *In vitro*-Untersuchungen zeigten zum Beispiel eine verminderte GRK2-Expression in Leukozyten bei Multipler Sklerose (Vroon et al. 2005) und eine gesteigerte Expression von GRK2 und GRK5 in neutrophilen Granulozyten von septischen Patienten (Arraes et al. 2006). Die Hochregulation von GRK2 bei Herzinsuffizienz ist ein Beispiel für ein verändertes GRK-Expressions-Muster bei einer kardiovaskulären Erkrankung (Ungerer et al. 1993, Ungerer et al. 1994).

GRK2 soll im Folgenden aufgrund ihrer Relevanz für diese Arbeit genauer betrachtet werden. Die als Kinase des β -adrenergen Rezeptors (β AR) beschriebene GRK2 ist ein überwiegend zytosolisches Protein (Lefkowitz 1998). Sie wird ubiquitär exprimiert mit besonders hohen Konzentrationen in Gehirn, Milz und Herz (Benovic et al. 1989). Im Herzen ist GRK2 die am meisten exprimierte G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase (Koch et al. 2000, Hata and Koch 2003).

Es existieren zahlreiche Hinweise zur Bedeutung von GRK2 im kardiovaskulären System. Untersuchungen verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen verdeutlichen den Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Aktivität von GRK2 und einer verminderten Aktivität von für die Regulation des Herz-Kreislauf-Systems wichtiger GPCR: (1) Die Untersuchung von Proben des menschlichen linken Ventrikels bei Herzinsuffizienz (dilatative und ischämische Kardiomyopathie) zeigte eine erhöhte GRK2-mRNA-Expression und GRK2-Aktivität bei deutlich verminderter mRNA-Expression und Anzahl β 1-adrenerger Rezeptoren und unveränderten Werten von β 2-adrenergen Rezeptoren (Ungerer et al. 1993). (2) Eine Untersuchung von Rattenherzen ergab, dass eine längerfristige myokardiale Ischämie zu einer erhöhten Aktivität und einer gesteigerten mRNA-Expression von GRK2 führt und die Aktivität der nachgeschalteten Adenylylcyclase abschwächt (Ungerer et al. 1996). (3) In murinen Herzen, die aufgrund einer chronisch gesteigerten Nachlast eine linksventrikuläre Hypertrophie entwickelten, konnte eine gesteigerte Aktivität von GRK2-Molekülen sowie eine gesteigerte GRK2-Protein-Expression neben

dem Funktionsverlust β -adrenerger Rezeptoren nachgewiesen werden (Choi et al. 1997). (4) Zudem ergab die Untersuchung von Lymphozyten hypertensiver Ratten eine gesteigerte GRK2-Aktivität und GRK2-Protein-Expression neben einer verminderten Aktivität der nachgeschalteten Adenylylcyclase (Gros et al. 1997).

Arbeiten über die Konsequenzen der Inhibition von GRK2 konnten die pathophysiologische Relevanz von GRK2 bei kardiovaskulären Erkrankungen erhärten: (1) Während die herzspezifische Überexpression von GRK2 eine reduzierte kardiale Kontraktilität, eine verminderte Adenylylcyclaseaktivität sowie die β 1-AR-Desensibilisierung zur Folge hatte, bewirkte die kardiale Überexpression eines GRK2-Peptidinhibitors (β ARKct) eine erhöhte kardiale Kontraktilität in Mäusen. Der verwendete Peptidinhibitor zeigte eine mit dem C-Terminus von GRK2 übereinstimmende Sequenz und enthielt die Bindungsstelle für die $G\beta\gamma$ -Untereinheit. Durch kompetitive Blockade der $G\beta\gamma$ -Untereinheit wurde die GRK2-Aktivität unterbunden (Koch et al. 1995). Volkert et al. lieferten kürzlich einen Erklärungsansatz für eine gesteigerte Kontraktilität durch β ARKct: Möglicherweise verhindert der Peptidinhibitor, dass $G\beta\gamma$ -Untereinheiten für die Kontraktilität wichtige kardiale LTCC-Ströme (L-Typ Calciumkanal) inhibieren (Volkert et al. 2011). (2) Weiter zeigten Rockman et al., dass die herzspezifische Überexpression von β ARKct in Mäusen die Entwicklung einer Kardiomyopathie in einem murinen genetischen Herzinsuffizienzmodell verhinderte. Echokardiographische Untersuchungen zeigten, dass die Verschlechterung der Herzfunktion bei β ARKct-Überexpression ausblieb (Rockman et al. 1998).

Die beschriebenen Zusammenhänge über GRK2 verdeutlichen die Relevanz GPCR-gesteuerter Signale im Herz-Kreislauf-System und eröffnen die Diskussion über die Inhibition von GRK2 als Ansatzpunkt zur Verhinderung der Progression von kardiovaskulären Erkrankungen. Die Entwicklung spezifischer GRK2-Inhibitoren für die Therapie der Herzinsuffizienz wird seit einigen Jahren intensiv erforscht und verschiedene Ansätze zur Kinaseinhibition wurden bereits beschrieben. 2003 wurde das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) als physiologischer Inhibitor von GRK2 charakterisiert (Lorenz et al. 2003). Über

die Wirkung dieses im Herzen physiologisch vorkommenden Proteins könnten GPCR-gesteuerte und kardiovaskuläre Prozesse beeinflusst werden.

1.4 Das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP)

1.4.1 Aufbau, Funktion und Regulation von RKIP

Das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) ist ein Protein, das in zahlreichen menschlichen Organen exprimiert wird. Es greift regulierend in wichtige biologische Signalkaskaden wie zum Beispiel GPCR-Signalwege und MAPK-Signalwege (*engl. mitogen-activated protein kinases*) ein (Zeng et al. 2008) und beeinflusst zum Beispiel die Zellteilung (Eves et al. 2006).

RKIP wird unter anderem im Menschen (Banfield et al. 1998), im Rind (Serre et al. 1998) und in Bakterien (Serre et al. 2001) exprimiert. Das Protein RKIP hat eine Länge von 187 Aminosäuren (Zeng et al. 2008) und ein molekulares Gewicht von ~23 kDa (Bernier and Jolles 1984). Die dreidimensionale Struktur von RKIP wurde mittels Röntgenkristallographie ermittelt und beinhaltet ein zentrales β -Faltblatt, welches von weiteren β -Faltblättern und α -Helices umgeben wird (Banfield et al. 1998, Serre et al. 1998).

RKIP wurde erstmalig als zytosolisches Protein in Rinderhirn beschrieben (Bernier and Jolles 1984) und ist aufgrund seiner Eigenschaften Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein 1 (PEBP1) genannt worden (Bernier et al. 1986). Die PEBP-Familie ist hochkonserviert und zeigt keine signifikante Sequenzähnlichkeit mit anderen Proteinen (Banfield et al. 1998). Alle PEBP weisen eine konservierte Bindungstasche auf (Bernier et al. 1986), die als Ursprung der Grundfunktion der PEBP verstanden wird. Die funktionellen Unterschiede einzelner PEBP-Varianten sind vermutlich auf variable Strukturareale zurückzuführen (Banfield et al. 1998, Serre et al. 2001, Zeng et al. 2008).

Die Bezeichnung RKIP wurde eingeführt, als Yeung et al. die Raf1-inhibierende Eigenschaft des Proteins entdeckten und charakterisierten. RKIP inhibiert kompetitiv die Interaktion von Raf-1 und MEK und die Aktivierung der Raf/MEK/Erk-Signalkaskade (Yeung et al. 1999). Als physiologischer Inhibitor von Raf-1 hat RKIP einen regulierenden Einfluss auf den MAPK-Signalweg

(Yeung et al. 1999). Raf-1 spielt als Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kinase eine regulierende Rolle in der MAPK/Erk-Kaskade (MAPK-Raf/MEK/Erk1/2). Aktivierte Erk1/2 regulieren die Phosphorylierung von vielen intrazellulären Zielproteinen und Transkriptionsfaktoren und induzieren Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und anti-apoptotische Effekte. Im Herzen scheint die Raf/MEK/Erk1/2-Kaskade eine Rolle bei der Entwicklung kardialer Hypertrophie zu spielen und anti-apoptotische Effekte zu vermitteln. Dysregulationen des MAPK-Signalweges können zu Entwicklungsstörungen und zum Beispiel Krebs führen (Harris et al. 2004, Raman et al. 2007, Schubbert et al. 2007, Lorenz et al. 2009).

Neben der Rolle im MAPK-Signalweg dient RKIP als Modulator von GPCR-Signalen. Unter basalen Bedingungen ist RKIP mehrheitlich an Raf-1 gebunden. Die Stimulation von Proteinkinase C-Isoformen (PKC) und die resultierende Phosphorylierung von RKIP an Serin¹⁵³ führt zur Dissoziation der RKIP-Raf-1-Bindung und zur Interaktion von RKIP und GRK2 (Lorenz et al. 2003). Deiss et al. zeigten im Jahr 2012, dass die RKIP-Dimerisierung, die durch die PKC-vermittelte RKIP-Phosphorylierung initiiert wird, eine Rolle für den Substratwechsel von Raf-1 zu GRK2 und die Interaktion von RKIP und Raf-1 und GRK2 spielt (Deiss et al. 2012).

RKIP beeinflusst zudem die NF κ B-Signal-Transduktions-Kaskade, indem es in der Lage ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor kappa B (NF κ B) zu regulieren. Die Transkriptionsfaktoren der NF κ B-Familie koordinieren für das Immunsystem und die Stressverarbeitung wichtige Gene. Die Stimulierung von NF κ B durch TNF- α oder IL-1 β kann durch RKIP antagonisiert und damit die Signalkaskade unterbrochen werden (Yeung et al. 2001, Li and Verma 2002, Karin and Greten 2005).

1.4.2 Die Rolle von RKIP bei physiologischen Prozessen und im kardiovaskulären System

Als Modulator und Integrator zahlreicher auf den Organismus einwirkender Umweltstimuli scheint RKIP (Zeng et al. 2008) bei Mechanismen und Signalwegen wichtig zu sein, die möglicherweise bei der Pathophysiologie

verschiedener Erkrankungen eine Rolle spielen. Es existieren Arbeiten zur Korrelation zwischen einer verminderten RKIP-Expression und der Progression von Krebserkrankungen, zum Beispiel für die Metastasierungstendenz bei Brustkrebs und die Tumorgenese von Melanomen (Hagan et al. 2005, Park et al. 2005) sowie der Pathogenese von Alzheimer (Maki et al. 2002). Untersuchungen an RKIP-*knockout*-Mäusen zeigten, dass das Fehlen von RKIP olfaktorische Defizite und verminderte Reproduktionsraten zur Folge hat (Moffit et al. 2007, Theroux et al. 2007).

Kardiale Erkrankungen wie Herzinsuffizienz (Ungerer et al. 1993) und Bluthochdruck (Gros et al. 1997, Gros et al. 2000) korrelieren mit einer erhöhten GRK2-Expression. Diese Ergebnisse sind interessant, da RKIP als physiologischer Inhibitor von GRK2 charakterisiert wurde (Lorenz et al. 2003). Die physiologische Relevanz von RKIP im kardiovaskulären System wurde an isolierten Rattenkardiomyozyten beschrieben. Die Verminderung von endogenem RKIP durch *Gene-silencing* führte zu einer reduzierten Kontraktilität nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation durch Isoprenalin (Lorenz et al. 2003). Bei einer anderen Untersuchung wurde mittels Linksherzkatheter ein hyperkontraktiler Phänotyp bei acht Wochen und zwölf Monate alten für RKIP transgenen Mäusen beobachtet (Lorenz et al., unpublizierte Daten). Die Aktivitätssteigerung von GPCR im Herzen (insbesondere β -adrenerger Rezeptoren) könnte das Ergebnis der Hemmung von GRK2 durch phosphoryliertes RKIP sein.

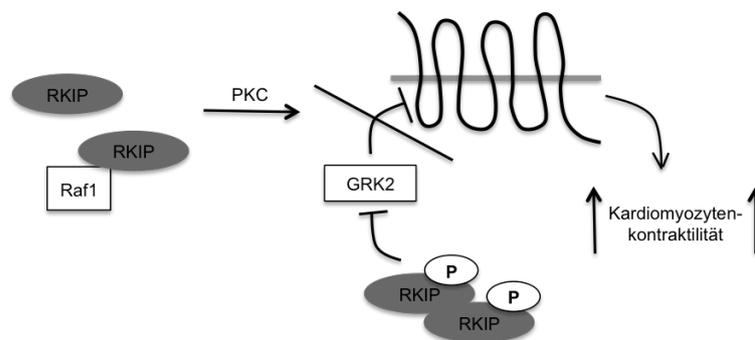


Abbildung 4: Modell der gesteigerten Kardiomyozytenkontraktilität durch RKIP-GRK2-Interaktion

Im nicht phosphorylierten Zustand bindet RKIP an Raf1. Die Phosphorylierung von RKIP durch PKC-Isoformen bewirkt dessen Dimerisierung. Die Inhibition von GRK2 durch phosphorylierte RKIP-Dimere bewirkt eine Steigerung der GPCR-Aktivität und der Kardiomyozytenkontraktilität.

Aufgrund der ubiquitären Expression von RKIP und dessen vielfach ungeklärten Einflusses auf den menschlichen Organismus hat die Erforschung und der potentielle Einsatz von RKIP in der Medizin eine große Bedeutung.

1.5 Zielsetzung

Kardiale Kontraktilität wird hauptsächlich über β 1-adrenerge Rezeptoren vermittelt, die zur Gruppe der GPCR gehören. Bei einigen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems kommt es zur verminderten Aktivität von β -adrenergen Rezeptoren im Herzen. Verminderte Pumpleistung und Kontraktionsfähigkeit sind die Hauptursachen von Herzinsuffizienz. Die Resensitisierung beziehungsweise die verminderte Desensitisierung von β -adrenergen Rezeptoren durch die Inhibition von GRK2 könnte eine potentielle neue Strategie bei der Behandlung von Herzinsuffizienz darstellen. In transgenen Mäusen bewirkte die RKIP-Überexpression eine Steigerung der Kontraktilität ohne schädliche Langzeitfolgen (Lorenz *et al.*, unpublizierte Daten). Diese Beobachtung ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass RKIP als physiologischer Inhibitor von GRK2 eine wichtige Rolle bei der Resensitisierung von kardialen β -Adrenozeptoren spielt.

Hauptthema dieser Arbeit war es den Effekt einer herzspezifischen Überexpression von RKIP bei der Progression von Herzinsuffizienz zu evaluieren sowie dessen Funktion bei Signalwegen und dessen Einfluss auf Rezeptoren im Herzen (GPCR) besser zu verstehen.

Grundlage für die Untersuchungen war das murine Herzinsuffizienzmodell TAC (Ligation der *Aorta transversa*). Die Verringerung des Aortendurchmessers bedeutet hämodynamisch eine chronisch erhöhte Druckbelastung für das Herz. TAC erwies sich in Voruntersuchungen als geeignet, eine Herzinsuffizienz in der verwendeten Mauslinie zu erzeugen.

Um die potentiell protektive Rolle von RKIP zu bewerten, wurden typische Merkmale der Herzinsuffizienz wie zum Beispiel die Fibrosierung des linken Ventrikels mittels histologischer Methoden untersucht. Zudem wurde das kardiale Expressionsmuster von RKIP bei Herzinsuffizienz mit dem in gesunden humanen und murinen Herzen mit Hilfe von Immunoblots verglichen. Um

weitere Erkenntnisse über den Einfluss von RKIP auf morphologische und funktionelle Veränderungen im Herzen durch chronische Druckbelastung zu gewinnen, wurden mittels Echokardiographie kardiale Wandstärken sowie der systolische und enddiastolische linksventrikuläre innere Durchmesser untersucht. Als Parameter der Kontraktilität wurde die Verkürzungsfraktion und als Maß der kardialen Hypertrophie das Verhältnis aus Herzgewicht zu Tibialänge errechnet.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Die untersuchten Mausherzen wiesen einen C57BL/6J-Hintergrund auf und überexprimierten RKIP herzspezifisch durch Verwendung des Maus- α myosin heavy chain-Promoters (schwere Kette des α -Myosins). Die Mäuse wurden im FVB/N-Hintergrund generiert. Dieser gilt als gut geeignet zur Erzeugung transgener Mäuse mittels DNA-Mikroinjektion (Taketo et al. 1991). Über mindestens zehn Generationen wurden die transgenen FVB/N-Mäuse in den C57BL/6J-Hintergrund zurückgekreuzt. Die transgenen Mäuse wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg generiert.

2.2 Humane Myokardbiopsien

Die menschlichen Myokardbiopsien aus dem basalen Septum entstammten Herzen von Individuen, die aufgrund von Herzinsuffizienz im Endstadium (NYHA IV) eine Herztransplantation erhielten. Weitere Myokardbiopsien entstammten Patienten mit *high-gradient*-Aortenklappenstenose (>40 mmHg). Das Gewebe wurde im Rahmen des Aortenklappenaustausches gewonnen, wenn bei der Operation eine Resektion des Septums wegen eines zu engen Ausflusstraktes notwendig war. Als Kontrollen dienten kardiale Septumbiopsien von gesunden Spenderherzen ohne Herzerkrankung in der Vorgeschichte und unauffälliger Echokardiographie, die nicht als Transplantat zum Einsatz kamen. Entsprechend der „Deklaration von Helsinki“ erfolgte die schriftliche Einwilligung nach Aufklärung der Teilnehmer oder Familienangehöriger potentieller Herzspender vor Entnahme des Herzens beziehungsweise vor Gewinnung der Septumbiopsien. Alle Experimente wurden mit Genehmigung des Ethikkomitees der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg durchgeführt. Die Experimente, bei denen Proben herzinsuffizienter Patienten und der o.g. Kontrollherzen verwendet wurden, wurden zudem durch das Ethikkomitee des „BIOSS Centre for Biological Signaling Studies“ der Universität Freiburg genehmigt.

2.3 Antikörper

Tabelle 1: Antikörper

	Epitop	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Primärer Antikörper	RKIP	Kaninchen	1:5000	eigene Herstellung (Lorenz <i>et al.</i> , 2003)
Sekundärer Antikörper	Kaninchen IgG	Ziege	1:10000	Dianova

Der primäre Antikörper wurde in Blockmilch, der sekundäre Antikörper in BSA-haltigem Waschpuffer (Bovines Serum Albumin Fraktion V) (s. 2.5) angesetzt. Sekundäre Antikörper waren an Meerrettich-Peroxidase (*engl. horseradish-peroxidase*, HRP) gekoppelt.

2.4 Oligonukleotidprimer

Tabelle 2: Oligonukleotide

Primer	Sequenz
ANF vorwärts	5'- ACAGATCTGATGGATTTCAAGAACCTGC -3'
ANF rückwärts	5'- AGTGCGGCCCTGCTTCCTCA -3'
BNP vorwärts	5' GGATCGGATCCGTCAGTCGTT 3'
BNP rückwärts	5' AGACCCAGGCAGAGTCAGAAA 3'
COL3a1 vorwärts	5'AAACAGCAAATTTCACTTACAC 3'
COL3a1 rückwärts	5'ACCCCCAATGTCATAGG 3'
CTGF vorwärts	5'- AAGGGCCTCTTCTGCGATTTTC -3'
CTGF rückwärts	5'- TGCACACTCCGATCTTGCG -3'
GAPDH vorwärts	5' TGGCAAAGTGGAGATTGTTG 3'
GAPDH rückwärts	5' CATTATCGGCCTTGACTGTG 3'
Periostin vorwärts	5'- CTGGTATCAAGGTGCTATCTGC -3
Periostin rückwärts	5'- ATTGCCCAGCGTGCCATAA -3
RKIP vorwärts	5'-CGGGCCTCCCAGTGGCACAGG-3'
RKIP rückwärts	5'- GCCGCGATTGTCTCCAGACTTGTTGC-3'
TGFβ vorwärts	5'- TCCAGAGTTTCACTCCCCC - 3'
TGFβ rückwärts	5'- GGCACCGTGGGAAATAGTAGA - 3'

2.5 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Lösungen wurden mit bi-destilliertem, vollentsalztem Wasser hergestellt.

Tabelle 3: Puffer, Lösungen und Medien

Lösung	Inhaltsstoffe	Erläuterung / Konzentration
100 x Proteaseinhibitormix	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	0,1 % (m/V)
	Benzamidin	25 mM
	TRIS	50 mM, pH 7,4
10 x Phosphataseinhibitormix	NaF	500 mM
	Na ₄ P ₂ O ₇	50 mM
	Na ₃ VO ₄	10 mM
	NaN ₃	3 mM
	β-Glycerolphosphat	50 mM
Blockmilch	NaCl	100 mM
	Magemilchpulver	5 % (m/V)
	TRIS-HCl	10 mM, pH 7,4
	Tween 20	0,1 % (V/V)
	H ₂ O	
BSA-Waschpuffer	NaCl	150 mM
	TRIS-HCl	50 mM, pH 7,4
	Nonidet P40	0,2 % (V/V)
	Albumin Fraktion V	0,25 % (m/V)
Lysispuffer	1xTSE-Puffer (pH 7,4)	
	Triton X 100	1 % (V/V)
	H ₂ O	
SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %), Ansatz für zwei Gele der Maße 16 x 18 cm	<u>Sammelgel</u> (4 % Acrylamid)	
	Rotiphorese 30	3 mL
	(Acrylamid/Bisacrylamid 30 % / 0,8 % (m/V))	
	4x Sammelgelpuffer	6 mL
	(0,5 M TRIS (pH 6,8) 0,4 % SDS (m/V))	
	H ₂ O	15 mL
	Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung (10 % (m/V))	240 µL
	Tetramethylethylendiamin (TEMED)	24 µL

	<u>Trenngel</u> (12 % Acrylamid)	
	Rotiphorese 30	24 mL
	4x Trenngelpuffer (1,5 M	15 mL
	TRIS	
	(pH 8,8) 0,4 % SDS (m/V))	21 mL
	H ₂ O	400 µL
	APS-Lösung (10 % (m/V))	30 µL
	TEMED	
Stripping-Puffer (pH 2,5)	Glycin	100 mM
	SDS	0,1 % (m/V)
Transferpuffer	TRIS-HCl	20 mM
	Glycin	150 mM
	Methanol	20 % (V/V)
	H ₂ O	

2.6 Chemikalien

Es wurden folgende Chemikalien verwendet: Apothekenwasser und Ethanol (Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Würzburg), Fluoromount-G™ (Biozol, Eching), Proteinmarker 27-1111 (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen), *Wheat germ agglutinin* (Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen, Darmstadt). Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Soweit erhältlich, wurden Chemikalien höchster analytischer Qualität (mindestens *p.A.*) verwendet.

2.7 Geräte

Bis auf die folgenden sind alle verwendeten Geräte im Methodenteil vermerkt.

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Hersteller
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
EB A 12 R	Hettich Zentrifugen
Gewebeprobenentwässerung	Sakura Tissue-Tek
Inkubator Typ B-6200	Heraeus instruments, Kendro Laboratory Products
Oberflächen-TEMP-Heizplatte IKAMAG® RCT IKA-COMBIMAG REO	IKA
Ofen	Memmert
Plattformschüttler	Biometra WT12
Plattformschüttler	Heidolph Promax 2020
Thermomixer 5436	Eppendorf
Trockenplatte	Medax
Vortex Genie 2TM	Bende & Hoblin AG

2.8 Verbrauchsmaterial

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Entwicklerflüssigkeit	Sigma Aldrich
Fixierflüssigkeit	Sigma Aldrich
Autoradiographiefilm	Fujifilm
Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran	GE Healthcare
Superfrost® PLUS (Objektträger)	Thermo-Scientific



3 Methoden

3.1 Histologische Methoden

3.1.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Direkt nach Entnahme wurde das Herzgewebe 24 h in 4 %-iger Formaldehydlösung fixiert. Die Dehydrierung des Gewebes erfolgte über eine ansteigende Isopropanolreihe. Nach Behandlung mit Xylol erfolgte die Einbettung in Paraffin in einer beheizten Paraffingießstation (EG 1150H, Leica). Mit einem Mikrotom (RM2165, Leica) wurden Schnitte (2 µm) angefertigt, die anschließend für mindestens 3 h bei 42 °C getrocknet wurden. Die Anfertigung der Paraffinschnitte übernahm die technische Assistentin Marianne Babl.

3.1.2 Histochemische Färbungen

3.1.2.1 Sirius Rot-Kollagenfärbung

Die Sirius Rot-Kollagenfärbung ermöglicht die Bestimmung des Fibrosegrades in einem Herzschnitt. Bei der Sirius Rot-Kollagenfärbung werden interstitielles Bindegewebe (Kollagen) rot, Parenchym gelb und Zellkerne schwarz dargestellt.

Für diese Färbung wurden die Paraffinschnitte zuerst in Roti-Histol entparaffiniert, dann in absteigender Ethanolkonzentration und in bi-destilliertem Wasser gewaschen. Daran schloss sich eine 45-minütige Inkubation in Sirius Rot (Direct Red 80)-Lösung zur Anfärbung des Kollagens im Herzschnitt an. Die Schnitte wurden in H₂O gewaschen und über eine ansteigende Ethanolreihe sowie Roti-Histol entwässert. Zuletzt wurden die Herzschnitte mit Eukitt (Fluka 03989) eingedeckt. Die Durchführung der Sirius Rot-Kollagenfärbung übernahm die technische Assistentin Marianne Babl.

An einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM4000B) wurden bei fünf- und zehnfacher Vergrößerung digitale Fotos repräsentativer Gewebeschnitte erstellt. Mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms „Adobe Photoshop CS5“ (Adobe) konnte anschließend der Fibrosegrad des linken Ventrikels mittels

halbautomatischer, semiquantitativer Pixelzählung ermittelt werden. Die Auswertung erfolgte verblindet.

3.1.2.2 TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) dient der Darstellung apoptotischer Zellkerne. Während der Apoptose, dem programmierten und häufigsten Zelltod in Eukaryoten, kommt es zu charakteristischen strukturellen Veränderungen im Zellkern und im Zytoplasma. Zytoplasmatische Endonukleasen fragmentieren die DNA in Mono- und Oligonukleosomen. Die dabei entstehenden Bruchstücke weisen an ihren Enden freie Hydroxygruppen (3'-OH-Gruppen) auf. Die terminale Transferase TdT (*terminal desoxynucleotidyl transferase*) versieht die Hydroxygruppen mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden und ermöglicht so die Detektion apoptotischer Zellkerne. Der TUNEL-Assay wurde mit Hilfe des „*In Situ Cell Death Detection Kit*“ (Roche Applied Science, Mannheim) nach Hersteller-Anleitung durchgeführt.

Die Behandlung der Gewebeschnitte in Xylol diene der Entparaffinierung. Mittels absteigender Ethanolreihe wurde im nächsten Schritt das Xylol entfernt und dann die Schnitte in PBS gelegt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in einer Proteinase-K-Lösung (Proteinase K, AppliChem, Darmstadt) 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um das Gewebe zu permeabilisieren. Nach Waschen in PBS wurde eine Behandlung mit RNase (5 µg/mL) (Ribonuklease, Sigma-Aldrich) durchgeführt. Dazu wurden die Gewebeschnitte 20 min bei 37 °C inkubiert und dann in PBS gewaschen. Danach wurde das auf Eis angesetzte TUNEL-Reagenz und die darin enthaltenen fluoreszenzmarkierten Nukleotide auf die Proben gegeben und für 1 h bei 37 °C im Brutschrank in der feuchten Kammer unter Lichtausschluss inkubiert. Tetramethyl-Rhodamin-dUTP (Deoxyuridintriphosphat) diene der direkten Fluoreszenzmarkierung der DNA-Bruchstücke.

Als Positivkontrolle diene ein 10 min mit DNase (Desoxyribonuklease, Sigma-Aldrich) (1:1 in PBS) behandelter Schnitt, der bei 15-25 °C unter Lichtausschluss inkubiert wurde. Die DNase induziert künstliche DNA-

Doppelstrangbrüche und maximiert durch die anschließende Anlagerung von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden das Fluoreszenzsignal. Als Negativkontrolle diente ein Gewebeschnitt, der nicht mit TUNEL-Reagenz behandelt wurde.

Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst-Reagenz, welches an DNA bindet (Ghosh et al. 2015) und Gegenfärbung der Zellgrenzen mit *Wheat Germ Agglutinin*, einem pflanzlichen Lektin, welches an Bestandteile der Plasmamembran bindet (Sialinsäure- und N-Acetylglukosaminreste) (Chazotte 2011). Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit WGA 30 min bei 37 °C im Brutschrank unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit Hoechst-Reagenz benetzt, 5 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert und dann in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte nach einmaligem Waschen in Xylol mit Fluoromount eingebettet.

Die Auswertung des TUNEL-Assays und die Auszählung apoptotischer Zellen wurde am Fluoreszenzmikroskop (Leica DM4000B) mit Hilfe der Software „Diskus“ (Leica) durchgeführt.

Im Fluoreszenzmikroskop werden Farbstoffe zur Fluoreszenz angeregt und das Fluoreszenzlicht mikroskopisch beobachtet. Farbstoffe eignen sich Zellbestandteile beziehungsweise Zellen selektiv zu markieren. Mit Hilfe optischer Filter wird die Beleuchtungswellenlänge im Mikroskop eingestellt, bei der spezifische Farbstoffe absorbieren und angeregt werden und mit ihrer charakteristischen Wellenlänge Fluoreszenzlicht aussenden. Auf diese Weise werden markierte Zellen oder Zellbestandteile im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Die verwendeten Fluorophore weisen unterschiedliche Absorptionsspektren auf und emittieren Licht unterschiedlicher Wellenlängen.

Apoptotische Zellen, Zellgrenzen und Zellkerne werden durch Verwendung der o.g. Fluorophore in unterschiedlichen Farben dargestellt. Das verwendete Hoechst-Reagenz weist ein Anregungsmaximum von 346 nm auf und emittiert blaues Licht (max. 460 nm), das verwendete WGA-Fluorophor ein Anregungsmaximum von 488 nm und emittiert grünes Licht (max. 525 nm), das TUNEL-Reagenz ein Anregungsmaximum von 540 nm und emittiert rotes Licht (max. 580 nm).

Die intrazelluläre Lage des roten TUNEL-Fluoreszenzsignals galt als Voraussetzung für die Identifikation eines apoptotischen Kardiomyozytenzellkerns.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Quantifizierung der Proteinexpression

3.2.1.1 Herstellung von Proteinlysaten

Die bei -80 °C aufbewahrten murinen Herzen wurden sofort nach Entnahme aus dem Gefrierfach mit Hilfe eines Ultraturrax mechanisch homogenisiert, nachdem das Gewebe mit Lysispuffer (s. 2.5.), Proteaseinhibitoren und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt wurde. Um Verunreinigungen zu minimieren, wurde der Ultraturrax (IKA Labortechnik) vor Versuchsbeginn mindestens 30 min in 0,5 molarem NaOH eingeweicht und mit H₂O gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 1000 x g (4 °C) wurde der Überstand abgenommen und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die Herstellung von Proteinlysaten aus humanen Myokardproben erfolgte analog zu der Herstellung von Proteinlysaten aus murinem Gewebe.

3.2.1.2 Quantifizierung der Proteinkonzentration in Lysaten

Die Proteinbestimmung wurde mittels „*BCA-Protein Assay Kit*®“ (Thermo Scientific, Pierce, Rockford USA) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. In einer Reaktion von Bicinoninsäure (BCA), zweiwertigen Kupferionen und dem Protein entsteht eine violette Verbindung. Mithilfe eines Plattenlesegeräts (Spectra MAX340 Corporation, Molecular Devices Corporation) wurde anhand dieser Verbindung die Proteinmenge in der enthaltenen Probe photometrisch bei 562 nm ermittelt. Die Proben wurden mit PBS auf eine Konzentration von 2 µg/µL eingestellt.

3.2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die zweidimensionale SDS-PAGE ermöglicht die Darstellung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer molekularen Masse. Durch Anlagerung des negativ

geladenen Natriumlaurylsulfats (SDS) an die Proteine wird deren Eigenladung überdeckt. Alle Proteine bewegen sich im elektrischen Feld in Richtung Anode. Eine Auftrennung innerhalb des Polyacrylamidgels erfolgt abhängig von der Molekülmasse und unabhängig von der Eigenladung. Je kleiner das Protein, desto schneller wandert es durch die Poren des Polyacrylamidgels (Al-Tubuly 2000). SDS ist wichtiger Bestandteil von Gelladepuffer, Laufpuffer und Polyacrylamidgelen (s. 2.5). Der prozentuale Anteil des Acrylamids entscheidet über die Porengröße der Gelmatrix und die Wandergeschwindigkeit der Proteine. Im Sammelgel werden die Proteine an der Lauffront fokussiert und anschließend im Trenngel nach Größe aufgetrennt. In der Regel wurden 20 µL des jeweiligen Lysats auf ein Gel aufgetragen und bei 70 V/Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gelektrophoresegerät „Power PacTM HC“ (BioRad) und das Netzgerät „PS 500 XT DC“ (Hoefer Scientific Instruments) dienten der Durchführung.

3.2.1.4 Westernblot

In einem *Semi-Dry-Blotter* (Transfer-Blot R SD, Biorad) erfolgte der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten negativ geladenen Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, die vorher einige Minuten in Methanol aktiviert wurde (Gultekin and Heermann 1988). Den elektrophoretischen Transfer der SDS-Proteinkomplexe auf eine PVDF-Membran bezeichnet man als *Westernblot* (Burnette 1981). In aufsteigender Reihenfolge wurden auf der mit Transferpuffer (s. 2.5) befeuchteten Anoden-Elektrode des Blotters drei Lagen in Transferpuffer getränktes Filterpapier, die aktivierte Membran, das Gel, drei Lagen in Transferpuffer getränktes Filterpapier und die befeuchtete Kathodenelektrode geschichtet. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Spannung von 15 V für eine Dauer von mindestens 1 h.

3.2.1.5 Immundetektion der immobilisierten Proteine

Die Immundetektion der immobilisierten Proteine diente dazu, die Proteine auf Grundlage einer Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen. Eine 1,5-stündige Behandlung der beladenen Membranen mit Blockmilch (5 % (m/V)) bei

Zimmertemperatur diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Bei 4 °C wurden die Membranen über Nacht unter leichtem Schütteln mit dem primären Antikörper gegen das gesuchte Protein (RKIP) inkubiert und dreimal 15 min in BSA-Waschpuffer (s.2.5) gewaschen, um ungebundenen Erstantikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Membranen mindestens 1 h in einem an eine HRP gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet an das IgG der Spezies des primären Antikörpers. Um überschüssigen, nicht gebundenen Zweitantikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal gewaschen (s.o.). Informationen zu Konzentration und Herkunft der verwendeten Antikörper sind im Materialteil (2.3) zu finden.

Das „*Amersham ECL Plus Detection Reagent®*“ (GE Healthcare) ermöglichte die Detektion des Proteins. Die Membran wurde mit luminolhaltigem Substrat (PS-3 Acridan) benetzt. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte HRP katalysiert die Oxidation des lumineszenten Substrats und ein Chemilumineszenz-Signal wird erzeugt. Die Chemilumineszenz wurde durch Schwärzung eines Autoradiographiefilms sichtbar gemacht. Die Software „*Adobe Photoshop CS5*“ ermöglichte die Quantifizierung der unterschiedlichen Schwärzung des Autoradiographiefilms.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Quantifizierung der mRNA-Expression mittels *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (*real-time* PCR)

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (*real-time* PCR) diente der Quantifizierung der *messenger* RNA-Expression (mRNA) bestimmter Markergene.

3.3.1.1 Isolation und Quantifizierung von mRNA

Mit Hilfe des „*RNeasy Midi Kit*“ (Qiagen, Hilden) wurde mRNA aus Herzgewebe isoliert. Die Durchführung des Versuchs erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Während des gesamten Versuchs wurde ausschließlich RNase-freies Wasser verwendet. Vor der Aufreinigung der mRNA wurde das Arbeitsmaterial mit

„RNase-ExitusPlusTM“ behandelt, um eine Dekontamination von RNA-Rückständen zu erreichen.

3.3.1.2 Umschreiben der RNA in komplementäre DNA

Mittels „Superskripttm-Kit“ (Invitrogen) erfolgte das Umschreiben der RNA in komplementäre DNA (cDNA), um die Analyse der Expression spezifischer Gene mittels quantitativer *real-time* PCR zu ermöglichen.

Der für mRNA spezifische Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der gespleißten RNA ist wichtig für die Einleitung der Translation. Der Einsatz von Oligo(dt)-Primern einer Länge von circa 20 Basen, die spezifisch an den Poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNA binden, ermöglichte eine mRNA-spezifische Untersuchung. Die aus Retro-Viren stammende reverse Transkriptase ist in der Lage aus einsträngiger RNA cDNA im Verhältnis 1:1 zu generieren, indem sie an einen Startpunkt der RNA bindet und in 3'-Richtung die cDNA synthetisiert. Durch Verwendung von Primern, die ein Intron überspannten, wurde die ausschließliche Vervielfältigung der gespleißten mRNA ermöglicht und die Vervielfältigung genomischer DNA blieb aus.

Eine Probe ohne reverse Transkriptase diente als Negativkontrolle. Für das Umschreiben der mRNA wurde deren Konzentration am Photometer Nanodrop (Pepqlab) gemessen und dann 1 µg RNA auf 10 µL mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und mit dem „Superskripttm-Kit“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

3.3.1.3 Prinzip und Durchführung der *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR ist eine spezielle Form der Polymerase-Kettenreaktion. Neben der Vervielfältigung des PCR-Produkts wird zusätzlich eine quantitative Analyse der mRNA ermöglicht. Durch Zugabe eines Fluoreszenz-Farbstoffs, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert, kann die Zunahme der PCR-Produkte während der PCR verfolgt werden (*real-time*). Nach jedem Amplifizierungszyklus wird die Fluoreszenz in der Probe gemessen. Unter optimalen Bedingungen verdoppeln sich die PCR-Produkte und die Fluoreszenz nach jedem Zyklus. Aus der Zyklusanzahl (*threshold cycle*,

Ct), die zum Erreichen eines Schwellenwerts nötig ist, kann später die in der Probe enthaltene mRNA bestimmt werden. Je weniger mRNA in der Probe vorhanden ist, desto höher ist die Zykluszahl. Als nicht-reguliertes Gen (*housekeeping*-Gen) und Referenzwert wurde die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Sinn der Expressionsanalyse eines *housekeeping*-Gens ist es die Ergebnisse der *real-time* PCR unabhängig von Pipettiergenauigkeiten und der Ausgangskonzentration bewerten zu können. Die quantitative *real-time* PCR wurde unter Verwendung des „C1000 Thermocyclers“ (CFX384 *TM real-time*-System, Biorad) und der Software „SOFTmax® PRO for Lmax“ (Version 1.0L Software, MDS Analytical Technologies) durchgeführt.

In einem 384-well-Format wurde die cDNA jeweils in Triplikaten analysiert. Es wurden jeweils 2,5 µL cDNA des Standards, der Negativkontrolle und eines Leerwertes (DEPC-Wasser) vorgelegt. Anschließend wurden die Primer (480 nM) mit dem Supermix (dNTPs, DNA-Polymerase, Fluorophor in gepufferter Lösung) dazu gegeben. Für die Amplifikation der cDNA von Periostin, Col3α1, TGFβ, CTGF, BNP, ANF und GAPDH verwendete ich ein Reaktionsgemisch aus „Supermix SsoFast Eva Green“ (Biorad).

Folgendes Schema des „C1000 Thermocyclers“ (CFX384 *TM real-time* System, Biorad) wurde für die *real-time* PCR verwendet:

98 °C	2 min			Doppelstrang-Denaturierung
98 °C	0,2 min		40 Zyklen	Primer-Aktivierung
56 °C	0,2 min	Fluoreszenzmessung	40 Zyklen	Primer-Anlagerung
65 °C	0,4 min	Fluoreszenzmessung	40 Zyklen	Primer-Anlagerung
65-95 °C	+ 0,5 °C/ 0,05 min	Fluoreszenzmessung		Amplifikation und Schmelzkurve

Durch die schrittweise Temperaturerhöhung und die kontinuierliche Fluoreszenzmessung konnte die Denaturierung der Doppelstränge verfolgt werden, da denaturierte Doppelstränge kein Fluoreszenzsignal erzeugen, und anhand der erzeugten Schmelzkurve bewertet werden.

3.3.1.4 Auswertung der *real-time* PCR

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode nach Livak (Livak and Schmittgen 2001), um die Daten in ein analysierbares Format zu bringen: Die Expression der mRNA wird in Bezug zu einem Referenzgen (hier GAPDH) gesetzt und als Vielfaches eines basalen Zustandes (hier Wildtyp-basal) dargestellt.

3.3.2 Caspase-Assay

Caspasen (*engl. cysteine aspartic acid-specific proteases*) spielen eine entscheidende Rolle bei der Apoptose. Mit Hilfe des auf Lumineszenz beruhenden „Caspase-Glo® 3/7 Assay-Kits“ (Promega Corporation, Madison USA) wurde die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 bestimmt. Die Durchführung der Versuche erfolgte entsprechend Herstelleranleitung. Der Assay enthält ein luminogenes Substrat für die Caspasen 3 und 7, das die Tetrapeptidsequenz DEVD aufweist (DEVD-Aminoluciferin). Das Substrat ist in einem Reagenz gelöst, das für Caspasenaktivität, Luciferaseaktivität und Zelllyse optimiert ist. Durch Zugabe des Caspase-Glo 3/7-Reagenzes lysieren die Zellen und die enthaltenden Caspasen werden freigesetzt. Die Caspasen spalten das DEVD-Aminoluciferin, sodass ein Substrat, das Aminoluciferin, für die in dem Assay enthaltene Luciferase entsteht. Die Luciferase katalysiert die Oxidation von Aminoluciferin und generiert so ein Lumineszenzsignal, das proportional zur Aktivität der Caspasen 3 und 7 ist. Das Lichtsignal konnte mit Hilfe des „Multi-Label-Reader Querty, Wallac EnVis“ (EnVision) von PerkinElmer erfasst werden.

Zunächst wurden Proteinlysate aus murinen Mausherzen hergestellt und quantifiziert (siehe 3.2.1.1). Die Lysate wurden auf eine Konzentration von 0,2 µg/µL eingestellt. Für die Caspase-Aktivitätsbestimmung wurde eine 24-well-Platte verwendet. 50 µL Lysat wurden im Verhältnis 1:1 mit 50 µL Kit-Lösung (mit enthaltener Luciferase) in ein well gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lumineszenz-Signal wurde nach 1 h gemessen.

3.4 Physiologische Methoden

3.4.1 Organentnahme

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und das Herz entnommen. Durch vorsichtigen Druck auf das Herz mit einer Pinzette wurde das Blut entfernt und das Organ auf Ebene der Papillarmuskel-Ursprünge in Herzbasis und Herzspitze geteilt. Die kraniale Herzhälfte wurde für histologische Analysen wie zum Beispiel den TUNEL-Assay in 4 %-igem Formalin fixiert. Die Herzspitze wurde geteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert, um eine adäquate Aufbewahrung bis zum Einsatz für RKIP-Expressionsanalysen und Caspase-Aktivitätsuntersuchungen zu sichern.

3.4.2 Ligation der *Aorta transversa* (TAC)

Tiermodelle werden verwendet, um pathophysiologische Zusammenhänge *in vivo* unter definierten Bedingungen zu erforschen. Kardiale Erkrankungen in Modellorganismen können das Resultat zum Beispiel einer genetischen Veränderung oder eines bestimmten operativen Eingriffs sein.

TAC dient seit seiner Validierung durch Rockman et al. (Rockman et al. 1991) häufig als Grundlage für die Erforschung der Entwicklung von Herzinsuffizienz. Die Reproduzierbarkeit von TAC in Bezug auf die Entwicklung von Herzinsuffizienz ist verlässlicher als zum Beispiel ein induzierter Myokardinfarkt durch den kompletten Verschluss der linken Koronararterie (deAlmeida et al. 2010).

Das in den Untersuchungen verwendete Herzinsuffizienzmodell TAC wurde operativ bei sieben bis acht Wochen alten Mäusen angewendet. Die Tiere wurden über eine intraperitoneale Injektion mit Pentobarbital (40 mg/kg Körpergewicht) betäubt. Eine Nadel der Gauge „27“ wurde verwendet, um die Ligation der *Aorta transversa* durchzuführen. Für die postoperative Analgesie wurde Carprofen (4 mg/kg Körpergewicht) subkutan gespritzt. Drei Wochen nach der Operation wurden die Tiere wie oben beschrieben getötet, es erfolgte die Entnahme der Herzen und die Aufbewahrung der Organe bei -80 °C. Die TAC-Operationen übernahm Frau Professorin Kristina Lorenz.

3.4.3 Echokardiographie

Unter Verwendung der hochauflösenden Bildverarbeitungssysteme „Vevo700“ oder „Vevo 2100“ (Visual Sonic) und hochauflösenden Schallköpfen (30 MHz) wurden transthorakale Echokardiographien durchgeführt. Die Experimente erfolgten verblindet. Untersuchungen innerhalb der parasternalen kurzen Achse in Höhe der Papillarsehnen im *2D M-Mode* ermöglichten die Ermittlung der enddiastolischen linksventrikulären posterioren (LVPW) und der enddiastolischen interventrikulären septalen Wandstärke (IVS) sowie des systolischen und enddiastolischen linksventrikulären inneren Durchmessers (LVID). Mittels der Software „*VisualSonics Cardiac Measurements*“ wurde die Verkürzungsfraction (engl. *fractional shortening*, FS) errechnet ($FS = ((LVID, \text{diastolisch} - LVID, \text{systolisch}) / LVID, \text{diastolisch}) * 100 (\%)$). Zudem wurde als Maß der kardialen Hypertrophie das Verhältnis aus Herzgewicht zu Tibialänge ermittelt (HW/TL). Die verwendeten Daten repräsentieren Durchschnittswerte aus mindestens sechs Herzzyklen pro Maus.

3.5 Statistik

Die Analysen wurden unter verblindeten Bedingungen ausgewertet. Alle Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM (engl. *standard error of the mean*). Die Auswertung erfolgte mittels zweiseitiger *t*-Test-Analyse für den Vergleich von zwei Gruppen.

ANOVA (*analysis of variances*) und *bonferroni*-Test (*post-hoc* Test, Paarvergleich) dienen dem Vergleich von mehr als zwei Gruppen. Als signifikant wurde ein *p*-Wert < 0.05 angenommen. Für die Analysen verwendete ich die Software „*Prism*“ (GraphPad, San Diego, USA). Ich erstellte Diagramme mit der Software „*Adobe Illustrator*“ (Adobe) und Abbildungen mit der Software „*Microsoft PowerPoint*“ (Microsoft).



4 Ergebnisse

4.1 Die Expression von RKIP ist bei Herzinsuffizienz und Aortenstenose gesteigert

Es ist bekannt, dass die Expression verschiedener Proteine (z.B. natriuretischer Peptide und GRK2) bei Herzinsuffizienz verändert ist. Die Expression von GRK2 ist wie weiter oben beschrieben (s. 1.3.2) bei Herzinsuffizienz gesteigert. RKIP könnte aufgrund seiner Funktion als GRK2-Inhibitor eine Rolle bei Herzinsuffizienz spielen und möglicherweise ist auch die Expression von RKIP bei Herzinsuffizienz verändert. Die Untersuchung der RKIP-Protein-Expression mittels *Westernblots* in gesundem und krankem murinem und humanem Herzgewebe diente dazu, Erkenntnisse über eine mögliche Änderung der Expression von endogenem RKIP im Herzen unter kardialen Stresssituationen zu gewinnen.

In Mäusen bewirkte die dreiwöchige linksventrikuläre Druckbelastung durch TAC tatsächlich eine signifikante Steigerung der RKIP-Expression (Abb.5).

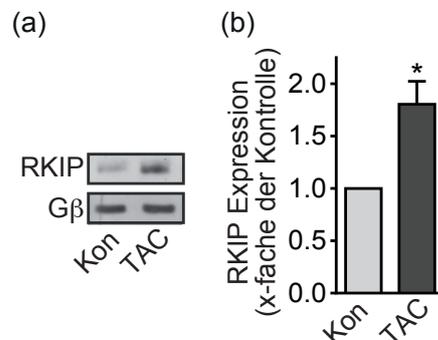


Abbildung 5: Protein-Expression von RKIP in Wildtyp-Mäusen nach drei Wochen TAC

(a) Gezeigt sind Immunoblot-Analysen der RKIP-Protein-Expression in Herzlysaten von 8 Wochen alten Kontroll-Mäusen (Kon) und Mäusen nach drei Wochen Ligation der *Aorta transversa* (TAC). Es wurden anti-RKIP-Antikörper verwendet. RKIP = 23 kDa, Gβ = 36 kDa. (b) Die quantitative Auswertung des gezeigten Immunoblot zeigt die Signalintensität normiert auf die RKIP-Expression in Kontrollherzen. Mittelwert ± SEM; *, $p < 0.05$ vs. Kon; $n = 9$ (Kon) und 9 (TAC).

Das Ergebnis könnte Resultat einer Hochregulation oder eines verminderten Abbaus von RKIP sein. Daher wurde im nächsten Schritt die mRNA-Expression von RKIP untersucht. Diese war nach TAC signifikant gesteigert (Abb.6).

Demnach scheint die kardiale Genexpression von TAC unter erhöhter linksventrikulärer Druckbelastung beziehungsweise bei Herzinsuffizienz hochreguliert zu sein.

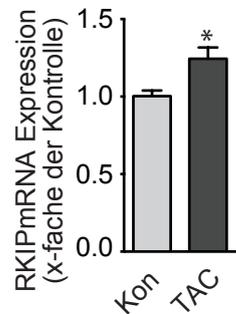


Abbildung 6: mRNA-Expression von RKIP in Wildtyp-Mäusen nach drei Wochen TAC

Mittels *real-time* PCR wurde die mRNA-Expression von RKIP bestimmt. Der Graph zeigt die Quantifizierung der RKIP-mRNA-Expression von Kontrollmäusen (Kon) und Mauserzen nach drei Wochen TAC. Mittelwert \pm SEM; *, $p < 0.05$ vs. Kon; $n = 5$ (Kon) und 5 (TAC).

Analysen der RKIP-Expression aus humanen Myokardbiopsien von herzinsuffizienten Patienten (Abb.7) und an Aortenstenose erkrankten Patienten (Abb. 8) zeigten eine signifikant höhere RKIP-Protein-Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollherzen. Die Myokardproben entstammten herzinsuffizienten Patienten im NYHA Stadium IV, Patienten mit einer *high-gradient*-Aortenstenose und Kontrollherzen von Patienten mit herzgesunder Vorgeschichte und unauffälliger Echokardiographie.

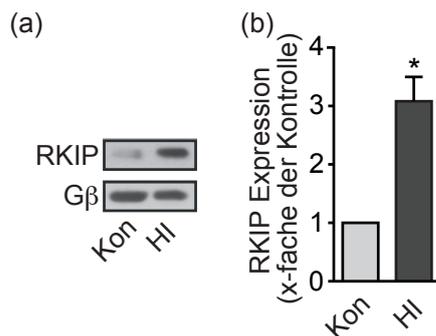


Abbildung 7: Protein-Expression von RKIP bei Herzinsuffizienz

(a) Die Abbildung zeigt Immunoblot-Analysen der RKIP-Protein-Expression in humanen Herzlysaten von gesunden Kontroll-Herzen (Kon) und herzinsuffizienten Herzen (HI). Als Kontrollen dienten Herzen, die nicht als Spenderherzen verwendet werden konnten. Es wurden anti-RKIP-Antikörper verwendet. RKIP = 23 kDa, G β = 36 kDa. Die quantitative Auswertung des gezeigten Immunoblot (b) zeigt die Signalintensität normiert auf die RKIP-Expression in Kontrollherzen. Mittelwert \pm SEM; *, $p < 0.05$ vs. Kon; $n = 7$ (Kon) und 7 (HI).

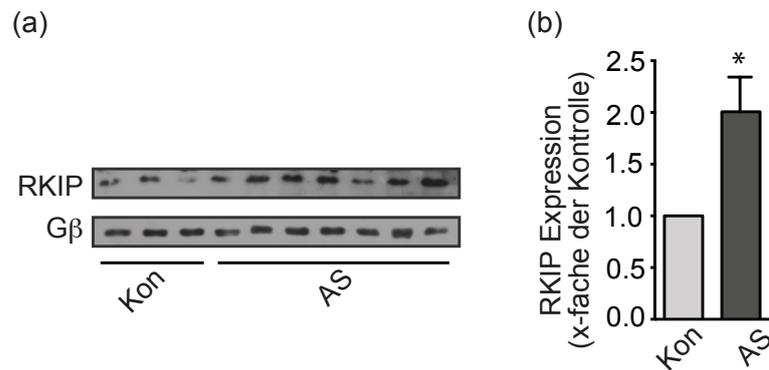


Abbildung 8: Protein-Expression von RKIP bei Aortenstenose

(a) Die Abbildung zeigt Immunoblot-Analysen der RKIP-Protein-Expression in humanen Herzlysaten von gesunden Kontrollherzen (Kon) und Herzen bei Aortenstenose (AS). Es wurden anti-RKIP-Antikörper verwendet. RKIP = 23 kDa, Gβ = 36 kDa. (b) Die quantitative Auswertung des gezeigten Immunoblot zeigt die Signalintensität normiert auf die RKIP-Expression in Kontrollherzen. Mittelwert ± SEM; *, $p < 0.05$ vs. Kon; $n = 3$ (Kon) und 7 (AS).

Die gesteigerte Expression von RKIP stellt möglicherweise einen Anpassungsmechanismus des Organismus als Reaktion auf eine kardiale Mehrbelastung dar, um pathologisch geschwächte GPCR-Signale, wie sie bei Herzinsuffizienz vorliegen, zu verstärken. Die Ergebnisse verdeutlichen eine physiologische Funktion von RKIP bei Herzinsuffizienz. Sie könnten ein erster Hinweis darauf sein, dass RKIP tatsächlich die GPCR-Signalgebung verstärkt und dass dies interessanterweise keinen negativen Einfluss auf den Herzmuskel in Mäusen zu haben scheint.

4.2 Die herzspezifische Überexpression von RKIP bewirkt dauerhaft eine verbesserte Herzfunktion in Mäusen

Um die Funktion von RKIP bei Herzinsuffizienz und den möglichen Sinn der Hochregulation unter kardialen Stresssituationen zu verstehen, wurden Mäuse generiert, die RKIP herzspezifisch unter Verwendung des α -MHC-Promoters überexprimierten (RKIP).

Voruntersuchungen an FVB/N-Mäusen zeigten bereits, dass die herzspezifische RKIP-Überexpression dauerhaft bis zu einem Alter von zwölf Monaten eine gesteigerte Kontraktilität ohne nachteilige Effekte auf das Herz

ermöglicht. In acht Wochen und zwölf Monate alten RKIP-tg-Mäusen war die Verkürzungsfraction (*engl. fractional shortening, FS*), ein Maß für die linksventrikuläre Kontraktilität, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant gesteigert (Abb. 9). Interessant ist, dass der dauerhaft hyperkontraktile RKIP-tg-Phänotyp die Lebensdauer der Mäuse nicht verkürzte (Abb.10) (Lorenz *et al.* unpublizierte Daten). Chronische Hyperkontraktilität, z.B. im Rahmen einer dauerhaften, sympathischen Stimulation bei arterieller Hypertonie, führt dagegen zu kardialer Hypertrophie, Dilatation und Herzversagen.

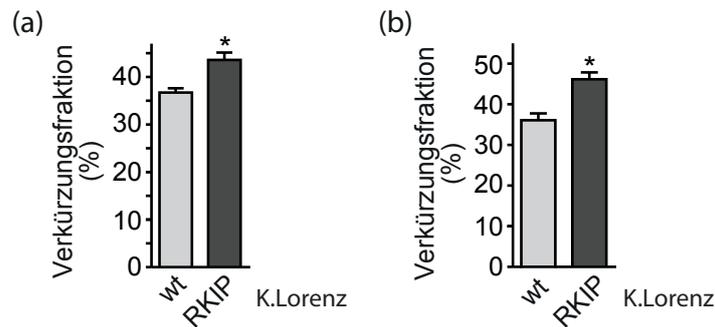


Abbildung 9: Verkürzungsfraction von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen

Die kardiale Verkürzungsfraction (FS) wurde in Mäusen mit FVB/N-Hintergrund mittels Echokardiographie bestimmt. Graphisch dargestellt sind in (a) die Verkürzungsfraction (FS) acht Wochen alter Wildtyp-Mäuse (wt) und RKIP-tg-Mäuse (RKIP) (n = 14 (wt) und 11 (RKIP)) und in (b) die Verkürzungsfraction (FS) zwölf Monate alter Wildtyp-Mäuse (wt) und RKIP-tg-Mäuse (RKIP) (n = 13 (wt) und 17 (RKIP)). Mittelwert \pm SEM; *, $p < 0.05$ vs. RKIP-tg.9

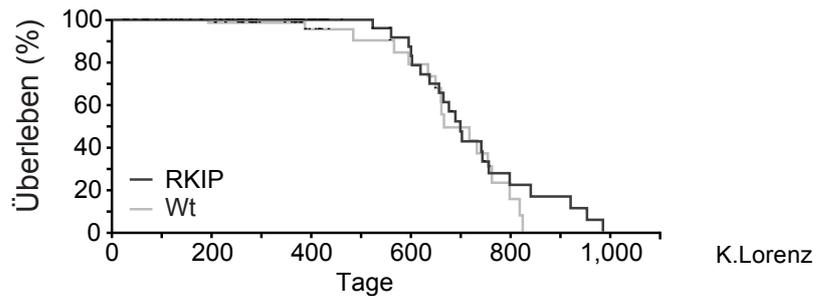


Abbildung 10: Überleben von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen

Graphisch dargestellt als Kaplan-Meier-Überlebenskurve ist das prozentuale Überleben von FVB/N-Wildtyp-Mäusen (wt) und -RKIP-tg-Mäusen (RKIP); n = 148 (wt) und 148 (RKIP).

4.3 RKIP schützt vor durch TAC induzierter Herzinsuffizienz

Die Frage, ob die herzspezifische Überexpression von RKIP eine Rolle bei der Entwicklung von Herzinsuffizienz spielt, blieb bisher ungeklärt. Das Herzinsuffizienzmodell TAC sollte dazu dienen, die Rolle von RKIP bei Herzinsuffizienz zu untersuchen. TAC ist ein etabliertes, murines, operatives Herzinsuffizienzmodell, welches sich durch gute Reproduzierbarkeit auszeichnet. Wildtyp-FVB-Mäuse entwickelten zwar eine kardiale Hypertrophie, eine Zunahme von Fibrose und Apoptose, aber zeigten keine funktionellen Anzeichen für eine Herzinsuffizienz. Wildtyp-C57/BL6-Mäuse zeigten nach drei Wochen TAC deutliche Anzeichen für eine verminderte Herzfunktion. Die Ergebnisse der Untersuchungen von RKIP-tg-C57/BL6-Mäusen sollen im Folgenden beschrieben werden.

4.3.1 RKIP schützt vor Verschlechterung der Herzfunktion

Um die Rolle von RKIP bei der Entwicklung von Herzinsuffizienz zu beurteilen, wurde zunächst der kardiale Phänotyp in Wildtyp-Mäusen und in RKIP-tg-Mäusen unter basalen Bedingungen im Alter von acht Wochen (Kon) und nach drei Wochen TAC (TAC) hinsichtlich typischer Zeichen von Herzinsuffizienz charakterisiert.

Echokardiographische Untersuchungen zeigten, dass C57/BL6-Mäuse, die RKIP herzspezifisch überexprimierten, eine bessere kardiale Kontraktilität (Verkürzungsfraction) als Wildtyp-C57/BL6-Mäuse aufwiesen (Abb. 11). Zudem führten drei Wochen chronische Druckbelastung (TAC) zur signifikanten Abnahme der Herzfunktion von Wildtyp-Mäusen, während sich diese bei RKIP-tg-Mäusen nicht signifikant änderte (Abb. 11 und 12). Unter basalen Bedingungen und drei Wochen nach TAC war die Verkürzungsfraction bei RKIP-tg-Mäusen signifikant höher als bei Wildtyp-Mäusen unter den entsprechenden Bedingungen. Chronische linksventrikuläre Druckbelastung scheint die Herzfunktion in RKIP-tg-Mäusen kaum zu beeinflussen

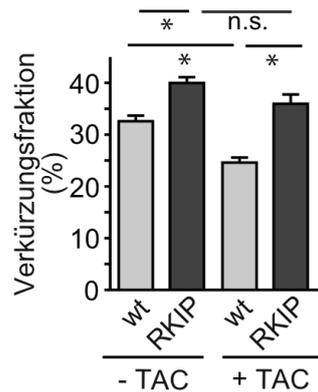


Abbildung 11: Verkürzungsfraction von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen unter basalen Bedingungen und nach drei Wochen TAC

Graphisch dargestellt ist die Verkürzungsfraction (FS) von Wildtyp-Mäusen (wt) und RKIP-tg-Mäusen (RKIP) im Alter von acht Wochen und nach drei Wochen TAC (n = 12 (wt - TAC), 8 (RKIP - TAC), 21 (wt TAC) und 13 (RKIP TAC)). Mittelwert \pm SEM; *, $p < 0.05$ wie angegeben.

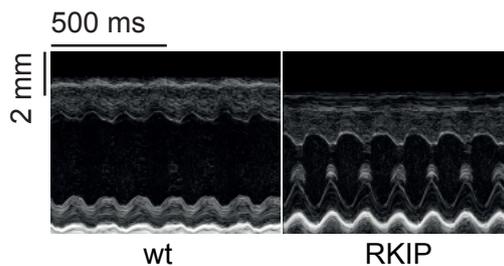


Abbildung 12: M-Mode-Echokardiogramme von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen

Die Abbildungen zeigen repräsentative M-Mode-Echokardiogramme des linken Ventrikels einer Wildtyp-Maus (wt) und einer RKIP-tg-Maus (RKIP) nach TAC. Die reflektierten Signale des sich während des Herzzyklus ändernden Durchmessers des linken Ventrikels werden zeitabhängig auf der x-Achse (Zeitachse) dargestellt.

Interessanterweise zeigten Wildtyp-Mäuse und RKIP-tg-Mäuse nach dreiwöchiger kardialer Druckbelastung eine ähnlich starke linksventrikuläre Hypertrophie. Die interventrikuläre septale Wandstärke (IVS) und die linksventrikuläre posteriore Wandstärke (LVPW), beides Parameter für kardiale Hypertrophie, nahmen in Wildtyp-Mäusen und in transgenen Mäusen signifikant zu und das relative Herzgewicht, gemessen als Verhältnis aus Herzgewicht und Tibiallänge (HW/TL) stieg in beiden Gruppen signifikant an. Die Tibiallänge diente als Referenzwert, da sie gut messbar und proportional zur Körpergröße ist.

Folge einer dauerhaften kardialen Stimulation oder einer kardialen Zusatzbelastung, z.B. im Rahmen einer Aortenstenose, ist wie auch in den Mäusen beobachtet, eine Zunahme der linksventrikulären Wanddicke. Zunächst bewirkt eine solche Zunahme der Wandstärke eine kardiale Kraftsteigerung. Bei Fortbestehen einer kardialen Belastung kommt es gewöhnlich zur Dilatation des linken Ventrikels und schließlich zum Herzversagen durch eine gestörte Herzfunktion. Bei Wildtyp-Mäusen bewirkte TAC eine linksventrikuläre Dilatation und somit wie oben beschrieben eine Abnahme der Herzfunktion. Der linke Ventrikel von RKIP-tg-Mäusen dilatierte nach TAC nicht signifikant (Tab. 6). Die nahezu erhaltene, oben beschriebene Herzfunktion in RKIP-tg-Mäusen nach TAC ist möglicherweise die Folge der ausbleibenden Dilatation.

Tabelle 6: Echokardiographische Charakterisierung von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen nach drei Wochen TAC

Tabellarisch dargestellt sind echokardiographische Analysen von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen im Alter von acht Wochen (Kon) und nach drei Wochen chronischer linksventrikulärer Druckbelastung (TAC). Die Tabelle zeigt Messergebnisse der interventrikulären septalen Wandstärke (IVS), der linksventrikulären posterioren Wandstärke (LVPW), dem linksventrikulären inneren Durchmesser (LVID), der Verkürzungsfraction (FS) und das relative Herzgewicht, Herzgewicht/Tibiallänge, (HW/TL). Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SEM); * $p < 0.05$ vs. jeweilige Kontrolle; § $p < 0.05$ vs. wt Kon; + $p < 0.05$ vs. wt TAC.

	wt Kon	RKIP-tg Kon	wt TAC	RKIP-tg TAC
IVS, enddiastolisch (mm)	0.64 ± 0.018	0.69 ± 0.034	0.95 $\pm 0.022^*$	0.99 $\pm 0.025^*$
LVPW, enddiastolisch (mm)	0.65 ± 0.018	0.71 ± 0.035	0.90 $\pm 0.026^*$	0.95 $\pm 0.034^*$
LVID, enddiastolisch (mm)	3.62 ± 0.055	3.31 ± 0.091	3.91 $\pm 0.081^*$	3.31 $\pm 0.091^+$
FS (%)	32.6 ± 1.08	40.0 $\pm 1.14§$	24.6 $\pm 0.99^*$	36.0 $\pm 1.81^+$
n	12	8	21	13
HW/TL (mg mm⁻¹)	5.8 ± 0.16	5.5 ± 0.12	9.8 $\pm 0.27^*$	9.1 $\pm 0.33^*$
n	28	29	21	13

Der schützende Effekt von RKIP unter kardialen Stressbedingungen konnte nicht nur im Hinblick auf die Herzfunktion, sondern auch im Hinblick auf das

Überleben gezeigt werden. Wildtyp-Mäuse starben früher unter TAC als RKIP-tg-Mäuse (Abb.13).

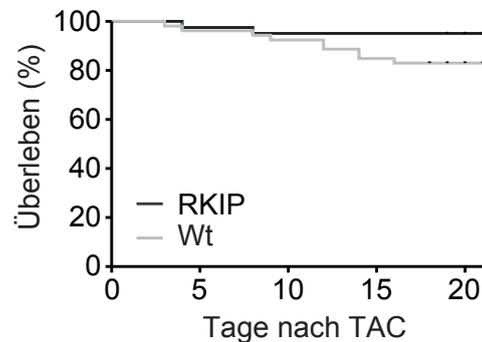


Abbildung 12: Überleben von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen nach drei Wochen TAC

Graphisch dargestellt als Kaplan-Meier-Überlebenskurve ist das prozentuale Überleben von Wildtyp-Mäusen (wt) und RKIP-tg-Mäusen (RKIP) nach chronischer linksventrikulärer Druckbelastung (TAC); n= 22 (wt) und 21 (RKIP).

Durch TAC kommt es in Wildtyp-Mäusen scheinbar zur Entwicklung einer progressiven Herzinsuffizienz mit zunehmender Verschlechterung der Herzfunktion. RKIP-tg-Mäuse scheinen die Belastung durch TAC deutlich besser zu tolerieren und die gute Herzfunktion bleibt langfristig erhalten. Das frühere Sterben von Wildtyp-Mäusen unter TAC ist Folge des versagenden Herzens oder einer Hypertrophie- oder Fibrose-induzierten Arrhythmie.

4.3.2 RKIP schützt vor kardialer Apoptose

Folge chronischer kardialer Belastung und Zeichen nicht vitalen Gewebes sind gesteigerter Zelltod und Apoptose. Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod. Durch Apoptose kommt es zum Verlust funktionsfähiger Kardiomyozyten und zur kardialen Funktionseinschränkung. Es sollte untersucht werden, ob RKIP Einfluss auf die kardiale Apoptose hat. Der TUNEL-Assay ermöglicht es, apoptotische Kardiomyozyten darzustellen, indem während der Apoptose entstehende DNA-Bruchstücke mittels fluoreszenzmarkierter Nukleotide sichtbar gemacht werden (Gavrieli et al. 1992, Kyrylkova et al. 2012). Im TUNEL-Assay wurde gezeigt, dass es unter basalen Bedingungen keinen signifikanten Unterschied der Apoptose zwischen Wildtyp-Mäusen (wt) und RKIP-tg-Mäusen (RKIP) gibt. Nach drei Wochen chronischer

Druckbelastung (TAC) zeigten Wildtyp-Mäuse eine signifikant gesteigerte Apoptose im Vergleich zu basalen 8 Wochen alten Wildtyp-Mäusen, wohingegen es keinen signifikanten Unterschied zwischen RKIP-tg-Mäusen gab.

In Wildtyp-Mäusen kommt es nach drei Wochen TAC zum signifikanten Anstieg der Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten, im Vergleich dazu zeigt sich in RKIP-tg-Mäusen ein deutlich geringerer, nicht signifikanter Anstieg der Apoptose durch TAC (Abb. 14). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass RKIP einen Schutz vor Apoptose infolge chronischer Druckbelastung bietet.

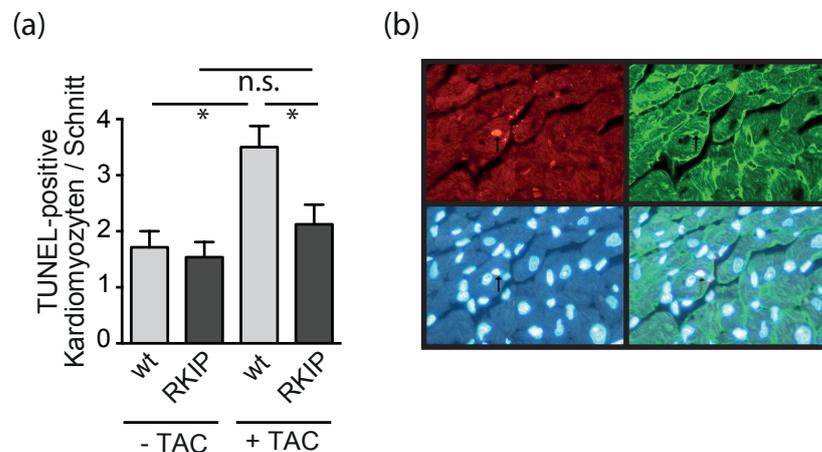


Abbildung 13: Analyse der Kardiomyozytenapoptose in Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen mittels TUNEL-Assay

Mittels TUNEL-Assay erfolgte die Quantifizierung der Kardiomyozyten-Apoptose in murinen Herzen von Kontroll-Mäusen und murinen Herzen nach drei Wochen TAC. Graph (a) zeigt die Quantifizierung TUNEL-positiver Kardiomyozyten. Abbildung (b) zeigt ein repräsentatives Foto eines Herzschnitts mit TUNEL-positivem Zellkern (↑). Links oben werden TUNEL-positive apoptotische Zellkerne, links unten Hoechst-positive Zellkerne, rechts oben durch WGA gefärbte Zellgrenzen sichtbar. Rechts unten ist die Überlagerung als Mehrkanalbild dargestellt. Mittelwert \pm SEM; *, $p < 0.05$ wie angegeben; $n = 7$ (wt -TAC), 13 (RKIP - TAC), 8 (wt TAC) und 8 (RKIP TAC).

Um die Ergebnisse des TUNEL-Assays zu validieren, bestimmte ich die myokardiale Apoptose auf molekularer Ebene mittels Caspase-Assay und bestätigte die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen. Caspasen, „Cystein-Aspartat spezifische Proteasen“ sind Enzyme, die eine entscheidende Rolle bei Apoptose spielen. Der Caspase-Assay ermöglicht es die Aktivität der Caspasen 3 und 7 zu messen, indem nach Zellyse und Freisetzung der

Caspasen ein Substrat durch die Caspasen gespalten und daraufhin durch Luciferase ein Lumineszenzsignal erzeugt und dessen Stärke gemessen wird. Unter basalen Bedingungen zeigten sich bei niedriger Caspase-Aktivität keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen. Nach chronischer linksventrikulärer Druckbelastung zeigte der Caspase-Assay eine signifikante Steigerung der Caspasen-Aktivität bei Wildtyp-Mäusen. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 war nach drei Wochen TAC in RKIP-tg-Mäusen signifikant geringer als in Wildtyp-Mäusen (Abb. 15).

Die geringere Zunahme der Apoptose nach chronischer, linksventrikulärer Druckbelastung in RKIP-tg-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen könnte eine potentiell protektive Funktion von RKIP bei der Entwicklung von Herzinsuffizienz anzeigen.

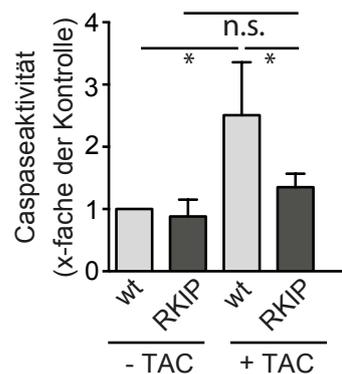


Abbildung 14: Analyse der Kardiomyozytenapoptose in Herzen von Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen mittels Caspase-Assay

Mittels Caspase-Assay erfolgte die Quantifizierung der Kardiomyozyten-Apoptose in murinen Herzen von Kontroll-Mäusen (wt - TAC) und murinen Herzen drei Wochen nach TAC. Mittelwert ± SEM; *, $p < 0.05$ wie angegeben; $n = 4$ (wt - TAC), 6 (RKIP - TAC), 4 (wt TAC) und 3 (RKIP TAC).

4.3.3 RKIP schützt vor kardialer interstitieller Fibrose

Kardialer Stress führt zur Umstrukturierung vom Herzgewebe. Es kommt zum bindegewebigen Umbau, zur Zunahme des Kollagenanteils und schließlich zur Versteifung und Funktionseinschränkung des Herzens (Brower et al. 2006), zudem wird durch die zusätzlichen Myofibroblasten die Gefahr kardialer Arrhythmien erhöht (Rohr 2009). Es sollte untersucht werden, ob RKIP einen Einfluss auf den gewöhnlich mit Herzinsuffizienz einhergehenden bindegewebigen Umbau hat. Die Sirius-Rot-Kollagenfärbung ermöglicht, in

histologischen Schnitten Kollagenewebe rot anzufärben und somit den Kollagenanteil im Gewebe sichtbar zu machen. Untersuchungen der myokardialen interstitiellen Fibrose mittels Sirius-Rot-Kollagenfärbung ergaben unter basalen Bedingungen keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen. Nach dreiwöchiger chronischer Druckbelastung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der kardialen interstitiellen Fibrose in Wildtyp-Mäusen und ein nicht signifikanter Anstieg in RKIP-tg-Mäusen. Die interstitielle Fibrose war nach drei Wochen TAC in Wildtyp-Mäusen signifikant höher als in RKIP-tg-Mäusen (Abb. 16). Diese Ergebnisse bestätigen weiter, dass RKIP möglicherweise einen schützenden Effekt in Bezug auf die Entwicklung von Herzinsuffizienz unter TAC hat.

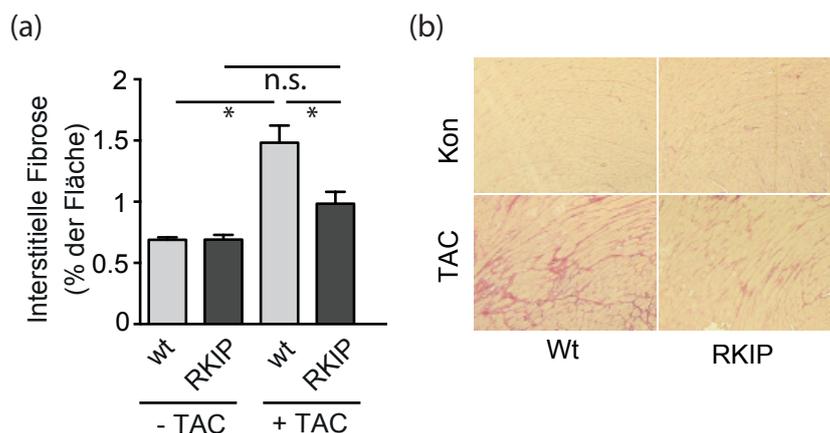


Abbildung 15: Analyse der kardialen interstitiellen Fibrose mittels Sirius-Rot-Kollagenfärbung

Graph (a) zeigt die Quantifizierung der kardialen interstitiellen Fibrose mittels Sirius-Rot-Kollagenfärbung von histologischen Schnitten des linken Ventrikels. Die rote Färbung wurde als Anteil der Gesamtfläche des Querschnitts graphisch dargestellt. Repräsentative Schnitte von den mittels Sirius-Rot-Färbung bearbeiteten linken Ventrikel aus Kontroll-Mäusen und Mauserzen drei Wochen nach TAC werden in (b) gezeigt. Mittelwert \pm SEM; *, $p < 0.05$ wie angegeben; $n = 7$ (wt - TAC), 10 (RKIP - TAC), 18 (wt TAC) und 12 (RKIP TAC).

Zur Validierung der Ergebnisse der histologischen Analysen untersuchte ich die mRNA-Expression von vier Fibrose-Markergenen. Kardiale Fibrosierung bedeutet eine Zunahme und Veränderung des Grundgerüsts der kardialen extrazellulären Matrix (EZM), dabei sind Kollagen I und III der Hauptbestandteil der kardialen EZM (Berk et al. 2007). Das Protein Periostin wird als geeigneter

Fibrosemarker beschrieben. Untersuchungen humaner, insuffizienter Herzen zeigten, dass die Periostin-Expression gut mit dem Grad der Fibrosierung korreliert (Zhao et al. 2014). Auch *Transforming Growth Factor β* (TGF β) und *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) werden mit kardialer Fibrosierung in Verbindung gebracht. Es wurde gezeigt, dass TGF β spezifisch die Bildung von CTGF in Kardiomyozyten und Fibroblasten induziert und die Hochregulation von TGF β und CTGF in Rattenherzen nach einem myokardialen Infarkt gut mit der Produktion Fibrose-relevanter Proteine, zum Beispiel Kollagen Typ I oder III, korreliert (Chen et al. 2000).

Kollagen Typ III alpha 1 (Col3 α 1), Periostin, TGF β und CTGF zeigten bei Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen unter basalen Bedingungen keine signifikant unterschiedliche mRNA-Expression. Nach chronischer linksventrikulärer Druckbelastung zeigte sich bei Wildtyp-Mäusen eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression der Fibrosemarker Col3 α 1 und Periostin. Die mRNA-Expression dieser Marker nach TAC ergab in Wildtyp-Mäusen signifikant höhere Werte als in RKIP-tg-Mäusen. Nach drei Wochen TAC zeigte sich ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von TGF β und CTGF in Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen. Jedoch war der Unterschied der mRNA-Expression in RKIP-tg-Mäusen nicht signifikant geringer als in Wildtyp-Mäusen (Abb.17).

Die geringere Fibrose-Entwicklung nach drei Wochen chronischer linksventrikulärer Druckbelastung in RKIP-tg-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen könnte eine protektive Funktion von RKIP bei der Entwicklung von Herzinsuffizienz anzeigen. Eine Erklärung für den simultanen Anstieg der mRNA-Expression der Fibrosemarker TGF β und CTGF in RKIP-tg-Mäusen und in Wildtyp-Mäusen könnte auf eine nicht für Fibrose spezifische Markerfunktion hinweisen.

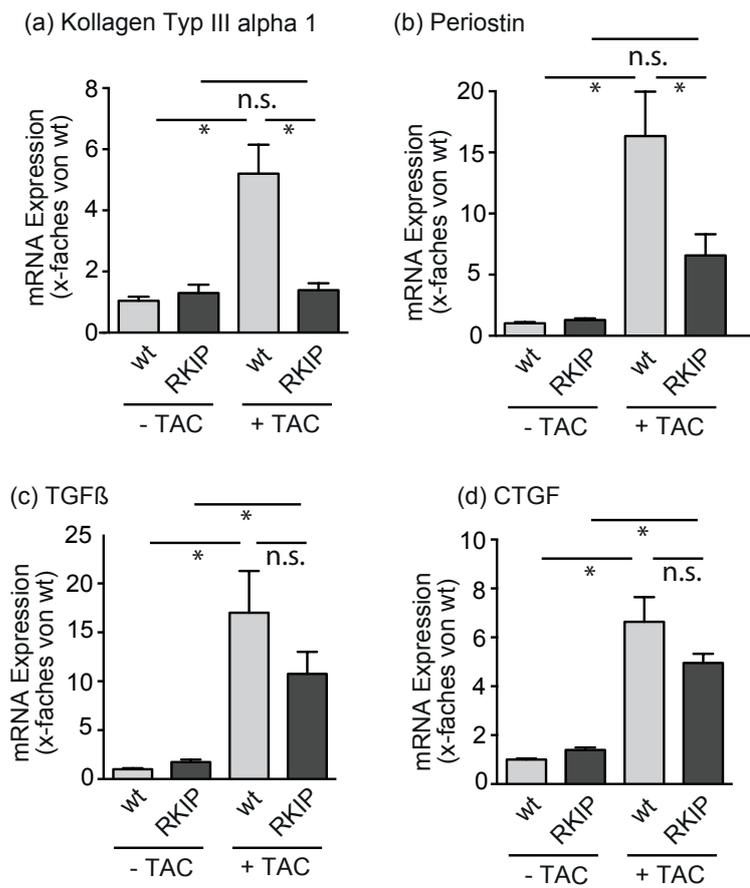


Abbildung 16: mRNA-Expression verschiedener Fibrosemarker in Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen

Die Quantifizierung der mRNA-Expression von (a) Kollagen Typ III (Col3a1; n= 5 (wt - TAC), 4 (RKIP - TAC), 5 (wt TAC) und 5 (RKIP TAC)), (b) Periostin (n= 5 (wt - TAC), 5 (RKIP - TAC), 4 (wt TAC) und 5 (RKIP TAC)), (c) TGFβ (n= 5 (wt - TAC), 5 (RKIP - TAC), 4 (wt TAC) und 5 (RKIP TAC)) und (d) CTGF (n= 5 (wt - TAC), 5 (RKIP - TAC), 4 (wt TAC) und 5 (RKIP TAC)) erfolgte mittels *real-time*-PCR in Herzen von Kontroll-Mäusen (- TAC) und drei Wochen nach TAC (TAC). Mittelwert \pm SEM; *, p < 0.05 wie angegeben, n repräsentieren die Anzahl Mäuse, die in Triplikaten gemessen wurden.

4.3.4 RKIP beeinflusst die Expression der Herzinsuffizienzmarker BNP und ANF

In der Literatur sind das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) und der atriale natriuretische Faktor (ANF) als prognostische und diagnostische Biomarker für Herzinsuffizienz und kardiale Hypertrophie beschrieben (Falcao et al. 2004, Battistoni et al. 2012, Sergeeva and Christoffels 2013). BNP wird zudem als geeigneter Herzinsuffizienzmarker im klinischen Alltag beschrieben und genutzt (Palazzuoli et al. 2012). Beide Peptide werden unter kardialer Belastung aus dem Herzgewebe ausgeschüttet.

Ich analysierte die mRNA-Expression der Marker, um zu untersuchen, ob die Ligation der *Aorta transversa* ein geeignetes Herzinsuffizienzmodell darstellt beziehungsweise um den potentiell protektiven Effekt von RKIP bei Herzinsuffizienz zu untermauern. Mit Hilfe der *real-time* PCR wurden BNP und ANF auf mRNA-Ebene bei Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen bestimmt. Unter basalen Bedingungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der BNP- und ANF-mRNA-Expression zwischen acht Wochen alten Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen. Drei Wochen chronische linksventrikuläre Druckbelastung (TAC) bewirkten in Wildtyp- und RKIP-tg-Mäusen je einen signifikanten Anstieg der BNP- und ANF-mRNA-Expression. Während die BNP-mRNA-Expression in RKIP-tg-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach TAC signifikant niedriger lag, war der Unterschied der ANF-mRNA-Expression zwischen Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen nach Ligation nicht signifikant (Abb. 18). Der signifikante Anstieg der BNP- und ANP-Expression spricht für die kardiale Mehrbelastung durch TAC. Die signifikant geringere BNP-Expression nach TAC in RKIP-tg-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse und spricht für die schützende Funktion von RKIP bei der Entwicklung von Herzinsuffizienz durch TAC.

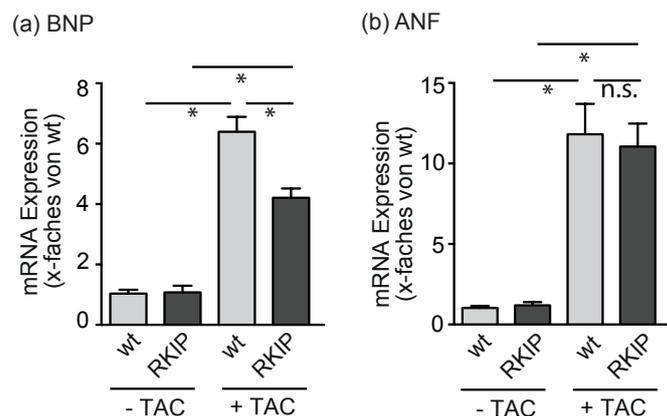


Abbildung 17: mRNA-Expression von BNP und ANF in Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen

Gezeigt sind die Ergebnisse der Quantifizierung der mRNA-Expression von BNP (a) und ANF (b) mittels *real-time* PCR in basalen Herzen und murinen Herzen vor (-TAC) und nach drei Wochen TAC (+ TAC). Mittelwert \pm SEM; *, $p < 0.05$ wie angegeben; $n = 5$ (wt - TAC), 5 (RKIP - TAC), 4 (wt + TAC) und 5 (RKIP + TAC), n repräsentiert die Anzahl Mäuse, die in Triplikaten gemessen wurden.

5 Diskussion

5.1 Welche Funktion hat RKIP bei Herzinsuffizienz?

GRK2 ist bei Herzinsuffizienz hochreguliert (Ungerer et al. 1993, Ungerer et al. 1994). Die direkte Interaktion von RKIP und der Proteinkinase GRK2 wurde 2003 beschrieben und RKIP als physiologischer Inhibitor von GRK2 charakterisiert (Lorenz et al. 2003). Es wurde gezeigt, dass RKIP nach Aktivierung von verschiedenen GPCR phosphoryliert und dadurch die Phosphorylierung unter anderem von β -adrenergen Rezeptoren gehemmt wird. Phosphoryliertes RKIP senkt z.B. die Phosphorylierung des β 2-Adrenozeptors durch GRK2 und die Rezeptorinternalisierung (Lorenz et al. 2003). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob RKIP als GRK2-Inhibitor eine mögliche Rolle bei Herzinsuffizienz spielt. Verzögert eine gesteigerte RKIP-Expression über GRK2-Inhibition und Resensitisierung beziehungsweise verminderte Desensitisierung kardialer β -adrenerger Rezeptoren möglicherweise die Progression von Herzinsuffizienz? Es wurden die Auswirkungen einer gesteigerten RKIP-Expression für die Progression von Herzinsuffizienz anhand typischer Herzinsuffizienzparameter beurteilt. Das Expressionsmuster von endogenem RKIP bei Herzinsuffizienz sollte untersucht werden, um herauszufinden, ob der Organismus selbst die protektiven Wirkungen von RKIP unter kardialen Stressbedingungen nutzt. Eine Korrelation zwischen RKIP-Expression und der Progression zum Beispiel von Krebserkrankungen oder Alzheimer wurde bereits beschrieben (Maki et al. 2002, Hagan et al. 2005, Park et al. 2005).

5.2 Die Expression von RKIP in humanem und murinem Herzgewebe unter kardialen Stressbedingungen

Ein verändertes Expressionsmuster von RKIP unter kardialen Stressbedingungen im Vergleich zu basalen Bedingungen könnte Hinweise auf die Funktion des Proteins im Organismus geben. Da RKIP als GRK2-Inhibitor funktioniert und GRK2 bei Herzinsuffizienz verstärkt exprimiert wird (1.3.2),

könnte auch die Expression von RKIP bei Herzinsuffizienz verändert sein. Deswegen wurde die RKIP-Protein- und -mRNA-Expression unter kardialen Stressbedingungen bestimmt und mit Expressionsmustern unter basalen Bedingungen verglichen. Nach drei Wochen TAC wurde eine signifikante Steigerung der kardialen RKIP-Protein- und RKIP-mRNA-Expression in Mäusen und auf Proteinebene auch in Proben humaner herzinsuffizienter Herzen und humaner Herzproben bei Aortenstenose im Vergleich zu gesunden Herzproben beobachtet. Möglicherweise stellt die erhöhte RKIP-Expression einen kardialen Stress-induzierten Anpassungsmechanismus dar. Die Hochregulation von RKIP könnte über die GRK2-Inhibition eine gesteigerte GPCR-Aktivität im Herzen, insbesondere β -adrenerger Rezeptoren, bewirken und so die Herzfunktion stärken und die Entwicklung von Herzinsuffizienz verzögern (siehe 1.4.2). Man nimmt an, dass die Dauerstimulation von β -adrenergen Rezeptoren im Herzen zur GRK2-vermittelten homologen Desensibilisierung von GPCR führt (siehe 1.2.2). Eine Hochregulation von RKIP könnte dazu beitragen, dass durch Inhibition von GRK2 die Desensibilisierung von GPCR vermindert wird und die GPCR-Aktivität trotz Dauerstimulation nicht beeinträchtigt wird.

5.3 RKIP induziert einen gut tolerierten hyperkontraktilen Phänotyp in Mäusen

Da RKIP als GRK2-Inhibitor wirkt und die Inaktivierung von Rezeptoren, die unter anderem für die kardiale Kontraktilität wichtig sind, möglicherweise durch diesen Mechanismus beeinflusst werden, könnte die Überexpression des Proteins eine verbesserte Herzfunktion bewirken. Es konnte gezeigt werden, dass die herzspezifische Überexpression von RKIP in Mauserzen positive Effekte auf die Herzfunktion hat. Echokardiographische Untersuchungen acht Wochen bis zwölf Monate alter Mäuse, die RKIP herzspezifisch überexprimierten, zeigten eine gesteigerte Verkürzungsfraction als Maß für die linksventrikuläre Kontraktilität und der lebenslang bestehende hyperkontraktile Phänotyp wurde gut toleriert ohne Verkürzung der Lebenszeit (Lorenz *et al.*, unpublizierte Daten). Die RKIP-Überexpression könnte durch GRK2-Inhibition eine ungehemmte GPCR-Signalgebung und eine verminderte

Desensibilisierung beziehungsweise die Resensitisierung kardialer β -Rezeptoren bewirken.

Für den hyperkontraktilen Phänotyp scheint insbesondere die Stimulation von β 1-adrenergen Rezeptoren wichtig zu sein. Es wurde gezeigt, dass der selektive β 1AR-Antagonist Esmolol in Wildtyp- und RKIP-tg-Mäusen die Herzfrequenz reduzierte und Kontraktions- und Relaxationszeiten verlängerte. In RKIP-tg/ β 1-*knockout*-Mäusen wurden keine kürzeren Kontraktions- oder Relaxationszeiten und kein günstiger Einfluss von RKIP auf die Verkürzungsfraction beobachtet. Das Fehlen von β 2AR beeinflusste die Hyperkontraktilität RKIP-tg-Mäuse dagegen nicht (Schmid et al. 2015).

Interessanterweise wird die dauerhafte Hyperkontraktilität durch die RKIP-Überexpression gut toleriert. Es scheint nicht zu strukturellen oder funktionellen Einschränkungen zu kommen. Wie in den Versuchsergebnissen beschrieben, reduziert RKIP durch chronische Druckbelastung hervorgerufene, schädliche, strukturelle Veränderungen wie Apoptose oder Fibrose. Auch funktionelle Einschränkungen (z.B. verminderte Verkürzungsfraction oder Auftreten tödlicher Arrhythmien) treten unter RKIP reduziert auf. Dies ist möglicherweise durch die dauerhafte Stimulation von β 2AR erklärbar. Es wurde gezeigt, dass nach drei Wochen TAC positiv inotrope, anti-apoptotische und anti-fibrotische Effekte in RKIP-tg/ β 1-*knockout*-Mäusen erhalten blieben. Das Fehlen von β 2AR in RKIP-tg/ β 2-*knockout*-Mäusen bewirkte nach drei Wochen TAC eine Zunahme von Apoptose und Fibrose (Schmid et al. 2015).

Scheinbar bewirkt RKIP auf der einen Seite eine gesteigerte Kontraktilität und schützt das Herz gleichzeitig vor Schäden, die durch eine vermehrte Belastung des Herzens hervorgerufen werden. Denn gesteigerte Kontraktilität bedeutet für das Herzgewebe eine Belastung im Sinne von z.B. einer stärkeren Wandspannung.

5.4 Die Ligation der *Aorta transversa* (TAC) bewirkt in C57BL/6J-Mäusen einen herzinsuffizienten Phänotyp

Um die Rolle von RKIP bei Herzinsuffizienz zu untersuchen, sollte ein gut reproduzierbares, stabiles Modell gewählt werden. Es gibt verschiedene Ursachen für Herzinsuffizienz und diese können durch verschiedene Modelle simuliert werden. So können Gendefekte zur Herzinsuffizienz führen. Murine Herzinsuffizienzmodelle wie die herzspezifische Überexpression oder Deletion bestimmter Gene wurden mehrfach beschrieben. Zum Beispiel bewirkte die herzspezifische Überexpression von Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) in Mäusen die Entwicklung von Herzinsuffizienz (Kubota et al. 1997). Ein anderes Beispiel sind Mäuse, denen das Muskel-spezifische LIM-Protein fehlte, welches eine wichtige Rolle für die Zytoarchitektur im Herzen spielt, und dadurch eine dilatative Kardiomyopathie entwickelten (Arber et al. 1997). Schmitt et al. zeigten 2003, dass eine *missense*-Mutation im Phospholamban ursächlich für eine dilatative Kardiomyopathie ist und in Mäusen zur Entwicklung von Herzinsuffizienz führte. Eine Dysregulation der für die kardiale Kontraktilität wichtigen Calciumhomöostase war in diesem Modell die Ursache der Entwicklung des Herzversagens (Schmitt et al. 2003). Des Weiteren ist bekannt, dass bestimmte Substanzen, z.B. Medikamente, kardiotoxisch wirken und bei Menschen das Herz schädigen beziehungsweise die Entwicklung von Herzinsuffizienz bewirken. Ethanol (Berk et al. 1975), das Zytostatikum Doxorubicin (Delgado et al. 2004) und Isoprenalin, ein synthetisches Sympathomimetikum, welches früher als Bronchospasmolytikum und bei der Reanimation zum Einsatz kam, führten zur Herzinsuffizienz in Mäusen (Oudit et al. 2003). Häufige Gründe für eine Dysfunktion des Herzens sind ein Myokardinfarkt oder eine dauerhaft gesteigerte Nachlast und kardiale Belastung z.B. durch eine Aortenstenose. Operative Herzinsuffizienzmodelle, die genau diese Pathologien simulieren, kommen am häufigsten in der Forschung zur Anwendung. Die Ligation der *Aorta transversa* (TAC) bewirkt durch chronisch gesteigerte linksventrikuläre Druckbelastung, dass Mäuse innerhalb weniger Wochen herzinsuffizient werden. Der operative Verschluss einer Koronararterie

verursacht einen myokardialen Infarkt und macht Mäuse herzinsuffizient (Breckenridge 2010).

TAC gilt als gut reproduzierbar, es zeichnet sich durch hohe chirurgische Überlebensraten und eine gleichmäßige Entwicklung von Herzinsuffizienz aus. Druckbedingt entwickeln Mäuse zunächst eine konzentrische kardiale Hypertrophie mit gesteigerter Kontraktilität. Langfristig kommt es zur Dilatation des linken Ventrikels und Herzinsuffizienz (deAlmeida et al. 2010). In Voruntersuchungen erwies sich TAC als geeignet, um einen herzinsuffizienten Phänotyp in C57BL/6J-Mäusen zu generieren (siehe 4.2.1, Abb.12 und Tab.6). Acht Wochen alte Mäuse erhielten eine Ligation der *Aorta transversa* und wurden drei Wochen später echokardiographisch untersucht. Die Analysen zeigten, dass nach chronischer Druckbelastung durch TAC die linksventrikuläre posteriore Herzwand (LVPW) signifikant verdickt und der linksventrikuläre innere Durchmesser (LVID) signifikant vergrößert waren. Zudem war die Verkürzungsfraction (FS) nach TAC signifikant reduziert. Nach einem Zeitraum von drei Wochen TAC waren die Herzfunktion geschädigt und die Mäuse herzinsuffizient (Lorenz et al., unpublizierte Daten).

Die Ligation der *Aorta transversa* (TAC) führt wie eine Aortenstenose zur kardialen Druckbelastung. Bei Aortenstenose ist eine verringerte Aortenklappenöffnungsfläche der Grund für einen Druckgradienten zwischen prästenotischem und poststenotischem Abschnitt. In beiden Fällen ist eine gesteigerte Kraft nötig, um Blut aus dem Herzen in die Peripherie zu pumpen. Die gesteigerte Kontraktilität resultiert aus der kompensatorischen Dickenzunahme der linksventrikulären Wand. Zudem führt die kompensatorische Dickenzunahme des linken Ventrikels zur Reduktion der durch gesteigerten Druck erhöhten Wandspannung. Das LAPLACE-Gesetz beschreibt physikalisch den Zusammenhang der (hier linksventrikulären) Wandspannung (T), der Wandstärke (hier des linken Ventrikels) (d), dem (hier linksventrikulären) Druck (p) und dem Radius (hier linksventrikulärer innerer Radius): Die linksventrikuläre Wandspannung (T) ist proportional zu dem Produkt aus intraventrikulärem Radius (r) und transmuraalem Druck (p) und umgekehrt proportional zu der Dicke der Herzwand (d) ($T = r p / (2 d)$).

Durch Kardiomyozytenwachstum und Neuformierung von Sarkomeren bewirkt die durch Aortenstenose verursachte pathologische Hypertrophie zunächst die Normalisierung der Wandspannung. Langfristig führen die übermäßige Anreicherung von Fibroblasten und die damit verbundene Vermehrung kollagenen Bindegewebes und extrazellulärer Matrix zur kardialen Versteifung und Dysfunktion. Zudem wird die pathologische Hypertrophie mit der Hochregulation fetaler Gene wie zum Beispiel ANP oder fetaler Isoformen kontraktiler Proteine in Verbindung gebracht (Brower et al. 2006, McMullen and Jennings 2007). Untersuchungen herzkranker Menschen zeigten zudem, dass die Entwicklung einer Hypertrophie aufgrund einer Aortenstenose mit einer Blutminderversorgung des betroffenen Herzgewebes korreliert (Marcus et al. 1982). Die chronische Mangelversorgung könnte ein mitverantwortlicher Stimulus für Apoptose und Zunahme des kollagenen Bindegewebes sein.

Wie weiter oben beschrieben, bewirken kardiale Stressbedingungen wie TAC und in humanen Herzen eine Aortenstenose die Hochregulation von RKIP. Dies ist interessant, da die RKIP-Überexpression in Mäusen Schutz vor einer Verschlechterung der Herzfunktion (Verkürzungsfraction), antiapoptotische und antifibrotische Effekte bietet. Die Hochregulation untermauert die protektive Funktion von endogenem RKIP und könnte einen Versuch oder Kompensationsmechanismus des Organismus darstellen, um die bei Herzinsuffizienz verminderte Herzfunktion zu stabilisieren und zu stärken.

5.5 Die herzspezifische RKIP-Überexpression hat protektive Effekte im murinen Herzinsuffizienzmodell TAC

5.5.1 RKIP schützt vor Verschlechterung der Herzfunktion

Um eine potentiell protektive Rolle von RKIP zu zeigen, wurden mittels Echokardiographie als Maße für die Herzfunktion die Verkürzungsfraction (FS) und die linksventrikuläre Dilatation ermittelt. Es sollte untersucht werden, ob Mäuse, die RKIP herzspezifisch überexprimieren, einen Vorteil im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen haben bezüglich der Resistenz gegenüber einer dauerhaften kardialen Mehrbelastung durch TAC.

Bei Herzinsuffizienz ist die Herzfunktion geschwächt und der Organismus wird unzureichend mit Sauerstoff versorgt. Kompensatorisch kommt es zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems, zunächst mit Steigerung von Herzkraft und Herzfrequenz. Die dauerhafte sympathische Stimulation führt zum Verlust der Herzfunktion und zu Herzversagen. Auch bei TAC ist eine gesteigerte Herzarbeit nötig, um die gesteigerte Nachlast zu bewältigen. In Wildtyp-Mäusen nahm nach drei Wochen TAC die Verkürzungsfraction signifikant ab und die linksventrikuläre Dilatation signifikant zu, in RKIP-tg-Mäusen hatte chronische linksventrikuläre Druckbelastung keine signifikante Abnahme der Verkürzungsfraction und auch keine signifikante linksventrikuläre Dilatation zur Folge. Interessant ist, dass Wildtyp-Mäuse und RKIP-tg-Mäuse nach dreiwöchiger kardialer Druckbelastung eine ähnlich starke kardiale Hypertrophie (IVS, LVPW) und einen ähnlichen Anstieg des Herzgewichts (HW/TL) aufwiesen. Die Herzfunktion in RKIP-tg-Mäusen wurde auf Dauer, wie oben beschrieben, trotz zunehmender Hypertrophie nicht signifikant beeinträchtigt.

Es ist bekannt, dass ein Anstieg von Herzfrequenz und Herzkontraktilität über β 1-adrenerge Rezeptoren vermittelt wird. Engelhardt et al. zeigten 1999, dass Mäuse, die β 1-adrenerge Rezeptoren herzspezifisch überexprimierten, eine gesteigerte kardiale Kontraktilität und eine myozytären Hypertrophie entwickelten. Im Verlauf kam es zur progressiven Herzinsuffizienz mit funktionellen und histologischen Defiziten (Engelhardt et al. 1999). Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und β 1-adrenerger Rezeptoren zwar vorübergehend zur Verbesserung der Herzfunktion führt, aber auf lange Sicht das Herz schädigt. Eine herzspezifische Überexpression von RKIP scheint zu verhindern, dass die ständige sympathische Stimulation das Herz schädigt, denn RKIP-tg-Mäuse weisen nach drei Wochen TAC eine deutlich bessere Herzfunktion und -struktur auf als Wildtyp-Mäuse.

Möglicherweise ist die Interaktion von RKIP und PKC für das simultane Auftreten von Herzwachstum und kaum veränderter Herzfunktion in RKIP-tg-Mäusen bedeutsam. Wie weiter oben beschrieben bewirkt die Phosphorylierung

von RKIP an Serin¹⁵³ durch PKC-Isoformen, dass phosphoryliertes RKIP GRK2 inhibiert und darüber protektive Effekte bezüglich der Herzfunktion vermittelt. Und die Raf/MEK/Erk1/2-Signalkaskade, die nach Phosphorylierung von RKIP ungehemmt ablaufen kann, vermittelt kardiale Hypertrophie (siehe 1.4.1).

5.5.2 RKIP schützt vor kardialer Apoptose und Fibrose

Um die potentiell protektiven Effekte von RKIP für die bei Herzinsuffizienz auftretenden kardialen Strukturänderungen zu evaluieren, führte ich Versuche zur Beurteilung der linksventrikulären Apoptose und kardialen interstitiellen Fibrose durch. Zunahme kardialen interstitiellen Bindegewebes und Verlust funktionsfähiger Kardiomyozyten bedingen eine Versteifung des Herzgewebes und sind mitverantwortlich für eine eingeschränkte Herzfunktion beziehungsweise Herzinsuffizienz.

Histologische Analysen zeigten nach chronischer Druckbelastung in Wildtyp-Mäusen gesteigerte Fibrose (Sirius Rot-Kollagenfärbung) und Kardiomyozyten-Apoptose (TUNEL-Assay). Unter basalen Bedingungen zeigten sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp-Mäusen und RKIP-tg-Mäusen. Die Analyse der Aktivität der Caspasen 3 und 7 mittels Caspase-Assay verifizierte die oben genannten Ergebnisse des histologischen TUNEL-Assays und die mittels quantitativer *real-time* PCR gemessene gesteigerte mRNA-Expression der Fibrosemarker Kollagen III und Periostin nach chronischer linksventrikulärer Druckbelastung untermauerten die Ergebnisse der Sirius-Rot-Kollagenfärbung. Die RKIP-Überexpression scheint tatsächlich zu einer besseren Toleranz von durch TAC verursachter Druckbelastung zu führen und vor TAC induzierten Schäden zu schützen. In Mäusen, die durch eine *missense*-Mutation im Phospholamban herzsuffizient wurden, hatte RKIP auch protektive Effekte im Hinblick auf strukturelle Veränderungen und bewirkte eine Reduktion von Apoptose und Fibrose (Lorenz *et al.*, unpublizierte Daten).

Unklar ist, wie RKIP auf molekularer Ebene den beobachteten Effekt auf Fibrose und Apoptose bewirkt. Möglicherweise vermittelt der β_2 -adrenerge Rezeptor antiapoptotische und antifibrotische Effekte. Kürzlich wurde gezeigt, dass RKIP-tg/ β_2 -*knockout*-Mäuse nach TAC Apoptose und Fibrose in gleichem

Ausmaß wie β_2 -*knockout*-Kontrollmäuse entwickelten. Der antiapoptotische und antifibrotische Effekt von RKIP blieb in RKIP-tg- β_1 -*knockout*-Mäuse dagegen erhalten (Lorenz *et al.*, unpublizierte Daten).

Interessanterweise kann RKIP auch als Raf1-Inhibitor fungieren (s. 1.4.1). Die aus der Raf1-Inhibition resultierende Abschwächung der Erk1/2-Signalgebung sollte eine Zunahme der Apoptose von Kardiomyozyten bewirken. Mehrfach wurde gezeigt, dass Erk1/2 antiapoptische Effekte in murinen Kardiomyozyten hat (Bueno *et al.* 2000, Harris *et al.* 2004, Purcell *et al.* 2007, Kehat and Molkenstin 2010, Ruppert *et al.* 2013). Dass eine sehr ausgeprägte herzspezifische Überexpression von RKIP in Mäusen eine Raf1-Inhibition und eine Zunahme TUNEL-positiver Kardiomyozyten in Mausherzen bewirkte, wurde kürzlich durch Fu *et al.* gezeigt (Fu *et al.* 2013). Physiologische RKIP-Konzentrationen dagegen scheinen Erk1/2 nicht zu beeinflussen (K.Lorenz *et al.*, unpublizierte Daten). In für RKIP transgenen Mäusen wurden wie oben beschrieben starke antiapoptotische Effekte beobachtet und in weiteren Versuchen zeigten RKIP-defiziente Mäuse eine gesteigerte Apoptose. Möglicherweise wirkt RKIP bei physiologischen Konzentrationen nur als GRK2-Inhibitor und die Raf1-Aktivität bleibt unbeeinflusst. Ein anderer Erklärungsansatz ist, dass sich die gleichzeitige Aktivierung von Erk1/2 über stimulierte GPCR und die Erk1/2-Inhibition in einem Gleichgewicht befinden, sodass sich der Effekt auf die Erk1/2-Aktivität nicht verändert (K. Lorenz *et al.*, unpublizierte Daten).

Die mRNA-Expression der *Fibrosemarker Transforming Growth Factor beta* (TGF β) und *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) nach drei Wochen TAC in transgenen und in Wildtyp-Mäusen stieg signifikant an, aber ein signifikanter Unterschied der mRNA-Expression zwischen Wildtyp-Mäusen und der transgenen Mausgruppe bestand nicht. Möglicherweise sind die Proteine nicht spezifisch für Fibrose im Herzen. TGF β und CTGF werden auch mit der kardialen Hypertrophie in Verbindung gebracht. In Proben aus humanen Herzen mit hypertropher Kardiomyopathie war die mRNA-Expression von TGF β gesteigert (Li *et al.* 1997). CTGF-transgene Mäuse entwickelten nach vier Monaten eine kardiale Hypertrophie und verdeutlichen die Hypertrophie-

induzierende Rolle von CTGF (Panek et al. 2009). Vorergebnisse von Herzechoanalysen der in dieser Arbeit untersuchten Tiere zeigten, dass die linksventrikuläre posteriore Wandstärke (LVPW), ein Maß für die kardiale Hypertrophie, drei Wochen nach Ligation der *Aorta transversa* bei Wildtyp-Mäusen als auch bei RKIP-transgenen Mäusen signifikant gesteigert war. Diese Untersuchungsergebnisse und der weiter oben (siehe 4.3.3) beschriebene Effekt von TGF β auf die CTGF-Expression in Fibroblasten und in Kardiomyozyten könnte eine Erklärung für den nicht signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen nach TAC sein.

Zwar konnte kein inhibierender Effekt von RKIP auf die Entwicklung von Hypertrophie und Herzwachstum gezeigt werden, wohl aber auf die strukturellen Eigenschaften des wachsenden Gewebes. Bei RKIP-Überexpression entwickelte sich trotz pathologischem Stimulus (chronische Druckbelastung durch TAC) keine pathologische kardiale Hypertrophie.

5.5.3 Die herzspezifische Überexpression von RKIP beeinflusst die Expression der Herzinsuffizienzmarker ANF und BNP

Die Plasmakonzentrationen von ANF und BNP sind bei Herzinsuffizienz erhöht. Sie gelten als Biomarker für Herzinsuffizienz mit verminderter Ejektionsfraktion. Es ist bekannt, dass sie kardioprotektiv wirken und man nimmt an, dass sie unter anderem aufgrund ihrer diuretischen Wirkung einen kompensatorischen Effekt bei Herzinsuffizienz haben (Nishikimi et al. 2006, Dietel et al. 2012). ANF- und BNP-Spiegel werden durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Zunehmendes Alter oder eine schlechte Nierenfunktion führen zu einem Anstieg. Bei Adipositas oder unter adäquater Therapie können die Werte verringert sein (Dietel et al. 2012).

Um die Rolle von RKIP für die Expression von ANF und BNP zu beurteilen, untersuchte ich die mRNA-Expression der Proteine in Herzen von Wildtyp- und transgenen Mäusen vor und nach chronischer kardialer Druckbelastung. Wie weiter oben beschrieben haben RKIP-tg-Mäuse nach TAC eine bessere Herzfunktion, aufgrund eines fehlenden Effekts von RKIP auf die linksventrikuläre Wanddicke weisen sie aber einen hypertrophen kardialen

Phänotyp auf. Die beobachtete signifikante Steigerung der mRNA-Expression von ANF und BNP in Wildtyp- und in transgenen Mäusen nach drei Wochen TAC steht möglicherweise damit in Zusammenhang.

Verschiedene Studien zeigten, dass BNP besser als Herzinsuffizienzmarker geeignet ist als ANF. Eine Langzeitstudie an Patienten mit chronisch progredienter Herzinsuffizienz zeigte einen Anstieg von ANF und BNP mit fortschreitender Herzinsuffizienz. Es wurde beobachtet, dass BNP als prognostischer Marker für die Mortalität besser geeignet war als ANF (Tsutamoto et al. 1997). Eine andere Studie zur Aussagekraft natriuretischer Peptide bewertete BNP als nützlichen prädiktiven Indikator für Herzinsuffizienz. Im Rahmen dieser Studie wurden Plasmakonzentrationen natriuretischer Peptide (ANF, N-terminales ANF und BNP) bei Patienten mit neu aufgetretener Herzinsuffizienz gemessen. BNP erwies sich aufgrund von Sensitivität, Spezifität und positivem prädiktivem Wert als der am besten geeignete Biomarker (Cowie et al. 1997). Der in meiner Arbeit beschriebene signifikant höhere Wert der BNP-Expression bei Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu transgenen Mäusen nach drei Wochen TAC passt gut zu der Annahme, dass BNP eine höhere Spezifität als Marker für Herzinsuffizienz besitzt. Möglicherweise ist der signifikante Anstieg von BNP nach TAC in RKIP-tg-Mäusen durch die Funktion auch als Hypertrophiemarker erklärbar. Die signifikant höhere Expression von BNP nach TAC in Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu RKIP-tg-Mäusen könnte das Ergebnis der Kombination aus Herzinsuffizienz und Hypertrophie sein.

Eine weitere Erklärung für die Expressionsmuster von ANF und BNP nach chronischer Druckbelastung könnten unterschiedliche Sekretionsstimuli sein, nämlich die Vorhofdehnung für ANF und die Ventrikeldehnung für BNP.

In einer Studie wurden die ANF- und BNP-Plasma-Spiegel von Patienten mit Mitralstenose (MS) und Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) verglichen. Patienten mit MS und DCM wiesen einen vergleichbaren signifikant höheren *wedge*-Druck, ein Maß für den Druck im linken Vorhof, und signifikant höhere ANF-Werte als die Kontrollen auf. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck und der BNP-Wert lagen bei Patienten mit DCM signifikant höher als bei

Patienten mit MS und bei MS höher als bei den Kontrollen. Die Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die Ventrikeldehnung ein Stimulus für die Expression von BNP beziehungsweise die Vorhofdehnung ein Stimulus für die Expression von ANF ist (Yoshimura et al. 1993). Möglicherweise bewirkt die Ligation der *Aorta transversa* (TAC), dass der linke Ventrikel einer stärkeren Volumenbelastung ausgesetzt ist und somit der linksventrikuläre Druck stärker ansteigt als der linksatriale Druck und damit stärkere Stimuli für die Sekretion von BNP vorliegen.

5.6 Inhibitoren der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2 (GRK2)

Charakteristisch für Herzinsuffizienz ist eine verminderte linksventrikuläre Pumpfunktion und strukturelle Umbauvorgänge im Herzgewebe (*kardiales Remodeling*). Merkmale auf molekularer Ebene sind eine gesteigerte GRK2-Expression (Ungerer et al. 1993), die damit verbundene verminderte β -Rezeptor-Dichte (Bristow et al. 1982, Ungerer et al. 1993) und die verminderte Empfindlichkeit auf positiv inotrope Substanzen (Bristow et al. 1982). Diese Erkenntnis macht die GRK2-Inhibition als therapeutischen Ansatz bei Herzinsuffizienz interessant. Ziel der Forschung ist es über diesen Mechanismus die kardiale Inotropie zu steigern, Symptome zu lindern und eine Verlängerung des Überlebens zu erreichen.

In anderen Bereichen der Medizin, insbesondere in der Onkologie, ist die Inhibition von Kinasen als Therapieprinzip bereits etabliert. Imatinib ist zum Beispiel ein Standardmedikament in der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML), das hohe Erfolgsraten verzeichnet (Druker et al. 2001, Druker et al. 2006). Über die kompetitive Inhibition der ATP-Bindungsstelle der bei der CML pathophysiologisch durch eine Chromosomentranslokation vorkommenden Abl-Tyrosinkinase verhindert das niedermolekulare Imatinib die Produktion unreifer weißer bcr-abl-positiver Blutzellen (Gambacorti-Passerini et al. 1997).

Die GRK2-Inhibition wurde bereits vielfach als potentieller Ansatzpunkt für die Therapie der Herzinsuffizienz beschrieben. Ein Beispiel für die Hemmung der

Kinaseaktivität durch eine niedermolekulare Substanz ist das RNA-Molekül C13 (Adaptamer), dessen Funktion als potenter, spezifischer GRK2-Inhibitor durch *in vitro*-Studien beurteilt wurde (Mayer et al. 2008). Auch die polyanionischen Verbindungen Heparin und Dextransulfat zeigen GRK2-inhibierende Eigenschaften (Benovic et al. 1989). Durch *in vitro*-Untersuchungen permeabler Zellen wurde 1989 gezeigt, dass Heparin die Desensibilisierung β -adrenerger Rezeptoren inhibiert, indem es die Isoproterenol-induzierte Phosphorylierung β -adrenerger Rezeptoren durch GRK2 verhindert (Lohse et al. 1989). Der Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer Paroxetin besitzt auch GRK2-inhibierende Eigenschaften. *In vitro*- und *in vivo*-Studien zeigten die positiven Effekte von Paroxetin auf die Herzfunktion in Mäusen. Der GRK2-inhibierende Effekt von Paroxetin beruht auf der Stabilisierung einer speziellen GRK2-Konformation durch die Bindung an eine spezifische Schlaufe in der Kinase (Thal et al. 2012). Die GRK2-Inhibition mittels Gentherapie ist ein anderer Ansatzpunkt. Das kardioprotektive Potential des Peptidinhibitors β ARKct wurde bereits mehrfach beschrieben (siehe 1.3.2). Die GRK2-Hemmung durch β ARKct beruht auf der kompetitiven Hemmung der $G\beta\gamma$ -Untereinheit. Normalerweise kommt es durch Aktivierung von GPCR zur Interaktion von $G\beta\gamma$ -Untereinheit und Carboxy-Terminus von GRK2. Dieses Zusammenspiel führt zur Membrantranslokation und zur Aktivierung von GRK2 (Pitcher et al. 1992). Die für die Interaktion spezifische Region des Carboxy-Terminus von GRK2 wurde 1992 durch *in vitro*-Studien von Koch et al. gefunden (Koch et al. 1993). Linksherzkatheter-Untersuchungen von Mäusen zeigten zum Beispiel, dass die kardiale Überexpression von β ARKct die durch GRK2-Überexpression erzeugte verminderte kardiale Kontraktilität normalisierte (Akhter et al. 1999). Eine andere Analyse zeigte, dass β ARKct die akute Schädigung des Myokards durch einen myokardialen Infarkt reduziert. Mäuse, die β ARKct herzspezifisch überexprimierten, wiesen eine signifikant kleinere Infarktnarbe und weniger Apoptose auf als Tiere, die GRK2 herzspezifisch überexprimierten (Brinks et al. 2010). Eine Untersuchung von Schweinen, die nach Myokardinfarkt herzinsuffizient wurden, verdeutlichte die potentielle Relevanz der β ARKct-Gentherapie. Sechs Wochen nach β ARKct-Gentransfer (durch retrograde

Injektion des an ein Virus gekoppelten Inhibitors in die vordere interventrikuläre Vene) zeigten die herzinsuffizienten Schweine eine reduzierte linksventrikuläre Fibrosierung und verringerte Katecholaminspiegel im Vergleich zu Kontrollen (Raake et al. 2013). Verschiedene Untersuchungen liefern potentielle Erklärungsansätze für den Mechanismus über die β ARKct-vermittelte GRK2-Inhibition. Möglicherweise ist der regulierende Einfluss von GRK2 auf den kardialen L-Typ Calciumkanal (LTCC) für die kardiale Kontraktilität von Bedeutung. Volkens et al. zeigten 2011 durch *in vitro*-Analysen adulter Rattenkardiomyozyten, dass β ARKct die kardiale Kontraktilität steigert, vermutlich, indem es verhindert, dass $G\beta\gamma$ -Untereinheiten kardiale LTCC-Ströme inhibieren und weniger durch cAMP-abhängige Mechanismen (Volkens et al. 2011). Auch Raake et al. verdeutlichten durch Analysen adulter Kardiomyozyten, dass GRK2 einen regulatorischen Effekt auf den kardialen Calcium-Haushalt und den LTCC haben könnte. Sie zeigten, dass bei GRK2-*knockout*-Mäusen ein lokaler Anstieg der Proteinkinase-A für die Aktivierung des LTCC mitverantwortlich zu sein scheint (Raake et al. 2012).

Die beschriebenen Möglichkeiten zur GRK2-Inhibition sind Ausgangspunkte für die Entwicklung potenter, spezifischer GRK2-Inhibitoren. Der Wirkmechanismus des von mir untersuchten, physiologisch vorkommenden GRK2-Inhibitor-Protein RKIP ist nicht vollständig geklärt, aber die beschriebenen Effekte, nämlich die Steigerung der kardialen Kontraktilität und die protektive Wirkung bei der Progression von Herzinsuffizienz, verdeutlichen sein Potential. Zudem macht RKIP besonders, dass es als endogenes Protein im Körper vorkommt und der Organismus scheinbar sein protektives Potential versucht zu nutzen. Die Hochregulation von RKIP bei Herzinsuffizienz und die von mir beschriebenen schützenden Effekte bezüglich Herzinsuffizienz durch künstlich erzeugte Hochregulation weisen darauf hin, dass RKIP tatsächlich eine Funktion bei Herzversagen hat.

Der Einfluss anderer Substanzen auf die RKIP-Expression stellt einen potentiellen Ansatzpunkt dar, die protektive Wirkung von RKIP zu nutzen. Genauere Erkenntnisse darüber könnten in Zukunft Entscheidungskriterien für

den Einsatz bestimmter Medikamente darstellen, wenn zum Beispiel komorbide eine Herzinsuffizienz besteht oder andere kardiotoxische Medikamente die Herzfunktion gefährden.

Der Einsatz als Therapeutikum für die Herzinsuffizienz müsste beachten, dass RKIP in vielen Organen exprimiert wird und bei physiologischen Vorgängen des menschlichen Organismus eine Rolle spielt, insbesondere bei der Beeinflussung wichtiger Signalkaskaden (Yeung et al. 2000, Yeung et al. 2001, Lorenz et al. 2003, Eves et al. 2006). Die Zusammenhänge sind erst ansatzweise untersucht und erfordern eine große Umsicht bei der Entwicklung einer möglichen Therapie, die über RKIP wirkt. Das Ziel sollte sein mit Hilfe von RKIP selektiv in die Physiologie des Herzens einzugreifen und allenfalls positive Nebeneffekte auf andere physiologische Prozesse zu bewirken.

5.7 Ausblick

In dieser Arbeit zeigte ich, dass RKIP eine protektive Wirkung bei der Progression von Herzinsuffizienz hat. Durch die herzspezifische Überexpression des Proteins wird das Voranschreiten von Herzinsuffizienz in Mäusen verzögert. Die Hochregulation des Proteins unter kardialen Stress als möglicher Anpassungsmechanismus verdeutlicht die physiologische Funktion des Proteins.

Die durchgeführten Untersuchungen fokussieren sich auf die Wirkungen einer herzspezifischen Überexpression von RKIP in Mäusen und dessen Effekte auf Herzinsuffizienz. Aktuelle Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kristina Lorenz zum Effekt einer globalen RKIP-Überexpression bei Herzinsuffizienz in Mäusen sind ein wichtiger Schritt zum weiteren Verständnis der Wirkungen von RKIP.

Die Effekte von RKIP als GRK2-Inhibitor bei Herzinsuffizienz weisen darauf hin, dass bei anderen kardiovaskulären Erkrankungen, die pathogenetisch mit GPCR-Signalgebung in Verbindung gebracht werden, protektive Effekte möglich sind. Die Wirkung einer gesteigerten RKIP-Expression in anderen Organen oder bei Erkrankungen, bei denen GPCR-Signalgebung eine Rolle spielt, sollte untersucht werden, um die Wirkweise von RKIP weiter zu

verstehen. Eine weitere zu klärende Frage ist, ob es möglicherweise Substrate, zum Beispiel Medikamente, gibt, die die Expression von RKIP beeinflussen und seine kardioprotektive Wirkung fördern.

6 Zusammenfassung

GRK2 vermittelt über die Phosphorylierung und Inaktivierung kardialer β 1-Rezeptoren eine verminderte kardiale Kontraktilität. RKIP als GRK2-Inhibitor spielt eine Rolle in der GPCR-Signalgebung. Die Überexpression des Proteins führt zu einer verbesserten Herzfunktion. Dieser Effekt wird möglicherweise über die GRK2-Inhibition vermittelt und eröffnet die Diskussion über weitere durch RKIP vermittelte protektive Effekte im Herzen.

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die kardiale RKIP-Expression in Mäusen und humanem Herzgewebe bei Herzinsuffizienz gesteigert ist. Zudem beschrieb ich den protektiven Effekt einer gesteigerten Expression von RKIP in murinen Herzen im Hinblick auf die Ausprägung typischer struktureller und morphologischer Zeichen von Herzinsuffizienz.

Echokardiographische Untersuchungen zeigten, dass RKIP die Herzfunktion positiv beeinflusst. RKIP-tg-Mäuse wiesen eine gesteigerte Verkürzungsfraction und einen dauerhaft hyperkontraktilen Phänotyp auf. Trotz fehlenden Einflusses auf die kardiale Hypertrophie bewirkte die chronische linksventrikuläre Druckbelastung durch TAC in RKIP-tg-Mäusen eine geringere kardiale Dilatation und den Erhalt einer stärkeren Kontraktilität als in Wildtyp-Mäusen.

Die Ligation der *Aorta transversa* bewirkte bei Wildtyp-Mäusen zudem strukturelle und molekulare Veränderungen, die typisch für einen herzinsuffizienten Phänotyp sind. Der Anteil fibrotischen Gewebes und die Apoptose im Herzen nahmen zu. Strukturelle Veränderungen des Herzgewebes sind ein Korrelat für ein herzinsuffizientes Herz. RKIP-tg-Mäuse zeigten diese Veränderungen in einem deutlich geringeren Ausmaß und weisen auf eine protektive Wirkung einer kardialen RKIP-Überexpression hin. Interessanterweise war die mRNA-Expression der Fibrosemarker CTGF und TGF β nach chronischer linksventrikulärer Druckbelastung sowohl bei Wildtyp-Mäusen als auch bei RKIP-transgenen Mäusen erhöht. Die Ursache für das Fehlen eines signifikanten Unterschiedes könnte sein, dass diese Marker nicht spezifisch für die kardiale Fibrosierung sind, sondern deren Expression auch mit der kardialen Hypertrophie zusammenhängt.

Eine weitere Beobachtung war der Anstieg der mRNA-Expression der Herzinsuffizienz-Marker BNP und ANF nach chronischer Druckbelastung in Wildtyp- und RKIP-tg-Mäusen. Die Ergebnisse bestätigten, dass BNP spezifischer für die durch chronische linksventrikuläre Druckerhöhung verursachte Herzinsuffizienz zu sein scheint.

Ich beobachtete eine gesteigerte RKIP-Expression bei Herzinsuffizienz und kardialer Hypertrophie. Herzbiopsien herzinsuffizienter und an Aortenstenose erkrankter Patienten wiesen im Vergleich zu Kontrollen eine erhöhte RKIP-Proteinexpression auf. Auch C57BL/6J-Mäuse wiesen nach chronischer linksventrikulärer Druckbelastung eine gesteigerte kardiale RKIP-Expression im Vergleich zu Kontrollen auf. Die Hochregulation der RKIP-Expression könnte als protektiver *feedback*-Mechanismus interpretiert werden.

Resultat dieser Arbeit ist, dass RKIP eine protektive Wirkung bei der Progression von durch chronische linksventrikuläre Druckbelastung induzierte Herzinsuffizienz hat, am ehesten durch seine Funktion als GRK2-Inhibitor und seine Rolle bei der GPCR-Signalgebung.

7 Literaturverzeichnis

Akhter, S. A., Eckhart, A. D., Rockman, H. A., Shotwell, K., Lefkowitz, R. J. and Koch, W. J. (1999). "In vivo inhibition of elevated myocardial beta-adrenergic receptor kinase activity in hybrid transgenic mice restores normal beta-adrenergic signaling and function." Circulation 100(6): 648-653.

Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. and Starke, K. (2009). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München, Elsevier.

Al-Tubuly, A. A. (2000). "SDS-PAGE and Western Blotting." Methods Mol Med 40: 391-405.

Arber, S., Hunter, J. J., Ross, J., Jr., Hongo, M., Sansig, G., Borg, J., Perriard, J. C., Chien, K. R. and Caroni, P. (1997). "MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure." Cell 88(3): 393-403.

Arraes, S. M., Freitas, M. S., da Silva, S. V., de Paula Neto, H. A., Alves-Filho, J. C., Auxiliadora Martins, M., Basile-Filho, A., Tavares-Murta, B. M., Barja-Fidalgo, C. and Cunha, F. Q. (2006). "Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation." Blood 108(9): 2906-2913.

Banfield, M. J., Barker, J. J., Perry, A. C. and Brady, R. L. (1998). "Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction." Structure 6(10): 1245-1254.

Battistoni, A., Rubattu, S. and Volpe, M. (2012). "Circulating biomarkers with preventive, diagnostic and prognostic implications in cardiovascular diseases." Int J Cardiol 157(2): 160-168.

Benovic, J. L., DeBlasi, A., Stone, W. C., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1989). "Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family." Science 246(4927): 235-240.

Benovic, J. L. and Gomez, J. (1993). "Molecular cloning and expression of GRK6. A new member of the G protein-coupled receptor kinase family." J Biol Chem 268(26): 19521-19527.

Benovic, J. L., Onorato, J. J., Arriza, J. L., Stone, W. C., Lohse, M., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1991). "Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family." J Biol Chem 266(23): 14939-14946.

Benovic, J. L., Stone, W. C., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1989). "Inhibition of the beta-adrenergic receptor kinase by polyanions." J Biol Chem 264(12): 6707-6710.

Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1986). "Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 83(9): 2797-2801.

Berk, B. C., Fujiwara, K. and Lehoux, S. (2007). "ECM remodeling in hypertensive heart disease." J Clin Invest 117(3): 568-575.

Berk, S. L., Block, P. J., Toselli, P. A. and Ullrick, W. C. (1975). "The effects of chronic alcohol ingestion in mice on contractile properties of cardiac and skeletal muscle: a comparison with normal and dehydrated-malnourished controls." Experientia 31(11): 1302-1303.

- Bernier, I. and Jolles, P. (1984). "Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain." Biochim Biophys Acta 790(2): 174-181.
- Bernier, I., Tresca, J. P. and Jolles, P. (1986). "Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol." Biochim Biophys Acta 871(1): 19-23.
- Bleumink, G. S., Knetsch, A. M., Sturkenboom, M. C., Straus, S. M., Hofman, A., Deckers, J. W., Wittteman, J. C. and Stricker, B. H. (2004). "Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study." Eur Heart J 25(18): 1614-1619.
- Breckenridge, R. (2010). "Heart failure and mouse models." Dis Model Mech 3(3-4): 138-143.
- Brinks, H., Boucher, M., Gao, E., Chuprun, J. K., Pesant, S., Raake, P. W., Huang, Z. M., Wang, X., Qiu, G., Gumpert, A., Harris, D. M., Eckhart, A. D., Most, P. and Koch, W. J. (2010). "Level of G protein-coupled receptor kinase-2 determines myocardial ischemia/reperfusion injury via pro- and anti-apoptotic mechanisms." Circ Res 107(9): 1140-1149.
- Bristow, M. R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R. S., Sageman, W. S., Lurie, K., Billingham, M. E., Harrison, D. C. and Stinson, E. B. (1982). "Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts." N Engl J Med 307(4): 205-211.
- Brower, G. L., Gardner, J. D., Forman, M. F., Murray, D. B., Voloshenyuk, T., Levick, S. P. and Janicki, J. S. (2006). "The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function." Eur J Cardiothorac Surg 30(4): 604-610.
- Buczylko, J., Gutmann, C. and Palczewski, K. (1991). "Regulation of rhodopsin kinase by autophosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A 88(6): 2568-2572.
- Bueno, O. F., De Windt, L. J., Tymitz, K. M., Witt, S. A., Kimball, T. R., Klevitsky, R., Hewett, T. E., Jones, S. P., Lefer, D. J., Peng, C. F., Kitsis, R. N. and Molkentin, J. D. (2000). "The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice." EMBO J 19(23): 6341-6350.
- Bunemann, M. and Hosey, M. M. (1999). "G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling." J Physiol 517 (Pt 1): 5-23.
- Bunemann, M., Lee, K. B., Pals-Rylaarsdam, R., Roseberry, A. G. and Hosey, M. M. (1999). "Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system." Annu Rev Physiol 61: 169-192.
- Burnette, W. N. (1981). ""Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem 112(2): 195-203.
- Chazotte, B. (2011). "Labeling membrane glycoproteins or glycolipids with fluorescent wheat germ agglutinin." Cold Spring Harb Protoc 2011(5): pdb prot5623.
- Chen, M. M., Lam, A., Abraham, J. A., Schreiner, G. F. and Joly, A. H. (2000). "CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis." J Mol Cell Cardiol 32(10): 1805-1819.
- Choi, D. J., Koch, W. J., Hunter, J. J. and Rockman, H. A. (1997). "Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase." J Biol Chem 272(27): 17223-17229.

- Collins, S., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1991). "Regulation of adrenergic receptor responsiveness through modulation of receptor gene expression." Annu Rev Physiol 53: 497-508.
- Cong, M., Perry, S. J., Lin, F. T., Fraser, I. D., Hu, L. A., Chen, W., Pitcher, J. A., Scott, J. D. and Lefkowitz, R. J. (2001). "Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79." J Biol Chem 276(18): 15192-15199.
- Cowie, M. R., Struthers, A. D., Wood, D. A., Coats, A. J., Thompson, S. G., Poole-Wilson, P. A. and Sutton, G. C. (1997). "Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care." Lancet 350(9088): 1349-1353.
- deAlmeida, A. C., van Oort, R. J. and Wehrens, X. H. (2010). "Transverse aortic constriction in mice." J Vis Exp(38).
- DeBurman, S. K., Ptasiński, J., Boetticher, E., Lomasney, J. W., Benovic, J. L. and Hosey, M. M. (1995). "Lipid-mediated regulation of G protein-coupled receptor kinases 2 and 3." J Biol Chem 270(11): 5742-5747.
- Deiss, K., Kisker, C., Lohse, M. J. and Lorenz, K. (2012). "Raf kinase inhibitor protein (RKIP) dimer formation controls its target switch from Raf1 to G protein-coupled receptor kinase (GRK) 2." J Biol Chem 287(28): 23407-23417.
- Delgado, R. M., 3rd, Nawar, M. A., Zewail, A. M., Kar, B., Vaughn, W. K., Wu, K. K., Aleksic, N., Sivasubramanian, N., McKay, K., Mann, D. L. and Willerson, J. T. (2004). "Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment improves left ventricular function and mortality in a murine model of doxorubicin-induced heart failure." Circulation 109(11): 1428-1433.
- Dickstein, K., Cohen-Solal, A., Filippatos, G., McMurray, J. J., Ponikowski, P., Poole-Wilson, P. A., Stromberg, A., van Veldhuisen, D. J., Atar, D., Hoes, A. W., Keren, A., Mebazaa, A., Nieminen, M., Priori, S. G., Swedberg, K. and Guidelines, E. S. C. C. f. P. (2008). "ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)." Eur J Heart Fail 10(10): 933-989.
- Dietel, M., Suttorp, N. and Zeitz, M. (2012). Harrisons Innere Medizin Band 2. Berlin, ABW Wissenschaftsverlag.
- Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabrilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J. L., Radich, J. P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L., Larson, R. A. and Investigators, I. (2006). "Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia." N Engl J Med 355(23): 2408-2417.
- Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S. and Sawyers, C. L. (2001). "Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia." N Engl J Med 344(14): 1031-1037.
- Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F. and Lohse, M. J. (1999). "Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A 96(12): 7059-7064.

- Eves, E. M., Shapiro, P., Naik, K., Klein, U. R., Trakul, N. and Rosner, M. R. (2006). "Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint." Mol Cell 23(4): 561-574.
- Falcao, L. M., Pinto, F., Ravara, L. and van Zwieten, P. A. (2004). "BNP and ANP as diagnostic and predictive markers in heart failure with left ventricular systolic dysfunction." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 5(3): 121-129.
- Ferguson, S. S., Downey, W. E., 3rd, Colapietro, A. M., Barak, L. S., Menard, L. and Caron, M. G. (1996). "Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization." Science 271(5247): 363-366.
- Flower, D. R. (1999). "Modelling G-protein-coupled receptors for drug design." Biochim Biophys Acta 1422(3): 207-234.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. and Schioth, H. B. (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Mol Pharmacol 63(6): 1256-1272.
- Fu, X., Koller, S., Abd Alla, J. and Quitterer, U. (2013). "Inhibition of G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) triggers the growth-promoting mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway." J Biol Chem 288(11): 7738-7755.
- Gambacorti-Passerini, C., le Coutre, P., Mologni, L., Fanelli, M., Bertazzoli, C., Marchesi, E., Di Nicola, M., Biondi, A., Corneo, G. M., Belotti, D., Pogliani, E. and Lydon, N. B. (1997). "Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis." Blood Cells Mol Dis 23(3): 380-394.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." J Cell Biol 119(3): 493-501.
- Ghosh, K. K., Jeong, Y. M., Kang, N. Y., Lee, J., Si Yan Diana, W., Kim, J. Y., Yoo, J., Kim, D., Kim, Y. K. and Chang, Y. T. (2015). "The development of a nucleus staining fluorescent probe for dynamic mitosis imaging in live cells." Chem Commun (Camb).
- Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. and Benovic, J. L. (1996). "Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor." Nature 383(6599): 447-450.
- Gros, R., Benovic, J. L., Tan, C. M. and Feldman, R. D. (1997). "G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension." J Clin Invest 99(9): 2087-2093.
- Gros, R., Chorazyczewski, J., Meek, M. D., Benovic, J. L., Ferguson, S. S. and Feldman, R. D. (2000). "G-Protein-coupled receptor kinase activity in hypertension : increased vascular and lymphocyte G-protein receptor kinase-2 protein expression." Hypertension 35(1 Pt 1): 38-42.
- Gultekin, H. and Heermann, K. H. (1988). "The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix." Anal Biochem 172(2): 320-329.
- Guo, D. F., Sun, Y. L., Hamet, P. and Inagami, T. (2001). "The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins." Cell Res 11(3): 165-180.
- Gurevich, E. V., Tesmer, J. J., Mushegian, A. and Gurevich, V. V. (2012). "G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs." Pharmacol Ther 133(1): 40-69.

- Hagan, S., Al-Mulla, F., Mallon, E., Oien, K., Ferrier, R., Gusterson, B., Garcia, J. J. and Kolch, W. (2005). "Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis." *Clin Cancer Res* 11(20): 7392-7397.
- Hamm, H. E. (1998). "The many faces of G protein signaling." *J Biol Chem* 273(2): 669-672.
- Harris, I. S., Zhang, S., Treskov, I., Kovacs, A., Weinheimer, C. and Muslin, A. J. (2004). "Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload." *Circulation* 110(6): 718-723.
- Hata, J. A. and Koch, W. J. (2003). "Phosphorylation of G protein-coupled receptors: GPCR kinases in heart disease." *Mol Interv* 3(5): 264-272.
- Hisatomi, O., Matsuda, S., Satoh, T., Kotaka, S., Imanishi, Y. and Tokunaga, F. (1998). "A novel subtype of G-protein-coupled receptor kinase, GRK7, in teleost cone photoreceptors." *FEBS Lett* 424(3): 159-164.
- Ho, K. K., Pinsky, J. L., Kannel, W. B. and Levy, D. (1993). "The epidemiology of heart failure: the Framingham Study." *J Am Coll Cardiol* 22(4 Suppl A): 6A-13A.
- Horner, T. J., Osawa, S., Schaller, M. D. and Weiss, E. R. (2005). "Phosphorylation of GRK1 and GRK7 by cAMP-dependent protein kinase attenuates their enzymatic activities." *J Biol Chem* 280(31): 28241-28250.
- Inglese, J., Koch, W. J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). "Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases." *Nature* 359(6391): 147-150.
- Jiang, X., Benovic, J. L. and Wedegaertner, P. B. (2007). "Plasma membrane and nuclear localization of G protein coupled receptor kinase 6A." *Mol Biol Cell* 18(8): 2960-2969.
- Karin, M. and Greten, F. R. (2005). "NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression." *Nat Rev Immunol* 5(10): 749-759.
- Kehat, I. and Molkenin, J. D. (2010). "Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy." *Ann N Y Acad Sci* 1188: 96-102.
- Kim, C. M., Dion, S. B. and Benovic, J. L. (1993). "Mechanism of beta-adrenergic receptor kinase activation by G proteins." *J Biol Chem* 268(21): 15412-15418.
- Kobilka, B. K. (2007). "G protein coupled receptor structure and activation." *Biochim Biophys Acta* 1768(4): 794-807.
- Koch, W. J., Inglese, J., Stone, W. C. and Lefkowitz, R. J. (1993). "The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase." *J Biol Chem* 268(11): 8256-8260.
- Koch, W. J., Lefkowitz, R. J. and Rockman, H. A. (2000). "Functional consequences of altering myocardial adrenergic receptor signaling." *Annu Rev Physiol* 62: 237-260.
- Koch, W. J., Rockman, H. A., Samama, P., Hamilton, R. A., Bond, R. A., Milano, C. A. and Lefkowitz, R. J. (1995). "Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor." *Science* 268(5215): 1350-1353.
- Kolesnikov, A. V., Rikimaru, L., Hennig, A. K., Lukasiewicz, P. D., Fliesler, S. J., Govardovskii, V. I., Kefalov, V. J. and Kisselev, O. G. (2011). "G-protein betagamma-complex is crucial for efficient signal amplification in vision." *J Neurosci* 31(22): 8067-8077.

- Krupnick, J. G. and Benovic, J. L. (1998). "The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation." Annu Rev Pharmacol Toxicol 38: 289-319.
- Kubota, T., McTiernan, C. F., Frye, C. S., Slawson, S. E., Lemster, B. H., Koretsky, A. P., Demetris, A. J. and Feldman, A. M. (1997). "Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha." Circ Res 81(4): 627-635.
- Kunapuli, P. and Benovic, J. L. (1993). "Cloning and expression of GRK5: a member of the G protein-coupled receptor kinase family." Proc Natl Acad Sci U S A 90(12): 5588-5592.
- Kunapuli, P., Gurevich, V. V. and Benovic, J. L. (1994). "Phospholipid-stimulated autophosphorylation activates the G protein-coupled receptor kinase GRK5." J Biol Chem 269(14): 10209-10212.
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M. and Kioussi, C. (2012). "Detection of apoptosis by TUNEL assay." Methods Mol Biol 887: 41-47.
- Lefkowitz, R. J. (1998). "G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization." J Biol Chem 273(30): 18677-18680.
- Li, Q. and Verma, I. M. (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." Nat Rev Immunol 2(10): 725-734.
- Li, R. K., Li, G., Mickle, D. A., Weisel, R. D., Merante, F., Luss, H., Rao, V., Christakis, G. T. and Williams, W. G. (1997). "Overexpression of transforming growth factor-beta1 and insulin-like growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy." Circulation 96(3): 874-881.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods 25(4): 402-408.
- Lodish, H. F. (2000). Molecular cell biology. New York, W.H. Freeman.
- Lohse, M. J. (1993). "Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization." Biochim Biophys Acta 1179(2): 171-188.
- Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J. P., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). "Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems." J Biol Chem 267(12): 8558-8564.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990). "beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function." Science 248(4962): 1547-1550.
- Lohse, M. J., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. and Benovic, J. L. (1989). "Inhibition of beta-adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of beta 2-adrenergic receptors." Proc Natl Acad Sci U S A 86(9): 3011-3015.
- Lorenz, K., Lohse, M. J. and Quitterer, U. (2003). "Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2." Nature 426(6966): 574-579.
- Lorenz, K., Schmitt, J. P., Vidal, M. and Lohse, M. J. (2009). "Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling." Int J Biochem Cell Biol 41(12): 2351-2355.

Maki, M., Matsukawa, N., Yuasa, H., Otsuka, Y., Yamamoto, T., Akatsu, H., Okamoto, T., Ueda, R. and Ojika, K. (2002). "Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol* 61(2): 176-185.

Marcus, M. L., Doty, D. B., Hiratzka, L. F., Wright, C. B. and Eastham, C. L. (1982). "Decreased coronary reserve: a mechanism for angina pectoris in patients with aortic stenosis and normal coronary arteries." *N Engl J Med* 307(22): 1362-1366.

Mayer, G., Wulffen, B., Huber, C., Brockmann, J., Flicke, B., Neumann, L., Hafenbradl, D., Klebl, B. M., Lohse, M. J., Krasel, C. and Blind, M. (2008). "An RNA molecule that specifically inhibits G-protein-coupled receptor kinase 2 in vitro." *RNA* 14(3): 524-534.

McMullen, J. R. and Jennings, G. L. (2007). "Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(4): 255-262.

McMurray, J. J. V., Adamopoulos, S., Anker, S. D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M. A., Jaarsma, T., Køber, L., Lip, G. Y. H., Maggioni, A. P., Parkhomenko, A., Pieske, B. M., Popescu, B. A., Rønnevik, P. K., Rutten, F. H., Schwitter, J., Seferovic, P., Stepinska, J., Trindade, P. T., Voors, A. A., Zannad, F., Zeiher, A., (CPG), E. C. f. P. G., Bax, J. J., Baumgartner, H., Ceconi, C., Dean, V., Deaton, C., Fagard, R., Funck-Brentano, C., Hasdai, D., Hoes, A., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., McDonagh, T., Moulin, C., Popescu, B. A., Reiner, Ž., Sechtem, U., Sirnes, P. A., Tendera, M., Torbicki, A., Vahanian, A., Windecker, S., Reviewers, D., McDonagh, T., Sechtem, U., Bonet, L. A., Avraamides, P., Ben Lamin, H. A., Brignole, M., Coca, A., Cowburn, P., Dargie, H., Elliott, P., Flachskampf, F. A., Guida, G. F., Hardman, S., Jung, B., Merkely, B., Mueller, C., Nanas, J. N., Nielsen, O. W., Ørn, S., Parissis, J. T. and Ponikowski, P. (2012). "ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012." *European Journal of Heart Failure* 14: 803-869.

Mendis, S. (2014). Global Status Report on noncommunicable diseases 2014. Geneva, World Health Organization.

Moffit, J. S., Boekelheide, K., Sedivy, J. M. and Klysik, J. (2007). "Mice lacking Raf kinase inhibitor protein-1 (RKIP-1) have altered sperm capacitation and reduced reproduction rates with a normal response to testicular injury." *J Androl* 28(6): 883-890.

Nishikimi, T., Maeda, N. and Matsuoka, H. (2006). "The role of natriuretic peptides in cardioprotection." *Cardiovasc Res* 69(2): 318-328.

Oudit, G. Y., Crackower, M. A., Eriksson, U., Sarao, R., Kozieradzki, I., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Gidrewicz, D., Rybin, V. O., Wada, T., Steinberg, S. F., Backx, P. H. and Penninger, J. M. (2003). "Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure." *Circulation* 108(17): 2147-2152.

Palazzuoli, A., Caputo, M., Calabro, A. and Nuti, R. (2012). "Clinical impact of BNP and other emerging biomarkers in heart failure evaluation and management." *Minerva Cardioangiol* 60(2): 183-194.

Panek, A. N., Posch, M. G., Alenina, N., Ghadge, S. K., Erdmann, B., Popova, E., Perrot, A., Geier, C., Dietz, R., Morano, I., Bader, M. and Ozcelik, C. (2009). "Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertrophy and protection against pressure overload." *PLoS One* 4(8): e6743.

- Park, S., Yeung, M. L., Beach, S., Shields, J. M. and Yeung, K. C. (2005). "RKIP downregulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells." Oncogene 24(21): 3535-3540.
- Pierce, K. L., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J. (2002). "Seven-transmembrane receptors." Nat Rev Mol Cell Biol 3(9): 639-650.
- Pippig, S., Andexinger, S., Daniel, K., Puzicha, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Lohse, M. J. (1993). "Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors." J Biol Chem 268(5): 3201-3208.
- Pitcher, J., Lohse, M. J., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). "Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms." Biochemistry 31(12): 3193-3197.
- Pitcher, J. A., Fredericks, Z. L., Stone, W. C., Premont, R. T., Stoffel, R. H., Koch, W. J. and Lefkowitz, R. J. (1996). "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies." J Biol Chem 271(40): 24907-24913.
- Pitcher, J. A., Freedman, N. J. and Lefkowitz, R. J. (1998). "G protein-coupled receptor kinases." Annu Rev Biochem 67: 653-692.
- Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Arriza, J. L., Casey, P. J., Kim, C., Benovic, J. L., Kwatra, M. M., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). "Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors." Science 257(5074): 1264-1267.
- Pitcher, J. A., Tesmer, J. J., Freeman, J. L., Capel, W. D., Stone, W. C. and Lefkowitz, R. J. (1999). "Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases." J Biol Chem 274(49): 34531-34534.
- Pitcher, J. A., Touhara, K., Payne, E. S. and Lefkowitz, R. J. (1995). "Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid." J Biol Chem 270(20): 11707-11710.
- Premont, R. T., Inglese, J. and Lefkowitz, R. J. (1995). "Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors." FASEB J 9(2): 175-182.
- Premont, R. T., Macrae, A. D., Aparicio, S. A., Kendall, H. E., Welch, J. E. and Lefkowitz, R. J. (1999). "The GRK4 subfamily of G protein-coupled receptor kinases. Alternative splicing, gene organization, and sequence conservation." J Biol Chem 274(41): 29381-29389.
- Premont, R. T., Macrae, A. D., Stoffel, R. H., Chung, N., Pitcher, J. A., Ambrose, C., Inglese, J., MacDonald, M. E. and Lefkowitz, R. J. (1996). "Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants." J Biol Chem 271(11): 6403-6410.
- Pronin, A. N. and Benovic, J. L. (1997). "Regulation of the G protein-coupled receptor kinase GRK5 by protein kinase C." J Biol Chem 272(6): 3806-3812.

- Purcell, N. H., Wilkins, B. J., York, A., Saba-El-Leil, M. K., Meloche, S., Robbins, J. and Molkentin, J. D. (2007). "Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 104(35): 14074-14079.
- Raake, P. W., Schlegel, P., Ksienzyk, J., Reinkober, J., Barthelmes, J., Schinkel, S., Pleger, S., Mier, W., Haberkorn, U., Koch, W. J., Katus, H. A., Most, P. and Muller, O. J. (2013). "AAV6.betaARKct cardiac gene therapy ameliorates cardiac function and normalizes the catecholaminergic axis in a clinically relevant large animal heart failure model." Eur Heart J 34(19): 1437-1447.
- Raake, P. W., Zhang, X., Vinge, L. E., Brinks, H., Gao, E., Jaleel, N., Li, Y., Tang, M., Most, P., Dorn, G. W., 2nd, Houser, S. R., Katus, H. A., Chen, X. and Koch, W. J. (2012). "Cardiac G-protein-coupled receptor kinase 2 ablation induces a novel Ca²⁺ handling phenotype resistant to adverse alterations and remodeling after myocardial infarction." Circulation 125(17): 2108-2118.
- Raman, M., Chen, W. and Cobb, M. H. (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." Oncogene 26(22): 3100-3112.
- Rockman, H. A., Chien, K. R., Choi, D. J., Iaccarino, G., Hunter, J. J., Ross, J., Jr., Lefkowitz, R. J. and Koch, W. J. (1998). "Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice." Proc Natl Acad Sci U S A 95(12): 7000-7005.
- Rockman, H. A., Ross, R. S., Harris, A. N., Knowlton, K. U., Steinhilber, M. E., Field, L. J., Ross, J., Jr. and Chien, K. R. (1991). "Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A 88(18): 8277-8281.
- Rohr, S. (2009). "Myofibroblasts in diseased hearts: new players in cardiac arrhythmias?" Heart Rhythm 6(6): 848-856.
- Ross, E. M. and Wilkie, T. M. (2000). "GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins." Annu Rev Biochem 69: 795-827.
- Ruppert, C., Deiss, K., Herrmann, S., Vidal, M., Oezkur, M., Gorski, A., Weidemann, F., Lohse, M. J. and Lorenz, K. (2013). "Interference with ERK(Thr188) phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A 110(18): 7440-7445.
- Schmid, E., Neef, S., Berlin, C., Tomasovic, A., Kahlert, K., Nordbeck, P., Deiss, K., Denzinger, S., Herrmann, S., Wettwer, E., Weidendorfer, M., Becker, D., Schafer, F., Wagner, N., Ergun, S., Schmitt, J. P., Katus, H. A., Weidemann, F., Ravens, U., Maack, C., Hein, L., Ertl, G., Muller, O. J., Maier, L. S., Lohse, M. J. and Lorenz, K. (2015). "Cardiac RKIP induces a beneficial beta-adrenoceptor-dependent positive inotropy." Nat Med.
- Schmitt, J. P., Kamisago, M., Asahi, M., Li, G. H., Ahmad, F., Mende, U., Kranias, E. G., MacLennan, D. H., Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (2003). "Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban." Science 299(5611): 1410-1413.
- Schubbert, S., Shannon, K. and Bollag, G. (2007). "Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer." Nat Rev Cancer 7(4): 295-308.

- Sergeeva, I. A. and Christoffels, V. M. (2013). "Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease." Biochim Biophys Acta 1832(12): 2403-2413.
- Serre, L., Pereira de Jesus, K., Zelwer, C., Bureaud, N., Schoentgen, F. and Benedetti, H. (2001). "Crystal structures of YBHB and YBCL from *Escherichia coli*, two bacterial homologues to a Raf kinase inhibitor protein." J Mol Biol 310(3): 617-634.
- Serre, L., Vallee, B., Bureaud, N., Schoentgen, F. and Zelwer, C. (1998). "Crystal structure of the phosphatidylethanolamine-binding protein from bovine brain: a novel structural class of phospholipid-binding proteins." Structure 6(10): 1255-1265.
- Stoffel, R. H., Randall, R. R., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J. and Inglese, J. (1994). "Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family." J Biol Chem 269(45): 27791-27794.
- Taketo, M., Schroeder, A. C., Mobraaten, L. E., Gunning, K. B., Hanten, G., Fox, R. R., Roderick, T. H., Stewart, C. L., Lilly, F., Hansen, C. T. and et al. (1991). "FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses." Proc Natl Acad Sci U S A 88(6): 2065-2069.
- Thal, D. M., Homan, K. T., Chen, J., Wu, E. K., Hinkle, P. M., Huang, Z. M., Chuprun, J. K., Song, J., Gao, E., Cheung, J. Y., Sklar, L. A., Koch, W. J. and Tesmer, J. J. (2012). "Paroxetine is a direct inhibitor of g protein-coupled receptor kinase 2 and increases myocardial contractility." ACS Chem Biol 7(11): 1830-1839.
- Theroux, S., Pereira, M., Casten, K. S., Burwell, R. D., Yeung, K. C., Sedivy, J. M. and Klysik, J. (2007). "Raf kinase inhibitory protein knockout mice: expression in the brain and olfaction deficit." Brain Res Bull 71(6): 559-567.
- Thiyagarajan, M. M., Stracquatano, R. P., Pronin, A. N., Evanko, D. S., Benovic, J. L. and Wedegaertner, P. B. (2004). "A predicted amphipathic helix mediates plasma membrane localization of GRK5." J Biol Chem 279(17): 17989-17995.
- Tsao, P. and von Zastrow, M. (2000). "Downregulation of G protein-coupled receptors." Curr Opin Neurobiol 10(3): 365-369.
- Tsutamoto, T., Wada, A., Maeda, K., Hisanaga, T., Maeda, Y., Fukai, D., Ohnishi, M., Sugimoto, Y. and Kinoshita, M. (1997). "Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction." Circulation 96(2): 509-516.
- Ungerer, M., Bohm, M., Elce, J. S., Erdmann, E. and Lohse, M. J. (1993). "Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart." Circulation 87(2): 454-463.
- Ungerer, M., Kessebohm, K., Kronsbein, K., Lohse, M. J. and Richardt, G. (1996). "Activation of beta-adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia." Circ Res 79(3): 455-460.
- Ungerer, M., Parruti, G., Bohm, M., Puzicha, M., DeBlasi, A., Erdmann, E. and Lohse, M. J. (1994). "Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart." Circ Res 74(2): 206-213.
- Virlon, B., Firsov, D., Cheval, L., Reiter, E., Troispoux, C., Guillou, F. and Elalouf, J. M. (1998). "Rat G protein-coupled receptor kinase GRK4: identification, functional expression, and differential tissue distribution of two splice variants." Endocrinology 139(6): 2784-2795.

- Volkers, M., Weidenhammer, C., Herzog, N., Qiu, G., Spaich, K., von Wegner, F., Peppel, K., Muller, O. J., Schinkel, S., Rabinowitz, J. E., Hippe, H. J., Brinks, H., Katus, H. A., Koch, W. J., Eckhart, A. D., Friedrich, O. and Most, P. (2011). "The inotropic peptide betaARKct improves betaAR responsiveness in normal and failing cardiomyocytes through G(betagamma)-mediated L-type calcium current disinhibition." *Circ Res* 108(1): 27-39.
- Vroon, A., Kavelaars, A., Limmroth, V., Lombardi, M. S., Goebel, M. U., Van Dam, A. M., Caron, M. G., Schedlowski, M. and Heijnen, C. J. (2005). "G protein-coupled receptor kinase 2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* 174(7): 4400-4406.
- Wallukat, G. (2002). "The beta-adrenergic receptors." *Herz* 27(7): 683-690.
- Weiss, E. R., Raman, D., Shirakawa, S., Ducceschi, M. H., Bertram, P. T., Wong, F., Kraft, T. W. and Osawa, S. (1998). "The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas." *Mol Vis* 4: 27.
- Weller, M., Virmaux, N. and Mandel, P. (1975). "Light-stimulated phosphorylation of rhodopsin in the retina: the presence of a protein kinase that is specific for photobleached rhodopsin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(1): 381-385.
- WHO (2014). Global Health Estimates: Death by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012. Geneva, World Health Organization.
- Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E. and Lohse, M. J. (1996). "Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5): 2105-2109.
- Yeung, K., Janosch, P., McFerran, B., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M. and Kolch, W. (2000). "Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein." *Mol Cell Biol* 20(9): 3079-3085.
- Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K. D., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M. and Kolch, W. (1999). "Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP." *Nature* 401(6749): 173-177.
- Yeung, K. C., Rose, D. W., Dhillon, A. S., Yaros, D., Gustafsson, M., Chatterjee, D., McFerran, B., Wyche, J., Kolch, W. and Sedivy, J. M. (2001). "Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation." *Mol Cell Biol* 21(21): 7207-7217.
- Yoshimura, M., Yasue, H., Okumura, K., Ogawa, H., Jougasaki, M., Mukoyama, M., Nakao, K. and Imura, H. (1993). "Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure." *Circulation* 87(2): 464-469.
- Zeng, L., Imamoto, A. and Rosner, M. R. (2008). "Raf kinase inhibitory protein (RKIP): a physiological regulator and future therapeutic target." *Expert Opin Ther Targets* 12(10): 1275-1287.
- Zhao, S., Wu, H., Xia, W., Chen, X., Zhu, S., Zhang, S., Shao, Y., Ma, W., Yang, D. and Zhang, J. (2014). "Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts." *J Cardiol* 63(5): 373-378.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Martin J. Lohse** für die Möglichkeit an seinem Institut zu promovieren.

Frau **Prof. Dr. Kristina Lorenz** danke ich für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren sowie für die kompetente Betreuung meiner Dissertation. Unter Leitung von Frau Prof. Dr. Kristina Lorenz erlernte ich die Grundzüge wissenschaftlichen Arbeitens sowie histologische und molekularbiologische Methoden. Sie stand mir mit Fachwissen und anregenden kritischen Hinweisen zur Seite und ermöglichte mir die Teilnahme an der DPTG Jahrestagung in Dresden, um meine Ergebnisse vorzustellen.

Ich möchte mich bei der Arbeitsgruppe von Frau **Prof. Dr. Kristina Lorenz** bedanken für die Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere Frau **Martina Fischer** und Frau **Nadine Yurdagül-Hemrich** danke ich für die Einführung in verschiedene Methoden und Frau **Dr. Katharina Deiß** für ihre hilfsbereite, geduldige Art und kompetente Hilfe bei der Laborarbeit.

Bei Frau **Marianne Babl** bedanke ich mich für die Anfertigung meiner histologischen Schnitte.

Zudem bedanke ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund für ihre Unterstützung und ihre Geduld.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe. Übernommene Inhalte wurden von mir eindeutig gekennzeichnet.

Die Gelegenheit zum Promotionsverfahren wurde mir nicht kommerziell vermittelt. Insbesondere wurde keine Person oder Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Meine Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise schon einmal einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erzielen, vorgelegt.

Ich habe bis zum heutigen Tag keine akademischen Grade erworben, noch versucht solche zu erwerben.

Es wurde mir kein akademischer Grad entzogen, noch wurde gegen mich diesbezüglich ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet.

Datum

Unterschrift